

Universidade de Brasília – UnB
Instituto de Ciências Biológicas – IB
Departamento de Botânica
Pós-graduação em Botânica

Filipe Sathler Meira

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM MACAÚBA (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex
Mart.) A PARTIR DE TECIDOS FOLIARES DE PLANTAS ADULTAS

Brasília - DF
Março /2015

Filipe Sathler Meira

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM MACAÚBA (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.) A PARTIR DE TECIDOS FOLIARES DE PLANTAS ADULTAS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Botânica, da Universidade de Brasília, como exigência para obtenção do título de Mestre em Botânica.

Orientador: Dr. Jonny Everson Scherwinski-Pereira

Coorientadora: Dra. Zanderluce Gomes Luis

Brasília – DF

Março/2015

Filipe Sathler Meira

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM MACAÚBA (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.) A PARTIR DE TECIDOS FOLIARES DE PLANTAS ADULTAS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Botânica, da Universidade de Brasília, como exigência para obtenção do título de Mestre em Botânica.

Aprovada em 26 de Março de 2015

BANCA EXAMINADORA

Dr. Jonny Everson Scherwinski Pereira (Presidente)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Dra. Gabriela Ferreira Nogueira
Universidade de Brasília

Dr. João Batista Teixeira
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Dra. Conceição Eneida dos Santos Silveira
Universidade de Brasília

**Aos meus pais Normando e Cássia,
Dedico.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

A Deus pela realização desse trabalho, por ter colocado em minha vida as pessoas que tive oportunidade de conhecer e trabalhar e por todos os momentos durante esse período,

Aos meus pais, Normando e Cássia pelo apoio, incentivo e todo amor dedicado,

À Vanessa por todo amor e carinho.

À tia Marta e família pelo apoio durante o período do mestrado.

Ao meu orientador, Dr. Jonny, pela orientação, confiança depositada e paciência.

À Dra. Zan pela coorientação, dedicação e amizade.

À Dra. Gabi pelo apoio, amizade e por toda ajuda durante as avaliações,

Ao Dr. João pela confiança, apoio e conhecimentos transmitidos.

A todos os colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos II da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia por todo apoio e amizade.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Botânica da UnB, em especial a professora Eneida pela dedicação e amizade.

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação em Botânica.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pela oportunidade de estudos e utilização das instalações para a realização dos experimentos.

A Capes pela concessão da bolsa.

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

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS.....	I
LISTA DE ABREVIATURAS.....	II
RESUMO GERAL.....	III
ABSTRACT.....	IV
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	01
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	03
2.1 Aspectos botânicos.....	03
2.2 Importância da macaúba.....	05
2.3 Cultura de tecidos de plantas.....	06
2.3.1 Embriogênese somática.....	07
2.4 Estudos Anatômicos.....	10
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	12
CAPÍTULO 1: EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM MACAÚBA (<i>Acrocomia</i>	
<i>aculeata</i>) A PARTIR DE TECIDOS FOLIARES DE PLANTAS ADULTAS	22
RESUMO.....	22
ABSTRACT.....	23
1 INTRODUÇÃO.....	26
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
2.1 Material vegetal.....	27
2.2 Indução da embriogênese somática.....	27
2.1.1 Efeito das auxinas associados ou não ao 2iP na formação de calos.....	27
2.1.2 Efeito da região do palmito utilizada como fonte de explante associados as	
diferentes tempos de coleta na indução de calos.....	28
2.3 Multiplicação e diferenciação dos embriões somáticos.....	30
2.4 Germinação <i>in vitro</i> dos embriões somáticos.....	31
2.5 Caracterização morfológica e análise anatômica.....	32
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
3.1 Indução de calos.....	33
3.1.1 Efeito das auxinas associados ou não ao 2iP na formação de calos.....	33

3.1.2 Efeito da região do palmito utilizada como fonte de explante associados as diferentes tempos de coleta na indução de calos.....	35
3.2 Multiplicação dos calos.....	36
3.3 Diferenciação <i>in vitro</i> dos embriões somáticos.....	37
3.4 Caracterização morfológica.....	39
3.5 Análise histológica.....	44
4 CONCLUSÕES.....	47
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

CAPÍTULO 2 ONTOGENIA DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM MACAÚBA (<i>Acrocomia aculeata</i>) A PARTIR DE TECIDOS FOLIARES DE PLANTAS ADULTAS	56
RESUMO.....	56
ABSTRACT.....	57
1 INTRODUÇÃO.....	58
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	59
2.1 Material vegetal.....	59
2.2 Análise Histológica.....	60
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
3.1 Análise histológica.....	61
4 CONCLUSÕES.....	71
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

CAPÍTULO 1

Figura 1: Aspecto do material utilizado para o cultivo <i>in vitro</i> de macaúba (<i>Acrocomia aculeata</i>). A: Regiões a partir das quais foram excisados os explantes. B: Explantes depois de transferidos para meio de cultura.....	29
Figura 2 Esquema ilustrativo da indução de calos em macaúba (<i>Acrocomia aculeata</i>), os diferentes tempos de coletas dos calos (6, 9 e 12 meses) e a multiplicação de calos durante quatro meses.....	30
Figura 3 Aspecto morfológicos da indução de calos e obtenção de plantas de macaúba (<i>Acrocomia aculeata</i>) a partir da embriogênese somática de tecidos foliares.....	42
Figura 4 Eventos histológicos de macaúba (<i>Acrocomia aculeata</i>) durante a embriogênese somática.....	45
Tabela 1. Efeito das auxinas picloram e 2,4-D associados (+) ou não (-) com 2iP na indução de calos em folhas jovens de <i>Acrocomia aculeata</i> , aos seis, nove e doze meses após a inoculação.....	33
Tabela 2. Porcentagem média de calos formados de <i>Acrocomia aculeata</i> em diferentes regiões do palmito avaliados em diferentes tempos de coletas associados ao picloram.....	35
Tabela 3. Efeito de diferentes regiões do palmito, de períodos de coleta de calos e do tempo de multiplicação sobre incremento de massa fresca de calos em <i>Acrocomia aculeata</i>	37
Tabela 4 Efeito do período de cultivo, tipo de auxina associado ou não ao 2iP e região do palmito nas respostas e morfologia de calos e graus de oxidação em macaúba.....	40

CAPÍTULO 2

Figura 1 Secção transversal de segmentos foliares de macaúba (<i>Acrocomia aculeata</i>) apresentando eventos histológicos durante a indução da embriogênese somática.....	62
Figura 2 Secção transversal de segmentos foliares de macaúba (<i>Acrocomia aculeata</i>) apresentando eventos histológicos durante a embriogênese somática no período de indução de calos em picloram.....	64
Figura 3 Anatomia das linhagens de calo nodular branco e granular obtidos a partir de tecidos foliares de macaúba (<i>Acrocomia aculeata</i>) em picloram.....	66
Figura 4 Anatomia do embriões somáticos obtidos a partir de tecidos foliares de macaúba (<i>Acrocomia aculeata</i>)	67
Figura 5 Secção transversal de segmentos foliares de macaúba (<i>Acrocomia aculeata</i>) submetidos ao teste com lugol durante a indução da embriogênese somática.....	68
Figura 6 Análise anatômica das linhagens de calo alongado, nodular, granular e do embrião somático obtido a partir de tecidos foliares de macaúba (<i>Acrocomia aculeata</i>) submetidos a embriogênese somática e corados com lugol.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS

μM - Micromolar

2iP - 2-isopenteniladenina

2,4 D - Ácido 2,4-. Diclorofenoxiacético

ANA - Ácido naftalenacético

Atm - Atmosfera

et al. - Expressão latina que significa “e outros”

mg - Miligramas

ml - Mililitro

MS - Meio de cultura desenvolvido por Murashige & Skoog (1962)

TCL - *Thin Cell Layer*

Y3 - Meio de cultura desenvolvido por Euweens (1976)

RESUMO GERAL

Este trabalho teve como objetivo induzir a embriogênese somática em macaúba a partir de tecidos foliares de plantas adultas, além de elucidar morfoanatomicamente as diferentes etapas envolvidas no processo. Foram utilizadas folhas jovens e não expandidas (palmito) de *Acrocomia aculeata*, provenientes de plantas adultas. Os explantes foram inoculados em meio de indução de calos, formado pelos sais e vitaminas do meio Y3, adicionado das auxinas 2,4-D e picloram na concentração de 450 μM , além da presença ou ausência de 20 μM de 2iP. Durante a indução, foi avaliada a influência da região do palmito utilizada na formação de calos. Assim, uma vez coletado e desinfestado, os palmitos (30 cm de comprimento) foram subdividido em regiões basal, mediana e apical, todas de igual tamanho (10 cm direção ápice meristemático para o ápice foliar), de onde foram excisados explantes de 1,0 cm^2 que foram inoculados em meio de indução. As avaliações sobre a formação, assim como a coleta dos calos formados foram realizadas aos 6, 9 e 12 meses de cultivo. Após cada período de coleta, os calos foram multiplicados por até quatro subcultivos de 30 dias cada em meio de cultura Y3, com 450 μM de picloram, sendo avaliados quanto à taxa de multiplicação e incremento de massa fresca. Para a etapa de diferenciação dos calos embriogênicos em embriões somáticos, três ensaios foram realizados: o primeiro, em meio de cultura Y3 semissólido com de 2,4-D e picloram (0, 10, 20, 40, 80 e 120 μM). No segundo, utilizou-se meio de cultura Y3 líquido sob agitação com 2,4-D (0 ou 5 μM). Por fim, no terceiro avaliou-se a influência do tempo de permanência dos calos em meio líquido. Os embriões somáticos diferenciados foram germinados em meio de cultura Y3, desprovido de reguladores de crescimento. Em todas as etapas do processo embriogênico, a caracterização morfoanatômica das diferentes etapas envolvidas no processo foram realizadas. Verificou-se resultados significativamente superiores quanto à percentagem de formação de calos utilizando a auxina picloram com relação ao 2,4-D em todos as condições testadas. A adição de 2iP ao meio de indução não proporcionou melhoria na formação de calos. Independentemente da região do palmito, os melhores resultados para indução de calos foram observados aos 9 meses em cultivo, com 59,9% dos explantes formando calo. Quando somente a região do palmito foi avaliada, independentemente do tempo da coleta, a mais distal ao meristema foi a que proporcionou maior formação de calos (52,9%). De maneira geral, os tratamentos utilizados para a diferenciação de embriões somáticos dos calos embriogênicos não diferiram nas respostas obtidas, podendo ser considerado um processo lento e irregular, fato também observado

durante a etapa de germinação dos embriões somáticos. Durante a avaliação da ontogenia dos calos, foi observado o desenvolvimento de células hipertrofiadas no explante aos 30 dias de cultivo dos explantes foliares em meio de indução. Aos 60 dias de cultivo foram verificados os primeiros sinais visíveis de divisão celular ativa e presença de células indiferenciadas no mesofilo foliar, progredindo até a formação de calos na região do feixe vascular aos 90 dias de cultivo. Os calos primários apresentaram constituição celular meristemática, com células de tamanho reduzido e com razão núcleo:citoplasma elevada. Na fase de multiplicação, observou-se a formação de calos com aspecto nodular amarelo, nodular esbranquiçado ou granular. A linhagem de calos nodulares amarelos apresentou as características anatômicas semelhantes à dos nodulares esbranquiçados, sendo constituído predominantemente por células meristemáticas. Ainda nessa fase, observou-se a formação de embriões somáticos, visualizados em estágio globular. Durante as análises histoquímicas, observou-se que o acúmulo de amido concentrou-se próximo aos centros de intensa divisão celular. No entanto, não foi observada a presença de amido nas linhagens de calos e embriões somáticos.

Palavras-chave: *Acrocomia aculeata*; macaúba; tecidos somáticos, cultura de tecidos, embriogênese somática, calos, ontogênese.

ABSTRACT

This work aimed to induce somatic embryogenesis in macaw palm from leaf tissues of adult plants, besides elucidating morpho-anatomically the different stages involved in the process. Young and not expanded (heart of palm) leaves from adult plants of *Acrocomia aculeata* were used. The explants were cultured on callus induction medium, consisting of salts and vitamins of Y3 medium with 2,4-D and picloram at 450 μM , alone or in combination with 20 μM 2iP. During induction the influence of the heart of palm region used in the calluses formation was also evaluated. Thus, once collected and disinfected, the heart of palm (30 cm length) was divided in basal, middle and apical regions (explant position), all of equal size (10 cm toward apex meristem to the leaf apex), from where explants were excised in 1.0 cm^2 and inoculated on callus induction medium. In order to evaluate calluses formation, the isolation and collection of calluses were performed after 6, 9 and 12 months of culture. After each collection period, the calluses were multiplied on Y3 medium supplemented with 450 μM picloram for up to four subcultures of 30 days each. At the end of each period, the multiplication rate and the callus fresh weight were determined. For somatic embryos differentiation, embryogenic calluses were cultured under three condition: Y3 semisolid culture medium with 2,4-D and Picloram (0, 10, 20, 40, 80 and 120 μM); Y3 liquid culture medium with 2,4-D (0 or 5 μM) under agitation; and finally, Y3 liquid medium were the influence of the calluses cultivation time was evaluated. Somatic embryos were regenerated on an Y3 culture medium devoid of growth regulators. During all embryogenic process, the morpho-anatomical characterization of different stages involved in the process was carried out. It was verified significant differences in calluses induction when picloram was used as auxin. The addition of 2iP not provided effects on callus formation. Independently of explant position (basal, middle or apical), the best results for callus induction was observed when explants were maintained for 9 months on culture medium, where 59.9% of explants presented callus formation. When only the explant position was evaluated, the most distal region of the meristem (apical region) proportioned higher callus formation (52.9%). In general, the treatments used for somatic embryos differentiation do not presented differences, suggesting that it is a slow and irregular process, a fact also observed during somatic embryos germination. Detailed morpho-anatomical analysis revealed the development of hypertrophied cells after 30 days of explants culture on callus induction medium. At 60 days the first visible signs of active cell division and the presence of undifferentiated cells were observed in leaf

mesophyll, progressing to callus formation in the region of the vascular bundle at 90 days. The primary calluses showed meristematic cell constitution, characterized by small size and a high nucleoplasmic ratio. In the multiplication phase, it was observed the formation of calluses with aspect yellow nodular, whitish granular or nodular. In general, the lineages of yellow nodular calluses showed anatomical features similar to whitish nodular, consisting predominantly of meristematic cells. Still in this phase, it was observed the formation of somatic embryos in the globular stage. Histological analysis revealed starch accumulation near the centers of intense cell division, but not in the lineages of calluses and somatic embryos.

Keywords: *Acrocomia aculeata*, macaw palm, somatic tissues, tissue culture, somatic embryogenesis, calluses, ontogenesis.

1 Introdução geral

O interesse por plantas nativas na produção agrícola vem se acentuando nos últimos anos, com a perspectiva de desenvolvimento de novas variedades para cultivo (Machado *et al.*, 2010). Portanto, espécies que apresentam este potencial devem ser pesquisadas para uso racional.

Com o desenvolvimento do programa nacional Probiodiesel (Portaria nº 702 do MCT, de 30 de Outubro de 2002), a produção do biodiesel, a partir de fontes renováveis, exige uma crescente demanda em tecnologias, por meio de ações integradas entre instituições de ensino e pesquisa, empresas e associações direta ou indiretamente ligadas ao tema, sob a forma de grupos de trabalho que integram a chamada Rede Brasileira de Biodiesel (Ramos, 2003).

O Probiodiesel passou por diversas reformulações e, em 2003, foi criado então o Grupo de Trabalho Interministerial (GTI) para apresentar estudos de viabilidade da produção e utilização do biodiesel como fonte alternativa de energia no País. Com base nesses estudos, em dezembro de 2004 foi lançado o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB), que tem proporcionado êxitos na instalação de uma cadeia de produção do biodiesel no País, tornando o Brasil o segundo maior produtor de biodiesel mundial, com a vantagem de poder inserir a agricultura familiar no processo de produção (Silva, 2013).

O Brasil apresenta clima favorável para o cultivo de diversas espécies oleaginosas que apresentam potencial para a produção do biodiesel. Dentre elas, se destacam as espécies da família *Arecaceae*, como a macaúba (*Acrocomia aculeata*), dendê (*Elais guineensis*) e babaçu (*Attalea speciosa*), que apresentam elevadas produtividades de óleo por hectare e relativos baixos custos de manutenção e produção, pois são plantas perenes que não necessitam de grandes investimentos anuais (Melo, 2012). Em avaliações *in situ* efetuadas em populações de macaúba, têm sido encontrados indivíduos com produção de cinco a sete cachos de até 35 kg/planta (Cargnin *et al.*, 2008). Além disso, Lleras e Coradin (1985) relatam que a macaúba tem potencial para produzir cerca de cinco toneladas de óleo em uma densidade de plantio de 200 plantas ha⁻¹. Seu desempenho como oleaginosa é semelhante ao dendê, o que justifica seu nome popular "dendê mineiro" (Dias, 2011).

A macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart) se distribui desde a América Central até o Sul da América do Sul. No Brasil, ocorre principalmente nos Estados de Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. Seu principal habitat são áreas

de vegetação aberta com alta incidência solar, sendo reconhecida como espécie indicadora de solos férteis (Lorenzi *et al.*, 1996; Motta *et al.*, 2002). Devido à elevada produtividade de óleos e aproveitamento quase que total dos sub-produtos, além do sistema de cultivo ser considerado sustentável do ponto de vista ambiental, social e econômico, esta palmeira pode ser utilizada para diferentes fins: as folhas na nutrição animal, os frutos para produção de farinhas e óleos, a casca para biomassa e o endocarpo para carvão. Dos frutos de macaúba, pode-se extrair o óleo tanto da polpa quanto da amêndoa, representando, dessa forma, a principal fonte de renda relativa ao uso comercial da espécie (Moura 2007; Ciconini, 2012).

Atualmente, apesar de ser considerada como uma espécie de alto potencial de utilização, a exploração da macaúba é feita de forma extrativista, com baixa produtividade de frutos, tornando-a desfavorável para a produção do biodiesel devido à heterogeneidade do material (Motta, 2002). Além disso, a reprodução exclusivamente de forma sexuada, presença de dormência das sementes e lento crescimento das plantas, também são empecilhos para que a macaúba ganhe importância mais destacada na produção de biodiesel (Arkcoll, 1990). Dessa forma, é de grande importância para a exploração comercial da macaúba, a utilização de tecnologias que possam acelerar a obtenção e propagação de genótipos superiores a partir de populações naturais.

A embriogênese somática apresenta-se como uma técnica potencial para a propagação clonal de espécies como a macaúba, pois pode permitir, dentre outras aplicações, a clonagem de genótipos selecionados em curto tempo e espaço físico limitado, a partir de diferentes tipos de explantes (propágulos), tais como, embriões zigóticos, inflorescências e folhas imaturas (Zimmerman, 1993; Litz & Gray, 1995; Herculano & Câmara, 2010), além da técnica possibilitar a aceleração dos programas de melhoramento genético da espécie (Luis & Scherwinski-Pereira, 2014).

Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi induzir a embriogênese somática em macaúba a partir de tecidos foliares de plantas adultas, além de elucidar morfo-anatomicamente a ontogênese das diferentes etapas envolvidas no processo.

2 Revisão de literatura

2.1 Aspectos botânicos

A macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.) pertence à família Arecaceae, ordem Arecales, referente à divisão Magnoliophyta do reino Plantae. Possui ampla distribuição geográfica que se estende ao longo da América tropical e subtropical, desde o Sul do México e Antilhas até o Sul do Brasil, chegando ao Paraguai e Argentina, estando ausente no Peru e Equador. No Brasil, sua área de ocorrência estende-se desde os Estados de São Paulo e Rio de Janeiro, passando por Minas Gerais e por todo o Centro-Oeste, Nordeste e Norte do país (Henderson *et al.*, 1995; Lorenzi *et al.*, 2010; Amaral, 2011).

O gênero *Acrocomia* possui três espécies: *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Martius, *A. hassleri* (Barb. Rodr.) W.J.Hahn e *A. crispa* (Kunt) C.F.Baker ex Becc. Destas, *Acrocomia aculeata* e *Acrocomia hassleri* apresentam semelhanças que dificultam a identificação (Lorenzi, 2006; Henderson *et al.*, 1995). Segundo Henderson *et al.* (1995), a *A. aculeata* se distingue da *A. hassleri* por apresentar maior altura e diâmetro caulinar e encontra-se amplamente distribuída na América Tropical, enquanto que a *A. hassleri* possui indivíduos de menor altura, ocorrendo apenas na fronteira entre Mato Grosso do Sul e Paraguai.

A macaúba pode atingir alturas entre 10 e 15 metros. O tronco é do tipo estipe ereto, com diâmetro de 20 a 30 centímetros e coberto por bainhas foliares remanescentes. As bainhas foliares apresentam espinhos escuros e afiados em sua superfície, com cerca de 10 centímetros de comprimento, especialmente, os encontrados na região dos nós (Lorenzi, 2004; Lorenzi, 2006). As folhas são pinadas, com pinas solitárias ou em grupo, usualmente inseridas em diferentes planos na raque (Martins, 2012). Geralmente consiste de 20 e 30 folhas no topo, com comprimento aproximado de 2,5 a 3,0 metros, e apresentando espinhos na raque (Lorenzi, 2006).

O florescimento da macaúba ocorre praticamente o ano inteiro, com intensidade nos meses de outubro a janeiro. A inflorescência é em espádice, interfoliar, pendente e protegida por uma bráctea, e quando esta alcança a maturidade, abre-se liberando a inflorescência (Henderson *et al.*, 1995; Lorenzi, 2006). A inflorescência é amarelada, com a raque sustentando de um a várias tríades (uma flor pistilada e duas estaminadas). As flores femininas se tornam maduras antes das flores masculinas, o que caracteriza o processo de

protoginia. Nas inflorescências, ocorre sobreposição parcial de flores masculinas e femininas maduras que permite a autopolinização quando a polinização cruzada não é possível (Scariot *et al.*, 1991). A polinização cruzada é feita especialmente por coleópteros das famílias Curculionidae, Nitidulidae e Scarabaedae (Scariot *et al.*, 1991; Henderson *et al.*, 1995).

O fruto da macaúba é do tipo drupa globosa, com diâmetro variando entre 2,5 e 5,0 cm e coloração marrom-amarelada, quando maduro. O epicarpo é liso e rompe-se facilmente quando maduro. O mesocarpo, correspondente a polpa, é fibroso, mucilaginoso, de coloração amarelo ou esbranquiçado, comestível e rico em glicerídeos. O endocarpo apresenta-se lignificado, com coloração escura, fortemente aderido ao mesocarpo e pode conter de uma a três sementes. A semente (amêndoa) é constituída, em maior parte, por endosperma comestível, com alto teor de óleos e proteínas, tendo o embrião zigótico aderido ao endosperma em formato de chave (Henderson *et al.*, 1995; Gray, 2005; Moura, 2007).

A dispersão das sementes de macaúba é feita geralmente por animais que se alimentam de seus frutos. Esses animais são principalmente mamíferos silvestres, embora animais domésticos também auxiliem na dispersão (Scariot, 1998, Martins 2012).

De maneira geral, a propagação comercial das palmeiras é feita sexuadamente, via sementes, e/ou assexuadamente, por divisão de touceiras, como observado em algumas espécies como a pupunheira (*Bactris gasipaes* Khunt.) e o açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) (Lorenzi *et al.*, 2004).

Em macaúba, a propagação é exclusivamente sexuada, pois a espécie não gera touceiras. Por outro lado, a propagação por semente é difícil e laboriosa, sendo a germinabilidade das sementes baixa, lenta e desuniforme. A baixa taxa de germinação das sementes é causada pela dormência física, imposta pela dureza e impermeabilidade do endocarpo à água (Lorenzi, 2006; Ribeiro 2011).

A macaúba é uma planta incipientemente domesticada e ainda possui sua exploração comercial dependente do desenvolvimento de tecnologias que incluam a seleção de genótipos. Genótipos superiores podem ser selecionados de populações naturais de plantas, porém, apresentam dificuldades de serem propagados vegetativamente por meio de técnicas convencionais, fato que dificulta que ganhos genéticos em ciclos de seleção sejam obtidos, ou então, que genótipos superiores possam ser multiplicados para plantios comerciais (Clement, 1999; Lorenzi, 2006).

2.2 Importância da macaúba

A macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.), também denominada de palmeira bocaiúva, é uma espécie nativa do Brasil, considerada como a palmeira de maior dispersão no país, sendo encontrada principalmente na floresta latifoliada semidecídua.

As folhas, frutos e sementes da macaúba são tradicionalmente utilizadas para diversos fins econômicos. Dentre estes, destaca-se o uso da madeira para produção de mourões e estacas, do estipe para obtenção do palmito, das folhas para forragem animal, cobertura de casas e extração de fibras usadas na fabricação de linha de pesca e redes, dos frutos como alimento *in natura*, obtenção da polpa com a qual são preparados licores e doces, além da extração do óleo que é utilizado na culinária e como combustível, da semente como substituto da brita no concreto e confecção de botões, além da amêndoa como alimento e, também, extração do óleo. (Lorenzi e Negrelle, 2006; Lorenzi 2006).

Apesar dos diversos usos, são os frutos da macaúba que representam a principal fonte de renda relativa ao uso comercial da espécie. Atualmente, o aproveitamento do óleo extraído dos frutos da macaúba vem sendo bastante visado, já que este óleo pode ser aproveitado na produção de biodiesel. O óleo de macaúba pode ser extraído da polpa e da amêndoa, e existem diferenças quanto à composição e as utilidades dos dois tipos de óleo (Ciconini, 2012). A diferença entre a composição dos óleos da amêndoa e da polpa da macaúba consiste no fato de que a polpa é mais rica em óleos de cadeia longa, predominando o ácido oléico. A concentração de óleo na polpa pode atingir valores superiores a 70%, o que confere a espécie o título de “*high oleic*”, que são produtos de alto valor e de grande demanda por parte das indústrias alimentícia e, sobretudo, energética, em função da maior estabilidade à oxidação e operabilidade a baixas temperaturas (biodiesel). Por outro lado, a amêndoa é rica em ácido láurico, justificando seu uso como fonte importante para a indústria de cosméticos (Amaral, 2011; Ciconin, 2012; Matsimbe, 2012).

A macaúba tem a segunda maior produtividade em óleo entre as plantas oleaginosas (com potencial de produtividade entre 1500 e 5000 kg de óleo por hectare) e, portanto, com alto potencial para a produção de biodiesel, especialmente em regiões tropicais secas, já que além de sua grande produtividade, ela se mantém produtiva, teoricamente, por mais de 100 anos (Lorenzi, 2000; Teixeira, 2005).

2.3 Cultura de tecidos de plantas

A cultura de tecidos de plantas é uma das ferramentas da biotecnologia que envolve diferentes técnicas de cultivo *in vitro* de plantas, fundamentada na totipotencialidade celular, na qual, a partir de um explante (célula ou qualquer fragmento de tecido ou órgão vivo), cultivado de forma asséptica, em um meio nutritivo, sob condições controladas de temperatura e luminosidade, obtêm-se uma nova planta (Torres *et al.*, 2000; Souza *et al.*, 2006)

As técnicas da cultura de tecidos de plantas têm sido empregadas de diferentes formas, tais como na propagação clonal de mudas em larga escala (micropropagação), produção de plantas transgênicas (melhoramento), conservação de recursos genéticos de plantas (conservação *in vitro*), além da regeneração de plantas livres de vírus e patógenos (limpeza clonal) (Torres *et al.*, 1998; Cid e Teixeira, 2010). Entre as técnicas citadas, a micropropagação parece ser a de maior utilidade prática, por oferecer a oportunidade de se produzir, em um curto espaço de tempo e espaço físico limitado, uma grande quantidade de propágulos e mudas livres de doenças, geralmente de genótipos superiores (Lakshmanan, 2006).

As palmeiras são plantas que apresentam dificuldades de serem multiplicadas vegetativamente. Dessa forma, a produção de mudas destas espécies tem a propagação *in vitro* como uma ferramenta de grande importância (Ledo *et al.*, 2001; Hartmann *et al.*, 2002; Rubio *et al.*, 2011; Ribeiro *et al.*, 2011). Os primeiros estudos *in vitro* com palmeiras, utilizando-se de *Cocos nucifera*, foram realizados há mais de cinco décadas (Cutter e Wilson, 1954),

A utilização de embriões zigóticos na cultura de tecidos têm proporcionado bons resultados na propagação de palmeiras, sendo importante por aumentar as taxas de germinação, uniformidade das plantas e conversão de plântulas viáveis (Soares *et al.*, 2011). Trabalhos com palmeiras utilizando-se dessa técnica têm mostrado resultados satisfatórios (Melo *et al.*, 2001; Spera *et al.*, 2001; Pereira *et al.*, 2006; Steinmacher *et al.*, 2007; Ledo *et al.*, 2007; Soares *et al.*, 2011). Entretanto, a utilização de embriões zigóticos não gera plantas com o mesmo genótipo da planta matriz, sendo necessário o emprego de tecidos somáticos para a propagação clonal de indivíduos que apresentem alguma característica agrônômica desejável.

2.3.1 Embriogênese somática

Dentre as técnicas de cultura de tecidos de plantas, a embriogênese somática tem se mostrado de grande importância para a propagação clonal, por permitir a produção de grande número de plantas, a partir da germinação de embriões somáticos *in vitro* (Litz & Gray, 1995; Herculano, 2010). A embriogênese somática é uma via morfogênica para regeneração *in vitro* de plantas, sendo definida como o processo pelo qual células ou tecidos somáticos, sob condições experimentais favoráveis, são induzidas a formar embriões somáticos bipolares, semelhantes aos embriões zigóticos, mas que não são produto da fusão de gametas (Guerra e Nodari, 2006; Namasivayam, 2007).

A embriogênese somática é diferenciada em duas rotas de desenvolvimento: direta ou indireta. Na embriogênese somática direta, os embriões se desenvolvem diretamente do tecido do explante. Alternativamente, na embriogênese somática indireta ocorre um passo intermediário à formação dos embriões que é a de formação de calos (Williams e Maheswaran, 1986; Guerra *et al.*, 1999).

Durante a embriogênese somática, tanto na rota direta quanto na indireta, o embrião somático se desenvolve seguindo as mesmas sequências do desenvolvimento do zigótico, ou seja, a passagem pelos estágios globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar. As células embriogênicas que dão origem aos embriões apresentam características comuns ao comportamento de células embrionárias em divisão ativa: tamanho reduzido, conteúdo citoplasmático denso, núcleos grandes com nucléolos proeminentes, vacúolos pequenos e presença de grãos de amido (Guerra *et al.*, 1999).

O processo de embriogênese somática indireta é dividido em várias etapas, sendo elas: iniciação do cultivo *in vitro* de tecido primário (explante) em meio geralmente contendo reguladores de crescimento para a indução de calos, principalmente uma auxina; proliferação ou multiplicação de cultivos embriogênicos, igualmente suplementado com reguladores de crescimento; pré-amadurecimento dos embriões somáticos, realizada em meio sem reguladores; amadurecimento dos embriões somáticos e desenvolvimento de plântulas (Von Arnold *et al.*, 2002).

Durante a fase inicial do cultivo *in vitro* e indução da embriogênese somática os explantes são expostos a um estímulo físico, químico ou biológico onde são desencadeados processos morfogênicos que permitem a formação de calos. Esta etapa é uma das mais críticas para o estabelecimento das culturas embriogênicas *in vitro* (Guerra & Nodari, 2006). Diversos

fatores influenciam na indução da embriogênese somática, como por exemplo, a fonte de explantes utilizados (tecidos embrionários ou juvenis) e, geralmente, as altas concentrações das auxinas a que são submetidos (Guerra *et al.*, 1999; Viñas e Jiménez, 2011).

Já a multiplicação de culturas embriogênicas consiste geralmente da redução nos níveis dos reguladores de crescimento do meio de cultura. Essa redução permite ciclos repetitivos de divisão celular e o controle dos processos de diferenciação, promovendo a proliferação das massas de calos formadas anteriormente (Guerra *et al.*, 1999;).

A etapa de desenvolvimento ou diferenciação de embriões somáticos consiste no cultivo de massas pró-embriogênicas, em meios de cultura específicos, culminando com o aparecimento de estruturas embriogênicas em estágios característicos de desenvolvimento, como globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar. Uma vez diferenciados, os embriões somáticos passam então por um processo de amadurecimento, onde são estimulados a acumular reservas para a próxima etapa de desenvolvimento, que é a conversão destes em plantas completas, já na fase de germinação (Viñas e Jiménez, 2011).

Durante o processo de embriogênese somática, a cultura em suspensão tem se mostrado uma técnica de grande importância para o desenvolvimento do material *in vitro*, por se tratar de uma ferramenta útil para a micropropagação. O cultivo em suspensão consiste na multiplicação e manutenção de células e/ou agregados, em forma de suspensão em meio líquido. Esta técnica permite a obtenção de grandes quantidades de mudas com baixo custo de produção (Touchet *et al.*, 1991; Sané *et al.*, 2006; Palanyandy *et al.*, 2013). Ele tem sido aplicado com sucesso em muitas espécies, tais como o *Triticum aestivum* (Vasil *et al.*, 1990), *Musa AAA cv Grand naine* (Côte *et al.*, 1996), *Coffea arabica* (Etienne e Bertrand 2001), *Phoenix dactylifera* (Fki *et al.*, 2003) e *Elaeis guineensis* (Touchet *et al.*, 1991; Kramut e Techato 2010). Além disso, suspensões embriogênicas também têm sido consideradas como um material promissor no melhoramento genético e conservação de recursos genéticos (Rival *et al.*, 2013).

Na maioria dos sistemas de cultura de tecidos, o padrão de desenvolvimento *in vitro* é determinado principalmente pela utilização de reguladores de crescimento (Kerbaui, 1999). O uso de auxinas e a indução de calos são pré-requisitos fundamentais para a obtenção de célula com competência embriogênicas (Viñas e Jiménez, 2011). Dentre as auxinas utilizadas para a indução da embriogênese somática, destacam-se o 2,4 – D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e o picloram, geralmente com o uso de altas concentrações (Guerra *et*

al. 1999). A influência tanto do 2,4-D, quanto do picloram, na indução da embriogênese somática é descrita por vários autores (Dudits *et al.*, 1995; Titon, *et al.*, 2007).

A propagação *in vitro* a partir da embriogênese somática tem se mostrado útil para aquelas espécies que apresentam dificuldades de se propagar pela via assexuada, devido às vantagens da alta taxa de multiplicação comparada a qualquer outro processo de propagação, permitindo estabelecer o período desejado para as obtenções de material propagativo e obter planta geneticamente igual à planta-mãe (Zimmerman, 1993).

Nesse sentido, a embriogênese somática tem sido foco de estudo por vários pesquisadores. Protocolos de embriogênese somática já foram descritos para algumas espécies de palmeiras, como a *Phoenix dactylifera* (Sharma *et al.*, 1984; Fki *et al.*, 2003; Sané, 2006; Othmani *et al.*, 2009), o *Elaeis guineensis* (Ahée *et al.*, 1981; Teixeira *et al.*, 1993; Scherwinski-Pereira *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2012; Balzon *et al.*, 2013), *Acrocomia aculeata* (Moura *et al.*, 2009), *Euterpe oleracea* (Scherwinski-Pereira *et al.*, 2012) e *Bactris gasipaes* (Steinmacher *et al.*, 2007; Heringer *et al.*, 2014).

É de grande importância para a exploração comercial da macaúba a utilização de tecnologias que possam propagar clones elite, pois como o programa de melhoramento genético para a espécie é lento, até que se obtenham materiais superiores, a seleção de genótipos poderia ser realizada a partir de populações naturais. E, por ser uma espécie com dificuldades de ser propagada vegetativamente por técnicas convencionais, a embriogênese somática se apresenta como ferramenta de grande importância na produção de mudas uniformes e em larga escala.

Dessa forma, experimentos visando a embriogênese somática em macaúba se iniciaram com os trabalhos de Teixeira *et al.* (1986), Moura *et al.* (2009) e mais recentemente, Luis e Scherwinski-Pereira (2014), utilizando embriões zigóticos como fonte de explante. Estes autores obtiveram os primeiros resultados quanto à embriogênese somática da macaúba, embora estes resultados demonstrem certas dificuldades nas fases de maturação e desenvolvimento dos embriões somáticos.

Assim, a embriogênese somática em macaúba, apesar de sua importância, ainda tem sido incipiente quanto aos resultados práticos e, principalmente, quando se pensa em regenerar plantas a partir de tecidos somáticos, muito embora já se conheçam algumas de suas repostas *in vitro*. Luis (2013) apresentou os primeiros resultados quanto à embriogênese somática a partir de tecido foliar de plantas adultas, sugerindo fatores envolvidos na indução de calos, embora não tenha obtido sucessos na obtenção embriões somáticos regenerados. Da

mesma forma, Luis (2013) e Padilha (2013), trabalhando com TCL (“*Thin Cell Layer*”) de mudas de macaúba, obtiveram embriões somáticos, muito embora ainda apresentando deficiências nas fases de maturação e o desenvolvimento de tais embriões somáticos.

Durante seus experimentos, Luis (2013) observou resultados significativos quanto a utilização da auxina picloram, demonstrando que a utilização do regulador na concentração de 450 μ M associado ao meio Y3 teve melhor efeito na formação de calos em explantes foliares de plantas adultas.

2.4 Estudos anatômicos

A análise anatômica envolve o emprego de variadas técnicas que permitem detalhar os eventos que ocorrem quando espécies vegetais são cultivadas *in vitro*. Desta forma, é possível, por exemplo, conhecer e acompanhar o desenvolvimento do material vegetal durante a indução da embriogênese somática. Além disso, a capacidade de uma célula ou grupo de células de tornar-se embriogênicas também depende do seu estado fisiológico e de diferenciação. Nesse sentido, alterações histológicas associadas com a posição e a atividade das células competentes têm sido bastante estudadas durante a embriogênese somática (Rodrigues *et al.*, 2004; Gueye *et al.*, 2009).

O estudo do desenvolvimento de células ou grupos de células por técnicas histológicas tem se mostrado útil para o entendimento da embriogênese em várias espécies vegetais. Em palmeiras, há relatos para diversas espécies, como *Cocus nucifera* (Chan *et al.*, 1998), *Euterpe edulis* (Guerra & Handro, 1998), *Phoenix dactylifera* (Sané *et al.*, 2006; Queye *et al.* 2009), *Bactris gasipaes* (Steinmacher *et al.*, 2007) e *Elaeis guineensis* (Schwendiman *et al.* 1988; Silva *et al.*, 2012).

Estudos histológicos realizados por Guerra & Handro (1998), durante o cultivo *in vitro* de culturas embriogênicas oriundas de embriões zigóticos de *Euterpe edulis*, observaram evidências da origem das massas meristemáticas a partir de tecidos da subepiderme. Além disso, esses autores descreveram os diferentes estágios de maturação dos proembriões e os embriões obtidos durante o processo.

Sané *et al.* (2006) e Queye *et al.* (2009) descrevem, em seus experimentos com *Phoenix dactylifera*, que o início da embriogênese somática está relacionada as divisões celulares que ocorrem na área do parênquima perivascular (próxima a região do feixe vascular) em explantes foliares, nas primeiras semanas de cultivo *in vitro*. Além disso, Sané *et*

al. (2006) observou o surgimento de calos do tipo nodular, com características embriogênicas, surgindo do calo primário na região perivascular.

O estudo anatômico relacionado com a embriogênese somática em macaúba vem sendo relatados por diversos pesquisadores (Bandeira, 2008; Moura *et al.*, 2009; Luis, 2013; Padilha 2013). No entanto, os estudos ainda são incipientes quando se trata da ontogênese da formação dos calos e embriões somáticos originados a partir das folhas de plantas adultas.

Bandeira (2008) observou em macaúba, por meio da análise anatômica de embriões zigóticos durante a indução da embriogênese somática, evidências de que proembriões somáticos surgiram a partir de regiões meristemáticas formadas de estruturas nodulares. Moura *et al.* (2009) constataram que a embriogênese somática obtida, em meio de indução, a partir de embriões zigóticos, originava-se de células do procâmbio ou de células perivasculares, que proliferavam produzindo massas meristemáticas.

Padilha (2013), utilizando-se da indução da embriogênese somática em macaúba por meio da técnica do TCL em folhas de plântulas produzidas *in vitro*, observou que os calos se originam do parênquima perivascular e os embriões somáticos de células da periferia do calo. Já Luis (2013), trabalhando com folhas imaturas de plantas adultas (região do palmito), observou que o início da formação de calos ocorreu por meio de divisões celulares das células dos feixes vasculares das folhas, possivelmente, de células procambiais, além das características relacionadas à estrutura dos diferentes tipos de calos formados.

3 Referências bibliográficas

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. La multiplication vegetative *in vitro* du palmier à huile par embriogenèse somatique. **Oléagineux**, 36(3): 113-117. 1981.

Amaral, F. P., Broetto, F., Batistella, C. B., Jorge, S. M. A. Extração e caracterização qualitativa do óleo da polpa e amêndoas de frutos de macaúba [*Acrocomia aculeata* (jacq) lodd. Ex mart] coletada na região de Botucatu, SP Botucatu. **Revista Energia na Agricultura** 26, (1), p.12-20, 2011.

Appezato-Da-Glória, B., Carmello-Guerreiro S. M. **Anatomia Vegetal**. Viçosa: Editora UFV. p.438, 2003.

Arkcoll, D. New crops from Brazil, In: Janick J., Simon E. J. **Advances in new crops** p. 367-371 Timber press, Portland, OR, 1990.

Balzon, T. A., Luis, Z. G., Scherwinski-Pereira, J. E. 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**, p. 41-50, 2013.

Bandeira, F. S. Cultivo in vitro e embriogênese somática de embriões zigóticos de macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Loddiges.). 92p. **Tese**. (Doutorado em Ciências Florestais). Universidade Federal de Viçosa, 2008.

Cargnin A., Junqueira N. T. V., Fogaça C. M. Potencial de macaubeira como fonte de matéria-prima para produção de biodiesel. Planaltina, DF : **Embrapa Cerrados**, 16 p. 2008.

Ciconini, G. Caracterização de frutos e óleo de polpa de macaúba dos biomas Cerrado e Pantanal do estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Dissertação**. Campo Grande, Fev. 2012.

Cid, P. B. L., Teixeira J. B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: Cid, P. B. L. (Eds.). **Cultivo *in vitro* de plantas. Embrapa-SPI/CNPH**, Brasília, 16-49, 2010.

Clement, C. R. 1492 and the loss of Amazonian crop genetic resources: I. The relation between domestication and human population decline. **Economic Botany**, 53,188-202, 1999.

Côte, F. X., Domergue R., Monmarson S. Embryogenic cell suspensions from the male flower of *Musa* AAA cv Grand nain. **Physiol Plant** 97:285–290 1996

Cutter, V. M. J. R., Wilson K. S. Effect of coconut endosperm and other growth stimulants upon the development in vitro of embryos of *Cocos nucifera*. **Botanical Gazette**, 115(3): 234-240. 1954

Dias, L. A. D. S. Biofuel plant species and the contribution of genetic improvement. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 11(SPE), 16-26, 2011.

Etienne, H., Bertrand, B. Trueness-to-type and agronomic characteristics of *Coffea arabica* trees micropropagated by the embryogenic cell suspension technique. **Tree Physiol.** 21:1031–1038 2001

Fki, L., Masmoudi, R., Drira, N. Rival. A. An optimised protocol for plant regeneration from embryogenic suspension cultures of date palm, *Phoenix dactylifera* L., cv. Deglet Nour. **Plant Cell Reports**, 21, 517-524, 2003.

Guerra, M. P. & Nodari, R. O. Apostila de Biotecnologia—CCA/UFSC—, Edição da Steinmacher p. 19. 2006.

Guerra, M. P., Torres, A. C., Teixeira, J. B. Embriogênese Somática e Sementes Sintéticas. In: Torres A.C., Caldas L.S., Buso, J.A. (eds.). **Culturas de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília, Embrapa-CBAB. (2) 533-568 1999.

Gueye, B., Morcillo, F., Collin, M., Gargani, D., Overvoorde, P., Aberlenc- Bertossi F., Tranbarger Sane D., Tregear Jw., Borgel A., Verdeil F. 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. 2009.

Gray, M. Palm and Cycad Societies of Australia. Disponível em:

<<http://www.pacsoa.org.au/palms/Acrocomia/aculeata.html>> Acesso em: 18 de mar. 2013.

Hartmann, H.T., Kester D. E., Davies F. T. Jr, Geneve R. L. **Plant propagation, principles and practices**. Prentice Hall, New Jersey. 2002.

Heringer, A. S., Steinmacher, D. A., Fraga, H. P., Vieira, L. N., Montagna, T., Quinga, L. A., Guerra M. P. Improved high-efficiency protocol for somatic embryogenesis in Peach Palm (*Bactris gasipaes* Kunth) using RITA[®] temporary immersion system. **Scientia Horticulturae**, 179, 284-292. 2014.

Lakshmanan, P. Somatic embryogenesis in sugarcane – an addendum to the invited review ‘sugarcane Biotechnology: the challenges and opportunities,’ *in vitro* cell. Dev. Biol. Plant. **Society for In vitro Biology** Maio 2006.

Ledo, A. S., Lameira, O. A., Benbadis, A. K., Menezes I. C., Ledo C. A. S., Oliveira M. S. P. Cultura *in vitro* de embriões zigóticos de açazeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura.**, Jaboticabal - SP, 23, (3), 468-472, 2001.

Ledo, A. da S. *et al.*. Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos e aclimação de plântulas de coqueiro-anão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, 42, (2), p.147-154, 2007.

Litz, R.E. e Gray, D.J. Somatic embryogenesis for agricultural improvement. **World Journal of Microbiology & Biotechnology** (11) 416-425, 1995.

Lleras, E. e Coradin, L. Palmeras nativas como oleaginosas: situación actual y perspectivas para América Latina. In Forero LE (ed.) Informe del seminário taller sobre oleaginosas

promisorias. **Asociación Interciencia/Asociación Colombiana para el Avance de la Ciencia**, Bogotá, 92-143. 1985.

Lorenzi, H., Souza, H. M., Medeiros-Costa, J. T., Cerqueira, L. S. C., Behr, N. **Palmeiras do Brasil: exóticas e nativas** Nova Odessa: Editora Plantarum, 1-20, 1996.

Lorenzi, H. **Árvores Brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**, Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 1 (3) 272. 2000.

Lorenzi, H. Souza, H. Costa, J. T. M, Cerqueira, LSC, Ferreira E. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 352. 2004.

Lorenzi, G. M. A. *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd ex Mart – **Arecaceae: bases para o extrativismo sustentável**. Tese (Doutorado em Produção Vegetal), Curitiba, UFPR, 156 p. 2006.

Luis, Z. G. **Estratégias para a embriogênese somática e conservação *ex situ* de germoplasma de macaúba [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.]**. Tese (doutorado) - Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica, 2013.

Luis, Z. G., & Scherwinski-Pereira, J. E. An improved protocol for somatic embryogenesis and plant regeneration in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from mature zygotic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, 1-12. 2014.

Lorenzi, G. M. A. C., Negrelle, R. R. B. *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex mart.: aspectos ecológicos, usos e potencialidades. **UFPR, SER (Sistema Eletrônico de Revistas)**, v. 7, n. 1, 2006 Disponível em: <http://www.entabanbrasil.com.br/downloads/Macauba_Aspectos-Ecologicos_Revisao_UFPR.pdf> Acessado em 20 de março, 2013.

Henderson, A. Galeano, G., Bernal, R. **Field Guide to the Palms of the Americas**. New Jersey: Princeton University. 166-167, 1995.

Herculano, L., Camara, T. R. Embriogênese somática em variedades de cana-de-açúcar. **X Jornada De Ensino, Pesquisa E Extensão – Jepex 2010** – UFRPE: Recife, 18 a 22 de outubro de 2010.

Martins, R. C. A família Areceaceae (Palmae) no estado de Goiás: florística e etnobotânica. Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 297p. 2012.

Martins C. C., Nakagawa, J. Bovi, M. L. A. Tolerância à dessecação de sementes de palmito-vermelho (*Euterpe espirosantensis* Fernandes). **Revista brasileira Botanica**. São Paulo, 22, (3) 391-396, dez. 1999.

Machado, C. A. C. *et al.* Modelo de viabilização da produção do consórcio: macaúba (*Acrocomia aculeata*) e cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*). In: **Anais do XXX Encontro Nacional de Engenharia de Produção**. São Carlos, SP, Brasil, 12 a 15 de outubro de 2010.

Matsimbe, S. F. S. **Utilização de características ópticas para estimar o Teor de óleo e volume do mesocarpo nos frutos de Macaúba**. Dissertação. Viçosa, Minas Gerais. 72 2012.

Melo, P. G. Produção e caracterização de biodieséis obtidos a partir de oleaginosa macaúba (*Acrocomia aculeata*). **Dissertação**. Uberlândia 2012.

Melo B., Pinto, J. E. B. P., Luz, J. M. Q., Peixoto J. R. & Juliatti F. C. Diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e desenvolvimento das plântulas na cultura *in vitro* de embriões da guarirrobeira (*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc). **Ciência e Agrotecnologia**, 25, 1301- 1306, 2001.

Motta, P.E., Curi, N., Oliveira-Filho, A.T., Gomes, J.B.V. Ocorrência da macaúba em Minas Gerais: relação com atributos climáticos, pedológicos e vegetacionais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 37: 1023-1031, 2002.

Moura, E. F. Embriogênese somática em macaúba: indução, regeneração e caracterização anatômica. **Dissertação** – Viçosa: UFV, 2007.

Moura, E. F. Ventrella, M. C., Motoike, S. Y. Anatomy, histochemistry and ultrastructure of seed and somatic embryo of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). **Scientia Agricola** (Piracicaba, Braz.) 67 (4) Piracicaba. 2010.

Namasivayam, P. Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. **Plant Cell Tissue Organic Culture** 90:1–8 2007.

Othmani A. Bayoudh C. Drira N. Marrakchi M. Trifi M. 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 2009.

Palanyandy, S. R., Suranthran, P., Gantait, S., Sinniah, U. R., Subramaniam, S. , Aziz M. A. , Sarifa S. R. S. A., Roowi S. H. In vitro developmental study of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) polyembryoids from cell suspension using scanning electron microscopy. **Acta Physiol Plant** 35:1727–1733 2013

Padilha, J. H. D. Embriogênese somática em *Acrocomia aculeata* (jacq.) Lodd. Ex mart. Utilizando a técnica do TCL (“Thin Cell Layer”). **Dissertação**. Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal do Paraná. 2013.

Pereira, J. E. S. *et al.*. Germinação de embriões zigóticos de murmuru (*Astrocaryum ulei*). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, 30, (2): 251-256, 2006

Gueye, B., Morcillo F., Collin M., Gargani D., Overvoorde P., Aberlenc Bertossi F., Tranbarger T.J., Sane D, Tregear, J.W., Borgel, A., Verdeil J. 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. 2009

Gueye, B, Said-Ahmed, H, Morcillo, F., Borgel, A, D. Sané, D, Hilbert, JL, Verdeil, J.L., Blervacq A.S. 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. 2009

Ramos, P. L. *et al.* Biodiesel: Um projeto de sustentabilidade econômica e socioambiental para o Brasil. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. Edição 31. 2003.

Ribeiro, L.M., Oliveira, T.G.S., Carvalho, V.S., Silva, P.O., Neves, S.C. and Garcia, Q.S. The behaviour of macaw palm (*Acrocomia aculeata*) seeds during storage, **Seed Science and Technology**, 2012

Ribeiro, L. M., Souza P. P., Rodrigues Jr. A. G., Oliveira T. G. S., Garcia Q. S. Overcoming dormancy in macaw palm diaspores, a tropical species with potential for use as bio-fuel. **Seed Science and Technology**., 39: 303-317. 2011.

Rival, A., Ilbert, P., Labeyrie, A., Torres, E., Doubeau, S., Personne, A., & Jaligot, E. Variations in genomic DNA methylation during the long-term in vitro proliferation of oil palm embryogenic suspension cultures. **Plant cell reports**, 32(3), 359-368. 2013

Rodrigues, L. R., de Oliveira, J. M. S., & de Araujo Mariath, J. E. Anatomia vegetal aplicada ao estudo de sistemas androgênicos *in vitro*. **Revista Brasileira de Biociências**, 2(3):159. 2004

Rubio, N. A., Silva, F. G., Sales, J. F., Reis, E. F., Silva, M. V. V. Souza, A. L. Dormancy breaking in macaw palm [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Loddiges e Mart.] seeds. **Acta Scientiarum Agronomy**. 2011.

Sané, D. Histocytological analysis of callogenesis and somatic embryogenesis from cell suspensions of date palm (*Phoenix dactylifera*). **Annals of Botany** 98: 301-308. 2006

Sané, D. Aberlenc-Bertossi, F, Diatta, Lid, Guèye, B, Daher, A, Sagna, M, Duval, Y, Borgel, A. Influence of growth regulators on callogenesis and somatic embryo development in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) Sahelian cultivars. **The Scientific World Journal**, 1-8. 2012

Schwendiman, J., Pannetier, C., Michaux-Ferriere, N. Histology of somatic embryogenesis from leaf explants of the oil palm *Elaeis guineensis*. **Annals of Botany**, 62: 43-52, 1988.

Scariot, A. Seed dispersal and predation of the palm *Acrocomia aculeata*. **Principes** v.42:p. 5-8, 1998.

Scherwinski-Pereira, J. E., Guedes, R. S. Fermino, P. C. P., Silva, T. L., Costa, F. H. S. Somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm using the thin cell layer technique. **In vitro Cellular & Developmental Biology** – Plant 46: 378-385. 2010

Scherwinski-Pereira, J. E. , Guedes, R. S. , Silva, R. A. , Fermino, J.R., P. C. P. , Luis, Z. G. , Freitas, E.O. . Somatic embryogenesis and plant regeneration in açai palm (*Euterpe oleracea*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 109: 501-508, 2012.

Sharma, D. R., Dawra S., Choudhury J. B. Somatic embryogenesis and plant regeneration in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Khadravi through tissue culture. **Indian Journal Experimental of Biology**, 22: 596-598. 1984.

Silva, R. C. Luis, Z. G. Scherwinski-Pereira, J. E. Differential responses to somatic embryogenesis of different genotypes of Brazilian oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 111: 59-67, 2012

Silva, J. A. Avaliação do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel no Brasil – PNPB. **Revista de Política Agrícola**, 22:18-31, 2013.

Soares, J. D. R. Rodrigues, F. A., Pasqual, M. Nunes, C. F. Araujo A. G., Germinação de embriões e crescimento inicial *in vitro* de macaúba. **Ciência Rural**, Santa Maria, 41(5): 773-778. 2011.

Souza, F. V. D., Junghans, T. G., Souza, A. S., Santos-Serejo, J. A., Costa, M. A. P. C. Micropropagação. In: Souza, A.S., Junghans, T.G (Eds.). Introdução a micropropagação de plantas. Bahia, **Embrapa**, 38-52, 2006.

Steinmacher, D.A *et al.* Somatic embryogenesis from immature peach palm inflorescence explants: towards development of an efficient protocol. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hange, 89, (1): 15-22, 2007.

Steinmacher, D. A. Guerra M. P., Saare-Surminski, K., Lieberei, R.. A temporary immersion system improves *in vitro* regeneration of peach palm through secondary somatic embryogenesis. **Annals of Botany** 108: 1463–1475, 2011.

Schwendiman, J.; Pannetier, C.; Michaux-Ferriere, N. Histology of somatic embryogenesis from leaf explants of the oil palm *Elaeis guineensis*. **Annals of Botany**, v. 62, n. 1, p. 43-52, 1988.

Teixeira, J. B., Söndahl, M. R. Kirby, E. G. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of oil palm. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 34: 227-233. 1993.

Teixeira, J. B., Söndahl, M. R., Kirby, E. G. Asexual embryogenesis in mature embryo callus of palms (*Acrocomia aculeata* and *Elaeis oleifera*). In: Somers, D. A., Gengenbach, B. G., Biesboer, D. D., Backett, W. P., Green, C. E. (edit.). **Resumos Congress International Plant Tissue Culture**, Minneapolis, EUA, IAPTC, p191, 1986.

Teixeira, L. C. Potencialidades de oleaginosas para produção de biodiesel. **Informe Agropecuário** 26: 18-27, 2005.

Torres, A. C., Caldas, L. S., Ferreira, A. T. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. In: Torres, A. C., Caldas, L. S., Buso, J. A. (Eds.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Embrapa-SPI/CNPH, Brasília 1:11-19, 1998.

Torres, A.C. *et al.* **Glossário de Biotecnologia Vegetal**. Brasília: Embrapa, 2000. 128p. In: Andrade S.R.M. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Planaltina: Embrapa, Documento 58. 14p. 2002

Touchet, B. Duval Y, Pannetier C Plant regeneration from embryogenic suspension cultures of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Plant Cell Rep** 10:529–532 1991

Vasil, V., Redway F., Vasil I. K. Regeneration of plants from embryogenic suspension culture protoplasts of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Nat Biotechnol** 8:429–434 1990

Viñas, M., & Jiménez V. M. Factores que influyen en la embriogénesis somática in vitro de palmas (Arecaceae). **Revista Colombiana de Biotecnología**, 13(2), 229-242. 2011.

Von Arnold, S., Sabala I., Bozhkov P., Dyachok J., & Filonova L. Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 69(3), 233-249. 2002.

Williams, E. G., Maheswaran G. Somatic embryogenesis: factors influencing behavior of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany** 57: 443-462, 1986.

Zimmerman, J. L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **The Plant Cell**, 5(10), 1411. 1993.

Capítulo 1

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM MACAÚBA (*Acrocomia aculeata*) A PARTIR DE TECIDOS FOLIARES DE PLANTAS ADULTAS

Resumo

O trabalho teve como objetivo induzir a embriogênese somática em macaúba a partir de tecidos foliares de plantas adultas. Explantes foliares jovens e ainda não expandidos (palmito) foram inoculados em meio de indução de calos, formado pelos sais e vitaminas do meio Y3, adicionado das auxinas 2,4-D e picloram na concentração de 450 μM , e da presença ou ausência de 20 μM de 2iP. Num segundo experimento, foi avaliada a influência da região do palmito utilizada na formação de calos. Assim, uma vez coletado, desinfestado e excisado em porções de 1,0 cm^2 , os explantes foliares provenientes do palmito foram divididos em regiões basal, mediana e apical, e inoculados no meio de indução, onde avaliações sobre a formação e coleta dos calos foram realizadas aos 6, 9 e 12 meses de cultivo. Os calos formados foram multiplicados por até 5 subcultivos de 30 dias cada em meio de cultura Y3, com 450 μM de picloram, onde foram avaliados quanto a taxa de multiplicação e incremento da massa fresca no tempo. Para a etapa de diferenciação dos calos embriogênicos em embriões somáticos, três ensaios foram realizados, sempre se utilizando do meio básico Y3: o primeiro, em meio de cultura semissólido com concentrações reduzidas de 2,4-D e picloram (0, 10, 20, 40, 80 e 120 μM). No segundo, utilizou-se meio de cultura líquido sob agitação com 2,4-D (0 ou 5 μM). Por fim, no terceiro, avaliou-se a influência do tempo de permanência dos calos em meio líquido. Uma vez diferenciados, a germinação dos embriões somáticos foi realizada pela transferência dos embriões diferenciados em meio Y3, desprovido de reguladores de crescimento. Em todas as etapas do processo embriogênico, análises morfoanatômica foram realizadas. Verificaram-se resultados significativamente superiores para a formação de calos utilizando a auxina picloram com relação ao 2,4-D. A adição de 2iP ao meio de indução não proporcionou aumento na formação de calos. Independentemente da região do palmito, os melhores resultados para indução de calos foram observados aos 9 meses de cultivo, com 59,9% de formação de calos nos explantes foliares. Quando somente a região do palmito foi avaliada, a mais distal ao meristema (apical) foi a que proporcionou a maior formação de calos (52,9%), enquanto na fase de multiplicação de calos foram os calos da região basal que apresentaram o maior incremento de massa fresca quando comparados com as outras regiões do palmito. Por fim, os embriões somáticos que foram separados e inoculados em meio de regeneração tiveram início da germinação a partir da quarta semana, apresentando processo lento e irregular. Os resultados obtidos demonstram que é possível induzir a embriogênese somática em macaúba a partir de tecidos foliares de plantas adultas, sugerindo que a técnica pode ser uma importante ferramenta para a clonagem de genótipos de interesse.

Palavras-chave: Arecaceae, embriogênese somática, clonagem, tecidos somáticos, taxa de multiplicação de calos, regeneração.

Chapter 1

SOMATIC EMBRYOGENESIS IN MACAW PALM (*Acrocomia aculeata*) FROM LEAF TISSUES OF ADULT PLANTS

Abstract

The work aimed to induce somatic embryogenesis in macaw palm from leaf tissues of adult plants. Young and not expanded (heart of palm) leaves from adult plants of *Acrocomia aculeata* were cultured on callus induction medium, consisting of salts and vitamins of Y3 medium with 2,4-D and picloram at 450 μM , alone or in combination with 20 μM 2iP. In a second experiment, the influence of the heart of palm region used in the calluses formation was also evaluated. Thus, once collected and disinfected, the heart of palm (30 cm length) was divided in basal, middle and apical regions (explant position), all of equal size (10 cm toward apex meristem to the leaf apex), from where explants were excised in 1.0 cm^2 and inoculated on callus induction medium. In order to evaluate calluses formation, the isolation and collection of calluses were performed after 6, 9 and 12 months of culture. After each collection period, the calluses were multiplied on Y3 medium supplemented with 450 μM picloram for up to four subcultures of 30 days each. At the end of each period, the multiplication rate and the callus fresh weight were determined. For somatic embryos differentiation, embryogenic calluses were cultured under three conditions: Y3 semisolid culture medium with 2,4-D and Picloram (0, 10, 20, 40, 80 and 120 μM); Y3 liquid culture medium with 2,4-D (0 or 5 μM) under agitation; and finally, Y3 liquid medium where the influence of the calluses cultivation time was evaluated. Somatic embryos were regenerated on an Y3 culture medium devoid of growth regulators. During all embryogenic process, the morpho-anatomical characterization of different stages involved in the process was carried out. It was verified significant differences in calluses induction when picloram was used as auxin. The addition of 2iP not provided effects on callus formation. Independently of explant position (basal, middle or apical), the best results for callus induction was observed when explants were maintained for 9 months on culture medium, where 59.9% of explants presented callus formation. When only the explant position was evaluated, the most distal region of the meristem (apical region) proportioned higher callus formation (52.9%), while in callus multiplication phase were the calluses from basal region that showed the higher fresh weight increase when compared to other regions. During callus multiplication phase the higher fresh weight accumulation was provided from calluses of basal explants. Finally, somatic embryos were separated and inoculated in regeneration medium where started germination from the fourth week of culture. The results achieved here suggest that the use of leaf tissues of adult plants is a promising way for producing clonal macaw palm.

Keywords: Arecaceae, somatic embryogenesis, cloning, somatic tissues, callus multiplication rate, regeneration.

1 Introdução

A macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.) é uma espécie da família Arecaceae, distribuída amplamente por todo território brasileiro. Sua área de ocorrência estende-se desde os estados de São Paulo e Rio de Janeiro, passando por Minas Gerais e por todo o Centro-Oeste, Nordeste e Norte do país (Henderson *et al.*, 1995; Lorenzi *et al.*, 2010; Amaral, 2011).

Também denominada de palmeira bocaiúva, as folhas, estirpe, frutos e sementes da macaúba são utilizadas tradicionalmente para diversos fins econômicos (Lorenzi e Negrelle, 2006; Lorenzi 2006). No entanto, a principal fonte de renda relativa à comercialização da espécie são os frutos em razão do elevado conteúdo de óleo. Atualmente, o aproveitamento do óleo extraído dos frutos da macaúba vem sendo bastante visado, já que este óleo pode ser aproveitado na produção de biodiesel (Amaral, 2011; Ciconin, 2012; Matsimbe, 2012).

A macaúba apresenta a segunda maior produtividade em óleo entre as plantas oleaginosas, com produção entre 1500 a 5000 kg de óleo/ha, fato que a torna uma espécie com grande potencial para a produção de biodiesel, já que além de sua elevada produtividade, ela se mantém produtiva, teoricamente, por mais de 100 anos (Teixeira, 2005).

No entanto, muitas espécies de palmeiras, tal como a macaúba, não podem ser multiplicada assexuadamente por técnicas convencionais de propagação, fazendo com que a propagação vegetativa via cultivo *in vitro* seja uma ferramenta de grande importância (Ledo *et al.*, 2001; Hartmann *et al.*, 2002; Rubio *et al.*, 2011; Ribeiro *et al.*, 2011). Entre as técnicas de cultivo *in vitro*, a embriogênese somática se destaca para as palmeiras por garantir a propagação de indivíduos em escala e de forma homogênea, seja para a produção de mudas de genótipos elite ou para acelerar programas de melhoramento genético (Schwendiman *et al.*, 1988; Teixeira *et al.*, 1994; Ledo *et al.*, 2002; Scherwinski-Pereira *et al.*, 2010). Nessa técnica, células somáticas diferenciadas ou indiferenciadas, sob condições experimentais favoráveis, tornam-se determinadas a seguir rotas morfogênicas específicas que culminam com o desenvolvimento de embriões somáticos ao final do processo, sem que ocorra a fusão de gametas (Namasivayam, 2007, Gueye *et al.*, 2009).

Em macaúba, trabalhos sobre embriogênese somática são escassos na literatura, embora o uso da técnica utilizando embriões zigóticos como fonte de explante já tenham sido relatados por Teixeira *et al.* (1986), Moura *et al.* (2009) e, mais recentemente, Luis e Scherwinski-Pereira (2014). Assim, a embriogênese somática em macaúba parece ainda estar

na sua fase inicial quanto aos resultados obtidos até o momento, especialmente quanto se trata do uso de propágulos originários de tecidos somáticos como material inicial de cultivo, onde praticamente inexistem resultados de pesquisa.

Devido à escassez de relatos da embriogênese utilizando-se de tecidos somáticos de plantas adultas como explantes para o cultivo *in vitro* e a necessidade da propagação da *A. aculeata* para a produção vegetativa de plantas, o objetivo desse trabalho foi induzir a embriogênese somática em macaúba a partir de tecidos foliares de plantas adultas.

2 Material e Métodos

2.1 Material vegetal

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos II da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, situado em Brasília, DF.

No presente trabalho, foram utilizadas folhas jovens e ainda não expandidas (palmito) de *Acrocomia aculeata*, provenientes de plantas adultas selecionadas de populações naturais localizada na região rural próxima ao Setor Habitacional Fercal em Sobradinho de Brasília, DF, (Coordenadas: 15°35'37.6''S, 47°54'36.1''WO) coletadas no mês de Novembro de 2012. Após coletado em campo, o material vegetal foi conduzido ao laboratório, onde as folhas mais externas foram removidas e o tamanho do palmito reduzido para aproximadamente 30 cm de comprimento (direção base meristemática para ápice foliar do cilindro central).

Em seguida, o palmito formado exclusivamente por folhas aclorofiladas foi desinfestado em condições de câmara de fluxo laminar, pela imersão em álcool 70% por três minutos, hipoclorito de sódio (1,5% de cloro ativo) por 20 minutos, seguida de tríplice lavagem em água destilada e autoclavada. Uma vez realizada a desinfestação, com o auxílio de pinças e bisturis, as folhas foram excisadas em explantes de 1,0 cm², os quais foram padronizados mantendo-se três lâminas de folhas/explante, obtendo, desta forma, os propágulos para os experimentos *in vitro*.

2.2 Indução da embriogênese somática

2.2.1 Auxinas associadas ou não ao 2iP na formação de calos

Para a indução de calos, foi seguido o protocolo inicialmente desenvolvido por Luis (2013). Os explantes foliares foram inoculados em meio básico composto de sais do meio de cultura Y3 (Euweens, 1976) e vitaminas do meio de MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose, 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol e 2,5 g.L⁻¹ de carvão ativado. As auxinas ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) e Ácido 4-amino-3, 5, 6-tricloro-picolínico (picloram) foram adicionadas ao meio na concentração de 450 µM, associadas ou não a 20 µM de 2-isopenteniladenina (2iP). O meio foi solidificado com 2,5 g.L⁻¹ de *Phytigel* (Sigma, St. Louis, MO) e o pH ajustado para 5,8±0,1 antes da esterilização realizada por autoclavagem a 120 °C e 1 atm de pressão por 20 minutos.

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) segundo o esquema fatorial 2 x 2 (auxinas x presença ou ausência da citocinina), totalizando 4 tratamentos. Os tratamentos foram compostos por dez repetições, cada uma constituída por uma placa de petri (15 x 90 mm), preenchida com 20 ml de meio de cultura e com oito explantes.

Os dados relativos à percentagem de formação de calos obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância utilizando-se do software Sisvar (Ferreira, 2011). Dados expressos em percentagem foram previamente transformados segundo arco-seno $(x/100)^{0.5}$.

2.2.2 Regiões do palmito utilizadas como fontes de explantes associadas a diferentes tempos de coleta na indução de calos

A influência da região do palmito utilizada para obtenção dos explantes foi avaliada sobre a formação de calos. Para tanto, o palmito foi dividido em três partes com tamanhos iguais (cerca de 10 cm), de onde foram obtidos os explantes e inoculados em meio de indução de calos: regiões Basal, Mediana e Apical, caracterizando a região Basal como a mais próxima do meristema; a região Mediana como intermediária, e região Apical como a mais próxima do ápice foliar (Figura 1A).

Neste experimento, o meio de cultura utilizado foi o meio básico composto de sais do meio de cultura Y3 (Euweens, 1976) e vitaminas do meio de MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose, 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol e 2,5 g.L⁻¹ de carvão ativado, e adicionado ao meio a auxina picloram na concentração de 450 µM. O meio foi solidificado com 2,5 g.L⁻¹ de *Phytigel* (Sigma, St. Louis, MO) e o pH ajustado para 5,8±0,1 antes da esterilização realizada por autoclavagem a 120 °C e 1 atm de pressão por 20 minutos.

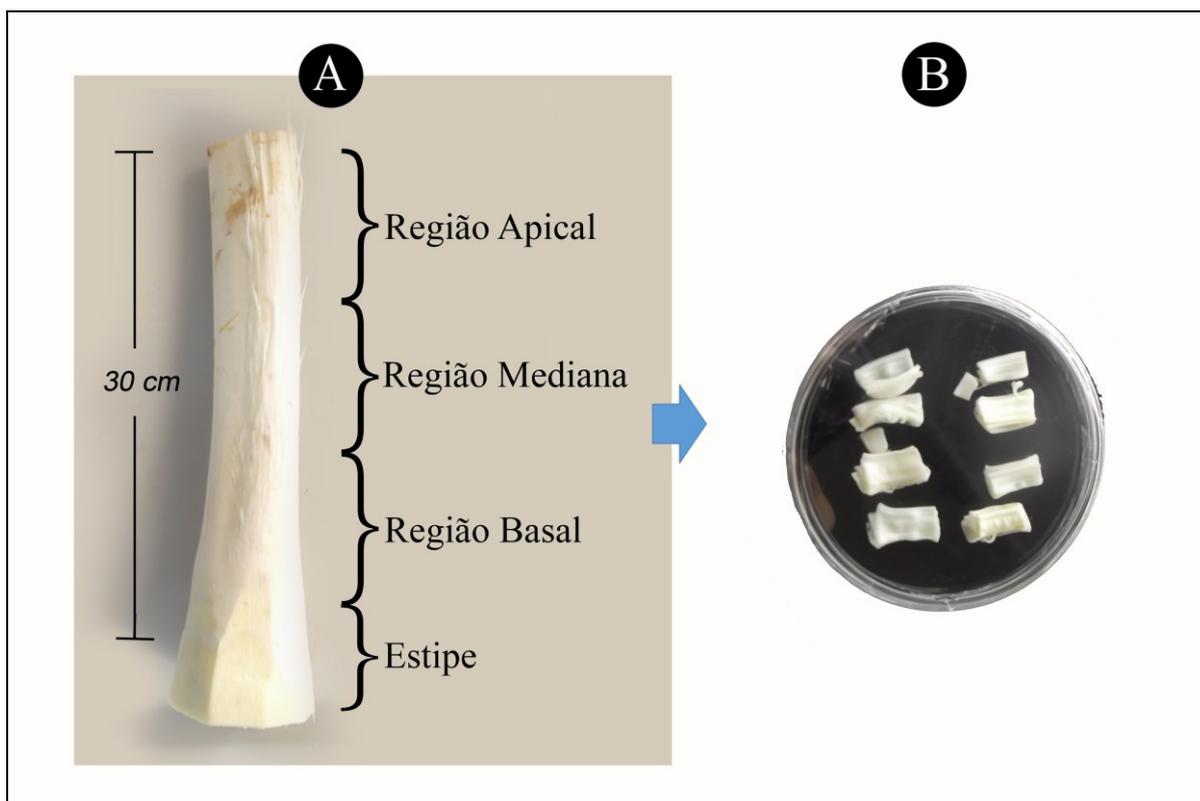


Figura 1: Aspecto do material utilizado para o cultivo *in vitro* de macaúba (*Acrocomia aculeata*). A: Regiões a partir das quais foram excisados os explantes. B: Explantes depois de transferidos para meio de cultura.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 3 x 3 (região do palmito x época de coleta de calos), totalizando 9 tratamentos. Os tratamentos foram compostos por dez repetições contendo oito explantes por parcela.

Os dados obtidos quanto à percentagem de formação de calos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância utilizando-se do software Sisvar (Ferreira, 2011). Dados expressos em percentagem foram previamente transformados segundo arco-seno $(x/100)^{0.5}$.

Em ambos os experimentos, aos 6, 9 e 12 meses de indução, os calos formados foram separados dos explantes de origem, sendo os mesmos transferidos para novo meio de cultura, de igual composição ao meio de indução, ao qual se denominou de meio de multiplicação. Uma vez coletados os calos dos explantes responsivos, os explantes foliares foram novamente inoculados no meio de indução de calos, onde permaneceram até a segunda (9 meses) e terceira coletas (12 meses), quando em cada respectiva época, as novas formações de calos foram avaliadas, individualizadas e inoculadas em meio de multiplicação.

Durante os experimentos de indução de calos, os explantes foram transferidos para novo meio com a mesma composição a cada 60 dias, cultivados em placas de *Petri* (15x 90 mm) (Figura 1B) na ausência de luz e em sala de cultivo com temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$.

2.3 Multiplicação e diferenciação de embriões somáticos

A multiplicação dos calos formados durante a fase de indução foi realizada em meio de cultura com a mesma composição e nas mesmas condições ambientais utilizadas para a fase de indução. Para tanto, os calos isolados foram avaliados quanto à taxa de multiplicação (g/mes) e taxa final de incremento em massa fresca, obtidas por meio de pesagens, a cada 30 dias, durante quatro subcultivos sucessivos (Figura 2).

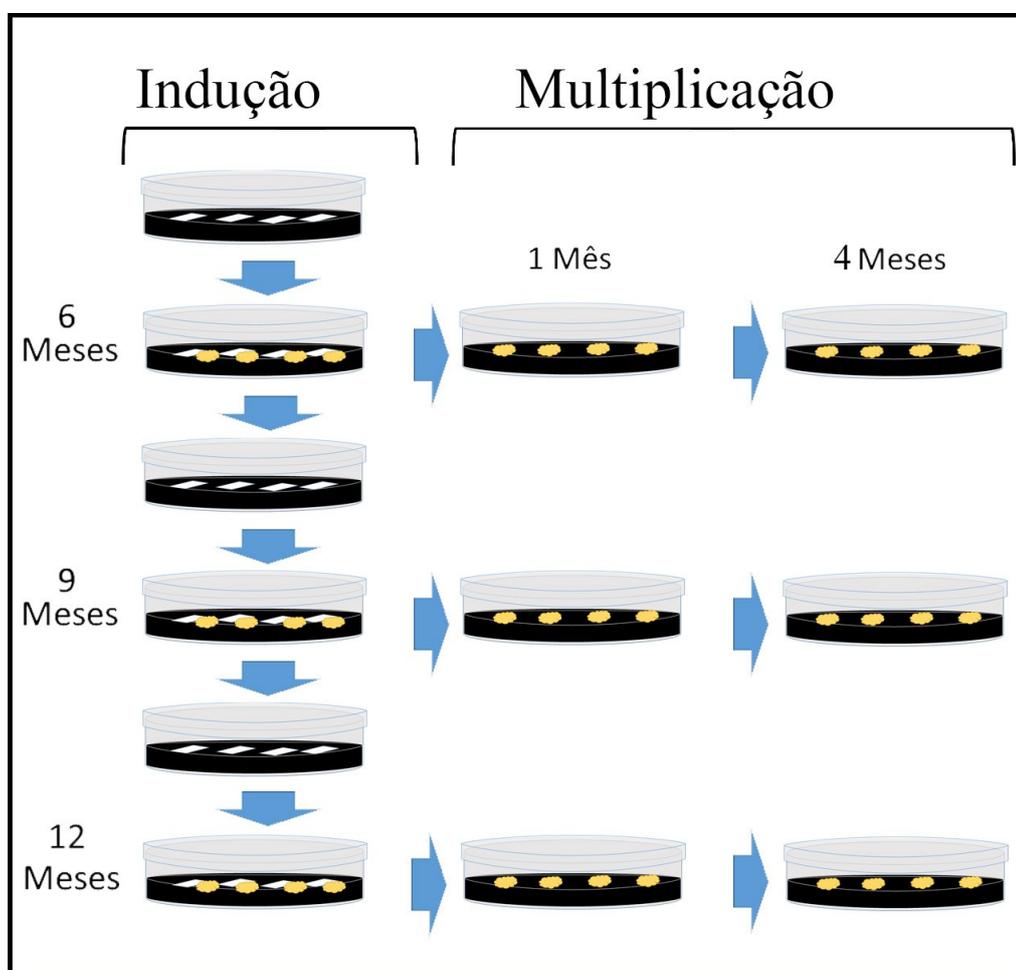


Figura 2 Esquema ilustrativo da indução de calos em macaúba (*Acrocomia aculeata*), os diferentes tempos de coletas dos calos (6, 9 e 12 meses) e a multiplicação de calos durante quatro meses.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) com três repetições (placas com calo) por tratamento. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey e regressão polinomial a 5% de significância.

A diferenciação dos embriões somáticos foi realizada avaliando-se três condições de cultivo: 1) em meio de cultura solidificado com concentrações reduzidas de 2,4-D e Picloram; 2) em meio de cultura líquido sob agitação, com concentrações reduzidas de 2,4-D, e; 3); avaliando a influência do período de tempo de passagem dos calos por meio líquido, como segue:

No primeiro experimento, foram testadas as concentrações de 0, 10, 20, 40, 80 e 120 μM da auxina picloram adicionada ao meio Y3 com vitaminas de MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com 30 g.L^{-1} de sacarose, 100 mg.L^{-1} de mio-inositol, com presença de 2,5 g.L^{-1} de carvão ativado. O meio foi solidificado com 2,5 g.L^{-1} de *Phytigel* (Sigma, St. Louis, MO) e o pH ajustado para $5,8 \pm 0,1$.

No segundo experimento, foram testadas as concentrações de 0, 5, 10, 20, 40 e 80 μM de 2,4-D adicionados ao meio Y3, com vitaminas de MS (Murashige e Skoog, 1962) e suplementado com 30 g.L^{-1} de sacarose, 100 mg.L^{-1} de mio-inositol, em sistema líquido, com o pH do meio ajustado para $5,8 \pm 0,1$.

No terceiro experimento, os calos foram mantidos em meio líquido Y3, vitaminas de MS (Murashige e Skoog, 1962), acrescidos das concentrações 0 ou 5 μM de 2,4-D, suplementado com 30 g.L^{-1} de sacarose, 100 mg.L^{-1} de mio-inositol e o pH ajustado para $5,8 \pm 0,1$. Durante essa fase, os calos foram avaliados a cada 30 dias para verificar a diferenciação destes.

Em todas as condições de cultivo, as avaliações foram feitas pela contagem do número de embriões somáticos formados a cada mês de cultivo. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com três repetições (placas/Erlenmeyers com calo) por tratamento. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

2.4 Germinação dos embriões somáticos

A germinação dos embriões somáticos foi realizada pela transferência dos embriões diferenciados para novo meio de cultura, desprovido de reguladores de crescimento,

segundo metodologia descrita por Balzon *et al.* (2013). Utilizou-se o meio Y3 (Euweens, 1976), vitaminas do meio de MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose, 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol e 2,5 g.L⁻¹ de carvão ativado. O meio foi solidificado com 2,5 g.L⁻¹ de *Phytigel* (Sigma, St. Louis, MO) e o pH ajustado para 5,8±0,1. Os embriões foram incubados em sala de cultivo com temperatura a 25±2°C, na presença de luz, com intensidade de 50 µmol.m⁻².s⁻¹, até que os embriões somáticos apresentassem crescimento suficiente para serem individualizados.

2.5 Caracterizações morfológicas e análise anatômica

Em todos os experimentos, foram realizadas avaliações quanto às características morfológicas e histológicas dos calos, além da taxa de oxidação dos explantes aos 6, 9 e 12 meses de indução.

A análise morfológica foi realizada de forma visual e às características dos calos aos 6, 9 e 12 meses de indução foram avaliadas em cada região do palmito. O registro fotográfico foi realizado com auxílio de um microscópio estereoscópio (lupa) acoplada a um computador com um software de captura de imagens (Software LAS EZ 2.0).

Para a análise histológica, foram retiradas amostras do material *in vitro* em diferentes estádios de desenvolvimento. As amostras do material vegetal *in vitro* se constituíram de folha imatura e folha com calo. Também foram coletadas amostras dos diferentes tipos de calos obtidos durante a fase de multiplicação, incluindo embrião somático.

As etapas de fixação, desidratação e emblocamento do material vegetal coletado foram realizadas conforme o protocolo: foram fixadas em FAA 70 (formaldeído 37%, ácido acético glacial e álcool etílico 70%, 1:1:18 v/v) por um período de 24h, sob vácuo. Depois de fixadas, as amostras foram desidratadas em uma série etanólica crescente (70-100%) por 1 hora cada e infiltradas em historresina (Leica, Heidelberg, Germany), segundo as especificações do fabricante. Posteriormente, cortes seriados longitudinais e transversais (7 µm) foram obtidos em micrótomo rotativo manual (Leica®, RM212RT), distendidos e aderidos às lâminas microscópicas em placa aquecida a 40 °C. Os cortes foram corados com azul de toluidina (0,5%) (O'Brien *et al.* 1965). Os resultados foram registrados em microscópio acoplado a um computador com um software de captura de imagens (Software LAS EZ 2.0).

3 Resultados e discussão

3.1 Indução de calos

3.1.1 Efeito de auxinas associados ou não ao 2iP na formação de calos

Verificaram-se respostas diferenciadas na formação de calos quanto ao efeito das auxinas associadas ou não ao 2iP nos diferentes tempos de avaliação (Tabela 1). De maneira geral, foram observados resultados significativamente superiores quanto à percentagem de formação de calos utilizando picloram com relação ao 2,4-D em todos os tempos de coleta. A adição de 2iP no meio de cultura de indução não se mostrou efetiva para a melhoria na formação de calos.

Tabela 1. Efeito das auxinas picloram e 2,4-D associados (+) ou não (-) com 2iP na indução de calos em folhas jovens de *Acrocomia aculeata*, aos seis, nove e doze meses após a inoculação.

Auxina	Formação de calo (%)								
	6 Meses			9 Meses			12 Meses		
	(-)2iP	(+)2iP	Média	(-)2iP	(+)2iP	Média	(-)2iP	(+)2iP	Média
2,4-D	9,5bA	6,1bA	7,8b	25,9bA	11,9bA	18,8b	4,6bA	3,4bA	4,0b
Picloram	35,7aA	30,1aA	32,9a	64,9aA	34,2aB	49,5a	30,0aA	32,6aA	31,3a
Média	22,3A	17,8A		45,4A	23,0B		17,3A	17,7A	

*Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, dentro de cada período de indução, diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

A eficiência na indução de calos com a utilização do picloram tem sido observada por vários autores em diversas espécies de palmeiras, tais como *Bactris gasipaes* (Steinmacher *et al.* 2007), *Elaeis guineensis* (Scherwinski-Pereira *et al.* 2010; Silva *et al.* 2012; Balzon, 2013) e *Acrocomia aculeata* (Luis, 2013; Padilha, 2013).

Steinmacher *et al.* (2007), utilizando a técnica TCL a partir de plantas jovens de pupunheiras inoculadas em meio que continha 300 ou 600 μM picloram, obtiveram maior número de calos embriogênicos e posterior formação de embriões somáticos. Da mesma forma, foi observado em *Elaeis guineensis* que o picloram na concentração de 450 μM

apresentou resultados superiores ao 2,4-D para indução de calos (Scherwinski -Pereira *et al.*, 2010).

Em macaúba, Luis (2013) obteve aumento significativo da formação de calos primários em explantes foliares obtidos por TCL provenientes de plantas *in vitro*, na concentração de 450 μM de picloram. Ao contrário do apresentado no presente estudo, Othmani *et al.* (2009) observaram melhores resultados utilizando 2,4-D na indução de calos em tamareira e nenhuma resposta em explantes cultivados em meio contendo picloram. Outros autores também observaram a formação de calos em tamareira ao utilizarem 2,4-D (Veramendi e Navarro, 1997; Eke *et al.*, 2005; Eshraghi *et al.*, 2005).

A utilização de citocininas em conjunto com auxinas na indução de calos em palmeiras ainda é pouco documentada. Apesar disso, é relatado por alguns autores o uso do 2iP na fase de indução de calos em *Phoenix dactylifera* (Veramendi e Navarro, 1997; Al-Khayri, 2001; Badawy *et al.*, 2005; Eke *et al.*, 2005; Eshraghi *et al.*, 2005).

Veramendi e Navarro (1997), utilizando folhas de plantas adultas de *Phoenix dactylifera*, observaram que a utilização de 15 μM de 2iP associado a 453 μM de 2,4-D proporcionou melhorias nos resultados de formação de calos. Al-Khayri (2001) também observou melhores resultados utilizando a concentração de 15 μM de 2iP associado a 453 μM de 2,4-D quando combinado ao meio semissólido acrescido de 0,5 mg.L^{-1} de tiamina e 2 mg.L^{-1} biotina.

Diferentemente do presente trabalho, Badawy *et al.* (2005) observaram que os ápices caulinares apresentaram maior formação de calos na fase de indução ao testar o efeito de 100 mg.L^{-1} de 2,4-D associado a 15 μM de 2iP. O mesmo foi observado por Eke *et al.* (2005), quando ao compararem o efeito do 2,4-D associado ao BAP ou 2iP verificaram que este último é mais efetivo na indução de calos.

De acordo com Abohatem *et al.* (2011), o uso de altas concentrações de citocininas durante a fase de indução de calos em palmeiras pode aumentar o acúmulo de compostos fenólicos e, assim, afetar negativamente a indução de calos e inibir o desenvolvimento de embriões somáticos posteriormente.

3.1.2 Efeito da região do palmito utilizada como fonte de explante associada aos diferentes tempos de coleta na indução de calos

Resultados significativos quanto à formação de calos foram observados em relação às diferentes regiões do palmito utilizado como fonte de explante, associada aos diferentes

tempos de coleta (Tabela 2). Assim, a porcentagem média de formação de calos de todas as regiões do palmito agrupadas, os melhores resultados para indução de calos foram observados em explantes mantidos por até 9 meses em cultivo, com 59,9% de formação de calo. Já quando somente a região do palmito foi avaliada, independentemente do tempo da coleta, a mais distal ao meristema (região basal) foi a que proporcionou maior formação de calos (52,9%), apesar de não diferir estatisticamente da região mediana (51,1%).

Tabela 2. Porcentagem média de calos formados de *Acrocomia aculeata* em diferentes regiões do palmito avaliados em diferentes tempos de coletas associados ao picloram.

Região do palmito	Formação de calo (%)			Média
	6 Meses	9 Meses	12 Meses	
Apical	62,3aA	76,0aA	20,6bB	52,9 a
Mediana	27,5bB	69,7aA	56,aAB	51,1 a
Basal	7,9bA	30,8bA	3,9bA	14,8b
Média	35,7B	59,9A	27,7B	

*Médias seguidas por letras minúsculas iguais na coluna e letras maiúsculas na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Luis (2013) observou resultados semelhantes ao avaliar a indução de calos em diferentes regiões do palmito de macaúba. Este autor verificou que a região mais distal ao meristema é a mais responsiva, principalmente quando cultivada em meio Y3 associado ao picloram, observando até 93% de formação de calos. Da mesma forma, Gueye *et al.* (2009) observou que a região mais distal ao meristema em folhas de plantas jovens de tamareira apresentaram melhores respostas quanto à formação de calos em relação a região mais basal.

Assim como observado por Gueye *et al.* (2009), os resultados obtidos aqui contrastam com a hipótese geral de que, em trabalhos de embriogênese somática de plantas adultas, explantes provenientes de tecidos menos diferenciados ou mais jovens são os mais responsivos para se desdiferenciarem e adquirirem a competência embriogênica.

Como relatado por Roberts *et al.* (1989) e Stasolla e Yeung (2003), diferentes tipos de tecidos em uma mesma planta ou o mesmo tecido em vários estádios de desenvolvimento podem apresentar respostas diferentes em condições *in vitro*. Além disso, o nível de auxina endógeno e a orientação dos explantes são provavelmente fatores que influenciam de alguma forma as respostas *in vitro* (Wang *et al.*, 2011).

Resultados observados em macaúba por Padilha (2013) mostraram que a região meristemática e basal de plantas germinadas *in vitro* usadas como explantes iniciais, geraram aumentos significativos na formação de calos primários, quando associados ao picloram.

3.2 Multiplicação dos calos

Os calos mantidos em meio de multiplicação foram avaliados para obtenção da taxa de multiplicação com relação a cada tempo de coleta e região do palmito (Tabela 3). De maneira geral, nas cinco épocas de coleta, os calos oriundos da região basal proporcionaram maior incremento de massa fresca do que outras regiões do palmito.

A região basal apresentou intervalos de incremento de massa fresca entre 5,27 e 6,22 vezes; a região mediana apresentou incrementos entre 3,48 e 4,42 vezes, e a apical de 2,98 e 4,04 vezes o peso inicial inoculado.

Para a multiplicação, os calos obtidos durante a fase de indução foram mantidos em meio com a mesma composição do meio utilizado na fase de indução. O mesmo procedimento foi usado por Konan *et al.* (2010) com calos de *Elaeis guineensis*, que foram mantidos no mesmo meio em que foram obtidos, sem o declínio da proliferação. Diferentemente de Balzon *et al.* (2013) que observaram que a redução da concentração da auxina foi importante para estabelecer ciclos repetitivos de divisão celular e para inibir os processos de diferenciação, possibilitando que os calos de *E. guineenses* se multiplicassem. De acordo com Guerra e Handro (1998) e Aberlenc-Bertossi *et al.* (1999), subculturas sucessivas em meio de cultura com altas concentrações de auxina durante a fase de multiplicação pode causar a inibição do desenvolvimento de embriões nas fases posteriores.

A influência de tempos de coletas e das diferentes regiões do palmito na multiplicação de calos em palmeiras ainda é pouco documentada. No entanto, com relação à influência da região do palmito na multiplicação de calos primários, Luis (2013) observou que não ocorreram diferenças entre as regiões quando as concentrações da auxina foram reduzidas nessa etapa.

Tabela 3. Efeito de diferentes regiões do palmito, de períodos de coleta de calos e do tempo de multiplicação sobre incremento de massa fresca de calos em *Acrocomia aculeata*.

Região do palmito	Coleta de calos nos explantes (meses)	Peso inicial	Multiplicação dos calos (gramas/mês de cultivo)				Incremento de massa fresca (x)	Equações da regressão
			30	60	90	120		
Apical	6	2,04±0,7	4,30±0,5	5,89±1,9	7,84±1,3	8,23±0,1	4,04	$y = -0.2471x^2 + 3.0829x - 0.878$ $R^2 = 0.9925^{**}$
	9	3,53±0,1	4,80±0,7	7,65±1,4	9,62±0,9	11,96±0,5	3,38	$y = 2.168x + 1.008$ $R^2 = 0.9904^*$
	12	1,85±0,4	2,76±0,8	4,65±0,6	5,55±0,4	5,52±0,4	2,98	$y = -0.205x^2 + 2.243x - 0.408$ $R^2 = 0.9624^{**}$
Mediana	6	0,60±0,01	1,36±0,3	1,96±0,5	2,04±0,4	2,09±0,2	3,48	$y = -0.1386x^2 + 1.1974x - 0.458$ $R^2 = 0.9926^{**}$
	9	5,25±1,2	8,11±3,2	10,25±3,6	15,94±5,3	23,23±6,7	4,42	$y = 4.379x - 0.581$ $R^2 = 0.9407^*$
	12	4,47±2,2	6,87±5,1	11,85±6,5	14,94±8,8	16,10±9,6	3,60	$y = 3.133x + 1.447$ $R^2 = 0.9639^*$
Basal	6	0,36±0,09	0,93±0,2	1,56±0,3	1,93±0,2	2,23±0,1	6,22	$y = -0.0571x^2 + 0.8169x - 0.42$ $R^2 = 0.9976^{**}$
	9	0,40±0,005	0,62±0,03	1,27±0,1	1,73±0,2	2,33±0,3	5,81	$y = 0.497x - 0.221$ $R^2 = 0.9823^{**}$
	12	0,22±0,08	0,44±0,1	0,71±0,1	1,0±0,1	1,19±0,1	5,27	$y = -0.0029x^2 + 0.2671x - 0.058$ $R^2 = 0.9962^{**}$

*significativo ** não significativo; Médias obtidas a partir de 3 repetições ± erro padrão.

3.3 Diferenciação e germinação *in vitro* dos embriões somáticos

Durante a multiplicação dos calos foi observado o início da formação de embriões somáticos, que foram separados e inoculados em meio Y3, desprovido de reguladores de crescimento para maturação e germinação. O início da germinação destes embriões somáticos foi observado a partir de quatro semanas. No entanto, não foi possível avaliar a taxa de formação de embriões somáticos por tratar-se de um processo lento e irregular.

A diferenciação de embriões somáticos em palmeiras é comumente relatada na literatura como surgimento assincrônico, assim como observado em açai (Ledo *et al.* 2002), pupunha (Steinmacher *et al.* 2007), dendê (Silva, 2011) e na própria macaúba (Padilha, 2013; Luis & Scherwinski-Pereira, 2014).

Por outro lado, Padilha (2013) observou que a passagem dos calos primários de *A. aculeata* do meio de indução diretamente para um meio de cultura desprovido de reguladores e de carvão ativado causou oxidação e morte dos calos e que a remoção da auxina do meio precocemente inibia a formação de embriões somáticos.

Neste trabalho, durante os experimentos de diferenciação dos calos em meio líquido, não foi observado o surgimento de embriões somáticos, sendo que os calos permaneceram em estágio de multiplicação. Diferentemente do observado aqui, Steinmacher (2011) observou que, em *Bactris gasipaes*, os calos apresentaram alta capacidade embriogênica e alta frequência de embriões somáticos em meio líquido, sendo, entretanto observado melhorias nas etapas de maturação dos embriões somáticos e germinação em meio de consistência semissólida.

A germinação de embriões somáticos é usualmente realizada em meio de cultura livre de reguladores de crescimento (Komatsuda *et al.*, 1992; Fernández-Guijarro *et al.*, 1995). Além disso, a germinação dos embriões somáticos diferenciados, a isolamento e transferência das plantas para meio de cultura é necessária para que a planta conclua seu desenvolvimento (Konan *et al.*, 2010; Balzon *et al.*, 2013).

Além dos resultados apresentados aqui, foi observado que os embriões somáticos que não germinaram entraram em colapso, crescendo de forma anormal. Já aqueles que germinaram entraram em senescência e morreram após poucas semanas da germinação. O processo de senescência em plantas micropropagadas pode estar associado a diversas causas, mas é mais comum acontecer quando estas são expostas por períodos prolongados de tempo a reguladores de crescimento, que refletem sobre os níveis endógenos de auxina, citocinina e, principalmente, o etileno (Jones, 2001).

Estes resultados corroboram com os observados por Moura (2009), que apesar de observarem a germinação de embriões somáticos de macaúba a partir de embriões zigóticos, não obtiveram a formação de plantas completas, uma vez que não houve diferenciação da parte aérea. Da mesma forma, apesar de não ter sido obtido sucesso na regeneração das plantas, o presente trabalho contribui com importantes informações para multiplicação *in vitro* via embriogênese somática a partir de folhas de macaúba. Contudo, novos testes são necessários nas fases de diferenciação, maturação e germinação dos embriões somáticos para obtenção de plantas completas de macaúba *in vitro*.

3.4 Caracterização morfológica

Em geral, observaram-se respostas à indução de calos em todos os tratamentos de indução. No entanto, houve diferenças na morfologia dos calos formados nos explantes foliares inoculados em meio contendo picloram ou 2,4-D, associados ou não ao 2iP, além das diferentes respostas dos explantes provenientes das regiões Basal, Mediana e Apical do palmito (Tabela 4).

Durante o período de indução, observaram-se diferenças nos tipos de calos formados entre os tempos de coletas. Na coleta realizada aos 6 meses, observou-se a predominância de calos alongados e amarelados no tratamento com picloram, enquanto nos outros períodos houve formação de calos com aspecto nodular esbranquiçado e amarelado. Calos formados em 2,4-D apresentaram aspecto mucilaginoso aos 6 meses, fato diferentemente observado nos calos formados na coleta de 9 meses, que exibiram aspecto nodular branco. Na coleta realizada aos 12 meses não foi verificada a formação de calos em meio contendo 2,4-D. Os calos formados em meio contendo 2iP não apresentaram diferenças morfológicas daqueles induzidos em meio desprovido dessa citocinina.

Após seis meses de indução dos calos observou-se o aumento gradativo da oxidação do material em cultivo que, em determinados tratamentos, levou à necrose parcial de calos e explantes. De maneira geral, a oxidação foi mais acentuada em explantes mantidos na presença de 2,4-D, principalmente, após nove e doze meses da inoculação. Este fator parece ter sido limitante na indução de calos, já que houve reduzida formação de calos no período de doze meses de indução.

Em determinadas espécies de plantas, os tecidos vegetais após transferidos para o cultivo *in vitro* podem sofrer oxidação, devido a liberação de compostos fenólicos. Esse acúmulo de polifenóis e produtos de oxidação em torno da superfície excisada, geralmente modifica a composição do meio de cultivo e, conseqüentemente, a absorção (Andrade *et al.*, 2000; Van Winkle *et al.*, 2003). Estas substâncias tóxicas produzidas normalmente inibem o crescimento dos explantes ocasionando, não raramente, até a morte dos mesmos (Sato *et al.*, 2001; Costa *et al.*, 2006).

Tabela 4 Efeito do período de cultivo, tipo de auxina associado ou não ao 2iP e região do palmito nas respostas e morfologia de calos e graus de oxidação em macaúba.

Período	Regulador	Região	Citocinina		Oxidação ^a	
			2iP(-)	2iP(+)	2iP(-)	2iP(+)
6 meses	Picloram	1	Alongado amarelo	Alongado amarelo, Nodular amarelo	+	+
		2	Alongado amarelo,	Alongado amarelo,	+	+
		3	Alongado amarelo,	Alongado amarelo,	++	++
	2,4-D	1	Não houve formação	Não houve formação	+	++
		2	Mucilaginoso Branco	Não houve formação	+	+
		3	Mucilaginoso Branco	Mucilaginoso Branco	++	++
9 Meses	Picloram	1	Alongado amarelo, Nodular Amarelo	Alongado amarelo, Nodular Amarelo	+	++
		2	Nodular Amarelo	Alongado amarelo, Nodular Amarelo	+	++
		3	Alongado amarelo, Nodular Amarelo	Alongado amarelo, Nodular Amarelo	++	++
	2,4-D	1	Não houve formação	Não houve formação	++	+++
		2	Nodular branco	Nodular branco	+++	+++
		3	Não houve formação	Nodular branco	++	++
12 Meses	Picloram	1	Alongado amarelo, Nodular amarelo, Nodular branco	Alongado amarelo, Nodular amarelo, Nodular branco	++	++
		2	Alongado amarelo, Nodular Amarelo	Alongado amarelo, Nodular amarelo, Nodular branco	++	++
		3	Nodular amarelo, Nodular branco	Nodular amarelo, Nodular branco,	++	++
	2,4-D	1	Não houve formação	Nodular branco	+++	++
		2	Não houve formação	Não houve formação	+++	+++
		3	Não houve formação	Não houve formação	++	++

^aGraus de oxidação do material + baixa, ++ moderada e +++ alta. Região 1: Basal; região 2: Mediana; região 3: Apical

Diversas espécies quando cultivadas *in vitro* em concentrações elevadas de auxinas podem apresentar oxidação dos explantes, fato comumente observado em palmeiras (Moura *et al.*, 2009; Scherwinski-Pereira *et al.*, 2010). Para contornar esse problema, o carvão ativado é geralmente adicionado ao meio, o qual tem a função de adsorção de substâncias inibidoras liberadas pelos tecidos (Van Winkle *et al.*, 2003).

Semelhantemente aos resultados observados nesse trabalho, Luis (2013) observou que em meio de cultura com picloram, a adição de carvão ativado proporcionou diminuição na oxidação dos explantes foliares, comparado com os explantes mantidos em 2,4-D. A menor taxa de oxidação dos explantes em meio contendo picloram favoreceu a produção de calos, em contraste com a utilização do 2,4-D, onde ocorreu diminuição nos índices de formação de calos.

Na fase de indução dos calos foi observada a primeira resposta dos explantes nos primeiros três dias de cultivo, observando-se intumescimento das folhas inoculadas. Este intumescimento foi caracterizado como um aumento no volume do explante (Figura 3A).

Aos 3 meses após inoculação, foi observada a primeira formação de calo nas bordas dos explantes do tratamento apenas com picloram (Figura 3B). Nesse período, foi observado também início da oxidação do material foliar.

Estas respostas quanto à formação de calos estão associadas ao cultivo *in vitro* com altas concentrações de auxinas sintéticas, não observando respostas dos explantes na ausência destas (Pádua *et al.*, 2013; Luis *et al.*, 2014). Resultados semelhantes foram observados por outros autores trabalhando com altas concentrações de auxinas sintéticas (Othmani *et al.*, 2009; Padilha, 2013). Dentre essas, destaca-se o picloram, onde além da macaúba (Padilha, 2013; Luis *et al.*, 2014), foram observadas respostas em outras palmeiras como tamareira (Gueye *et al.*, 2009), dendezeiro (Scherwinski-Pereira *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2012; Pádua *et al.*, 2013) e açazeiro (Scherwinski-Pereira *et al.*, 2012).

Entre quatro a seis meses de indução, o material se desenvolveu gradativamente até ser observado elevada formação de calos (Figura 3C-D). Estes calos apresentavam características morfológicas predominantemente alongadas, de coloração amarelada, surgindo principalmente das bordas seccionadas dos explantes em meio contendo picloram. Aos 4 meses estes calos foram separados dos explantes e transferidos para meio de multiplicação.

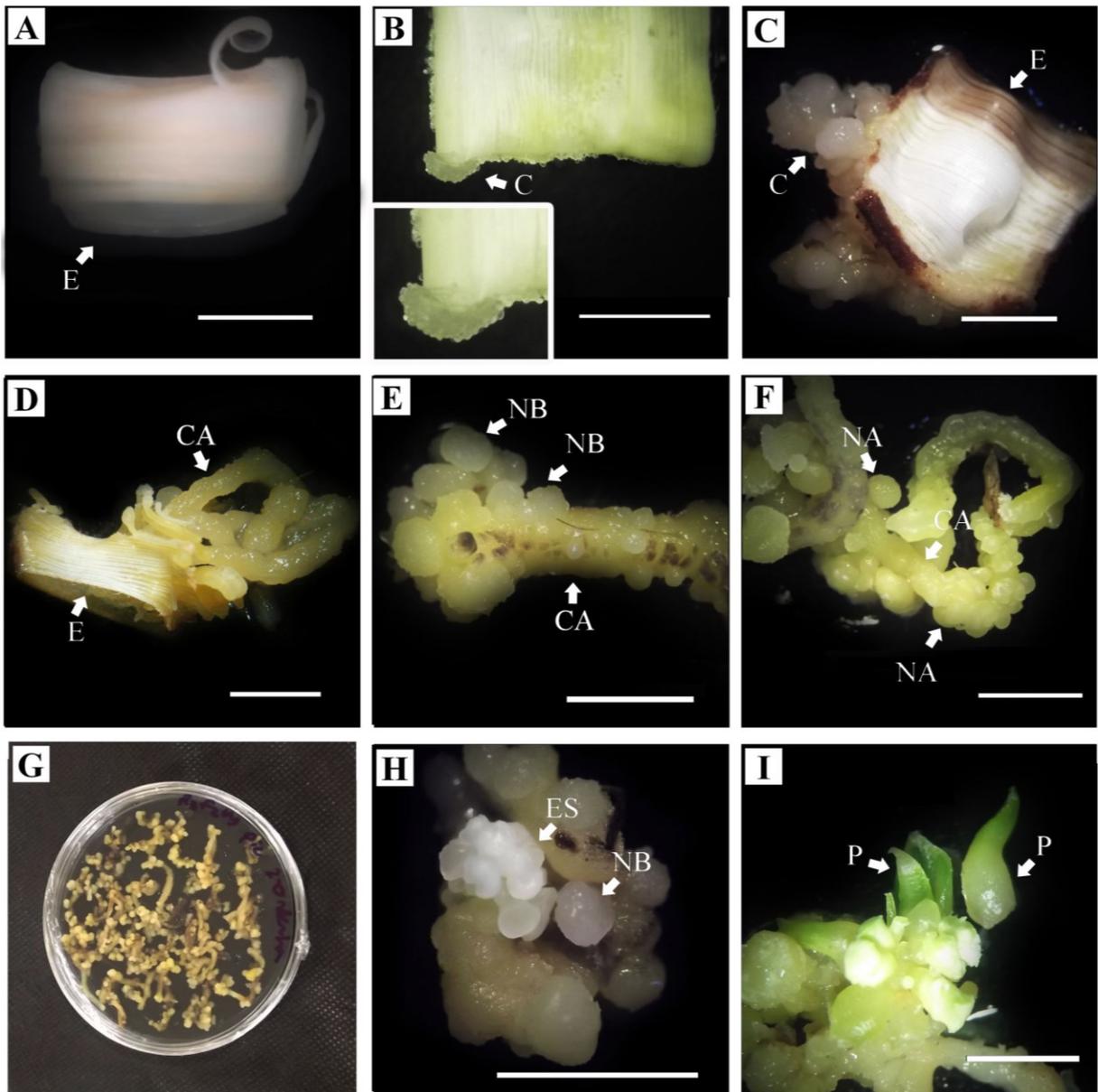


Figura 3 Aspecto morfológicos da indução de calos e obtenção de plantas de macaúba (*Acrocomia aculeata*) a partir da embriogênese somática de tecidos foliares. A: Explante. B: Explante aos 3 meses de cultivo com início de formação de calo. C: Explante aos 4 meses com desenvolvimento de calos nas bordas. D: Explantes aos 6 meses com calos alongados amarelados. E: Calo alongado amarelado aos 9 meses de cultivo, apresentando formação de calos com aspecto nodular branco. F: Calo alongado amarelado aos 9 meses de cultivo, apresentando calos com aspecto nodular amarelo. G: Placa de Petri aos 9 meses de cultivo *in vitro* mostrando a quantidade de calos formados. H: Embriões somáticos observados aos 12 meses dias de cultivo *in vitro*. I: Germinação de embriões somáticos apresentando primórdios foliares. Legenda: C: calo primário, E: explante, CA: calo alongado, NB: nodular branco, NA: nodular amarelo, ES: embrião somático, P: plântula. Escalas: 0,5 cm.

Após a transferência dos calos para meio de multiplicação foi observado aos 9 meses após inoculação, o surgimento de calos com aspecto nodular e com coloração variando de amarelada a esbranquiçada (Figura 3E e F). Durante este período, os calos se multiplicaram, ao ponto de preencher todo espaço da placa de petri (Figura 3G).

Durante o cultivo dos calos em meio de multiplicação, observou-se o surgimento de proembriões somáticos de forma não simultânea nas regiões onde os calos se caracterizavam como nodulares brancos ou amarelados. Aos 12 meses após a inoculação foi observado aumento de tamanho dos proembriões, que progrediram para o estágio globular e coloração esbranquiçada. Assim, foram separados do calo e transferidos para meio desprovido de reguladores de crescimento para a germinação (Figura 3H - I).

Os calos formados em meio contendo 2,4-D apresentaram características morfológicas variando entre mucilaginoso, nodular e coloração branca, apesar de uma taxa bem menor do que os formados em picloram.

Semelhantemente aos resultados encontrados neste trabalho, Pádua *et al.* (2013) trabalhando com folhas jovens de dendezeiro associadas ao picloram observaram quatro tipos de calos que foram classificados quanto à coloração e formato: translúcido-alongado, translúcido-aquoso, bege-globular e branco-globular. De acordo com as características anatômicas e ultraestruturais, os calos bege-globular e branco-globular foram considerados com maior potencial embriogênico.

Por outro lado, Sané *et al.* (2011) observaram em explantes foliares de tamareira uma atividade altamente calogênica caracterizada pela proliferação de calos do tipo compacto globular ao utilizar 2,4-D em duas das quatro cultivares testadas.

A aptidão para a calogênese primária parece ser fortemente dependente da natureza do explante, o genótipo, e os reguladores de crescimento usados (Sané *et al.*, 2011). Outros autores trabalhando com palmeiras encontram resultados semelhantes quanto a morfologia utilizando de picloram como regulador para indução de calos no cultivo *in vitro*, como em *Areca catechu* (Karun *et al.*, 2004), pupunha (Steinmacher *et al.*, 2011), dendezeiro (Scherwinski-Pereira *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2012) e açaí (Scherwinski-Pereira *et al.* 2012).

Os aspectos morfológicos dos calos caracterizados com potencial embriogênico são citados por Moura (2007) e Padilha (2013), promovendo, posteriormente, a formação de embriões somáticos.

3.5 Análise histológica

Na análise histológica do material foi observado aos 60 dias o início da formação do calo a partir do feixe vascular, evidenciada pelo alinhamento celular e presença de células com dois núcleos, a presença de células indiferenciadas e os primeiros sinais visíveis de divisão celular ativa (Figura 4A). Aos 90 dias de cultivo foi verificada a continuidade da formação de calos no feixe vascular, observado em estágio mais avançado de desenvolvimento. Nesta etapa, verificou-se que a proliferação celular no interior do calo, o que resultou no afastamento das faces epidérmicas, ocorrendo a exposição dos calos na superfície da folha (Figura 4B). As divisões mitóticas repetidas e em diferentes direções formaram agrupamentos de células isoladas que, posteriormente, deram origem a iniciação de calos primários. Os calos primários apresentaram constituição celular meristemática, caracterizados pelas células de tamanho reduzido e com razão núcleo:citoplasma elevada.

Rose *et al.* (2006) sugerem que as células do procâmbio que, normalmente, seriam diferenciadas em tecidos vasculares que constituem a nervura da folha, após serem estimuladas pela auxina presente no meio de cultura, se desdiferenciam e reprogramam-se, promovendo a proliferação celular e formação dos calos.

Após transferidos para um novo visando a manutenção e proliferação, os calos alongados obtidos na fase de indução se multiplicaram, e a formação de novas linhagens de calos a partir dos calos alongados obtidos na primeira fase foi observado. As novas linhagens de calos apresentaram aspecto nodular amarelo e nodular esbranquiçado. A linhagem de calos nodulares amarelos apresentaram as características anatômicas semelhantes à dos nodulares esbranquiçados, sendo constituídos predominantemente por células meristemáticas (Figura 4C). Pádua *et al.* (2013), ao classificar linhagens de calos de dendê, sugerem que os calos bege-globular e branco-globular apresentam maior potencial embriogênico a partir dos aspectos anatômicos estudados. Semelhantemente, Luis (2013) observou que os calos de linhagens nodulares de macaúba apresentavam maior potencial embriogênico, e a partir destes foi observada a diferenciação de embriões somáticos.

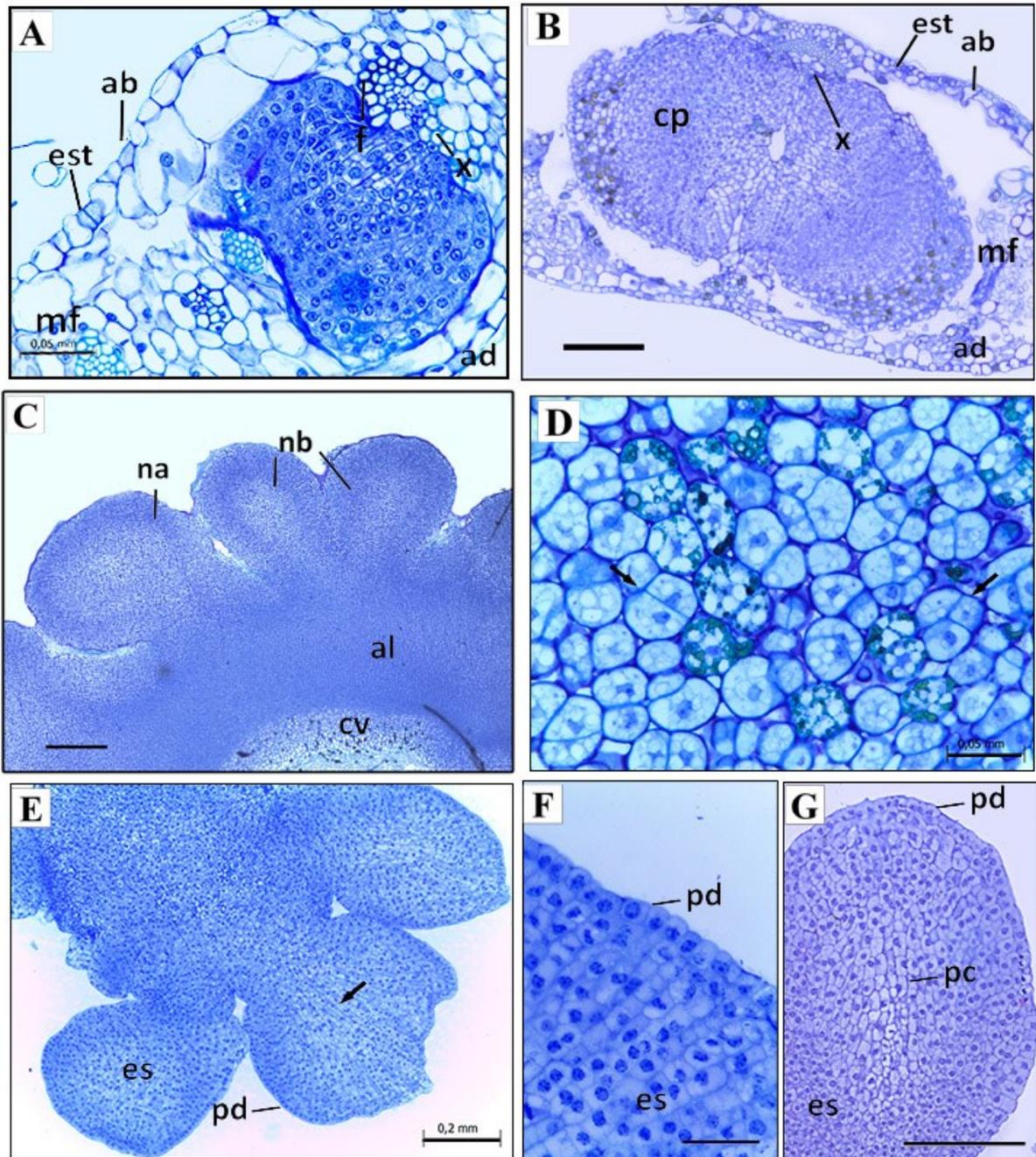


Figura 4 Eventos histológicos de macaúba (*Acrocomia aculeata*) durante a embriogênese somática. A: Folha aos 60 dias apresentando início de calo na região do feixe vascular. B: Calo formado na região do feixe vascular após 90 dias de cultivo apresentando afastamento das faces epidérmicas C: Corte anatômico do calo alongado amarelo apresentando formação de calos nodulares brancos e amarelos em sua superfície. D: Proembriões delimitados pelo espessamento da parede celular. E: *Cluster* de embriões somáticos delimitados pela protoderme e com células alongadas na região central (seta). F: Detalhe protoderme na região periférica do embrião. G: Detalhe do procâmbio localizado na região central do embrião. Abreviações: (ab) epiderme abaxial, (ad) epiderme adaxial, (cv) células vacuoladas, (cp) calo primário, (f) floema, (fv) feixe vascular, (en) estrutura nodular, (es) embrião somático, (est) estômato, (mf) mesofilo, (pc) procâmbio, (pd) protoderme, (x) xilema. Escalas: A, B e C: 0,1 mm, D, E e F: 0,05 mm, E: 0,2 mm.

Ainda durante a fase de proliferação de calos foi observado a formação de proembriões (Figura 4D). Assim como observado por Silva *et al.* (2013) e Balzon *et al.* (2013), foi possível detectar a formação de proembriões a partir do desenvolvimento da massa de calos embriogênicos, caracterizados pelo isolamento de um grupo de células por um aparente espessamento da parede.

Foi observado Verdeil *et al.* (2001) em *Cocus nucifera* e por Sané *et al.* (2006) em *Phoenix dactylifera*, estudando a aquisição de competência dos calos embriogênicos, o isolamento dos proembriões pelo espessamento da parede celular, caracterizada pelo encerramento dos plasmodesmos e deposição de calose (polímeros de glicose), o que sugere que, para os próximas etapas do desenvolvimento dos calos, estes acontecimentos conduzem ao isolamento necessário para a reprogramação celular e o início dos eventos embriogênicos.

Ainda em meio de proliferação, houve a formação de embriões somáticos, visualizados em estágio globular e com coloração esbranquiçada. Os embriões somáticos apresentavam-se constituídos por células meristemáticas de diferentes formas e tamanhos. A camada de células mais externa dos embriões é a protoderme, meristema precursor da epiderme e caracterizado por apresentar uma camada de células justapostas com núcleos proeminentes. Algumas células localizadas na região central do embrião exibem formato alongado, com o seu maior eixo paralelo ao maior eixo do embrião somático, caracterizando células de procâmbio, o meristema precursor dos tecidos vasculares (Figura 4E-G). Assim como encontrado em macaúba (Moura *et al.*, 2010) e tamareira (Aslam *et al.*, 2011), os embriões somáticos foram caracterizadas por apresentar protoderme circundando todo o embrião e pequenas células com características meristemáticas, além de núcleos e citoplasmas densos na região central no embrião somático.

4 Conclusões

- A utilização de picloram não associado ao 2iP tem melhor efeito na formação de calos primários em explantes foliares de macaúba;
- A região Apical do palmito apresenta maior reposta na formação de calos primários em explantes foliares quando coletados aos 6 meses;
- A região Mediana do palmito tem maior resposta na formação de calos primários em explantes foliares quando coletados aos 9 meses;
- A região Basal do palmito, apesar de menor resposta durante a indução, apresenta maior taxa de multiplicação ao longo de 120 dias de cultivo;
- A permanência de calos em meio com mesma composição do meio para indução permite a multiplicação dos calos, com incrementos em massa fresca de até 6 vezes o peso inicial em 120 dias de cultivo, independentemente do período de coleta dos calos dos explantes;
- É possível a obtenção de embriões somáticos de macaúba utilizando-se tecidos foliares jovens e aclorofilados de plantas adultas;

5 Referências bibliográficas

Aberlenc-Bertossi, F., Noirot, M. e Duval, Y. B. A. enhances the germination of oil palm somatic embryos derived from embryogenic suspension cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 56: 53-57. 1999.

Al-Khayri, J. M. Optimization of biotin and thiamine requirements for somatic embryogenesis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant** 37: 453-456. 2001.

Amaral, F. P., Broetto, F., Batistella, C. B., S. M. Jorge, A. Extração e caracterização qualitativa do óleo da polpa e amêndoas de frutos de macaúba [*Acrocomia aculeata* (jacq) lodd. Ex mart] coletada na região de Botucatu, SP Botucatu. **Revista Energia na Agricultura** 26, (1), p.12-20, 2011.

Andrade, M.W., Luz, J.M.Q., Lacerda, A.S. Micropropagação da aroeira (*Myracrodun urundeuva* Fr. All.). **Ciência e Agrotecnologia**, 24 (1): 174-180, 2000.

Badawy, E. M., Habib, A. M. A., El-Bana, A. and Yosry, G. M. Propagation of date palm (*Phoenix dactylifera*) plants by using tissue culture technique. **Arabian Journal of Biotechnology** 8: 343-354. 2005

Balzon, T. A. Luis, Z. G., Scherwinski-Pereira, J. E. 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**, p. 41-50, 2013.

Carlo, A. De, Lambardi, M. Ozudogru, E. A. Cryogenic Technologies for the Long-Term Storage of Citrus Germplasm **Plant Embryo Culture Methods in Molecular Biology**. 710, 185-200. 2011.

Costa, F.H.S., Scherwinski-Pereira, J.E., Pereira, M.A.A., Oliveira, J.P. Efeito da interação entre carvão ativado e N6 - Benzilaminopurina na propagação in vitro de bananeira, cv. Grand naine (AAA). **Revista Brasileira de Fruticultura**, 28(2): 280-283, 2006.

Dias, L. A. D. S. Biofuel plant species and the contribution of genetic improvement. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 11(SPE), 16-26, 2011.

Eeuwens, C. J. 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, 1976.

Eke, C. R., Akomeah, P. e Asemota, O. Somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) from apical meristem tissues from 'Zebia' and 'Loko' landraces. **African Journal of Biotechnology** 4: 244-246. 2005

Eshraghi, P., Zarghami, R. and Mirabdulbaghi, M. Somatic embryogenesis in two Iranian date palm cultivars. **African Journal of Biotechnology** 4: 1309-1312. 2005

Fernández-Guijarro, B., Celestino, C., Toribio, M. Influence of external factors on secondary embryogenesis and germination in somatic embryos from leaves of *Quercus suber*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 41, 99-106, 1995.

Ferreira, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: Reunião anual da região brasileira da sociedade internacional de biometria, 45, São Carlos. **Anais**. São Carlos: UFSCar. 2000. 225-258. 2000.

Gueye, B., Morcillo F., Collin, M., Gargani D., Overvoorde P., Aberlenc Bertossi F., Tranbarger T.J., Sane D, Tregear, J.W., Borgel, A., Verdeil J. 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. 2009

Gueye, B, Said-Ahmed H, Morcillo F., Borgel A, D. Sané D, Hilbert JL, Verdeil J.L., Blervacq A.S. Callogenesis and rhizogenesis in date palm leaf segments: are there similarities between the two auxin-induced pathways? **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 98(1): 47-58. 2009

Henderson, A., Galeano, G., Bernal, R. **Field Guide to the Palms of the Americas**. New Jersey: Princeton University. 166-167, 1995.

Herculano, L., Camara, T. R. Embriogênese somática em variedades de cana-de-açúcar. **X Jornada De Ensino, Pesquisa E Extensão – Jepex 2010** – UFRPE: Recife, 18 a 22 de outubro de 2010.

Hartmann, H.T., Kester D. E., Davies F. T. Jr, Geneve, R. L. **Plant propagation, principles and practices**. Prentice Hall, New Jersey. 2002.

Jones, A. M. Programmed cell death in development and defense. **Plant Physiol** 125(1):94–97. 2001

Karun, A., Siril E., Radha, E., Parthasarathy V. A. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from leaf and inflorescence explants of arecanut (*Areca catechu* L.) **Current Science** 86:1623-1628 2004.

Karunaratne, S., Kurukulaarachchi, C., Gamage, C.A. A report on the culture of embryos of dwarf coconut, *Cocos nucifera* L. var nana, in vitro. *Cocos*, Sri Lanka, v.3, p.1-8, 1985.

Komatsuda, T., Lee, W., Oka, S. Maturation and germination of somatic embryos as affected by sucrose and plant growth regulators in soybeans *Glycine gracilis* Skvortz and *Glycine max* (L.) Merr. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, V. 18, 103-113, 1992.

Konan, K. E. Gasselin, T. D. Kouadio, Y. J. Flori, A. Rival, A. Duval, Y. Pannetier, C. *In vitro* conservation of oil palm somatic embryos for 20 years on a hormone-free culture medium: characteristics of the embryogenic cultures, derived plantlets and adult palms. **Plant Cell Rep** 29:1–13 2010.

Ledo, A., S. Lameira, O. A., Benbadis, A. K., Menezes, I. C., Ledo, C. A. S., Oliveira, M. S. P. Cultura *in vitro* de embriões zigóticos de açaizeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura.**, Jaboticabal - SP, 23, (3), 468-472, 2001.

Ledo, A. D. S., Lameira, O. A., Benbadis, A. K., Menezes, I. C. D., Oliveira, M. D. S. P. D., & Medeiros Filho, S. Somatic embryogenesis from zygotic embryos of *Euterpe oleracea* Mart. **Revista Brasileira de Fruticultura** 24(3), 601-603. 2002

Ledo, A. da S. *et al.*. Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos e aclimação de plântulas de coqueiro-anão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, 42, (2), p.147-154, 2007.

Lorenzi, H., Souza, H. M., Medeiros-Costa, J. T., Cerqueira, L. S. C., Behr, N. **Palmeiras do Brasil: exóticas e nativas** Nova Odessa: Editora Plantarum, 1-20, 1996.

Lorenzi, H. **Árvores Brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**, Nova Odessa, SP:Instituto Plantarum, 1 (3) 272. 2000.

Lorenzi, H, Souza, H, Costa, J. T. M, Cerqueira LSC, Ferreira E. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 352. 2004.

Lorenzi, G. M. A. *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd ex Mart – **Arecaceae: bases para o extrativismo sustentável**. Tese (Doutorado em Produção Vegetal), Curitiba, UFPR, 156 p. 2006.

Lorenzi, G. M. A. C., Negrelle, R. R. B. *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex mart.: aspectos ecológicos, usos e potencialidades. **UFPR, SER (Sistema Eletrônico de Revistas)**, v. 7, n. 1, 2006 Disponível em: <http://www.entabanbrasil.com.br/downloads/Macauba_Aspectos-Ecologicos_Revisao_UFPR.pdf> Acessado em 20 de março, 2013.

Luis, Z. G. Estratégias para a embriogênese somática e conservação *ex situ* de germoplasma de macaúba [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.]. **Tese (doutorado)** - Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica, 2013.

Luis, Z. G., & Scherwinski-Pereira, J. E. An improved protocol for somatic embryogenesis and plant regeneration in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from mature zygotic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, 1-12. 2014.

Matsimbe, S. F. S. **Utilização de características ópticas para estimar o Teor de óleo e volume do mesocarpo nos frutos de Macaúba**. Dissertação. Viçosa, Minas Gerais. 72 2012.

Moura, E. F. Embriogênese somática em macaúba: indução, regeneração e caracterização anatômica. **Dissertação** – Viçosa: UFV, 2007.

Moura, E. F. Ventrella, M. C., Motoike, S. Y. Anatomy, histochemistry and ultrastructure of seed and somatic embryo of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). **Scientia Agricola** (Piracicaba, Braz.) 67 (4) Piracicaba. 2010.

Murashige, T. & Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia**, 15, 473-497.1962.

Namasivayam, P. Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. **Plant Cell Tissue Organic Culture** 90:1–8 2007.

Othmani, A. Bayouhd, C., Drira, N. Marrakchi M. Trifi M. 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 2009.

Padilha, J. H. D. Embriogênese somática em *Acrocomia aculeata* (jacq.) Lodd. Ex mart. Utilizando a técnica do TCL (“Thin Cell Layer”). **Dissertação**. Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal do Paraná. 2013.

Pádua, M. S., Paiva, L.V., Labory, C. R.G., Alves, E. Stein, V. C. Induction and characterization of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) pro-embryogenic masses. **An Acad Bras Cienc** (2013) 85 (4) 2013

Pereira, J. E. S. *et al.*. Germinação de embriões zigóticos de murmuru (*Astrocaryum ulei*). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, 30, (2): 251-256, 2006

- Ribeiro, L.M., Oliveira, T.G.S., Carvalho, V.S., Silva, P.O., Neves, S.C. and Garcia, Q.S. The behaviour of macaw palm (*Acrocomia aculeata*) seeds during storage, **Seed Science and Technology**, 2012
- Ribeiro, L. M., Souza P. P., Rodrigues Jr. A. G., Oliveira T. G. S., Garcia Q. S. Overcoming dormancy in macaw palm diaspores, a tropical species with potential for use as bio-fuel. **Seed Science and Technology**, 39: 303-317. 2011.
- Roberts, D. R, Flinn, B. S, Webb, D.T, Webster, F. B. & Sutton B. C. S. Characterization of immature embryos of interior spruce by SDS–PAGE and microscopy in relation to their competence for somatic embryogenesis. **Plant Cell Rep.** 8: 285–288 1989
- Rose, R. J., Wang, X. D., Nolan, K. E., Rolfe, B. G. 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 2006
- Rubio, N. A., Silva, F. G., Sales, J. F., Reis, E. F., Silva, M. V. V. Souza AL. Dormancy breaking in macaw palm [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Loddiges e Mart.] seeds. **Acta Scientiarum Agronomy**. 2011.
- Sato, A.Y., Dias, H.C.T., Andrade, L.A. Micropropagação de *Celtis* sp.: controle da contaminação e oxidação. **Cerne**, Lavras, 7 (2):117-123, 2001.
- Sané, D. Histocytological analysis of callogenesis and somatic embryogenesis from cell suspensions of date palm (*Phoenix dactylifera*). **Annals of Botany** 98: 301-308. 2006
- Sané, D. Aberlenc-Bertossi F, Diatta Lid, Guèye B, Daher A, Sagna M, Duval Y, Borgel A. Influence of growth regulators on callogenesis and somatic embryo development in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) Sahelian cultivars. **The Scientific World Journal**, 1-8. 2012
- Schwendiman, J., Pannetier, C., Michaux-Ferriere, N. Histology of somatic embryogenesis from leaf explants of the oil palm *Elaeis guineensis*. **Annals of Botany**, 62: 43-52, 1988.

Scherwinski-Pereira, J. E., Guedes, R. S. Fermino, P. C. P., Silva, T. L., Costa, F. H. S. Somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm using the thin cell layer technique. ***In vitro Cellular & Developmental Biology*** – Plant 46: 378-385. 2010

Scherwinski-Pereira, J. E. , Guedes R. S. , Silva, R. A. , Fermino, J.R., P. C. P. , Luis, Z. G. , Freitas, E.O. Somatic embryogenesis and plant regeneration in açai palm (*Euterpe oleracea*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 109: 501-508, 2012.

Silva, R. C. Luis, Z. G. Scherwinski-Pereira, J. E. Differential responses to somatic embryogenesis of different genotypes of Brazilian oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 111: 59-67, 2012

Silva, J. A. Avaliação do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel no Brasil – PNPB. **Revista de Política Agrícola**, 22:18-31, 2013.

Soares, J. D. R. Rodrigues, F. A., Pasqual, M. Nunes, C. F. Araujo A. G., Germinação de embriões e crescimento inicial *in vitro* de macaúba. **Ciência Rural**, Santa Maria, 41(5): 773-778. 2011.

Steinmacher, D.A *et al.* Somatic embryogenesis from immature peach palm inflorescence explants: towards development of an efficient protocol. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hange, 89 (1): 15-22, 2007.

Steinmacher, D. A. Guerra M. P., Saare-Surminski, K., Lieberei, R.. A temporary immersion system improves *in vitro* regeneration of peach palm through secondary somatic embryogenesis. **Annals of Botany** 108: 1463–1475, 2011.

Stasolla, C., Yeung, E. C. Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, 74:15–35 2003.

Teixeira, J. B., Söndahl, M. R. Kirby, E. G. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of oil palm. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 34: 227-233. 1993.

Teixeira, J. B., Söndahl, M. R., Kirby, E. G. Asexual embryogenesis in mature embryo callus of palms (*Acrocomia aculeata* and *Elaeis oleifera*). In: SOMERS, D.A., GENGENBACH, B.G., BIESBOER, D.D., BACKETT, W.P., GREEN, C.E. (edit.). **Resumos Congress International Plant Tissue Culture**, Minneapolis, EUA, IAPTC, p191, 1986.

Teixeira, L. C. Potencialidades de oleaginosas para produção de biodiesel. **Informe Agropecuário** 26: 18-27, 2005.

Van Winkle, S., Johnson, S., Pullman, G.S. The impact of gelrite and activated carbon on the elemental composition of plant tissue culture media. **Plant Cell Report**, 21:1175-1182, 2003.

Veramendi, J. e Navarro, L. Influence of physical conditions of nutrient medium and sucrose on somatic embryogenesis of date palm. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 45: 159-164. 1996

Viñas, M., & Jiménez, V. M. Factores que influyen en la embriogénesis somática in vitro de palmas (Arecaceae). **Revista Colombiana de Biotecnología**, 13(2): 229-242. 2011.

Wang, Y. L, Fan, M. J., Liaw, S. L. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of papaya (*Carica papaya* L.) by vitrification. **Botanical Bulletin of the Academia Sinica** 46:29-34. 2005.

Capítulo 2

ONTOGENIA DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM MACAÚBA (*Acrocomia aculeata*) A PARTIR DE TECIDOS FOLIARES DE PLANTAS ADULTAS

Resumo

O objetivo desse trabalho foi descrever os eventos ontogênicos e a caracterização anatômica que envolvem o processo de embriogênese somática da macaúba (*Acrocomia aculeata*). Folhas jovens e não expandidas (palmito) de *Acrocomia aculeata*, provenientes de plantas adultas foram inoculadas em meio básico composto de sais do meio de cultura Y3 e suplementado com 450 μM de Picloram. A análise histológica foi realizada com amostras do material vegetal *in vitro*, que se constituíram de folha imatura e folha com calo, coletadas aos 0, 30, 60, 90 e 120 dias após a indução em meios de indução de calos. Em adição, amostras dos diferentes tipos de calos obtidos durante a fase de multiplicação também foram caracterizados, incluindo calos em início de formação e embrião somático. Para isso, desidratação e emblocamento do material vegetal foram realizadas. As amostras foram fixadas em FAA 70 (formaldeído 37%, ácido acético glacial e álcool etílico 0%, 1:1:18 v/v) por um período de 24h, sob vácuo durante a primeira hora. As amostras foram desidratadas em uma série etanólica crescente (70-100%) por 1 hora cada e infiltradas em historresina. Posteriormente, cortes seriados foram obtidos em micrótomo rotativo manual. Os cortes foram corados com azul de toluidina e submetidos a testes de lugol para detecção de níveis de amido. Detalhadas análises morfoanatômicas revelaram o desenvolvimento de células hipertrofiadas após 30 dias de cultivo. Após 60 dias os primeiros sinais visíveis de divisão celular ativa e a presença de células indiferenciadas foram observadas no mesofilo foliar, progredindo para a formação de calos na região do feixe vascular aos 90 dias de cultivo. Os calos primários apresentaram constituição celular meristemática, caracterizadas por células de tamanho reduzido e com razão núcleo:citoplasma elevada. Na fase de multiplicação observou-se a proliferação e formação de calos alongados obtidos na fase de indução, e a formação de novas linhagens de calos a partir dos calos com aspecto nodular amarelado, granular esbranquiçado ou nodular. Em geral, as linhagens de calos nodulares amarelados apresentaram características anatômicas similares aos esbranquiçados, consistindo predominantemente por células meristemáticas. Ainda nesta fase foi observado o início da formação de embriões somáticos, visualizados em estágio globular. As análises histológicas químicas evidenciaram acúmulo de amido próximo aos centros de intensa divisão celular, mas não nas linhagens de calos e embriões somáticos.

Palavras-chave: *Acrocomia aculeata*, embriogênese somática, ontogênese.

Chapter 2

ONTOGENY OF SOMATIC EMBRYOGENESIS IN MACAW PALM (*Acrocomia aculeata*) FROM LEAF TISSUES OF ADULT PLANTS

Abstract

The objective of this study was to describe the ontogenetic events and anatomical characterization involving during the acquisition and development of somatic embryogenesis in macaw palm (*Acrocomia aculeata*). Young and not expanded leaves (heart of palm) from adult plants of *Acrocomia aculeata* were inoculated on Y3 culture medium supplemented with 450 μ M picloram. Histological analysis was performed on samples of leaves and calluses, collected at 0, 30, 60, 90 and 120 days after inoculation on callus induction media. In addition, samples of different types of calluses obtained during the multiplication stage, besides somatic embryos were also characterized. For this, dehydration and embedment of plant material were performed and samples were fixed in FAA 70 (37% formaldehyde, glacial acetic acid and ethyl alcohol, 0%, 1: 1: 18 v / v) for a period of 24 hours under vacuum in the first hour. The samples were then dehydrated in an increasing ethyl alcohol series (70%-100%), infiltrated, and embedded in historresin. Serial transverse and longitudinal cross-sections were obtained in a manual rotator microtome. The sections were stained with toluidine blue, and submitted to lugol's iodine test to detect starch levels. Detailed morpho-anatomical analysis revealed the development of hypertrophied cells after 30 days of explants culture on callus induction medium. At 60 days the first visible signs of active cell division and the presence of undifferentiated cells were observed in leaf mesophyll, progressing to callus formation in the region of the vascular bundle at 90 days. The primary calluses showed meristematic cell constitution, characterized by small size and a high nucleoplasmic ratio. In the multiplication phase, it was observed the multiplication and formation of calluses with aspect yellow nodular, whitish granular or nodular. In general, the lineages of yellow nodular calluses showed anatomical features similar to whitish nodular, consisting predominantly of meristematic cells. Still in this phase, it was observed the formation of somatic embryos in the globular stage. Histochemical analysis revealed starch accumulation near the centers of intense cell division, but not in the lineages of calluses and somatic embryos.

Keywords: *Acrocomia aculeate*, somatic embryogenesis, ontogenesis.

1 Introdução

A macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.) é uma espécie monocotiledônea membro da família Arecaceae. Possui ampla distribuição geográfica que se estende ao longo da América tropical e subtropical, desde o Sul do México e Antilhas até o Sul do Brasil, chegando ao Paraguai e Argentina. No Brasil é considerada uma das palmeiras de maior dispersão, com ocorrência de populações naturais em praticamente todo o território (Henderson *et al.*, 1995; Lorenzi *et al.*, 2010; Amaral, 2011).

A macaúba, também denominada de palmeira bocaiúva, é utilizada tradicionalmente para diversos fins econômicos, e quase todas as partes da planta podem ser aproveitadas, desde as folhas, estirpe, frutos até sementes (Lorenzi e Negrelle, 2006; Lorenzi 2006). Apesar dos diversos usos, a principal fonte de renda relativa à comercialização da espécie são os frutos que apresentam grande proporção de conteúdo de óleo. Atualmente, o aproveitamento dos frutos da macaúba vem sido o foco maior dentre os produtos gerados por esta espécie, já que o óleo extraído deste pode ser aproveitado na produção de biodiesel, e ainda apresentar a segunda maior produtividade em óleo entre as plantas oleaginosas (Teixeira, 2005; Amaral, 2011; Ciconini, 2012; Matsimbe, 2012).

Dentre as técnicas de cultivo *in vitro*, a embriogênese somática via tecido foliar se destaca por proporcionar propagação de populações em grande número de plantas e de forma homogênea ou podendo ainda acelerar programas de melhoramento genético, sendo indicada pra propagação de palmeiras em geral (Schwendiman *et al.*, 1988; Teixeira *et al.*, 1994; Ledo *et al.*, 2002; Scherwinski-Pereira *et al.* 2010).

A embriogênese somática tem sido foco de estudo por vários pesquisadores e já foram descritos diversos protocolos de embriogênese somática para espécies de palmeiras, como a *Phoenix dactylifera* (Sharma *et al.*, 1984; Fki *et al.*, 2003; Sané, 2006; Othmani *et al.*, 2009), o *Elaeis guineensis* (Ahée *et al.*, 1981; Teixeira *et al.*, 1993; Scherwinski-Pereira *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2012; Balzon *et al.*, 2013), *Acrocomia aculeata* (Moura *et al.*, 2009), *Euterpe oleracea* (Scherwinski-Pereira *et al.*, 2012) e *Bactris gasipaes* (Steinmacher *et al.*, 2007; Heringer *et al.*, 2014).

Assim, a embriogênese somática em macaúba, apesar de sua importância, ainda é pouco conhecida quanto aos resultados práticos e, principalmente, quando se pensa em regenerar plantas a partir de tecidos somáticos, necessitando de mais estudos nessa área, sobretudo dos processos envolvidos.

O estudo do processo da embriogênese somática por meio de observações histológicas tem se mostrado cada vez mais útil, abrangendo o emprego de variadas técnicas que permitem detalhar os eventos que ocorrem quando espécies vegetais são cultivadas *in vitro*. Desta forma, é possível, por exemplo, conhecer e acompanhar o desenvolvimento celular e dos tecidos do material vegetal durante as diferentes etapas do processo da embriogênese somática. Além disso, a capacidade de uma célula ou grupo de células de tornar-se embriogênica também depende do seu estado fisiológico e de diferenciação. Nesse sentido, alterações histológicas associadas com a posição e a atividade das células competentes têm sido bastante estudadas durante a embriogênese somática, assim como todo o desenvolvimento ontogênico (Rodrigues *et al.*, 2004; Sané *et al.*, 2006; Gueye *et al.*, 2009).

As análises anatômicas da macaúba ainda são escassas quando se trata da ontogênese da formação dos calos e embriões somáticos originados a partir das folhas de plantas adultas. Já, análises anatômicas relacionados a embriogênese somática em macaúba a partir de outros tecidos vem sendo relatados por diversos pesquisadores, (Bandeira, 2008; Moura *et al.*, 2009; Luis, 2013; Padilha 2013). Nesse contexto, este trabalho teve por objetivo elucidar a ontogênese durante a embriogênese somática da macaúba (*Acrcomia aculeata* Jacq.) a partir de tecido somático.

2 Material e métodos

2.1 Material vegetal

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos II da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Brasília – DF.

Para a obtenção de calos foram utilizadas folhas jovens e não expandidas (palmito) de *Acrocomia aculeata*, provenientes de plantas adultas selecionadas de populações naturais localizada na região rural próxima ao Setor Habitacional Fercal em Sobradinho de Brasília, DF, (Coordenadas: 15°35'37.6''S, 47°54'36.1''WO) coletadas no mês de Novembro de 2012.

Após assepsia do palmito, foi induzida a formação de calo nos explantes seguindo o protocolo inicialmente desenvolvido por Luis (2013), com alterações. Os explantes foliares foram inoculados em meio básico composto de sais do meio de cultura Y3 (Euweens, 1976) e vitaminas do meio de MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose, 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol e 2,5 g.L⁻¹ de carvão ativado. A auxina Ácido 4-amino-3,

5, 6-tricloro-picolínico (Picloram) foi adicionada na concentração de 450 μM . Durante a fase de multiplicação, foi realizada a separação dos calos dos explantes e estes inoculados em meio com mesma composição da fase anterior. O meio utilizado durante todo experimento foi solidificado com 2,5 g.L^{-1} de *Phytigel* (Sigma, St. Louis, MO) e o pH ajustado para $5,8 \pm 0,1$. A esterilização foi realizada por autoclavagem a 121 °C e 1 atm de pressão por 20 minutos.

2.2 Análise histológica

Para a análise histológica, foram retiradas amostras do material *in vitro* em diferentes estádios de desenvolvimento. As amostras do material vegetal *in vitro* se constituíram de folha imatura e folha com calo, coletadas aos 0, 30, 60, 90 e 120 dias após a indução da embriogênese somática. Além disso, amostras dos diferentes tipos de calos obtidos durante a fase de multiplicação também foram coletadas, incluindo calo em início de formação e embrião somático.

As amostras foram fixadas em FAA 70 (formaldeído 37%, ácido acético glacial e álcool etílico 70%, 1:1:18 v/v) por um período de 24h, sob vácuo durante a primeira hora. Depois de fixadas, as amostras foram desidratadas em uma série etanólica crescente (70-100%) por 1 hora cada e infiltradas em historresina (Leica, Heidelberg, Germany), segundo as especificações do fabricante. Posteriormente, secções (5-7 μm) foram obtidas em micrótomo rotativo manual (Leica®, RM212RT), distendidos e aderidos às lâminas microscópicas em placa aquecida a 40 °C. As secções foram coradas com azul de toluidina (O'Brien *et al.* 1965), e submetidas ao teste de lugol (Johansen, 1940) para detecção de amido segundo metodologia descrita por Ventrella *et al.*(2013). Os resultados foram registrados em microscópio acoplado a um computador com um software de captura de imagens (Software LAS EZ 2.0).

3 Resultados e discussão

3.1 Análise histológica

A Figura 1 apresenta as características anatômicas das folhas jovens e aclorofiladas de *A. aculeata* utilizada como fonte de explantes na indução da embriogênese somática, além dos explantes após 30 e 60 dias da inoculação, demonstrando o princípio de formação de calos.

A secção transversal evidenciou que os explantes foliares possuem epiderme unisseriada, com células de tamanho homogêneo e justapostas. Os estômatos são nivelados com as demais células epidérmicas e ocorrem na face abaxial, caracterizando a folha como hipoestomática. O mesofilo é constituído pela hipoderme nas duas faces, adjacente à epiderme, e pelo parênquima homogêneo, composto por células poliédricas arranjadas de forma compacta e intercalado por feixes vasculares. Os feixes vasculares de maior calibre são do tipo colateral fechados, envolto por uma bainha esclerenquimática mais externa e uma parenquimática interna, enquanto os feixes de menor calibre estão em processo de diferenciação, apresentando apenas bainha parenquimática (Figura 1A).

Após 30 dias de cultivo dos explantes foliares em meio de indução, observou-se o desenvolvimento de células hipertrofiadas no parênquima e na face abaxial da epiderme do explante foliar (Figura 1B). Nesta fase, não foi observado sinais de divisão celular e formação de calos.

Aos 60 dias de cultivo foi verificado a presença de células indiferenciadas e os primeiros sinais visíveis de divisão celular ativa, e presença de células com dois nucléolos no feixe vascular (Figura 1C). As divisões mitóticas repetidas e em direções diferentes formaram agrupamentos de células isolados que, posteriormente, deram origem a iniciação de calos primários. As células indiferenciadas e os agrupamentos celulares estavam associados aos feixes vasculares de menor calibre, principalmente, aqueles localizados nas regiões próximas ao bordo do explante foliar (Figura 1D-F).

Os calos primários apresentaram constituição celular meristemática, com células de tamanho reduzido e com razão núcleo:citoplasma elevada. Ressalta-se que, os calos apresentaram-se isolados das células do mesofilo desde o início da sua formação até o seu posterior desenvolvimento e desprendimento do explante (Figura 1D).

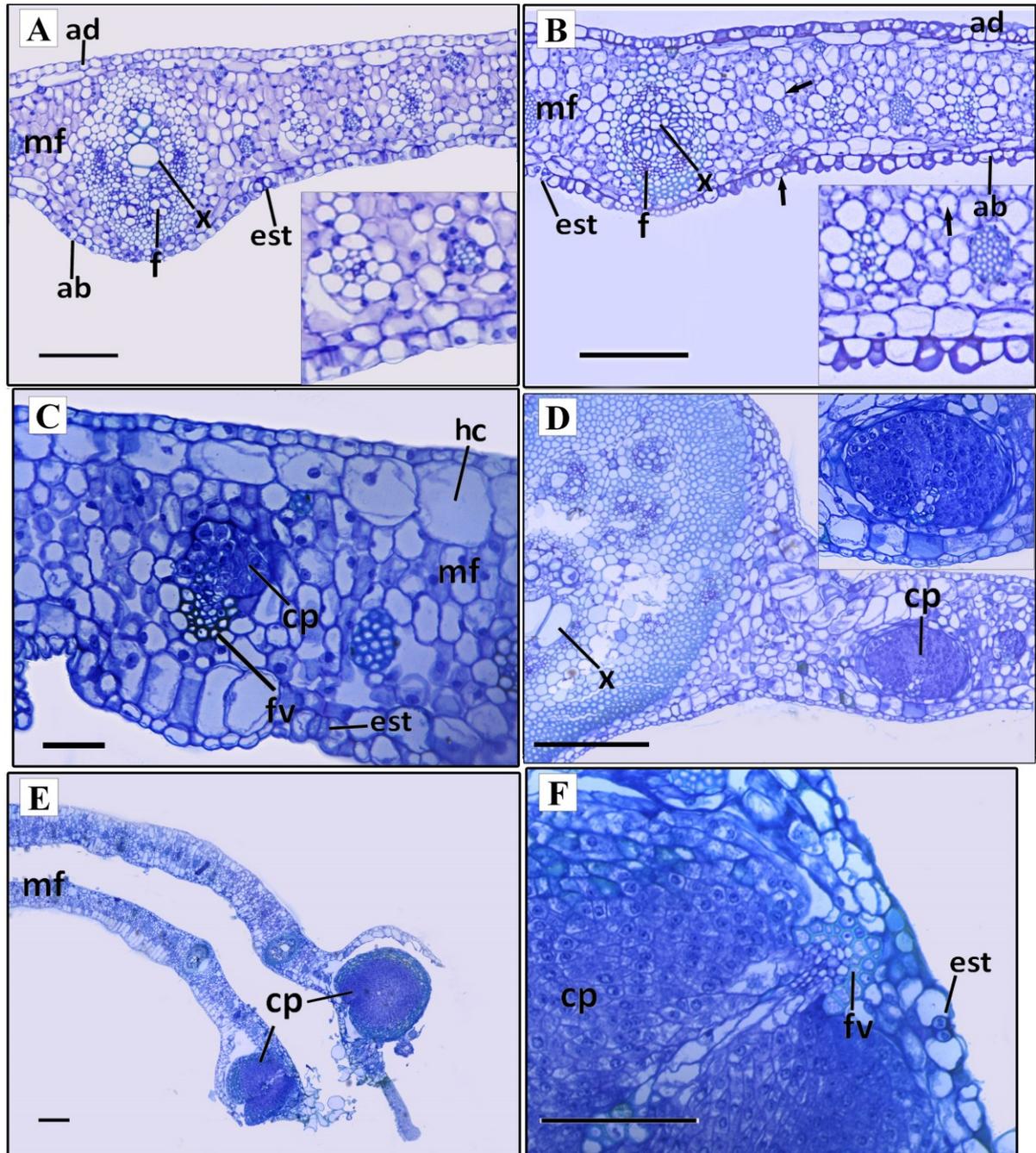


Figura 1. Secção transversal de segmentos foliares de macaúba (*Acrocomia aculeata*) apresentando eventos histológicos durante a indução da embriogênese somática. A: Explante foliar. B: Folha aos 30 dias de cultivo apresentando células hipertrofiadas (Setas). C: Folha após 60 dias apresentando início de formação de calos na região do feixe vascular. D: Folha com formação de calo em estágio mais avançado com detalhe do calo formado. E: Calos formados a partir de feixes vasculares da região periférica das folhas. F: Detalhe do calo na região de feixe vascular. Abreviações: (ab) epiderme abaxial (ad) epiderme adaxial, (cp) calo primário, (f) floema, (fv) feixe vascular, (est) estômato, (hc) hipoderme, (mf) mesofilo, (x) xilema. Escalas: A, B, D, E e F: 0,1 mm, C: 0,02 mm.

Neste estudo, acredita-se que a formação de calos esteja relacionada às células presentes no feixe vascular. As células do procâmbio podem estar relacionadas ao desenvolvimento do calo, uma vez que, este tecido apresenta células com maior potencial mitótico se comparado aos outros tecidos presentes no feixe vascular.

Segundo pesquisas realizadas por Bartos (2012), há evidências que confirmam a origem dos calos a partir das células do procâmbio, devido a proliferação celular inicial próxima ao feixe vascular e ausência de sinais de desdiferenciação nas células parenquimáticas nos primeiros estádios ontogênicos dos calos.

Além disso, Rose *et al.* (2006) sugerem que as células do procâmbio, que normalmente seriam diferenciadas para a formação da nervura da folha, após serem estimuladas pela auxina presente no meio de cultura, se desdiferenciam e reprogramam, promovendo a proliferação celular e formação dos calos.

Diferentemente, Sané *et al.* (2006) e Queye *et al.* (2009) descrevem que divisões celulares ocorrem na área do parênquima perivascular em explantes foliares de tamareira, nas primeiras semanas de cultivo *in vitro*. Queye *et al.* (2009) divide as reações nesta região em dois eventos: o primeiro evento envolve células do parênquima perpendicular ao eixo vascular, onde adquirem características tipicamente observadas em células meristemáticas, o segundo evento é caracterizado pela alteração de células da bainha perivascular adjacentes, as células se tornam calogênicas e sofrem divisão celular, levando à formação de calo.

O desenvolvimento de calos a partir de células próximas aos tecidos vasculares de espécies da família Arecaceae também tem sido relatadas por outros autores, tais como *Elaeis guineensis* (Schwendiman *et al.*, 1988), *Cocos nucifera* (Buffard-Morel *et al.*, 1992; Fernando *et al.*, 2003), *Bactris gasipaes* (Steinmacher *et al.*, 2011) e *Acrocomia aculeata* (Luis, 2013).

Aos 90 dias, os calos apresentavam, visualmente, tamanho maior em relação aos observados aos 60 dias de cultivo. Anatomicamente, verificou-se que esse aumento de tamanho foi em consequência da proliferação celular no interior do calo e resultou no afastamento das faces epidérmicas, provocando a desorganização e perda celular do mesofilo (Figura 2A-C).

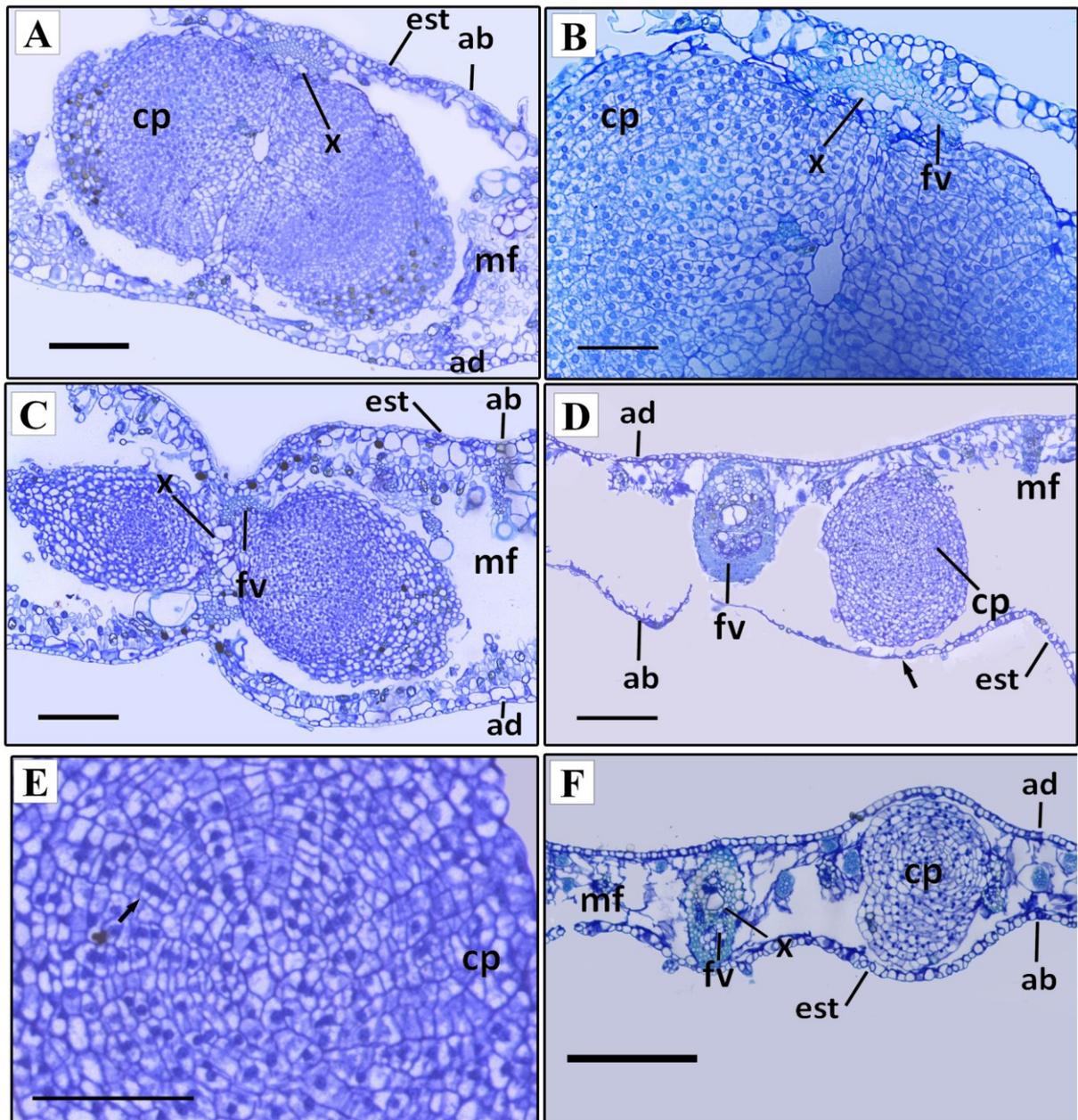


Figura 2 Secção transversal de segmentos foliares de macaúba (*Acrocomia aculeata*) apresentando eventos histológicos durante a embriogênese somática no período de indução de calos em picloram. A, C: Calo formado na região do feixe vascular após 90 dias de cultivo B: Detalhe do resquício do feixe vascular e do calo formado D: Calo formado na região do feixe vascular aos 120 dias de cultivo. E: calo formado aos 120 dias de cultivo contendo células meristemáticas e ativa divisão celular (seta) em início de formação de primórdio de raiz. F: Folha após 120 dias de cultivo com calo primário e ausência da região do mesofilo. Abreviações: (ab) epiderme abaxial, (ad) epiderme adaxial, (cp) calo primário, (est) estômato, (f) floema, (fv) feixe vascular, (hc) hipoderme, (mf) mesofilo, (x) xilema. Escala: A, C, D e F: 0,1 mm B: 0,05 mm E: 0,02 mm.

Aos 120 dias, ocorreu o rompimento da epiderme do explante foliar e a exposição dos calos na superfície da folha (Figura 2D-F). Os calos expostos possuíam formato alongado, consistência compacta, coloração amarelada e eram constituídos por células parenquimáticas na região periférica e, de células meristemáticas na região interna formando um feixe. Os calos também apresentaram início de diferenciação, evidenciando organização celular e formação de primórdio de raiz (Figura 2E).

Após a permanência dos explantes por 180 dias em meio de indução, os calos foram isolados da folha e transferidos para um novo meio visando a manutenção e proliferação. Nesta etapa, ocorreu a proliferação dos calos alongados obtidos na fase de indução, e a formação de novas linhagens de calos a partir dos calos alongados. As novas linhagens de calos apresentaram aspecto nodular amarelo, nodular esbranquiçado ou granular.

A linhagem de calos nodulares brancos apresentaram as características anatômicas semelhantes à dos nodulares amarelos, sendo constituída predominantemente por células meristemáticas (Figura 3A-D). Já as linhagens de calos granulares apresentaram superfície irregular e são formados, predominante, de células meristemáticas com eventos de divisão celular (Figura 3E-F).

Pádua *et al.* (2013), também classificou linhagens de calos de dendê quanto à cor e ao formato: translúcido-longado, translúcido-aquoso, bege-globular e branco-globular. Esse autor considerou as linhagens de calos bege-globular e branco-globular com maior potencial embriogênico a partir dos aspectos anatômicos. Semelhantemente, Luis (2013) observou que os calos de linhagens nodulares de macaúba apresentavam maior potencial embriogênico, e a partir destes foi observada a diferenciação de embriões somáticos.

Em meio de proliferação ocorreu a formação de embriões somáticos, visualizados em estágio globular e com coloração esbranquiçada (Figura 4A-B). Os embriões somáticos apresentavam-se constituídos por células meristemáticas de diferentes formas e tamanhos. A camada de células mais externa dos embriões é a protoderme, meristema precursor da epiderme caracterizado por uma camada de células justapostas e núcleo proeminente (Figura 4 C). Adjacente a protoderme, as células são poliédricas e maiores, enquanto as que ocupam a região central do embrião exibem formato alongado, com o seu maior eixo paralelo ao maior eixo do embrião somático, caracterizando células de procâmbio, o meristema precursor dos tecidos vasculares (Figura 4 D-E).

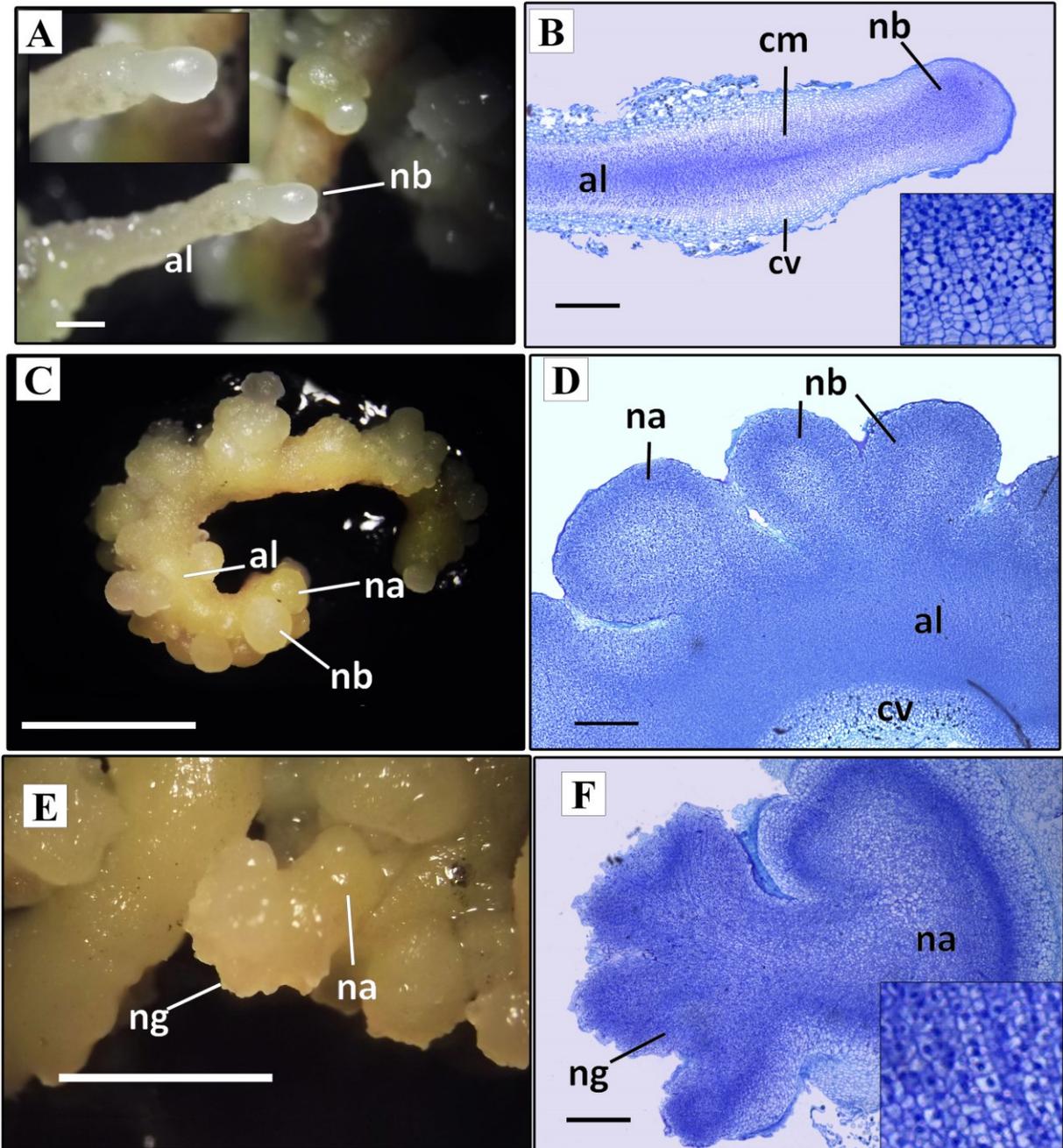


Figura 3 Anatomia das linhagens de calo nodular branco e granular obtido a partir de tecidos foliares de macaúba (*Acrocomia aculeata*). A: Calo alongado apresentando calo nodular branco B: Secção longitudinal do calo alongado evidenciando células meristemáticas na região central e calo nodular branco formado na extremidade C: Calo alongado amarelo apresentando formação de calos nodulares brancos e amarelos em sua superfície. D: Secção do calo alongado apresentando calo nodular branco e amarelo em sua superfície e constituídos de células meristemáticas. E: Calo com aspecto granuloso formado em calos alongados. F: Secção calo granuloso formado por células meristemáticas. Abreviações: (al) calo alongado, (ng) nodular granuloso, (nb) nodular branco, (na) nodular amarelo, (en) estrutura nodular; (cv) células vacuoladas, (cm) células meristemáticas. Escalas: A, C e E:0,5 cm; B e F: 0,2 mm; D, 0,1 mm.

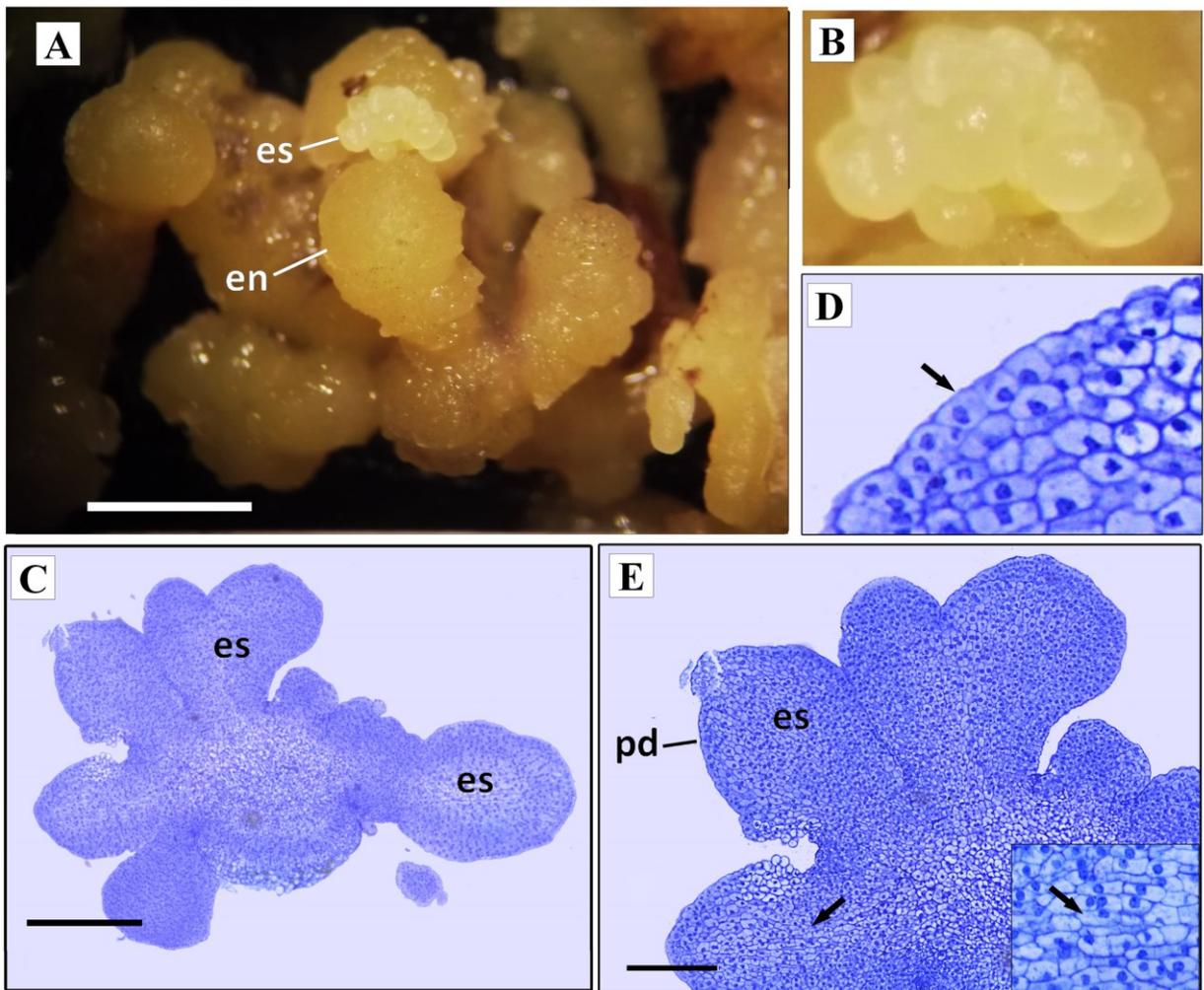


Figura 4 Anatomia dos embriões somáticos obtidos a partir de tecidos foliares de macaúba (*Acrocomia aculeata*). A: Formação de embriões a partir de calo nodular amarelo. B: Detalhe dos embriões somáticos. C: Secção longitudinal dos embriões somáticos. D: Protoderme do embrião somático E: Detalhe dos embriões somáticos delimitados pela protoderme e com células alongadas na região central (seta).. Abreviações: (es) embrião somático, (en) estrutura nodular, (pd) protoderme. Escalas: A: 0,5 cm, B, C e F: 0,1 mm D: 0,25 cm E: 0,2 mm.

Os embriões somáticos foram caracterizadas por apresentar protoderme circundando todo, como encontrado em macaúba (Moura *et al.*, 2010) e tamareira (Aslam *et al.*, 2011). O embrião apresentou ainda pequenas células com características meristemáticas, núcleos e citoplasma densos na região central no embrião somático.

As análises histoquímicas evidenciaram que o acúmulo de amido durante o processo de embriogênese somática concentrou-se próximos aos centros de intensa divisão celular (Figura 5).

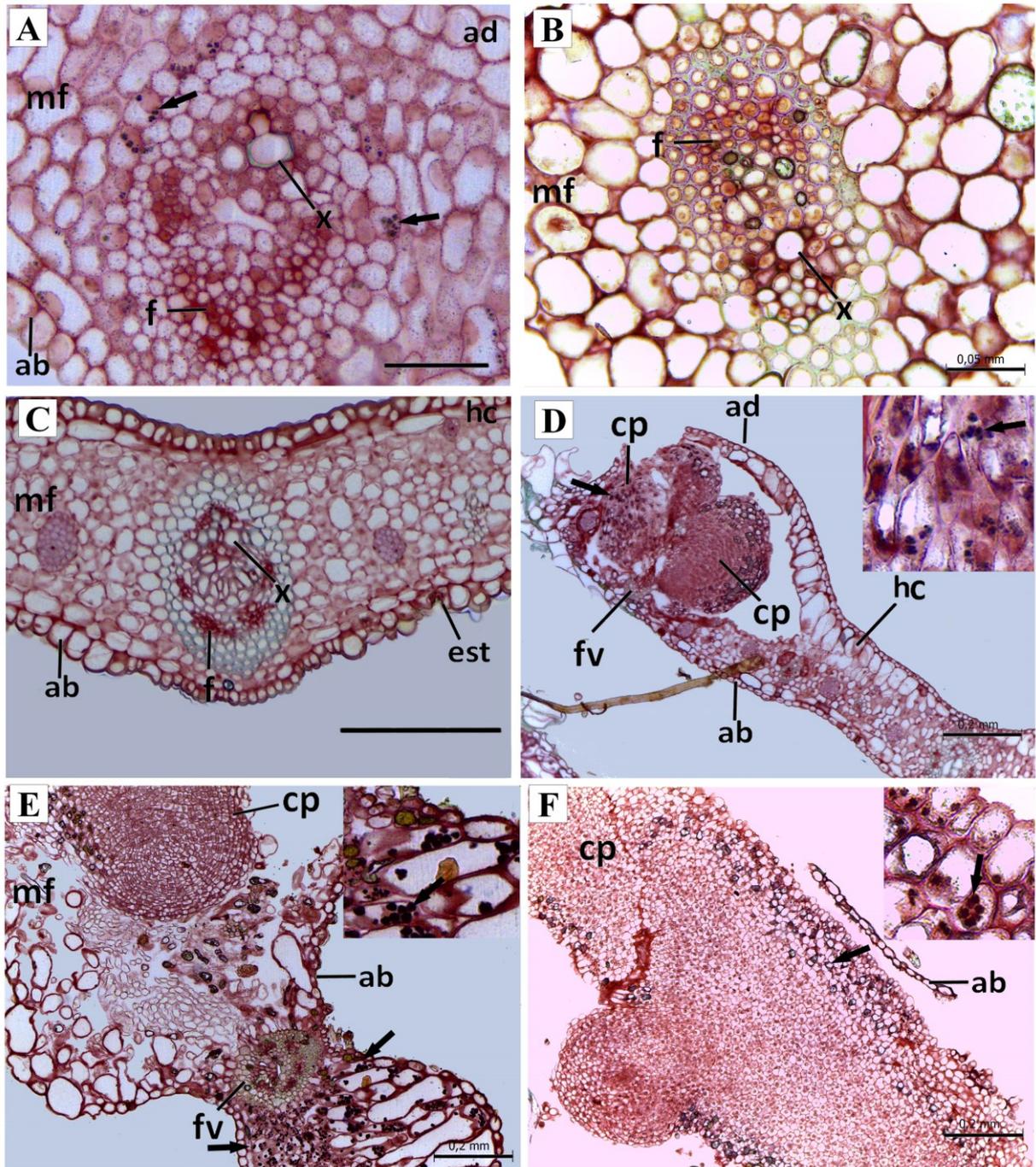


Figura 5 Secção transversal de segmentos foliares de macaúba (*Acrocomia aculeata*) submetidos ao teste com lugol durante a indução da embriogênese somática. A: Explante foliar com três dias de cultivo. Presença de amido na região da bainha do feixe vascular (seta). B: Folha aos 15 dias de cultivo apresentando células hipertrofiadas. C: Folha após 30 dias de indução com ausência de amido. D: Folha aos 60 dias de cultivo com formação de calo e presença de amido em sua extremidade (setas). E: Calo com acúmulo de amido (seta) após 90 dias de cultivo. F: Calo aos 120 dias com acúmulo de amido (setas) e resquício da epiderme foliar. Abreviações: Abreviações: (ab) epiderme abaxial, (ad) epiderme adaxial, (cp) calo primário, (est) estômato, (f) floema, (fv) feixe vascular, (hc) hipoderme, (mf) mesofilo, (x) xilema. Escalas: A,B: 0,05 mm, C,D e F: 0,2 mm

Aos três dias de cultivo foi verificada presença de amido na região da bainha do feixe vascular (Figura 5A). No entanto aos 15 dias e 30 dias não foram observados o acúmulo nessa região (Figura 5B-C). Já, aos 60 dias de indução foi verificada o acúmulo de amido na região próxima a formação dos calos (Figura 5D-F).

O armazenamento de grãos de amido durante a embriogênese somática em palmeiras é comumente relacionado com a diferenciação de células embriogênicas por diversos autores, como observado em *Cocos nucifera* (Magnaval *et al.* 1991; Verdeil *et al.*, 2001) e *Elaeis guineensis* (Schwendiman *et al.*, 1988; Kanchanapoom e Domyoas, 1999).

As células parenquimáticas adjacentes as regiões com intensas divisões celulares apresentam acúmulo de amido, podendo estar relacionado à aquisição de competência embriogênica, já que as células em intensa divisão, geralmente não apresentam acúmulo de amido. Ao estudar a embriogênese somática de *Cocos nucifera*, Magnaval *et al.* (1991) observaram a presença de amido nas células adjacentes às células meristemáticas. Kanchanapoom & Domyoas (1999) também detectaram acúmulo de amido nos calos de *E. guineensis*, indicando que a presença de amido está relacionada a formação de embriões somáticos.

No entanto, não foi observado a presença de amido nas linhagens de calos (Figura 6A-C). Isto pode estar relacionado ao fato desses calos, em geral, serem constituídos por células meristemáticas em intensa divisão ou por consequência da fase em que o calo se encontra. Diferentemente, Pádua *et al.*, (2013) ao analisar o acúmulo de amido em linhagens de calos, observou que calos do tipo nodular bege apresentaram armazenamento de amido, semelhantemente aos embriões.

O embrião somático também não apresentou acúmulo de amido (Figura 6D). Diferentemente, Moura *et al.*, (2010) observou a presença de amido nas células do embrião somático, no entanto, não são abundantes e apresentam distribuição desuniforme. O embrião somático pode seguir a mesma sequência de desenvolvimento do zigótico, e apresentar células embrionárias em divisão ativa, tamanho reduzido, conteúdo citoplasmático denso, núcleos grandes com nucléolos proeminentes, vacúolos pequenos e presença de grãos de amido (Guerra *et al.*, 1999), no entanto, a quantidade de amido também pode mudar dependendo da fase de crescimento do embrião, pois, a divisão e a diferenciação celular demandam energia (Martin *et al.*, 2000).

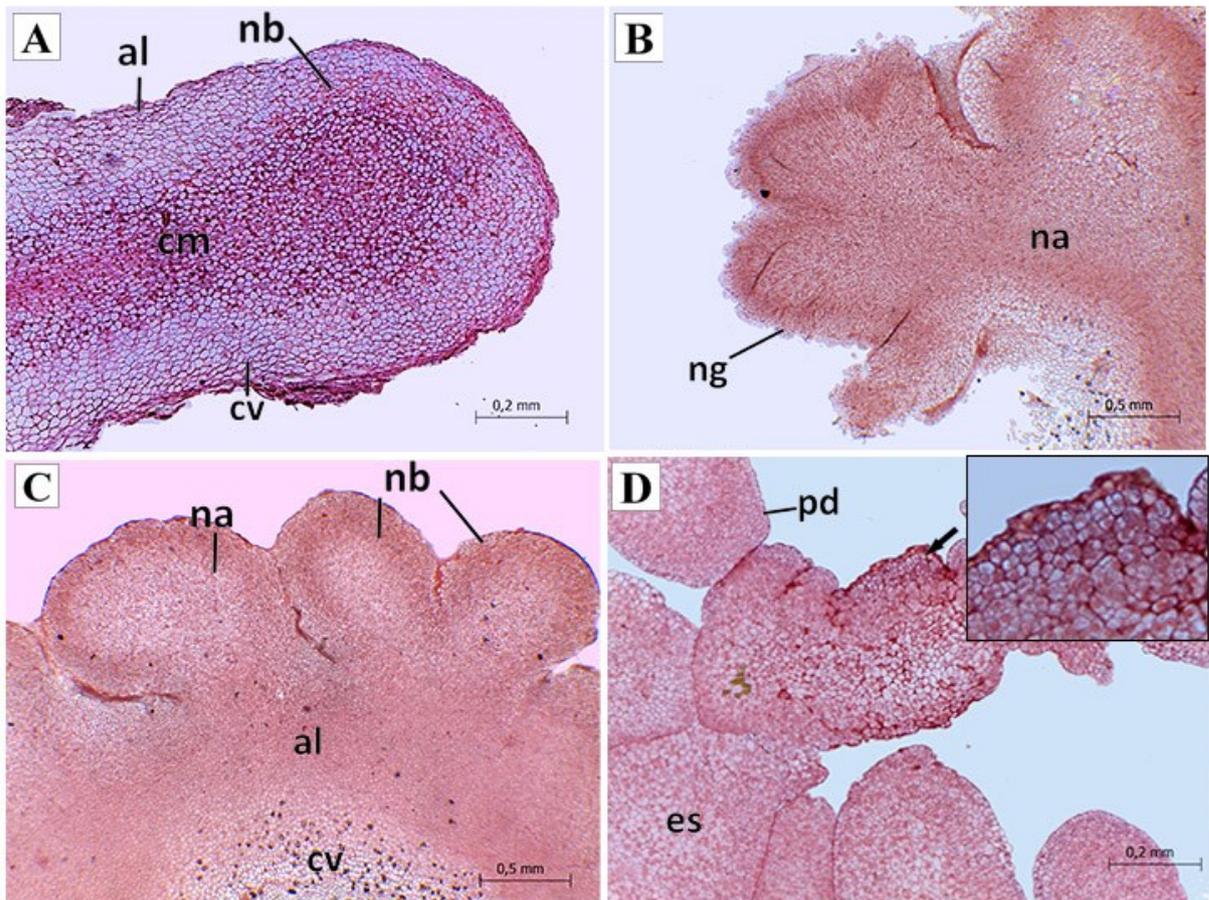


Figura 6 Análise anatômica das linhagens de calo alongado, nodular, granular e do embrião somático obtido a partir de tecidos foliares de macaúba (*Acrocomia aculeata*) submetidos a embriogênese somática e corados com lugol. A: Calo alongado apresentando calo nodular branco na extremidade B: Calo granular formado a partir do calo nodular amarelo. C: Calo alongado amarelo com calos nodulares brancos e amarelos em sua superfície com ausência de amido. D: Embrião somático. Abreviações: (al) calo alongado, (cm) células meristemáticas, (cv) células vacuoladas, (en) estrutura nodular, (na) nodular amarelo, (nb) nodular branco, (ng) nodular granuloso. Escalas: A, D: 0,2 mm, B e C: 0,5 mm

4 Conclusões

- A formação de calos está relacionada ao procâmbio localizado nos feixes vasculares de menor calibre das folhas;
- Aos 60 dias de cultivo em meio de indução os explantes apresentam os primeiros sinais de formação de calos;
- Em meio de multiplicação surgem os calos com aspecto nodular amarelo, nodular esbranquiçado ou granular a partir do calo alongado;
- Os calos primários apresentaram constituição celular meristemática, com células de tamanho reduzido e com razão núcleo:citoplasma elevada;
- Em meio de proliferação ocorreu a formação de embriões somáticos, visualizados em estágio globular e com coloração esbranquiçada.

5 Referências Bibliográficas

Amaral, F. P., Broetto, F., Batistella, C. B., S. M. Jorge, A. Extração e caracterização qualitativa do óleo da polpa e amêndoas de frutos de macaúba [*Acrocomia aculeata* (jacq) lodd. Ex mart] coletada na região de Botucatu, SP Botucatu. **Revista Energia na Agricultura** 26, (1), p.12-20, 2011.

Appezato-Da-Glória, B., Carmello-Guerreiro, S. M. **Anatomia Vegetal**. Viçosa: Editora UFV. p.438, 2003.

Aslam J, Khan S. A., Cheruth A. J, Mujib A., Sharma, M. P, Srivastava P. S. 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 2011.

Bandeira, F. S. **Cultivo in vitro e embriogênese somática de embriões zigóticos de macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Loddiges.)**. 92p. Tese. (Doutorado em Ciências Florestais). Universidade Federal de Viçosa, 2008.

Bartos, P. M. C. Embriogênese somática do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) e caracterização bioquímica e anatômica das diferentes etapas envolvidas no processo. **Dissertação**. Departamento de Botânica, Universidade de Brasília. 2012.

Buffard-Morel, J., Verdeil, J. L., Pannetier, C. Embryogenese somatique du cocotier (*Cocos nucifera* L) a partir d'explants foliaires: études histologiques. **Canadian Journal of Botany**, 70: 735-741, 1992.

Ciconini, G. Caracterização de frutos e óleo de polpa de macaúba dos biomas Cerrado e Pantanal do estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Dissertação**. Campo Grande, Fev. 2012.

Euwens C. J. 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, 1976.

Fernando, S. C, Verdeil, J. L., Hocher, V., Weerakoon L. K., Hirimburegama K. Histological analysis of plant regeneration from plumule explants of *Cocos nucifera*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** 72: 281-284. 2003.

Gueye B, Morcillo F, Collin M, Gargani D, Overvoorde P, Aberlenc- Bertossi F, Tranbarger, Sane D, Tregear Jw, Borgel A, Verdeil F. 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. 2009.

Hartmann, H.T., Kester D. E., Davies F. T. Jr, Geneve, R. L. **Plant propagation, principles and practices**. Prentice Hall, New Jersey. 2002.

Johansen, D. A. **Plant microtechnique**. McGraw-Hill, New York, 1940.

Ledo, A., S. Lameira, O. A., Benbadis, A. K., Menezes, I. C., Ledo, C. A. S., Oliveira, M. S. P. Cultura *in vitro* de embriões zigóticos de açaizeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura.**, Jaboticabal - SP, 23, (3), 468-472, 2001.

Ledo A. S., Lameira O. A., Menezes I.C. Embriogênese somática e regeneração de plantas em açaizeiro. Rio Branco: **Boletim de Pesquisa-Embrapa Acre**, 34: 22. 2002.

Ledo, A. da S. *et al.*. Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos e aclimação de plântulas de coqueiro-anão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, 42, (2), p.147-154, 2007.

Lorenzi, H., Souza, H. M., Medeiros-Costa, J. T., Cerqueira, L. S. C., Behr, N. **Palmeiras do Brasil: exóticas e nativas** Nova Odessa: Editora Plantarum, 1-20, 1996.

Lorenzi, H. **Árvores Brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**, Nova Odessa, SP:Instituto Plantarum, 1 (3) 272. 2000.

Lorenzi, H, Souza, H, Costa, J. T. M, Cerqueira LSC, Ferreira E. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 352. 2004.

Lorenzi, G. M. A. *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd ex Mart – **Arecaceae: bases para o extrativismo sustentável**. Tese (Doutorado em Produção Vegetal), Curitiba, UFPR, 156 p. 2006.

Lorenzi H, Noblick L, Kahn F, Ferreira E. Flora Brasileira: Arecaceae (Palmae). **Instituto Plantarium**, Nova Odessa, Brasil, 394p 2010.

Luis, Z. G. Estratégias para a embriogênese somática e conservação *ex situ* de germoplasma de macaúba [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.]. **Tese (doutorado)** - Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica, 2013.

Luis, Z. G., & Scherwinski-Pereira, J. E. An improved protocol for somatic embryogenesis and plant regeneration in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from mature zygotic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, 1-12. 2014.

Lorenzi, G. M. A. C., Negrelle, R. R. B. *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex mart.: aspectos ecológicos, usos e potencialidades. **UFPR, SER (Sistema Eletrônico de Revistas)**, v. 7, n. 1, 2006 Disponível em: <http://www.entabanbrasil.com.br/downloads/Macauba_Aspectos-Ecologicos_Revisao_UFPR.pdf> Acessado em 20 de março, 2013.

Henderson, A., Galeano, G., Bernal, R. **Field Guide to the Palms of the Americas**. New Jersey: Princeton University. 166-167, 1995.

Matsimbe, S. F. S. Utilização de características ópticas para estimar o Teor de óleo e volume do mesocarpo nos frutos de Macaúba. **Dissertação**. Viçosa, Minas Gerais. 72 2012.

Moura, E. F. Embriogênese somática em macaúba: indução, regeneração e caracterização anatômica. **Dissertação** – Viçosa: UFV, 2007.

Moura, E. F. Ventrella, M. C., Motoike, S. Y. Anatomy, histochemistry and ultrastructure of seed and somatic embryo of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). **Scientia Agricola** (Piracicaba, Braz.) 67 (4) Piracicaba. 2010.

Murashige, T. & Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia**, 15, 473-497.1962.

Namasivayam, P. Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. **Plant Cell Tissue Organic Culture** 90:1–8 2007.

Padilha, J. H. D. Embriogênese somática em *Acrocomia aculeata* (jacq.) Lodd. Ex mart. Utilizando a técnica do TCL (“Thin Cell Layer”). **Dissertação**. Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal do Paraná. 2013.

Pádua, M. S., Paiva, L.V., Labory, C. R.G., Alves, E. Stein, V. C. Induction and characterization of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) pro-embryogenic masses. **An Acad Bras Cienc** (2013) 85 (4) 2013

Gueye, B., Morcillo F., Collin M., Gargani D., Overvoorde P., Aberlenc Bertossi F., Tranbarger T.J., Sane D, Tregear, J.W., Borgel, A., Verdeil J. 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. 2009

Gueye, B, Said-Ahmed H, Morcillo F., Borgel A, D. Sané D, Hilbert JL, Verdeil J.L., Blervacq A.S. 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. 2009

Ribeiro L. M., Souza P. P., Rodrigues Jr. A. G., Oliveira T. G. S., Garcia Q. S. Overcoming dormancy in macaw palm diaspores, a tropical species with potential for use as bio-fuel. **Seed Science and Technology**., 39: 303-317. 2011.

Rodrigues, L. R., de Oliveira, J. M. S., & de Araujo Mariath, J. E. Anatomia vegetal aplicada ao estudo de sistemas androgênicos *in vitro*. **Revista Brasileira de Biociências**, 2(3):159. 2004

Rose, R. J., Wang, X. D., Nolan, K. E., Rolfe, B. G. 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 2006

Rubio N. A., Silva F. G., Sales J. F., Reis E. F., Silva M. V. V. Souza AL. Dormancy breaking in macaw palm [*Acrocomia acleata* (Jacq.) Loddiges e Mart.] seeds. **Acta Scientiarum Agronomy**. 2011.

Sané, D. Histocytological analysis of callogenesis and somatic embryogenesis from cell suspensions of date palm (*Phoenix dactylifera*). **Annals of Botany** 98: 301-308. 2006

Sané, D. Aberlenc-Bertossi F, Diatta Lid, Guèye B, Daher A, Sagna M, Duval Y, Borgel A. Influence of growth regulators on callogenesis and somatic embryo development in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) Sahelian cultivars. **The Scientific World Journal**, 1-8. 2012

Schwendiman, J., Pannetier, C., Michaux-Ferriere, N. Histology of somatic embryogenesis from leaf explants of the oil palm *Elaeis guineensis*. **Annals of Botany**, 62: 43-52, 1988.

Scherwinski-Pereira, J. E., Guedes, R. S. Fermino, P. C. P., Silva, T. L., Costa, F. H. S. Somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm using the thin cell layer technique. **In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant** 46: 378-385. 2010

Steinmacher, D.A *et al.* Somatic embryogenesis from immature peach palm inflorescence explants: towards development of an efficient protocol. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hange, 89, (1): 15-22, 2007.

Steinmacher D. A. Guerra M. P., Saare-Surminski, K., Lieberei, R.. A temporary immersion system improves *in vitro* regeneration of peach palm through secondary somatic embryogenesis. **Annals of Botany** 108: 1463–1475, 2011.

Teixeira, J. B., Söndahl, M. R., Kirby, E. G. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of oil palm. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 34: 227-233. 1993.

Teixeira, J. B., Söndahl, M. R., Kirby, E. G. Asexual embryogenesis in mature embryo callus of palms (*Acrocomia aculeata* and *Elaeis oleifera*). In: SOMERS, D.A., GENGENBACH, B.G., BIESBOER, D.D., BACKETT, W.P., GREEN, C.E. (edit.). **Resumos Congress International Plant Tissue Culture**, Minneapolis, EUA, IAPTC, p191, 1986.

Teixeira, L. C. Potencialidades de oleaginosas para produção de biodiesel. **Informe Agropecuário** 26: 18-27, 2005.

Ventrella, M. C., Almeida, A. L., Nery, L. A., & Coelho, V. P. D. M. Métodos histoquímicos aplicados às sementes. Viçosa, Ed. UFV. 2013