

MANUELA MARIA CAVALCANTE GRANJA

**OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DE LINHAGENS EMBRIOGÊNICAS *in vitro* A
PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS EM FAMÍLIAS DE ACROCOMIA
ACULEATA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de Doctor Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

G758o
2014
Granja, Manuela Maria Cavalcante, 1983-
Obtenção e manutenção de linhagens embriogênicas in vitro a partir de
embriões zigóticos em famílias de *Acrocomia aculeata* / Manuela Maria
Cavalcante Granja. - Viçosa, MG, 2014.
x, 53f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Sérgio Yoshimitsu Motoike.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.44-51.

1. Macaúba - Melhoramento genético. 2. Embriogênese somática. 3.
Famílias de polinização aberta. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Fitotecnia. Programa de Pós-graduação em Genética e
Melhoramento. II. Título.

CDD 22. ed. 633.85

MANUELA MARIA CAVALCANTE GRANJA

**OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DE LINHAGENS EMBRIOGÊNICAS *in vitro* A
PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS EM FAMÍLIAS DE ACROCOMIA
ACULEATA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de Doctor Scientiae.

APROVADA: 12 de junho de 2014.

Mychelle Carvalho

Wagner Campos Otoni

Edgard Augusto de Toledo Picoli
(Coorientador)

Pedro Crescêncio Souza Carneiro
(Coorientador)

Sérgio Yoshimitsu Motoike
(Orientador)

Aos meus pais, irmã, tia e avô (in memoriam).

Dedico

*“Se você consegue sonhar algo,
consegue realizá-lo.”*

(Walt Disney)

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo e principalmente por sempre colocar no meu caminho pessoas maravilhosas.

Aos meus pais Delma de Oliveira Cavalcante Granja e Manoel de Siqueira Granja Junior, pelo amor, pelas palavras de incentivo que me motivaram, tornando meu sonho realidade.

A minha irmã Nathalia Maria Cavalcante Granja por sua cumplicidade, pelos conselhos, pelo apoio e pela linda amizade.

Ao meu avô Granja (in memorian) e a minha tia Ana Maria de Moraes Granja, pelo grande carinho e pelas palavras de incentivo.

Ao meu orientador Sérgio Y. Motoike pela confiança, pelo apoio, pelas palavras de motivação e ensinamentos.

À pesquisadora D.Sc. Kacilda Naomi Kuki pela disposição em ajudar a qualquer hora e pelas valiosas sugestões.

Aos conselheiros Edgard Augusto Toledo Picoli e Pedro Crescêncio Souza Carneiro pela ajuda, disponibilidade, dedicação e valiosas contribuições.

Aos membros da banca, Wagner Campos Otoni e Mychelle Carvalho pela ajuda e contribuições.

Ao professor D.Sc Carlos Nick e a D.Sc Fabiana Souza pelos conselhos e pela amizade, servindo de exemplo de determinação.

Ao doutorando Sebastián Giraldo Montoya pelo amor, pelo carinho, cumplicidade e pelas palavras de motivação que possibilitaram superar as dificuldades nas etapas finais do doutorado.

Às amigas, Ana Paula de Souza Andrade, Thais Roseli Correa, Patrícia Souza, Neia Lopes, Angélica Plata, Aline Pitol, Cleriane André, Brenda Neves Porto, Pollyana Ferreira, Maria Lucília Machado e Taline Silva pelo companheirismo e pelos inesquecíveis dias compartilhados.

Aos colegas do Laboratório de Cultura de Células e Tecidos Vegetais (LCCTV) da

fruticultura, principalmente para Débora Durso, Maria Clara Martino, Melina Gonçalves e ao técnico de laboratório Francisco pela grande ajuda.

Ao laboratório de Anatomia Vegetal, principalmente às pós-graduandas Luana, Lais e Andrea pela ajuda e também as técnicas de laboratório Aurora e Patrícia pela simpatia e disposição.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento pela oportunidade de formação.

Ao grupo REMAPE pelas contribuições e aprendizado ao longo dos quatro anos.

À CAPES, CNPq e PETROBRÁS pelo apoio financeiro.

BIOGRAFIA

Manuela Maria Cavalcante Granja, filha de Manoel de Siqueira Granja Junior e Delma de Oliveira Cavalcante Granja, irmã de Nathalia Maria Cavalcante Granja, nasceu em 21 de outubro de 1983 em Recife, Pernambuco – Brasil. Ingressou, em 2003, no curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) sede de Recife, graduando-se Bióloga em Setembro de 2007. Em 2008, ingressou no mestrado em Agronomia com ênfase em Melhoramento Genético de Plantas da mesma Universidade, tornando-se mestre em Dezembro de 2009. Iniciou o doutorado no programa de Genética e Melhoramento da Universidade Federal de Viçosa (UFV) no ano de 2010, submetendo-se à defesa da tese em 12 de junho de 2014.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	5
3. MATERIAL E MÉTODOS	6
3.1 Avaliação de progênies de matrizes de <i>A. aculeata</i> quanto à resposta à indução de embriogênese somática	6
3.1.1 Material vegetal e condições de cultivo.....	6
3.1.2 Indução de embriogênese somática	6
3.1.3 Análise de agrupamento.....	8
3.2 Aprimoramento do processo de embriogênese somática	8
3.2.1 Multiplicação das linhagens embriogênicas (LEs).....	8
3.2.2 Maturação e regeneração de embriões somáticos.....	9
3.2.3 Germinação e conversão dos embriões somáticos	10
3.3 Análise histológica.....	10
3.4 Análise dos dados	11
4. RESULTADOS.....	11
4.1 Avaliação de progênies de matrizes de <i>A. aculeata</i> quanto a resposta à indução de embriogênese somática	11
4.1.1 Indução de embriogênese somática	11
4.1.2 Análise de agrupamento.....	15
4.2 Aprimoramento do processo de embriogênese somática	20
4.2.1 Multiplicação das linhagens embriogênicas (LEs).....	21
4.2.2 Maturação e regeneração dos embriões somáticos.....	22
4.2.3 Germinação e conversão dos embriões somáticos	23
4.3 Análise histológica.....	27
4.3.1 Indução de embriogênese somática	27
4.3.2 Multiplicação das linhagens embriogênicas (LEs).....	27
4.3.3 Maturação e regeneração dos embriões somáticos.....	28
4.3.4 Germinação e conversão dos embriões somáticos	28
5. DISCUSSÃO	35
6. CONCLUSÕES	43
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
8. ANEXOS	52

RESUMO

GRANJA, Manuela Maria Cavalcante, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Junho de 2014. **Obtenção e manutenção de linhagens embriogênicas in vitro a partir de embriões zigóticos em famílias de *Acrocomia aculeata*.** Orientador: Sérgio Yoshimitsu Motoike. Coorientadores: Edgard Augusto Toledo Picoli e Pedro Crescêncio Souza Carneiro.

O estabelecimento de protocolo eficiente para a obtenção e manutenção de massas pró-embriogênicas capazes de produzir embriões somáticos é requerido para a propagação in vitro de *A. aculeata* em larga escala. Diante do efeito significativo do genótipo frente à indução a embriogênese somática in vitro, tornou-se indispensável a avaliação de progênies de diferentes matrizes de *A. aculeata* de polinização aberta. Neste intuito, os objetivos do trabalho foram avaliar progênies de matrizes de *A. aculeata* de polinização aberta quanto à indução de embriogênese somática in vitro e aprimorar o processo de embriogênese somática da espécie a partir de embriões zigóticos. Embriões zigóticos maduros oriundos de 19 famílias de *A. aculeata* foram inoculados em meio Y3 contendo 9 μM de Picloram e/ou Dicamba, ambos combinados com 0,9 μM de 2iP. As famílias apresentaram respostas significativamente diferentes para os caracteres embriões intumescidos (EI), porcentagem de embriões calejados (ECAL), porcentagem de calos embriogênicos (CEM) e porcentagem de oxidação (OXID), na fase de indução de embriogênese somática. Por meio da análise de diversidade genética foi possível separar as 19 famílias em 5 grupos no meio suplementado com Picloram, enquanto que, em meio suplementado com Dicamba, foram formados 4 grupos de dissimilaridade. O meio suplementado com Picloram foi mais eficiente em relação aos caracteres EI, ECAL, CEM, enquanto que o meio suplementado com Dicamba foi superior para os caracteres números de linhagens embriogênicas (LEs) e OXID. Das 19 famílias testadas, 16 apresentaram a capacidade de formar LEs, as quais se encontram em meio de multiplicação com 18 μM de Picloram por mais de 24 meses sem prejuízo da sua competência embriogênica. As LEs apresentaram aparência granular, coloração amarela e aspecto translúcido. As massas pró-embriogênicas (MPEs) formadas foram maturadas com maior eficiência em meio com 5,5 μM de ANA combinado com 2,5 μM de 2iP suplementado com carvão ativado, sendo caracterizadas pelo alongamento e mudança de coloração de amarelo translúcido para branco opaco. Apesar das famílias se comportarem distintamente em cada meio de germinação, a família 9 apresentou o maior número de embriões somáticos germinados (NEG) em meio contendo GA₃. O

processo de germinação dos embriões zigóticos e somáticos são similares, ocorrendo primeiramente o alongamento do pecíolo cotiledonar e o crescimento do haustório. A análise histológica permitiu comprovar a formação dos embriões somáticos com um sistema vascular fechado. Verificou-se também a presença de uma camada mucilaginosa peculiar na protoderme formada, característica que poderá servir de marcador do processo de embriogênese para a *A. aculeata*. O presente trabalho é pioneiro na obtenção e manutenção de linhagens embriogênicas e na análise da resposta *in vitro* de diferentes famílias de *A. aculeata*.

ABSTRACT

GRANJA, Manuela Maria Cavalcante, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2014. **Obtainment and maintenance of embryogenic lineages in vitro from zygotic embryos in families of *Acrocomia aculeata***. Adviser: Sérgio Yoshimitsu Motoike. Co-advisers: Edgard Augusto Toledo Picoli and Pedro Crescêncio Souza Carneiro.

The establishment of an efficient protocol for obtainment and maintenance of pro-embryogenic masses able to produce somatic embryos is required for in vitro large scale propagation of *A. aculeata*. The significant effect of genotype on inducing somatic embryogenesis in vitro is essential to evaluate progenies of different arrays of open-pollinated *A. aculeata*. To this end, the aims of this work were to evaluate progeny arrays of open-pollinated *A. aculeata* by induction of somatic embryogenesis in vitro and optimize the process of somatic embryogenesis of this species from zygotic embryos. Mature zygotic embryos from 19 families of *A. aculeata* were inoculated in Y3 containing 9 μM of Picloram and/or Dicamba, both combined with 0.9 μM of 2iP. Families showed significantly different responses to the characters swollen embryos (SE), percentage of callused embryos (CALE), percentage of embryogenic callus (EMCA), and percentage of oxidation (OXID), in the induction phase of somatic embryogenesis. Through analysis of genetic diversity, the 19 families were separated in 5 groups in medium supplemented with Picloram, whereas in medium supplemented with Dicamba dissimilarity formed 4 groups. The medium supplemented with Picloram was more efficient on the characters SE, CALE, and EMCA, while medium supplemented with Dicamba was superior to the characters number of embryogenic lineages (ELINs) and OXID. Of the 19 families tested, 16 showed the ability to form ELINs, which are in multiplication medium with 18 μM of Picloram for more than 24 months without prejudice to their embryogenic competence. The ELINs showed granular appearance, yellow color and translucent appearance. The produced pro-embryogenic masses (PEMs) were more efficiently matured in medium with 5.5 μM of ANA combined with 2.5 μM of 2iP supplemented with activated charcoal, being characterized by elongation and changes in color from translucent yellow to opaque white. Although families behave distinctly in each germination medium, the family 9 had the highest number of germinated somatic embryos (GSE) in medium containing GA_3 . The process of germination of zygotic and somatic embryos is similar, occurring primarily elongation of the cotyledon petiole and the growth of haustoria. Histological

analysis allowed us to verify the formation of somatic embryos with a closed vascular system and the presence of a peculiar mucilaginous layer in the protoderm formed, a characteristic that may serve as a marker for the process of embryogenesis of *A. aculeata*. This study is a pioneer in obtainment and maintenance of embryogenic lineages and in vitro response analysis of different families of *A. aculeata*.

1. INTRODUÇÃO

A macaúba (*Acrocomia aculeata*) é uma palmeira nativa de florestas tropicais que produz frutos com alto teor de óleo. Devido a sua rusticidade se adapta a condições climáticas adversas, apresentando ampla distribuição geográfica, sendo encontrada ao longo da América tropical e subtropical, desde o sul do México até a Argentina (Henderson et al., 1995).

A utilização da *A. aculeata* é vasta, podendo servir de alimentação para humanos e animais, bem como fonte de energia gerada a partir do carvão proveniente do endocarpo. Entretanto, é o caráter oleaginoso dos frutos que confere a essa espécie potencial agrícola e comercial, sendo atualmente apontada como uma das mais promissoras espécies oleaginosas para a produção de biocombustível.

Segundo Motta et al. (2002), a ocorrência natural da *A. aculeata* é observada em áreas de pastagens, acompanhando vegetação primitiva e de fisionomia florestal. É considerada uma planta pioneira devido à grande plasticidade adaptativa da espécie, contribuindo para a recuperação de pastagens, onde pode ser empregada como vegetação arbórea em sistema silvipastoril e na redução da emissão de CO₂, conseqüentemente, minimizando os efeitos do aquecimento global.

Um dos desafios para a plena exploração agrícola da *A. aculeata* é que esta palmeira ainda não é domesticada. Para o seu cultivo comercial, como de qualquer outra cultura, esta espécie necessita ser adaptada, buscando o desenvolvimento de técnicas de cultivo e uniformidade das plantas para a garantia de produtividade e qualidade do seu produto. Plantas nativas desta espécie apresentam grande variabilidade na forma, na produtividade e no conteúdo de óleo de seus frutos, consequência de seu sistema de reprodução misto (Scariot et al., 1991). No momento inexistem cultivares desenvolvidas para plantio comercial da espécie, o que justifica o desenvolvimento de um programa de melhoramento genético para esse fim.

O melhoramento genético da *A. aculeata* é demorado por se tratar de espécie perene de reprodução exclusivamente sexuada e de ciclo reprodutivo longo (Manfio et al., 2012), podendo levar décadas para atingir seu objetivo. O caminho mais curto para a obtenção de cultivares de *A. aculeata* é a clonagem *in vitro* a partir da indução da embriogênese somática de plantas elites selecionadas.

Devido a sua importância econômica, vários representantes da família *Arecaceae* foram objeto de estudo da técnica de embriogênese somática. Dentre eles figuram *Cocos nucifera* (Pérez-Núñez et al., 2006; Fernando et al., 2003), *Elaeis guineensis* (Balzon et al., 2013; Silva et al., 2012), *Phoenix dactylifera* (Sané et al., 2012; Zouine e Hadrami et al., 2007), *Euterpe oleracea* (Scherwinsk-Pereira et al., 2012; Ledo et al., 2002), *Bactris gasipaes* (Maciel et al., 2010; Steinmacher et al., 2007a) e incluindo também a *A. aculeata* (Moura et al., 2009; Luis e Scherwinski-Pereira, 2014).

Porém, estudos de propagação clonal em *A. aculeata*, ainda são incipientes, evidenciando a necessidade do aprimoramento da técnica para a espécie. Os únicos casos de sucesso com indução e regeneração de plântulas *in vitro* por embriogênese somática em *A. aculeata* publicado até o momento foram relatados por Moura et al. (2009), o qual foi o pioneiro na descrição do processo de embriogênese somática na espécie e por Luis e Scherwinski-Pereira (2014). Entretanto, segundo Moura et al. (2009), o processo apresenta dificuldades para a multiplicação das massas embriogênicas e para a maturação dos embriões somáticos, enquanto que Luis e Scherwinski-Pereira (2014) não conseguiram estabelecer protocolo de sincronização de linhagens embriogênicas competentes, a fim de aumentar a taxa de plantas regeneradas.

A embriogênese somática é um processo no qual células somáticas desenvolvem estruturas semelhantes a embriões zigóticos, denominados embriões somáticos. Estes se regeneram em plantas completas, seguindo padrões de diferenciação similares aos embriões zigóticos. O embrião somático é morfo-fisiologicamente similar ao embrião zigótico, apresenta estrutura bipolar, sistema vascular fechado, sem conexão com os tecidos adjacentes (Jiménez, 2001; Dodeman et al., 1997).

Vários fatores podem influenciar o processo de embriogênese somática, tais como o genótipo, a fonte de explante, o meio de cultivo, o tipo e a concentração de reguladores de crescimento (Viñas e Jiménez, 2011). O efeito significativo do genótipo no sucesso da embriogênese somática sugere que fatores genéticos são primordiais na determinação do nível da resposta *in vitro* (Sané et al., 2012; Silva et al., 2012; Paim Pinto et al., 2011; Henry et al., 1994). A influência do genótipo em relação à capacidade embriogênica é relatada na família *Arecaceae*, sendo as espécies mais estudadas *Phoenix dactylifera* (Sané, et al., 2012), *Elaeis guineenses* (Silva et al., 2012) e *Bactris gasipaes* (Steimacher et al., 2011b).

A indução de embriogênese somática está associada à utilização de auxinas e citocininas, principais reguladores de crescimento envolvidos no controle da divisão

celular e diferenciação dos tecidos (Fehér et al., 2003). Dentre as auxinas mais utilizadas na indução de embriogênese somática em palmáceas, pode ser citado o 2,4-D (Gueye et al., 2009; Saldanha et al., 2006; Eke et al., 2005; Ledo et al., 2002). Porém, outras auxinas como o Picloram e o Dicamba tem se mostrado eficientes (Sanputawong e Te-chato, 2011; Steinmacher et al., 2011; Maciel et al., 2010; Steinmacher et al., 2007a,b).

A combinação de auxinas e citocininas na indução de embriogênese somática é relatada para *Elaeis guineensis* (Rajesh et al., 2003), *Phoenix dactylifera* (Zouine et al. 2005) e *Cocos nucifera* (Pérez-Núñez et al., 2006). O BAP é a citocinina mais comumente utilizada na indução de embriogênese somática (Guedes et al., 2011; Maciel et al., 2010; Zouine e Hadrami, 2007), porém a utilização do 2iP também é eficiente na formação de massas pró-embriogênicas (Khierallah e Hussein, 2013; Al-Khayrie e Al-Bahrany, 2012; Eke et al., 2005).

Os diferentes meios de cultura utilizados no processo de embriogênese somática diferem essencialmente na concentração dos macro e micronutrientes, vitaminas, compostos orgânicos, fonte de carbono e outras substâncias complexas, normalmente específicas para cada etapa do processo e para a espécie utilizada. As formulações de meio de cultura mais utilizadas para embriogênese somática em palmáceas compreendem o meio MS (Murashige e Skoog, 1962) (Balzon et al., 2013; Silva et al., 2012; Thuzar et al., 2011; Guedes et al., 2011; Steinmacher et al., 2011; Wang et al., 2010) e o meio Y₃ (Eeuwens, 1978) (Moura et al., 2009; Pérez-Núñez et al., 2006; Fernando et al., 2003; Chan et al., 1998).

A embriogênese somática pode ser induzida, geralmente, a partir de qualquer tipo de explante, tais como, gemas apicais (Khierallah e Hussein, 2013), inflorescências (Guedes et al., 2011), raízes (Yang et al., 2010), embriões zigóticos imaturos (Maciel et al., 2010) e maduros (Moura et al., 2009). A utilização de embriões zigóticos é ponto de partida para o desenvolvimento de protocolo de clonagem, por ser um tecido ontogeneticamente mais jovem e conseqüentemente mais responsivo, o que reduz o tempo para a obtenção do processo (Thuzar et al., 2011; Abdullah et al., 2005). Essa técnica é especialmente importante no desenvolvimento de protocolos para a clonagem de matrizes de planta perenes, pois o comportamento da planta matriz ao processo de clonagem pode ser predito a partir da resposta de seus embriões zigóticos (descendentes), permitindo a formulação de meios de cultura mais adequados para a sua clonagem. Além disso, esse estudo possibilita selecionar matrizes mais responsivas à

clonagem, eliminando genótipos recalcitrantes nos programas de melhoramento genético.

O sucesso do programa de clonagem de plantas via embriogênese somática depende da eficiência do protocolo em gerar grande número de plantas. Essa eficiência está diretamente relacionada à capacidade do protocolo em proporcionar a alta frequência de multiplicação de linhagens embriogênicas e a sua manutenção por longo período de tempo.

2. OBJETIVOS

- Avaliar progênies de matrizes de *A. aculeata* de polinização aberta quanto à resposta ao processo de indução de embriogênese somática *in vitro*;
- Aprimorar o processo de embriogênese somática de *A. aculeata* a partir de embriões zigóticos para permitir a alta frequência de multiplicação das linhagens embriogênicas e a sua manutenção por longo período de tempo, sem a perda da capacidade de regeneração.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Avaliação de progênies de matrizes de *A. aculeata* quanto à resposta à indução de embriogênese somática

3.1.1 Material vegetal e condições de cultivo

Foram selecionadas 19 matrizes de *A. aculeata* de populações naturais, em fase produtiva, localizadas no município de Santa Luzia – MG, Brasil (19° 46' 11" S, 43° 51' 05" W, 751 m altitude) situado na zona metalúrgica do Estado de Minas Gerais em áreas de pastagens margeadas por floresta subcaducifólia com alto grau de antropização. A seleção das matrizes foi realizada com base no índice de massa processável (IMP) dos frutos (Manfio et al., 2011).

Foram obtidos 300 frutos de cada matriz, os quais foram secos a temperatura ambiente para facilitar a separação da semente aderida ao endocarpo. Posteriormente, 60 sementes foram separadas por matriz para a obtenção dos embriões zigóticos, os quais foram denominados de famílias de polinização aberta. Os embriões zigóticos foram submetidos a tratamento de desinfestação com hipoclorito de sódio (NaClO) a 0,1 % por 10 min, e posteriormente, foram enxaguadas em água deionizada estéril por três vezes, em condições assépticas.

3.1.2 Indução de embriogênese somática

Os embriões zigóticos obtidos foram inoculados individualmente em tubos de ensaio (25 x 150 mm), contendo 10 mL de meio Y₃ (Eeuwens, 1978), suplementado com: 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 100 mg L⁻¹ de glutamina, 100 mg L⁻¹ de arginina, 100 mg L⁻¹ de asparagina, 100 mg L⁻¹ de ácido cítrico, 1,0 g L⁻¹ de caseína hidrolisada, 0,9 µM de 2iP (dimetil-alil-amino-purina) e solidificado com 2,0 g L⁻¹ de Phytigel. Duas auxinas foram testadas nessa fase: TI-1) 9,0 µM de Picloram (Ácido 4-amino-3,5,6-tricloro picolínico) e TI-2) 9,0 µM de Dicamba (Ácido 3,6 dicloro-2-metoxibenzoico) (Tabela 1). O meio de cultura teve o pH ajustado para 5,7 ± 0,01 antes de ser autoclavado por 20 min. a 121 °C e 1,5 atm.

Tabela 1: Tratamentos utilizados nas diversas fases de embriogênese somática de *A. aculeata* para fins de clonagem

Fases	Trat.	Auxina (μM)			GA_3	Citocinina (μM)	Putrescina (μM)	Carvão (g L^{-1})
		Picloram	Dicamba	ANA		2iP		
Indução	TI-1	9,0	-	-	-	0,9	-	-
	TI-2	-	9,0	-	-	0,9	-	-
Multiplicação	TM-1	18,0	-	-	-	-	-	-
	TM-2	36,0	-	-	-	-	-	-
	TM-3	-	18,0	-	-	-	-	-
	TM-4	-	36,0	-	-	-	-	-
Maturação	TMA-1	-	-	5,55	-	2,50	1000	3,0
	TMA-2	-	-	0,55	-	0,25	1000	-
Germinação	TG-1	-	-	-	-	-	1000	-
	TG-2	-	-	-	-	-	1000	-
	TG-3	-	-	-	0,55	0,25	1000	-
	TG-4	-	-	0,55	-	0,25	1000	-

TI: Tratamento de indução; TM: Tratamento de multiplicação; TMA: Tratamento de maturação e TG: Tratamento de germinação.

O experimento foi conduzido em blocos casualizados em esquema fatorial 19×2 , com 3 repetições. A parcela foi constituída de 10 tubos de ensaio vedados com tampas de polipropileno, contendo um embrião zigótico por tubo, oriundos de cada família. Os explantes foram mantidos em sala de cultura, no escuro, a 25 ± 2 °C. Após incubação os embriões zigóticos foram acompanhados semanalmente para averiguação de contaminações.

Aos 30 dias foi determinada a porcentagem de embriões intumescidos (EI) e aos 90 dias a porcentagem de embriões calejados (ECAL). Após esse período, os ECAL foram transferidos para placas de Petri de poliestireno (J. Prolab[®], Brasil) contendo 30 mL do mesmo meio onde foram originados. Posteriormente as placas de Petri foram revestidas com filme plástico de cloreto de polivinila (Goodyear[®], São Paulo, Brasil).

Aos 120 dias de inoculação os calos formados foram classificados em embriogênicos e não embriogênicos, conforme Moura et al. (2009). Foi determinada a porcentagem de explantes que formaram calos embriogênicos (CEM) e a taxa de oxidação (OXID), baseada no escurecimento total do explante. Posteriormente, os calos embriogênicos foram subcultivados para placas de Petri de poliestireno com 30 mL do mesmo meio onde foram originados, para a obtenção de linhagens embriogênicas (LEs),

as quais foram devidamente identificadas. Após 30 dias de incubação, em mesmo ambiente de indução foram avaliados o número de LEs obtidas.

Para os dados dos caracteres avaliados foi realizada a análise de variância (ANOVA), exceto para o número de LEs que foi realizada apenas análise descritiva em razão da baixa taxa de formação nas famílias.

3.1.3 Análise de agrupamento

Além da análise de variância univariada (ANOVA) foi realizada análise multivariada pelo método não hierárquico de otimização de Tocher, com base na distância euclidiana média padronizada, em cada meio de indução (TI-1 e TI-2) tendo como base os caracteres EI, ECAL, CEM e OXID. Utilizou-se, também, o critério de Singh (1981) para quantificar a contribuição relativa desses caracteres para a divergência genética.

3.2 Aprimoramento do processo de embriogênese somática

3.2.1 Multiplicação das linhagens embriogênicas (LEs)

O meio utilizado nessa fase do estudo foi composto de sais MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com: 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 100 mg L⁻¹ de glutamina, 100 mg L⁻¹ de arginina, 100 mg L⁻¹ de asparagina, 1,0 g L⁻¹ de caseína hidrolisada e solidificado com 2,0 g L⁻¹ de Phytigel. O meio de cultura teve o pH ajustado para 5,7 ± 0,01 antes de ser autoclavado por 20 min. a 121 °C e 1,5 atm.

Foram testadas nesse meio o efeito de duas auxinas (Picloram e Dicamba) em duas concentrações (18 e 36 µM) na multiplicação das LEs de quatro famílias. As famílias objeto de estudo foram selecionadas baseadas no volume disponível de massas pró-embriogênicas (MPEs) para a montagem do experimento. As MPEs das LEs, em cada família foram reunidas e homogeneizadas em placas de Petri de poliestireno, com auxílio de pinça e bisturi de cabo fixo, formando uma MPE composta, a qual representou cada família no estudo. Três porções de cinco mm de diâmetro dessas MPEs foram repicadas para placas de Petri de poliestireno, sendo posteriormente vedadas com filme plástico de cloreto de polivinila (Goodyear[®], São Paulo, Brasil).

O experimento foi conduzido em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), em esquema fatorial 4 x 2 x 2, sendo cada parcela experimental representada por uma placa de Petri.

As placas de Petri foram mantidas em sala de cultura no escuro a 25 ± 2 °C. Ao final dos 45 dias foi quantificado o crescimento (baseado na diferença do diâmetro inicial e final da base das MPEs), a presença de MPEs oxidadas (com escurecimento total) e a diferenciação das MPEs em embriões somáticos.

A ANOVA foi realizada para o caráter crescimento e para os caracteres presença de explantes oxidados e a diferenciação das LEs em embriões somáticos foi realizada análise descritiva.

3.2.2 Maturação e regeneração de embriões somáticos

O meio utilizado nessa fase foi o meio de maturação (MMA) composto de sais de MS (Murashige e Skoog, 1962) suplementados com 30 g L⁻¹ de sacarose, 500 mg L⁻¹ de mio-inositol, 500 mg L⁻¹ de glutamina, 500 mg L⁻¹ de arginina, 500 mg L⁻¹ de asparagina, 500 mg L⁻¹ de caseína hidrolisada, 1000 µM de putrescina e solidificado com 2,0 g L⁻¹ de Phytigel.

Dois composições de meio de cultura e carvão ativado foram: TMA-1) MMA + 5,5 µM de ANA + 2,5 µM de 2iP + 3,0 g L⁻¹ de carvão ativado e TMA-2) MMA + 0,55 µM de ANA + 0,25 µM de 2iP (Tabela 1). MPEs de aproximadamente cinco milímetros de diâmetro foram repicadas para placas de Petri de poliestireno contendo 30 mL do meio de cultura, sendo posteriormente vedadas com filme plástico de cloreto de polivinila (Goodyear[®], São Paulo, Brasil).

O delineamento experimental utilizado nessa fase foi o DIC, em esquema fatorial 4 x 2, sendo quatro famílias e duas composições de meio de cultura (TMA-1 e TMA-2), com sete repetições. A parcela foi composta de uma placa de Petri de poliestireno contendo três MPEs, mantida por 60 dias em sala de cultivo a 25 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 h e irradiância de 30 µmol m⁻²s⁻¹, obtidos com lâmpadas fluorescentes de 40 W.

A eficiência dos tratamentos foi avaliada por meio do número de embriões somáticos regenerados (NER) e do número de embriões somáticos que germinaram

precocemente (GP). Foram considerados embriões somáticos regenerados os embriões alongados e de coloração branca (Figura 2A).

3.2.3 Germinação e conversão dos embriões somáticos

Esta fase de estudo foi dividida em duas etapas: (1) germinação do embrião somático, caracterizado pelo alongamento do pecíolo cotiledonar e (2) conversão, caracterizada pela formação da plântula.

A germinação do embrião somático foi realizada em frascos de 300 mL, contendo 30 mL de meio de cultura. A conversão, por sua vez foi realizada em tubos de ensaio de 25 x 150 mm, contendo 10 mL de meio. Em ambas, as etapas, o meio de cultura utilizado foi o MBM com 3,0 g L⁻¹ de Phytigel.

Nessa fase foram testadas a presença e a ausência de reguladores de crescimento e duas concentrações de sacarose, totalizando quatro tratamentos: TG-1) sem regulador de crescimento com suplementação de 30 g L⁻¹ de sacarose; TG-2) sem regulador de crescimento com suplementação de 60 g L⁻¹ de sacarose; TG-3) 0,55 µM de GA₃ + 0,25 µM de 2iP e TG-4) 0,55 µM de ANA + 0,25 µM de 2iP (Tabela 1). As duas etapas foram conduzidas sob fotoperíodo de 16 h e irradiância de 30 µmol m⁻²s⁻¹, obtido com lâmpadas fluorescentes de 40 W a 30 ± 2 °C. A etapa de germinação foi conduzida em DIC em esquema fatorial 4 x 4, sendo quatro famílias e quatro tratamentos e composta por quatro repetições. A parcela experimental foi representada por um frasco de 300 mL contendo três grupos de embriões somáticos maturados, sendo avaliado o número de embriões germinados (NEG) após 30 dias de incubação. Na segunda etapa, os embriões germinados foram individualizados e inoculados no mesmo meio da primeira etapa de forma que o haustório ficasse inserido no meio de cultura (Figura 2E), permanecendo por mais 30 dias nessa condição.

3.3 Análise histológica

Amostras de cada etapa da embriogênese somática de *A. aculeata* foram coletadas e fixadas em FAA₅₀ (Johansen, 1940) por 48 horas sob vácuo e conservadas em álcool etílico 70%. Em seguida foram desidratadas em série etílica crescente e em seguida feita a inclusão em metacrilato (historesina, Leica) de acordo com as recomendações do fabricante. Na sequência, as amostras foram seccionadas em cinco µm em micrótomo rotativo e os cortes corados em azul de toluidina (O'Brien et al.,

1964) por 15 minutos, lavados em água corrente e secos a temperatura ambiente. As lâminas foram montadas em resina sintética (Permount) e para a observação e documentação foi utilizado Fotomicroscópio Olympus Ax70.

3.4 Análise dos dados

As análises de variância e a análise de agrupamento foram realizadas com auxílio do programa GENES (Cruz, 2013) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p=0,05$).

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação de progênies de matrizes de *A. aculeata* quanto a resposta à indução de embriogênese somática

4.1.1 Indução de embriogênese somática

Os embriões zigóticos maduros (Figura 2A) das 19 famílias não apresentaram contaminações biológicas ou oxidação nos primeiros 30 dias de inoculação. Estes resultados indicam que o processo de desinfestação foi eficaz e não causou danos ao explante. Em todas as famílias foi observado, inicialmente, o intumescimento do embrião zigótico por volta dos sete dias e aos 12 dias foi possível perceber o rompimento da região proximal do embrião (Figura 2B). Posteriormente, observou-se calos nessa região. Foi verificada a formação de dois tipos de calos, denominados embriogênicos e não embriogênicos. Os calos embriogênicos tinham aparência nodular e coloração amarelada (Figura 2C), enquanto os não embriogênicos eram esponjosos e de coloração branca.

Durante o processo de indução de embriogênese somática as diferentes famílias objeto deste estudo apresentaram respostas significativamente diferentes para os caracteres EI, ECAL e OXID (Tabela 2). Estes resultados indicam que as 19 famílias apresentam variabilidade quanto à responsividade *in vitro*. Para todos os caracteres avaliados (EI, ECAL, CEM e OXID) houve significância para o efeito de meios de cultura (Tabela 2).

O meio suplementado com Picloram (TI-1) foi mais eficiente em relação aos caracteres EI, ECAL, CEM, para as famílias testadas, os quais apresentaram valores de

60%, 46% e 15%, respectivamente, enquanto que para o meio suplementado com Dicamba (TI-2), esses valores foram de 52%, 39% e 6%. Um incremento de 2,5 vezes pode ser observado para CEM no TI-1, em relação ao TI-2. Já em relação à OXID dos explantes, o TI-2 foi 1,6 vezes superior, comparado com o TI-1 (Tabela 3).

Tabela 2. Resumo da análise de variância (ANOVA) dos caracteres porcentagem de embriões intumescidos (EI), porcentagem de embriões calejados (ECAL), porcentagem de formação de calos embriogênicos (CEM) e porcentagem de oxidação dos explantes (OXID) avaliados em embriões zigóticos maduros em 19 famílias de *A. aculeata*

FV	GL	Q.M.			
		EI	ECAL	CEM	OXID
Blocos	2	3498,245	1111,403	316,667	195,614
Famílias (F)	18	1324,658**	793,274*	201,656 ^{ns}	391,325*
Meios (M)	1	1937,719*	1621,929*	3371,930**	4176,316**
F x M	18	222,904 ^{ns}	288,596 ^{ns}	125,633 ^{ns}	335,575 ^{ns}
Resíduo	72	297,344	400,592	122,973	220,8393
Média		55,701	42,540	9,820	25,700
CV(%)		30,957	47,045	112,873	57,820

CV = Coeficiente de variação; ^{ns} Não significativo; * e ** significativo em nível de 5 e 1% de probabilidade pelo teste F.

A avaliação da EI aos 30 dias após a incubação indicou ser a família 1 a mais respondente, com média de 80%, enquanto que a família 18 apresentou a menor média (28,33%) (Tabela 3). Para os caracteres ECAL e OXID, embora o teste F tenha apontado diferença significativa (Tabela 2), não foi verificada diferença entre as médias pelo teste de Tukey (Tabela 3). Os maiores valores de ECAL foram observados no TI-1 nas famílias 2 e 1 (73,33 e 73%), respectivamente. A família 1 também apresentou a maior porcentagem de CEM (40%). Apesar do efeito de família não ter sido significativo para CEM, foi observado valor 27 vezes superior para a família 1 em relação a família 18 (Tabela 3). Dentre as 19 famílias, as que apresentaram as maiores OXID foram as famílias 5 e 10 (40%) (Tabela 3). A relação ECAL/EI foi mais favorável para a família 18, em relação às demais famílias, apresentando-se 1,7 vezes superior ao valor da família 17, de menor desempenho (Tabela 3). Para a relação CEM/ECAL também pode ser observada variação entre as famílias, apresentando os

maiores valores nas famílias 1 e 7. A família 18, a qual apresentou a maior taxa na relação ECAL/EI, exibiu uma taxa nula para a relação CEM/ECAL (Tabela 3).

A formação de LE iniciou-se após 10 dias de inoculação no meio de indução, apresentando formato granular, coloração amarela translúcida, alto grau de proliferação e formação de mucilagem na base das MPEs, as quais tinham contato direto com o meio de cultura (Figura 2D). Das 19 famílias testadas, 16 formaram LEs (Tabela 4). Quanto à produção total de LEs, o Dicamba (TI-2) foi mais eficiente, induzindo maior formação de LEs em relação ao Picloram (TI-1) (Tabela 4). As famílias mais responsivas na ordem decrescente para a produção de LEs foram: 1, 9, 4, 5, 13, 14, todas apresentando valores maior ou igual a três LEs (Tabela 4). Por outro lado, as famílias 6, 16 e 18 não obtiveram sucesso na obtenção de LEs.

Tabela 3. Respostas fenotípicas in vitro quanto à porcentagem de embriões intumescidos (EI), porcentagem de embriões calejados (ECAL), porcentagem de formação de calos embriogênicos (CEM), porcentagem de oxidação dos explantes (OXID) e as relações ECAL/EI e CEM/ECAL avaliados em embriões zigóticos maduros em 19 famílias de *A. aculeata* em dois meios de indução (Picloram e Dicamba)

Famílias	Caracteres												ECAL/ EI	CEM/ ECAL
	EI			ECAL			CEM			OXID				
	Meios			Meios			Meios			Meios				
	TI-1	TI-2	Média	TI-1	TI-2	Média	TI-1	TI-2	Média	TI-1	TI-2	Média		
1	83,33	76,66	80,00a	73,00	43,33	58,00a	40,00	13,33	27,00	10,00	33,33	22,00a	0,73	0,47
2	80,00	73,33	77,00ab	73,33	46,66	60,00a	16,66	03,33	10,00	16,66	46,66	32,00a	0,78	0,17
3	70,00	66,66	68,00ab	63,33	40,00	52,00a	20,00	10,00	15,00	03,33	43,33	23,00a	0,76	0,29
4	80,00	63,33	72,00ab	63,33	50,00	57,00a	20,00	13,33	17,00	13,33	30,00	22,00a	0,79	0,30
5	60,00	53,33	57,00ab	43,33	30,00	37,00a	03,33	06,66	5,00	50,00	30,00	40,00a	0,65	0,14
6	66,66	60,00	63,00ab	53,33	46,66	50,00a	23,33	10,00	17,00	13,33	23,33	18,00a	0,79	0,34
7	46,66	30,00	38,00ab	36,66	33,33	33,00a	23,33	03,33	13,00	10,00	26,66	18,00a	0,87	0,40
8	50,00	53,33	52,00ab	40,00	43,33	42,00a	16,66	03,33	10,00	06,66	43,33	25,00a	0,81	0,24
9	66,66	50,00	58,00ab	46,66	46,66	47,00a	16,66	13,33	15,00	26,66	20,00	23,00a	0,80	0,32
10	80,00	40,00	60,00ab	60,00	30,00	45,00a	16,66	03,33	10,00	36,66	43,33	40,00a	0,75	0,22
11	56,66	53,33	55,00ab	43,33	30,00	37,00a	10,00	06,66	08,00	26,66	36,66	32,00a	0,67	0,22
12	50,00	33,33	42,00ab	33,33	33,33	33,00a	20,00	03,33	12,00	26,66	30,00	28,00a	0,80	0,36
13	66,66	50,00	58,00ab	33,33	46,66	40,00a	06,66	10,00	08,00	26,66	40,00	33,00a	0,69	0,20
14	63,33	40,00	52,00ab	53,33	33,66	45,00a	23,33	03,33	13,00	20,00	23,33	22,00a	0,87	0,30
15	63,33	60,00	62,00ab	50,00	43,33	47,00a	13,33	00,00	07,00	23,33	43,33	33,00a	0,76	0,15
16	36,66	40,00	38,00ab	30,00	30,00	30,00a	06,66	00,00	03,00	13,33	23,33	18,00a	0,78	0,10
17	30,00	30,00	30,00ab	16,66	16,66	17,00a	06,66	03,33	05,00	16,66	06,66	12,00a	0,56	0,30
18	23,33	33,33	28,00ab	20,00	33,33	27,00a	00,00	00,00	00,00	10,00	20,00	15,00a	0,94	0,00
19	63,33	73,33	68,00ab	46,66	60,00	53,00a	10,00	00,00	05,00	23,33	40,00	32,00a	0,78	0,10
Média	60,00 A	52,00 B		46,00 A	39,00 B		15,00 A	06,00 B		20,00 B	32,00 A			

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de TUKEY em nível de 5% de probabilidade e médias seguidas pela letra maiúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste F em nível de 5% de probabilidade, considerando cada caracter.

Tabela 4. Porcentagem de linhagens embriogênicas (LEs) obtidas em dois meios de indução a partir de embriões zigóticos maduros em 19 famílias de *A. aculeata*

Famílias	LEs		Total
	Meios		
	Picloram (TI-1)	Dicamba (TI-2)	
1	3,33 (01) ¹	13,33 (04)	16,66 (05)
2	3,33 (01)	0,00 (0)	3,33 (01)
3	3,33 (01)	3,33 (01)	6,66 (02)
4	3,33 (01)	6,66 (02)	10,00 (03)
5	3,33 (01)	6,66 (02)	10,00 (03)
6	0,00 (0)	0,00 (0)	0,00 (0)
7	3,33 (01)	3,33 (01)	6,66 (02)
8	3,33 (01)	0,00 (0)	3,33 (01)
9	3,33 (01)	10,00 (03)	13,33 (04)
10	3,33 (01)	3,33 (01)	6,66 (02)
11	0,00 (0)	6,66 (02)	6,66 (02)
12	3,33 (01)	3,33 (01)	6,66 (02)
13	0,00 (0)	10,00 (03)	10,00 (03)
14	6,66 (02)	3,33 (01)	10,00 (03)
15	6,66 (02)	0,00 (0)	6,66 (02)
16	0,00 (0)	0,00 (0)	0,00 (0)
17	0,00 (0)	3,33 (01)	3,33 (01)
18	0,00 (0)	0,00 (0)	0,00 (0)
19	6,66 (02)	0,00 (0)	6,66 (02)
Total	(16)	(22)	

¹ Valores entre parênteses representam o número de LE obtidas.

4.1.2 Análise de agrupamento

As 19 famílias estudadas foram agrupadas em 5 grupos diferentes em relação às respostas ao Picloram (TI-1) pelo método de agrupamento de Tocher (Tabela 5), indicando que há variabilidade entre as famílias de *A. aculeata* quanto à resposta ao tratamento de indução de embriogênese somática in vitro.

O grupo 1 reuniu o maior número de famílias (13), seguido pelo grupo 2 com três famílias. As famílias 5, 10 e 1 seguiram isoladas, constituindo os grupos 3, 4 e 5, respectivamente. O grupo 5 (família 1) se destacou por apresentar os maiores valores de EI, ECAL e CEM. Já o grupo 2 reuniu as famílias de menor desempenho quanto a estes

caracteres (Tabela 5). Quanto à contribuição dos caracteres na estimativa da divergência, destacaram-se a EI e a ECAL com 27,38% e 27,60%, respectivamente. Já o caráter CEM contribuiu com 18,26%.

Quando as 19 famílias foram submetidas ao Dicamba (TI-2), estas foram agrupadas em 4 grupos distintos, que diferiram dos grupos formados quando submetidos ao TI-1. O grupo 1 foi constituído por 9 famílias, seguido do grupo 2 com 6 famílias, grupo 3 com 3 famílias e o grupo 4 com apenas uma família (Tabela 5). As dispersões gráficas dos grupos formados são apresentadas na figura 1.

O grupo 2 se destacou por apresentar os maiores valores para CEM, diferentemente do observado para o grupo 3, o qual apresentou os menores valores para o mesmo caráter. A família 17 foi a mais divergente no meio contendo Dicamba (TI-2) (Tabela 5), com menores valores para EI, ECA e OXID. Para o meio contendo Dicamba (TI-2), os caracteres CEM e EI foram os mais que contribuíram para a divergência, com valores de 42,87 e 35,75%, respectivamente.

Tabela 5. Agrupamento das 19 famílias de *A. aculeata* pelo método de otimização de Tocher, com base nas distâncias euclidianas médias padronizadas a partir dos caracteres: porcentagem de embriões intumescidos (EI), porcentagem de embriões calejados (ECAL), porcentagem de calos embriogênicos (CEM) e porcentagem de oxidação dos explantes (OXID) em dois meios de indução suplementados com Picloram (TI-1) e Dicamba (TI-2)

Meios	Grupos	Famílias													
Picloram (TI-1)	1	15	19	11	9	13	12	14	6	8	7	4	3	2	
	2	16	17	18											
	3	5													
	4	10													
	5	1													
Dicamba (TI-2)	1	7	12	14	16	18	5	11	10	8					
	2	6	9	4	1	13	3								
	3	2	15	19											
	4	17													

Figura 1: Dispersão gráfica do agrupamento obtido pelo método de otimização de Tocher, com base nas distâncias euclidianas médias padronizadas a partir dos caracteres: porcentagem de embriões intumescidos (EI), porcentagem de embriões calejados (ECAL), porcentagem de calos embriogênicos (CEM) e porcentagem de oxidação dos explantes (OXID) em dois meios de indução suplementados com A) Picloram (TI-1) e B) Dicamba (TI-2).

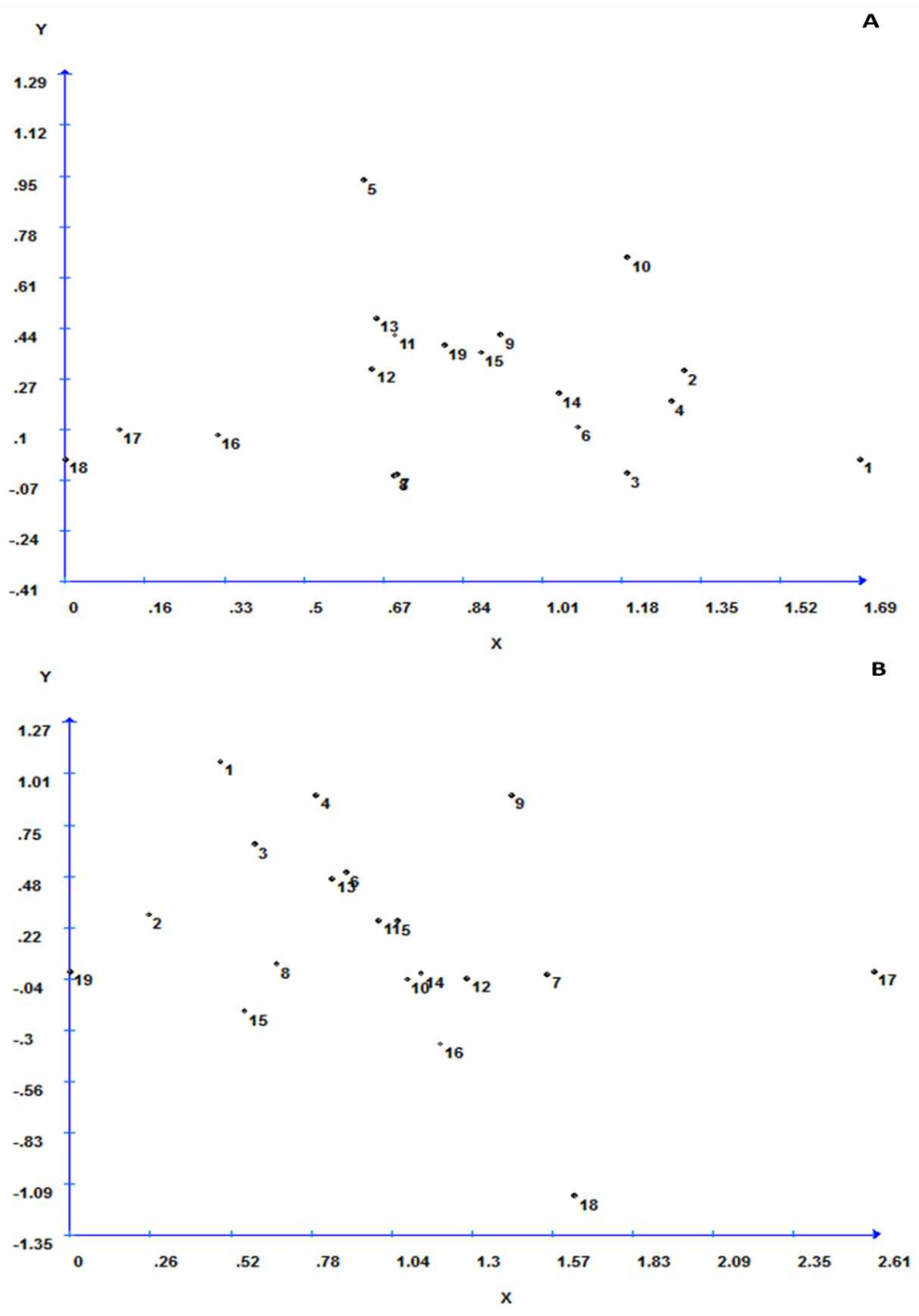


Tabela 6. Contribuição relativa, pelo método de Singh (1981), dos caracteres porcentagem de embriões intumescidos (EI), porcentagem de embriões calejados (ECAL), porcentagem de calos embriogênicos (CEM) e porcentagem de oxidação dos explantes (OXID) em dois meios de indução (TI-1 e TI-2), para a diversidade genética de 19 famílias de *A. aculeata*

Caracteres	S.j (%)	
	Meios de Indução	
	Picloram (TI-1)	Dicamba (TI-2)
EI	27,38	35,75
ECA	27,60	18,49
CEM	18,26	42,88
OXID	19,95	24,64

Figura 2: Embriogênese somática in vitro a partir de embriões zigóticos maduros em *A. aculeata*: **A**– Partes constituintes do fruto de *A. aculeata*, destacando-se o embrião zigótico (ponta da seta) utilizado como fonte de explante. **B** – Embrião zigótico maduro aos 12 dias no meio de indução; **C** – Calo aos 35 dias com potencial embriogênico formado na região proximal do embrião zigótico; **D** – Linhagem embriogênica aos 30 dias em meio de indução, sugerindo a presença de mucilagem (ponta da seta); **E** – Linhagem embriogênica em meio de multiplicação, também sugerindo mucilagem (ponta de seta); **F** – Diferenciação dos embriões somáticos da família 19 aos 45 dias em meio de multiplicação em concentração de 18 μ M de Dicamba; ep epicarpo; me mesocarpo; en endocarpo; am amêndoa; ez embrião zigótico; rp região proximal; rd região distal. Barras **A** = 20mm **B, C** = 10 mm; **D – F** = 3 mm.

4.2 Aprimoramento do processo de embriogênese somática

4.2.1 Multiplicação das linhagens embriogênicas (LEs)

A multiplicação e a manutenção das LEs (Figura 2E) foram obtidas com sucesso, porém de forma assíncrona. Após 45 dias em meio de multiplicação as MPEs mais que duplicaram de diâmetro em todos os tratamentos testados. Entretanto, observou-se interação entre concentração de auxinas e famílias quanto ao crescimento das MPEs. A concentração mais elevada de auxinas (36 μM) reduziu o crescimento das MPEs em 20,29% na família 9 (Tabela 7).

Tabela 7: Crescimento médio das massas pró-embriogênicas (MPEs) baseado na diferença do diâmetro inicial e final das MPEs nas duas concentrações de auxinas testadas, avaliadas em embriões zigóticos maduros em quatro famílias de *A. aculeata*

Famílias	Concentrações das auxinas (μM)	
	18	36
9	6,85 aA	5,46 aB
12	6,71 aA	6,60 bA
13	6,28 aA	6,67 bA
19	6,58 aA	6,27 abA

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade e médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste F em nível de 5% de probabilidade.

A formação prematura de embriões (Figura 2F) foi observada na menor concentração de Dicamba (TM-3) na família 19 (66,66%), mas não nas demais famílias estudadas ou em maior concentração do regulador de crescimento (36 μM). As famílias 12 e 19 foram mais susceptíveis à oxidação, notadamente no TM-4, apresentando valores de 77,77% e 33,33%, respectivamente, o que prejudicou o processo cíclico de proliferação de MPEs. Já em TM-1, as MPEs de todas as famílias apresentaram crescimento exuberante com maior sincronização e sem sinal de oxidação. As MPEs formadas nesse tratamento foram mantidas nessas condições por mais de 24 meses sem perder a capacidade de multiplicação e a competência em regenerar embriões somáticos.

4.2.2 Maturação e regeneração dos embriões somáticos

A fase de maturação e regeneração caracterizou-se pelo desenvolvimento e mudança na coloração das MPEs de amarelo translúcido para branco opaco (Figura 3A) que gradativamente ganhou forma, originando dezenas de embriões somáticos.

O número de embriões regenerados (NER) variou em função do tratamento aplicado e da família estudada, sendo observada interação significativa entre estes fatores. De modo geral, a família 19 e 9 obtiveram melhor desempenho no NER, quando comparadas às demais famílias no TMA-1 (Tabela 8). Contudo, no TMA-2, as famílias 19 e 9 apresentaram redução significativa do NER, em relação ao TMA-1.

Tabela 8. Número médio de embriões regenerados (NER) e embriões germinados precocemente (GP) de quatro famílias de *A. aculeata* em dois tratamentos de maturação

Famílias	Tratamentos			
	TMA-1		TMA-2	
	NER	GP	NER	GP
9	31,50 abA	11,00 aA	18,83 abB	1,16 aB
12	14,33 cA	1,83 bA	13,16 bcA	0,83 aA
13	26,33 bcA	2,00 bA	23,00 aA	1,50 aA
19	40,16 aA	3,83 bA	6,83 cB	0,00 aA

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade e médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste F em nível de 5% de probabilidade.

O número de embriões somáticos que germinaram precocemente (Figura 3B) na fase de maturação e regeneração variou em função do tratamento aplicado e da família estudada, sendo observada interação significativa entre estes fatores. A família 9 apresentou o maior número de GP no TMA-1, em relação às demais famílias, sendo observada diferença superior a seis vezes, em relação a família 12 (Tabela 8). O número de GP foi reduzido no TMA-2, não sendo observada diferença significativa entre as famílias (Tabela 8).

4.2.3 Germinação e conversão dos embriões somáticos

A maior parte dos embriões somáticos estabelecidos nos quatro tratamentos testados iniciou a sua germinação aos 10 dias, alongando-se e formando o pecíolo cotiledonar e o haustório (Figura 3C), assemelhando-se às estruturas germinativas de um embrião zigótico (Figura 3D). Os embriões somáticos germinados apresentaram-se com coloração verde opaca (Figura 3D) ou bege translúcida, sendo isso observado em todas as famílias e tratamentos testados. Foi verificada a presença de embriões fundidos nas famílias 9 e 12 (Figura 3D).

As diferentes famílias apresentaram NEG distintos nos diferentes tratamentos testados, mostrando que não há um meio de germinação que possa garantir a germinação de todas as famílias de maneira uniforme (Tabela 9). Entretanto, a maior média de NEG foi observada na família 9, no meio TG-3 (Tabela 9).

Aos 15 dias da individualização (Figura 3E), os embriões somáticos, em sua maioria, emitiram radícula e posteriormente a parte aérea, contudo, alguns embriões formaram exclusivamente raízes ou parte aérea, apresentando-se incompletos.

Tabela 9. Resposta fenotípica in vitro em relação ao número de embriões somáticos germinados (NEG) após 30 dias de incubação, em quatro famílias de *A. aculeata* em diferentes tratamentos de germinação

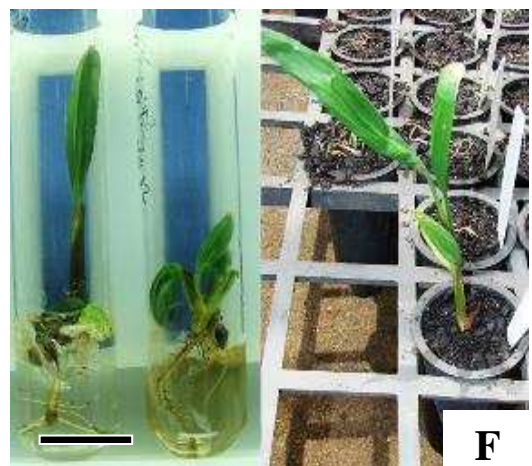
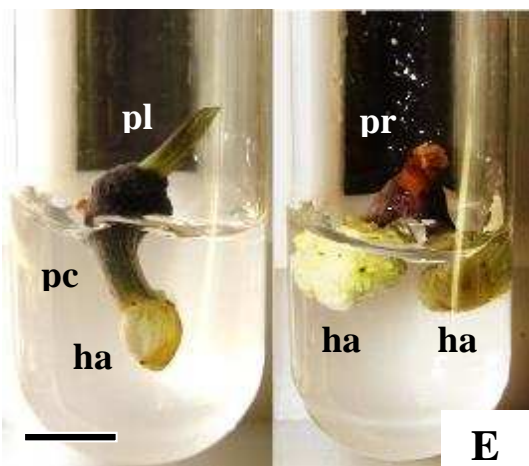
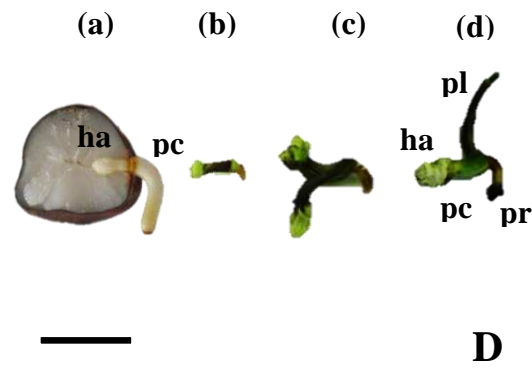
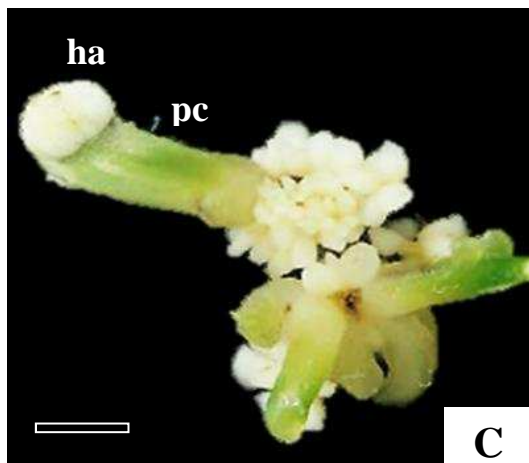
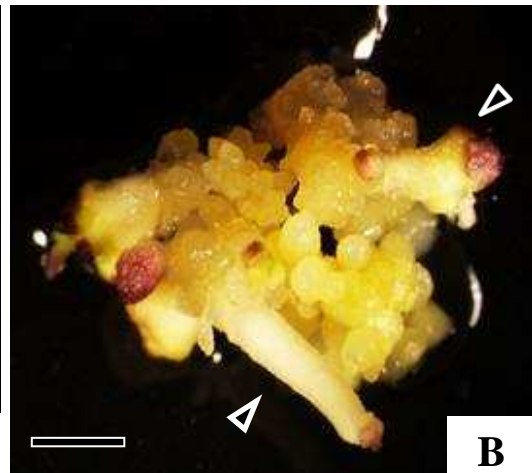
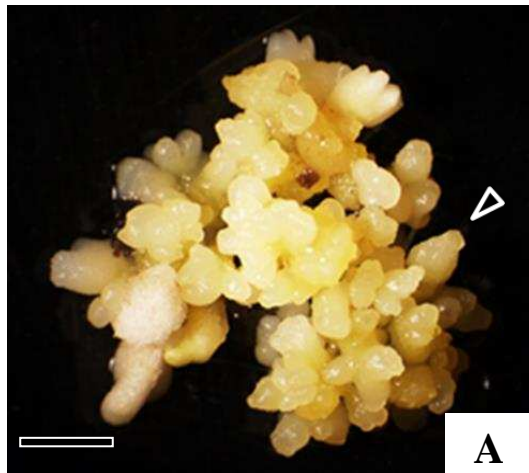
Famílias	NEG			
	TG-1	TG-2	TG-3	TG-4
9	15,25 aAB	11,00 abB	19,00 aA	17,25 aAB
12	12,25 aA	17,25 aA	14,25 abA	14,00 abA
13	10,75 aAB	5,50 bB	15,25 abA	8,25 bAB
19	13,00 aA	16,75 aA	11,25 bA	13,25 abA

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferirem estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

A formação das plântulas foi observada a partir de embriões que possuíam coloração verde opaca e um único pecíolo cotiledonar com haustório (Figura 3E). As plântulas obtidas foram transferidas para meio de enraizamento para promover maior formação de raízes. Nas famílias 9 e 19 foi observada a formação de novas raízes aos 15

dias, porém ainda em quantidade insuficiente. As plântulas foram transferidas para casa de vegetação para a aclimatização (Figura 3F), onde se encontram atualmente.

Figura 3: Processo de embriogênese somática e regeneração de plântulas in vitro a partir de embriões zigóticos maduros em *A. aculeata*: **A** – Embriões somáticos maturados (ponta de seta) aos 60 dias em meio de maturação **B** – Germinação precoce (ponta de seta) em embriões somáticos da família 9 aos 60 dias em meio de maturação; **C** – Germinação dos embriões somáticos aos 30 dias de inoculado; **D** – Embrião zigótico e somáticos germinando: (a) Germinação ex vitro do embrião zigótico aos 15 dias; (b) Embrião somático germinado apresentando alongamento do pecíolo cotiledonar com haustório e presença do primórdio radicular aos 15 dias; (c) formação de embriões somáticos fundidos com a presença de primórdio radicular aos 15 dias; (d) embrião somático com germinação completa aos 30 dias; **E** – Embriões somáticos germinados na segunda fase de germinação com a presença do pecíolo cotiledonar, plúmula, primórdio radicular e embrião bifurcado apresentando dois haustórios; **F** – Plantas regeneradas aos 60 dias em meio de germinação e em fase de aclimatação em casa de vegetação; ha haustório; pc pecíolo cotiledonar; pl plúmula; pr primórdio radicular. Barras **A - C** = 3 mm; **D, E** = 10 mm.



4.3 Análise histológica

4.3.1 Indução de embriogênese somática

A análise histológica dos explantes no momento da indução revelou que as regiões proximal (Figura 4A) e distal (Figura 4B) apresentaram organização celular homogênea e sem oxidação nos explantes. A região proximal é formada pelo eixo embrionário, composta pela plúmula e cordões procambiais (Figura 4A). A porção distal do embrião de *A. aculeata* é composta pelo haustório (cotilédone) e apresenta invaginações na porção superior (Figura 4B).

Após 120 dias em meio de indução, observou-se o mesmo padrão de indução em relação aos dois meios testados, porém as regiões distal e proximal apresentaram respostas diferenciadas. A parte mais periférica da região distal apresentou células menores, enquanto a presença de células fenolizadas foi observada na porção mais central (Figura 4C), porém, sem grande diferenciação celular. Na região proximal, setores compostos por células menores com características de células meristemáticas, com o citoplasma denso e alta relação núcleo/citoplasma foram formados (Figura 4C) e sendo observados por toda a região proximal (Figura 4D).

Divisões periclinais das células da protoderme contribuíram para o intumescimento do embrião zigótico e para o crescimento das células no interior do explante, ocasionando colapso de parte da região proximal (Figura 4E) onde o isolamento dos setores também ocorreu (Figura 4E).

4.3.2 Multiplicação das linhagens embriogênicas (LEs)

A avaliação histológica realizada em corte longitudinal ao maior eixo da MPEs, aos 165 dias após a indução permitiu observar uma porção superior formada por setores meristemáticos, enquanto que a porção inferior, em contato com o meio, apresentou células fenolizadas (Figura 4F). Essas características foram observadas em todas as famílias que apresentaram a formação das LEs. Em corte transversal da porção superior, também aos 165 dias, foram observados esses setores com células meristemáticas no interior da estrutura (Figura 5A).

4.3.3 Maturação e regeneração dos embriões somáticos

Aos 225 dias após indução, os embriões somáticos em meio com carvão ativado foram observados com protoderme evidente e formação de cordões procambiais (Figura 5B). Em corte longitudinal, os embriões somáticos formados em meio sem carvão ativado apresentam uma protoderme menos desenvolvida, apesar de apresentar os cordões procambiais fechados sem conexão com o tecido de origem (Figura 5D).

Uma camada mucilaginosa rica em polissacarídeos foi observada na superfície da protoderme dos embriões somáticos incubados na presença (Figura 5E) e ausência de carvão ativado (Figura 5C). Estômatos também foram observados em corte transversal do embrião somático (Figura 5F).

4.3.4 Germinação e conversão dos embriões somáticos

A Figura 6A mostra o corte longitudinal do embrião somático na primeira etapa da germinação aos 30 dias após inoculação. Podem ser observadas três regiões: o terço superior formado pelo haustório (ha), o médio formado pelo pecíolo cotiledonar (pc) e o inferior formado pelo primórdio radicular (pr). No terço superior é possível perceber a presença de invaginações. As células nessa região são maiores vacuolizadas com paredes finas e com espaços intercelulares evidentes (Figura 6B). O terço médio é formado por células menores e com cordões de procâmbio evidentes (Figura 6C) por todo embrião somático. No terço inferior, inclusões citoplasmáticas (ráfides) foram observadas nas células mais periféricas (Figura 6D). As ráfides são encontradas margeando toda a estrutura do embrião somático e mais evidentes do terço inferior.

Figura 4: Histologia das fases de embriogênese somática in vitro em *A. aculeata*: **A e B** – Embrião zigótico maduro antes da indução; **C** – Embrião zigótico aos 120 dias de indução apresentando a região distal menos diferenciada em relação a proximal e presença de compostos fenólicos na região mais central (ponta de seta amarela) e células menores na região mais periférica (ponta de seta preta); **D** – Região proximal do embrião zigótico aos 120 dias de inoculação em meio de indução apresentando células com características meristemáticas (ponta da seta); **E** – Formação de novas camadas de células a partir da protoderme (ponta da seta preta) e região com células fenolizadas (ponta da seta amarela) aos 120 de indução; **F** – Plano transversal dos setores com células meristemáticas na região mais periférica e células fenolizadas na região mais interna formados aos 165 dias de indução; pl plúmula; rp região proximal; rd região distal; in invaginações; sm setores meristemáticos; cf células fenolizadas. Barras **A - F** = 400 μm .

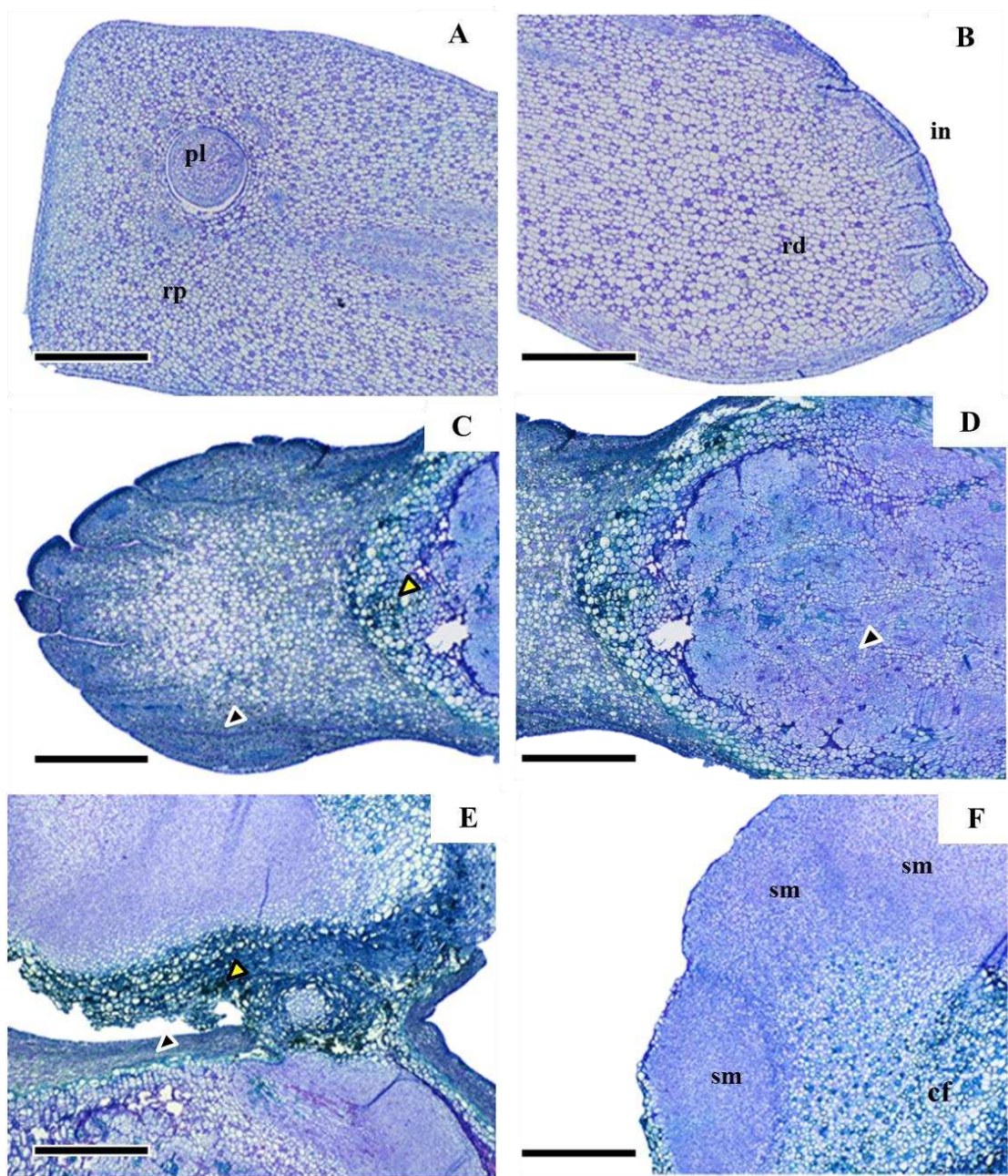


Figura 5. Histologia das fases de embriogênese somática in vitro em *A. aculeata*: **A** – Corte horizontal dos setores com células meristemáticas aos 165 dias de indução na fase de multiplicação; **B** – Plano transversal de embriões somáticos aos 225 dias de indução em meio de maturação com carvão ativado; **C** – Detalhe da protoderme do embrião somático em meio suplementado com carvão ativado com a presença de uma camada espessa de mucilagem (ponta da seta); **D** – Plano longitudinal de embriões somáticos aos 225 dias de indução em meio de maturação sem carvão ativado; **E** – Detalhe da região distal do embrião somático da família 9 na ausência de carvão ativado com a camada mais delgada de mucilagem (ponta da seta); **F** – Plano longitudinal do embrião somático da família 9 evidenciando a presença de estômatos (ponta da seta) na epiderme; sm setores meristemáticos; cp cordões de procâmbio; mc mucilagem; ep epiderme; es estômato. Barras **A, B, D** = 400 μm ; **C, F** = 100 μm e **E** = 200 μm .

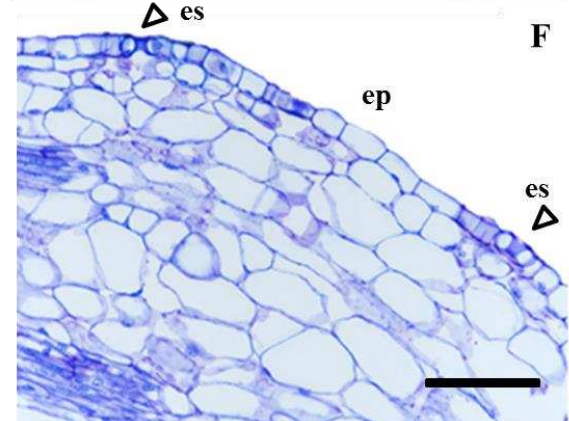
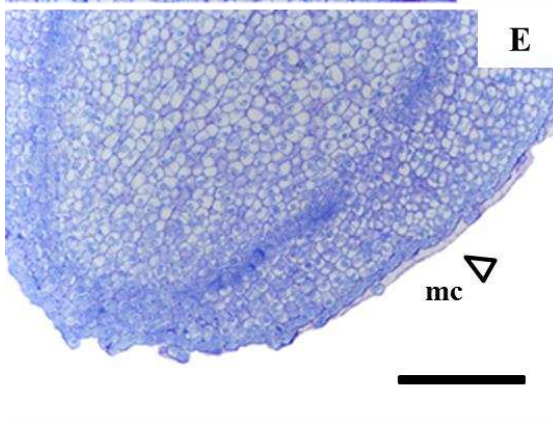
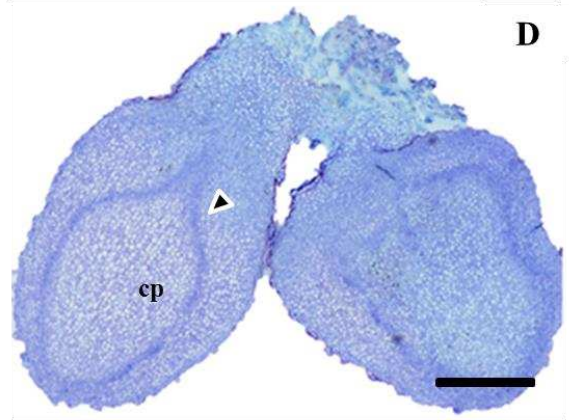
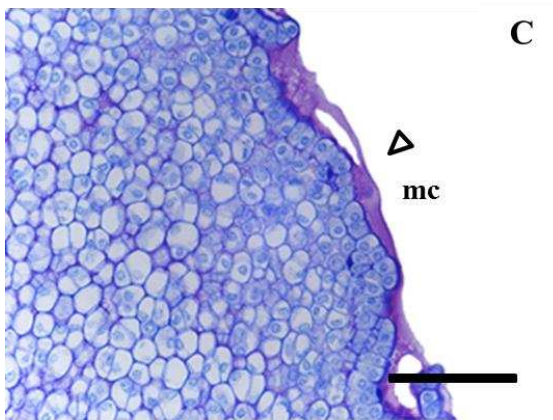
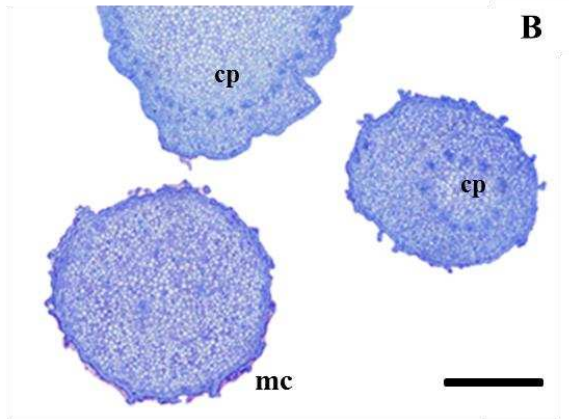
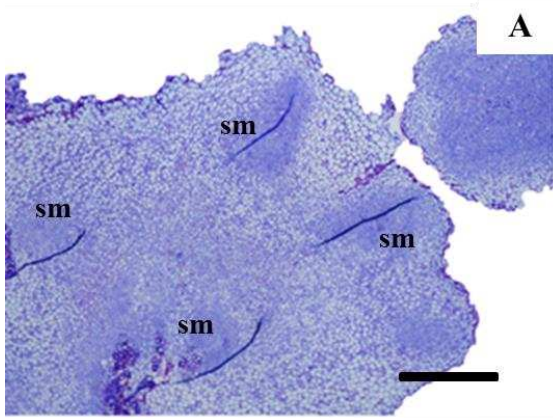
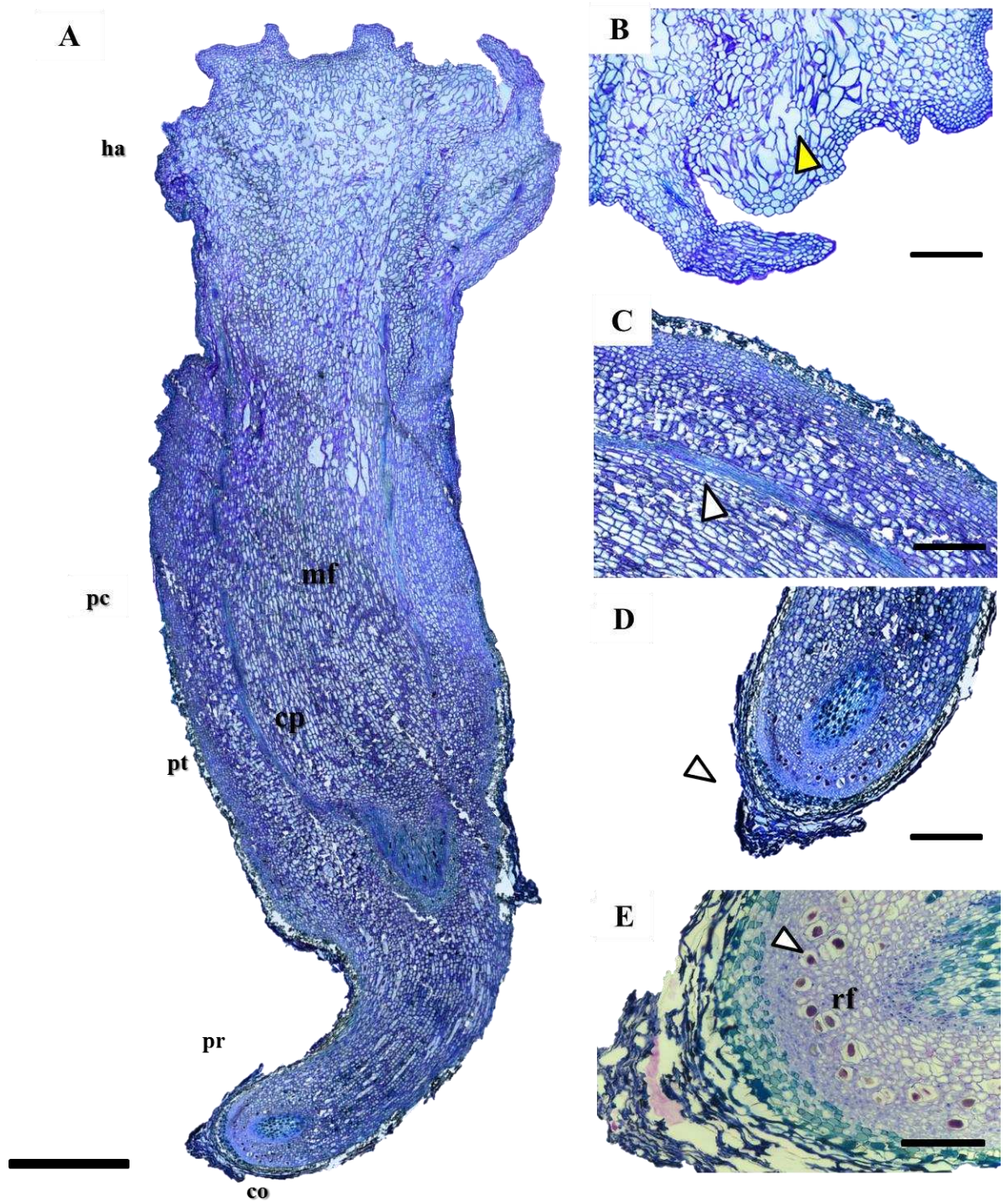


Figura 6: Histologia da germinação do embrião somático de *A. aculeata* representado pela família 19. **A** – Plano longitudinal do embrião somático germinado; **B** – Região do haustório aos 30 dias de indução na fase de germinação, evidenciando as células vacuolizadas e com grandes espaços intercelulares (ponta de seta); **C** – Plano horizontal da região do pecíolo cotiledonar evidenciando os cordões de procâmbio (ponta de seta); **D** – Plano horizontal da região do primórdio radicular e com detalhe da região mais externa, a coifa (ponta de seta); **E** – Detalhe das ráfides no interior das células; ha haustório; pc pecíolo cotiledonar; pr primórdio radicular; pt protoderme; mf meristema fundamental; cp cordões de procâmbio; rf ráfides. Barras **A** = 20 mm , **B** , **C**, **D** = 400 μm **C**, **D** = 400 μm ; **E** = 100 μm



5. DISCUSSÃO

O presente trabalho é pioneiro na obtenção e manutenção de linhagens embriogênicas em *A. aculeata*, tendo ainda como adicional a análise da resposta *in vitro* de diferentes famílias de polinização aberta.

Em plantas perenes, diversos fatores dificultam o emprego de técnicas convencionais de melhoramento genético. Dentre estes, destacam-se o longo período juvenil, a complexa análise dos descendentes - devido às dificuldades de controle nos processos de polinização e fecundação, a alta heterozigosidade dos indivíduos e tempo necessário para a obtenção de variedades melhoradas (Golle et al., 2009). Nesse contexto, o uso de técnicas biotecnológicas é crucial para o sucesso nos programas de melhoramento destas espécies. A técnica de cultivo *in vitro*, em especial a embriogênese somática é capaz de produzir clones e acelerar esse processo de melhoramento.

No caso da *A. aculeata*, em que informações a respeito da cultura *in vitro* são incipientes, o desenvolvimento de um protocolo de clonagem a partir de embriões zigóticos é ponto de partida para a clonagem a partir de outras fontes de explantes, bem como predizer o meio de indução para a clonagem de matrizes elites. A utilização de embriões zigóticos, por ser um tecido mais jovem e responsivo, reduz o tempo para a obtenção do processo de clonagem. As informações sobre a capacidade embriogênica *in vitro* de famílias de polinização aberta, a partir de embriões zigóticos também servem de base para a seleção das famílias mais competentes, além da predição da capacidade da planta matriz em transmitir essa característica para os seus descendentes. Essas informações são a base para a seleção de matrizes competentes *in vitro* para serem utilizadas em cruzamentos com matrizes de alta produção de óleo, visando o melhoramento genético dessa palmeira.

Existem diversos fatores que influenciam a ES em palmáceas, com destaque para o genótipo, o tipo e o estado de desenvolvimento do explante, os meios de cultivo e os reguladores de crescimento (Viñas e Jiménez, 2011). Os reguladores de crescimento aqui utilizados foram eficientes na indução de calos embriogênicos e obtenção de linhagens embriogênicas nos explantes de *A. aculeata*. As auxinas e citocininas são os principais agentes na regulação da divisão e diferenciação celular (Fehér et al., 2003). As auxinas são essenciais para a formação de MPEs e Dudtis et al. (1991) afirmaram que a reprogramação celular que induz a ES é a principal função das auxinas.

A influência das auxinas na indução de ES são reportadas em várias espécies: *Phoenix dactylifera* (Gueye et al., 2009), *Elaeis guineensis* (Thuzar et al., 2011), *Passiflora edulis* (Paim Pinto et al., 2011) e *Curcuma amada* (Raju et al., 2013). Apesar da auxina 2,4-D ser a mais utilizada para induzir a ES em palmáceas (Gueye et al., 2009; Saldanha et al. 2006; Eke et al., 2005; Ledo et al., 2002), outras auxinas como o Picloram e o Dicamba, têm se mostrado eficientes na indução em representantes da família botânica *Arecaceae* (Sanputawong e Te-chato, 2011; Steinmacher et al., 2011; Maciel et al., 2010; Steinmacher et al., 2007a e b).

Baixa concentração de Dicamba (9 μM) é eficaz na indução de calos primários, tanto em embriões zigóticos de *Elaeis guineensis*, quanto em inflorescências de *Bactris gasipaes* (Chehmalee e Te-chato, 2008; Steinmacher et al., 2007b). Silva et al. (2013), trabalhando com embriões zigóticos maduros de *Elaeis guineensis*, induziram ES com uma alta concentração de Picloram (450 μM), enquanto Moura et al. (2009), induziram a ES em *A. aculeata* em uma concentração reduzida da mesma auxina (9 μM), no mesmo tipo de explante, resultando na obtenção de embriões somáticos.

Conforme Moura et al. (2009), calos com capacidade embriogênica foram obtidos, em meio suplementado com Picloram, porém não obtiveram sucesso na evolução das demais fases. Foi relatado que a multiplicação das células embriogênicas e a regeneração dos embriões somáticos não foram satisfatórias apresentando dificuldades no amadurecimento desses embriões. Porém, Luis e Scherwinski-Pereira (2014) induziram calos embriogênicos em *A. aculeata* com maior eficiência utilizando baixa concentração de 2,4-D (1,5 mgL^{-1}), mas apresentaram dificuldade na multiplicação das linhagens embriogênicas. No presente trabalho foi possível a otimização do protocolo de ES em *A. aculeata* obtendo-se calos e linhagens embriogênicas (Figura 1C, D e E) em meio suplementado com as duas auxinas testadas. Esse fato pode estar relacionado com a inclusão da citocinina ao meio suplementado com auxina, o que garantiu uma divisão celular mais eficiente permitindo a formação e multiplicação das estruturas embriogênicas.

As auxinas em combinação com a citocinina 2iP utilizadas no presente trabalho induziram as LEs, porém o meio com Dicamba foi superior na indução. Provavelmente, isso ocorreu porque o Dicamba é metabolizado mais rapidamente, quando comparado a outros reguladores (Carman et al., 1988), porém leva também a maiores taxas de oxidação dos explantes. Por outro lado, em relação às características EI, CA e CEM, o meio suplementado com Picloram foi mais eficiente.

O 2iP foi outro regulador que apresentou grande influência na formação de LEs. Essa citocinina é menos utilizada na indução de ES em relação ao BAP (Guedes et al., 2011; Maciel et al., 2010; Zouine e Hadrami, 2007). A combinação de auxinas e citocininas na indução de embriões somáticos é relatada na literatura para palmáceas, entre elas, *Elaeis guineensis* (Rajesh et al., 2003), *Phoenix dactylifera* (Zouine et al. 2005), *Cocos nucifera* (Pérez-Núñez et al., 2006) e *Phoenix Canariensis* (Huong et al., 1999). As citocininas estão envolvidas na divisão celular e atuam em etapas específicas do ciclo celular, regulando a atividade de ciclinas, as quais são proteínas regulatórias desse ciclo (Kerbaui, 2004).

A inclusão de citocinina em meio já suplementado com auxina incrementou a frequência de calos em *Phoenix dactylifera* (Sané et al., 2012), fato também observado em *Acacia raddiana* (Sané et al., 2000). Durante as etapas iniciais da ES em *Phoenix dactylifera* é requerido um equilíbrio na relação auxina/citocininas (Sané et al., 2012). Al-Khayri e Al-Bahrany (2001) trabalhando com a palmeira *Phoenix dactylifera*, percebeu que a incorporação do 2iP no meio de cultura resultou em maior número de embriões. O balanço auxina/citocinina também foi mais favorável no presente trabalho para a indução de células embriogênicas em *A. aculeata*, o que corrobora com os resultados observados pelos autores citados acima.

O protocolo desenvolvido neste trabalho garantiu a obtenção e o processo cíclico de multiplicação das LEs, a maturação e a regeneração dos embriões somáticos nas diferentes famílias. Apesar de ser a mesma espécie do trabalho de Moura et al. (2009) e de Luis e Scherwinski-Pereira (2014), houve diferenças nos materiais genéticos, nos tipos e concentrações de reguladores de crescimento utilizados, enfatizando a grande influência desses fatores no sucesso da ES.

A influência do genótipo em relação à capacidade embriogênica é relatada na família *Arecaceae*, sendo as espécies mais estudadas *Phoenix dactylifera* (Sané et al., 2012), *Elaeis guineensis* (Silva et al., 2012) e *Bactris gasipaes* (Steinmacher et al., 2011b). O efeito significativo do genótipo no sucesso da ES sugere que fatores genéticos são primordiais na determinação do nível da resposta *in vitro* (Sané et al., 2012; Silva et al., 2012; Paim Pinto et al., 2011; Henry et al., 1994).

Essa influência dos fatores genéticos provavelmente está relacionada com a alta diversidade genética dos materiais vegetais dessa família botânica, que são propagados via semínifera, que em muitos casos é decorrente do sistema de polinização misto e

embora monóica e auto-compatível, há predominância de alogamia (Abreu et al., 2012), o que ocasiona alta heterozigosidade nos descendentes de um indivíduo.

Em *Elaeis guineensis* foi observada a influência dos genótipos utilizados na indução de calos embriogênicos, evidenciando o papel decisivo da constituição genética da espécie na responsividade *in vitro* (Thawaro e Te-chato, 2009). Em *Phoenix dactylifera*, Sané et al. (2012) afirmaram que é essencial a identificação da concentração ótima de reguladores de crescimento para o incremento da resposta de cada genótipo. Da mesma forma, o status fisiológico do explante, facilmente interfere na responsividade aos estímulos à ES, como observado em *Phoenix dactylifera* (Gueye et al., 2009) e *Bactris gasipaes* (Steinmacher et al., 2007).

A relação ECA/EI e CEM/ECA (Tabela 3) apresentou variações entre as famílias, havendo maior favorecimento para a família 18 na formação de calos a partir dos embriões intumescidos, se compararmos a formação de calos embriogênicos a partir do total de calos, essa foi nula. Portanto, podemos observar que a embriogênese somática está ligada ao intumescimento do embrião zigótico e calogênese, mas estes processos não são garantia de ocorrência de embriões somáticos.

As famílias 1 e 9 apresentaram as maiores taxas de formação de LEs, como também os maiores valores de ECA e CEM (Tabela 3). Porém, as LEs também foram formadas a partir de baixas taxas de CEM, ou seja, a quantidade de CEM não irá influenciar na quantidade de formação de LEs, não havendo dessa forma uma influência direta entre as duas variáveis.

Foi observado no presente trabalho que a oxidação dos explantes não foram prejudiciais na indução de LEs, apesar de serem para a sua multiplicação. A oxidação é um fenômeno caracterizado pelo escurecimento atribuído à produção da enzima polifenoloxidase (PPO). Esses produtos fenólicos são tóxicos ao resto do explante e se difunde no meio podendo levá-los a morte. Em espécies lenhosas, esse problema é intensificado, pois nessas espécies há mais precursores da síntese de lignina, os quais são ricos em compostos fenólicos (Van Winkle et al., 2003). Uma das causas desse processo é devido ao estresse abiótico imposto, tais como injúrias ao tecido vegetal e alta concentração de reguladores de crescimento. A fim de evitar a oxidação são inseridas ao meio de cultura substâncias antioxidantes, como ácido ascórbico, ácido cítrico, polivinilpirrolidona (PVP) e além dessas substâncias, carvão ativado.

A partir da análise de variância (ANOVA) dos caracteres na fase de indução foi possível observar que houve significância pelo teste F, porém as médias foram

semelhantes entre si pelo teste comparativo e também observado altos coeficientes de variação (CV) (Tabela 2), segundo a classificação de Pimentel Gomes e Garcia (2002).

Os altos valores de CV, resultantes da elevada variação entre as repetições, reduziu o poder do teste de Tukey em detectar diferença entre as médias das famílias de *A. aculeata*. Esse resultado era esperado, por se utilizar explantes com alta variabilidade genética. Outra causa do alto CV pode ter sido o número insuficiente de embriões por parcela.

Outra forma de avaliação da variabilidade existente entre os genótipos é por meio das estimativas de divergência genética. Estudos de divergência genética são de grande importância para o conhecimento da variabilidade genética das populações (Cruz et al., 2012). Para determinar quão distante geneticamente os indivíduos de uma população são uns dos outros, são utilizados métodos biométricos, os quais são analisados pela estatística multivariada permitindo unificar múltiplas informações de um conjunto de caracteres (Sudré et al., 2005).

O método de otimização de Tocher requer a obtenção da matriz de dissimilaridade, onde se assume que a média das medidas de dissimilaridade dentro de cada grupo deve ser menor que a distância média entre os grupos, sobre o qual é identificado o par de genótipos mais similares, que constituirá o grupo inicial (Cruz et al., 2012). Análises de agrupamento são bastante utilizadas para avaliar a divergência genética através de caracteres morfo-agronômicos em palmáceas (Negreiros et al., 2013; Oliveira et al., 2007; Ribeiro et al., 1999). Apesar de não ser amplamente utilizada para avaliação da divergência genética de caracteres relacionados com a indução de calogênese *in vitro*, a análise de agrupamento também pode auxiliar na diferenciação dos genótipos. No presente estudo a análise de agrupamento permitiu separar as famílias em grupos distintos em cada meio de indução (Tabela 5) o que comprova que as famílias respondem de forma diferenciada aos tratamentos de indução e que cada família tem um comportamento diferenciado entre os tratamentos.

A proliferação de LEs é parte essencial de qualquer protocolo eficiente de regeneração de plantas, pelo fato de prover um suprimento contínuo de material permitindo a sua propagação em larga escala em espaço reduzido (Deo et al., 2010). Na fase de multiplicação das massas pró-embriogênicas (MPEs), geralmente é utilizada a mesma concentração de auxinas do meio de indução ou até mesmo a sua redução (Moura et al., 2009; Rajesh et al., 2003; Huong et al., 1999).

No presente trabalho foi observada uma melhor resposta com o aumento da concentração das auxinas em *A. aculeata*, isso provavelmente está relacionado com a possível recalcitrância da espécie em induzir embriogênese somática secundária. O sucesso da manutenção das células em um mesmo estágio de desenvolvimento, sem a sua diferenciação, depende da compatibilidade perfeita entre a concentração de auxina e o estado fisiológico do material vegetal. A oxidação observada nessa fase prejudicou a obtenção e o processo proliferativo de novas MPEs.

A etapa de maturação foi caracterizada pela suplementação de carvão ativado e também pela inclusão do ANA ao meio e os melhores resultados foram encontrados em meio com carvão ativado, havendo maior porcentagem na maturação das MPEs nas diferentes famílias. Paim Pinto et al. (2011), trabalhando com *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, afirmaram que a adição de carvão ativado no meio de maturação foi essencial para a diferenciação dos embriões somáticos.

O carvão ativado é frequentemente adicionado ao meio a fim de adsorver e minimizar a toxicidade do regulador ou de substâncias com efeitos deletérios, como os compostos fenólicos (Guedes et al., 2011; Sáenz et al., 2010). Suranthran et al. (2011) também verificaram melhor resposta de *Elaeis guineensis* em meios com alta concentração de carvão ativado (2 mg L^{-1}) na regeneração e conversão de plantas a partir de embriões zigóticos. Silva et al. (2013) também observaram completa formação dos embriões somáticos, em meio de maturação contendo carvão ativado.

Além do carvão ativado, a suplementação de aminoácidos também pode ter influenciado a maturação das MPEs, uma vez que espécies de monocotiledôneas requerem suplementação de nitrogênio nos cultivos *in vitro* para uma melhor promoção da embriogênese somática (Sun e Hong, 2012).

A germinação dos embriões somáticos também depende de fatores genéticos. Sanputawong e Te-Chato (2011) observaram em embriões zigóticos de *Elaeis guineensis* que apesar do meio semelhante ocorreram respostas distintas na germinação. Enquanto uns apresentaram a formação de parte aérea e plântulas completas, outros embriões só produziram raízes. Silva et al (2012) observaram em *Elaeis guineensis* a diferença na velocidade de resposta quanto à formação de plântulas entre os genótipos, sugerindo a influência do genótipo na regeneração. Em diferentes variedades de *Areca catechu* também foi observada resposta diferencial no desenvolvimento de plântulas (Karun et al., 2004). No presente trabalho, também foi observado que alguns genótipos

exibem uma melhor capacidade de germinação, já outros são recalcitrantes ou não responsivos.

Os reguladores de crescimento também possuem uma forte influência nessa fase, sendo observados maiores números de embriões germinados em meio contendo o GA₃ em combinação com 2iP ou em meio com ANA em combinação com a mesma citocinina. No trabalho de Moura et al. (2009), não foi possível garantir a formação de plântulas. Esse fato pode estar relacionado com o requerimento de reguladores de crescimento para alguns genótipos e a adequada concentração de sacarose utilizada para a germinação dos embriões somáticos.

Segundo Taiz e Zeiger (2004), na maioria das espécies, as giberelinas (GA₃) promovem a expansão celular e o alongamento da parte aérea e das raízes, fazendo com que a raiz primária rompa os tecidos que restringem seu crescimento. O desenvolvimento dos embriões somáticos requer estímulos hormonais exógenos, como os reguladores de crescimento que podem ser adicionados ao meio de cultura de forma isolada ou em combinação.

A emissão da radícula foi observada antes da parte aérea, durante a germinação de *A. aculeata*, esse fato se deve a essa área possuir formação independente dos meristemas, por isso foi observado inicialmente o alongamento do pecíolo cotiledonar e a protusão da raiz, em relação à plúmula.

No desenvolvimento do cotilédone na *A. aculeata*, o alongamento celular é o principal responsável pelo crescimento do pecíolo cotiledonar, sendo observado mais do que a própria mitose. O aumento do volume celular reflete no aumento do diâmetro da estrutura que ocorre devido a divisões celulares das células subepidérmicas. Esse processo também é observado durante o desenvolvimento do haustório (Ribeiro et al., 2012). Foi observado no presente trabalho a formação de um ou dois haustórios e a formação exclusiva de raiz e de parte aérea, o que pode ser devido a anormalidades dos embriões somáticos ocorrida durante o processo de maturação.

O enraizamento também é um fator que exhibe influência de genótipos, sendo observadas diferenças entre as famílias utilizadas. Foram observadas dificuldades na formação de raízes secundárias e terciárias nas plântulas de *A. aculeata* obtidas a partir de embriões somáticos. Diante disso, sugere-se estudos mais detalhados entre genótipos de *A. aculeata* na fase de enraizamento, permitindo o desenvolvimento eficiente de raízes secundárias e terciárias.

A comparação histológica do embrião somático com a estrutura do embrião zigótico, durante os 120 dias da indução, mostra que a região distal pouco se diferenciou em relação a proximal, onde foram formadas as massas meristemáticas. Moura et al. (2008) também observaram divisão de células na região proximal resultando na formação de embriões de origem multicelular, porém não obtiveram sucesso na multiplicação e regeneração desses pró-embriões somáticos em plântulas. Os autores observaram que a região distal do embrião, composta inteiramente pelo cotilédone, o haustório, foi a mais respondente. Luis e Scherwinki-Pereira (2014) também observaram a região distal como sendo a mais respondente, diferente do que foi observado no presente trabalho.

O estímulo causado pela inclusão da citocinina ao meio de indução parece ter afetado positivamente a região proximal, onde se encontra o meristema apical, induzindo maior proliferação de células que originaram os calos embriogênicos. Em *Elaeis guineensis*, Silva et al. (2013) induziram a ES em embriões zigóticos e observaram a ocorrência de intensa divisão celular na região proximal do explante, portanto confirmando a região mais respondente ao estímulo imposto, corroborando com os resultados aqui encontrados.

A análise histológica dos embriões somáticos após 60 dias de maturação comprovou a formação de uma protoderme bem definida, cordões procambiais fechados e a formação de uma camada de mucilagem na superfície da nova protoderme formada nos embriões somáticos. Ribeiro et al. (2012), induzindo a germinação *in vitro* de embriões zigóticos de *A. aculeata*, também observaram essa mucilagem rica em pectina. Além da presença de uma camada mucilagínosa na superfície da protoderme dos embriões somáticos, estômatos também foram observados.

Em *Brassica napus*, uma camada de mucilagem também foi encontrada sobre as células epidérmicas do explante, detectado até a fase de desenvolvimento embrionário globular, o que sugere a existência de um possível marcador para a aquisição de competência embriogênica (Namasivayam et al., 2006). Verdeil et al., (2001) observaram a formação da camada de mucilagem ao redor de células embriogênicas em *Cocos nucifera*, o que foi caracterizado como modificação estrutural celular para aquisição de competência embriogênica. De forma semelhante, a presença de mucilagem pode estar relacionada com a embriogênese somática da *A. aculeata*.

Em *A. aculeata*, foi observada por Ribeiro et al. (2012) a presença de estômatos na protoderme da região distal do embrião zigótico (haustório), a qual foi associada à

grande demanda de oxigênio pelos tecidos. Nesse estudo foram identificados tecidos de textura esponjosa e coloração branca na região distal do embrião somático, sendo esses nomeados haustórios (Figura 2C e 2E). O haustório no embrião somático também pode estar relacionado com a transferência de nutrientes do meio, até que as raízes estejam completamente desenvolvidas, as quais passam a assumir esse papel, nutrindo a plântula em condições heterotróficas.

Foram evidenciadas a presença de invaginações no haustório de *A. aculeata*, semelhante ao que foi observado por Aguiar e Mendonça (2002) em haustórios de embriões de *Euterpe precatória* durante o processo germinativo. A presença de invaginações está associada ao aumento da superfície de contato para absorver e transferir os nutrientes essenciais ao embrião, seja no endosperma (germinação *ex vitro*) ou no meio de cultura (germinação *in vitro*). Esta investigação demonstra grande similaridade morfo-anatômica entre os tecidos do embrião zigótico e do somático.

É notável grande avanço no processo de embriogênese somática, no que se diz à obtenção e manutenção de MPEs e também na germinação dos embriões somáticos da espécie. Porém, são necessários mais estudos nas fases de maturação das MPEs a fim de se obter maior número de embriões com desenvolvimento normal e no enraizamento para a formação de raízes secundárias e terciárias, estruturas importantes para a absorção de nutrientes, podendo assim ser consolidada a obtenção de plantas de *A. aculeata in vitro*.

6. CONCLUSÕES

Há resposta diferencial em relação à indução de embriogênese somática *in vitro* entre as 19 famílias de polinização aberta de *A. aculeata*, sendo as famílias 1 e 9 as mais competentes *in vitro*, em relação ao caráter formação de linhagens embriogênicas.

O protocolo obtido permitiu a obtenção e manutenção de linhagens embriogênicas a partir de embriões zigóticos maduros nos diferentes genótipos de *A. aculeata*, além de ser evidenciada a eficiência do Picloram e Dicamba em combinação com o 2iP na indução das linhagens. Em meio suplementado com Dicamba obteve-se maior número de linhagens embriogênicas, apesar do meio com Picloram ser superior em relação à porcentagem de intumescimento de embriões, porcentagem de embriões calejados e porcentagem de calos embriogênicos. A camada de mucilagem formada nos embriões somáticos pode estar relacionada com o processo de embriogênese somática da espécie.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdullah, R.; Zainal, A.; Yew Heng, W.; Chui Li, L.; Chee Beng, Y.; Mei Ping, L.; Abdullah Sirajuddin, S.; Yap Soo Ping, W.; Lourdes Joseph, J. Immature embryo: A useful tool for oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) genetic transformation studies. **Electronic Journal of Biotechnology**, 8:24-35, 2005.

Abreu, A. G.; Priolli, R. H. G.; Azevedo-Filho, J. A.; Nucci, S. N.; Zucchi, M. I.; Coelho, R. M.; Colombo, C. A. The genetic structure and mating system of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). **Genetics and Molecular Biology**, 35:119-121, 2012.

Aguiar, M. O.; Mendonça, M. S. Aspectos morfo-anatômicos do embrião de *Euterpe precatoria* Mart. durante o processo germinativo. **Acta Botanica Brasilica**, 16:241-249, 2002.

Al-Khayri, J. M.; Al-Bahrany. Effect of abscisic acid and polyethylene glycol on the synchronization of somatic embryo development in Date palm (*Phoenix dactylifera* L.). **Biotechnology**, 11:318-325, 2012.

Al-Khayri, J. M..Al-Bahrany, A. M. Silver nitrate and 2-isopentyladenine promote somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.). **Scientia Horticulturae**, 89:291-298, 2001.

Balzon, T. A.; Luis, Z. G.; Scherwinsk-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 and Developmental Biology Plant**, 49:41-50, 2013.

Carman, J. G.; Jefferson, N. E.; Campbel, W. F. Induction of embryogenic *Triticum aestivum* L. calli. II. Quantification of organic addenda and other culture variable effects. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 12:97-110, 1988.

Chan, J. L.; Saénz, L.; Talavera, C.; horning, M.; Oropeza, C. Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**, 17: 515-521, 1998.

- Chehmalee, S.; Te-chato, S. Induction of somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured zygotic embryo of oil palm. **Journal of Agricultural Technology**, 4:137-46, 2008.
- Cruz, C. D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum Agronomy**, 35:271-276, 2013.
- Cruz, C. D.; Regazzi, A. J.; Carneiro, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento Genético**. Viçosa: UFV, v.1, 4ª edição, 2012, 514 p.
- Deo, P. C.; Taylor, M.; Harding, R. M.; Tyagi, A. P.; Becker, D. K.; Initiation of embryogenic cell suspensions of taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*) and plant regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 100:283-291, 2010.
- Dodeman, V. L.; Ducreux, G.; Kreis, M. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. **Journal of Experimental Botany**, 48:1493-1509, 1997.
- Dudits, D.; Bögre, L.; Györyey, J. Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic cells in vitro. **Journal of Cell Science**, 99:475-484, 1991.
- 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, 1978.
- Eke, C. R., Akomeah, P.; 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.
- Fehér A.; Pasternak, T. P.; Dudits, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 74:201-228, 2003.
- Fernando, S.C., Verdeil, J.L., Hoher, 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.
- Golle, D. P.; Reniger, L. R. S.; Curti, A. R.; Bevilacqua, C. B. Melhoramento florestal: ênfase na aplicação da biotecnologia. **Ciência Rural**, 39:1606-1613, 2009.

Guedes, R. S.; Silva, T. L.; Luis, Z. G.; Scherwinski-Pereira, J. E. Initial requirements for embryogenic calluses initiation in thin cell layers explants from immature female oil palm inflorescences. **African Journal of Biotechnology**. 10:10774-10780, 2011.

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. L. Acquisition of callogenic capacity in date palm leaf tissues in response to 2,4-D treatment. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 99:35-45, 2009.

Henderson, A.; Galeano, G.; Bernal, R. **Field guide to the palms of the Americas**. New Jersey: Princeton University Press, 1995.

Henry, Y.; Vain, P.; De Buyser, J. Genetic analysis of in vitro plant tissue culture responses and regeneration capacities. **Euphytica**, 79:45-58, 1994.

Huong, L. T. L.; Baiocco, M.; Huy, B. P.; Mezzetti, B.; Santilocchi, R.; Rosati, P. Somatic embryogenesis in Canary Island date palm. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 56:1-7, 1999.

Jiménez, V. Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 13:196-223, 2001.

Johansen, D. A. **Plant microtechnique**. New York. McGraw-Hill Book Co. Inc. 523p. 1940.

Karun, A.; Siril, E. A.; Radha, E.; Parthasarathy, V. A. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from leaf and inflorescence explants of arecanut (*Areca catechu* L.). **Current Science**, 89:1623-1628.

Kerbaudy, G. B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 452 p.

Khierallah, H. S. M.; Hussein, N. H. The role of coconut water and casein hydrolysate in somatic embryogenesis of date palm and genetic stability detection using RAPD markers. **Research in Biotechnology**, 4:20-28, 2013.

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

- 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**, Published online, may, 2014.
- Maciel, S. A.; Fermino Junior, P. C. P.; da Silva, R. A.; Scherwinski-Pereira, J. E. Morpho-anatomical characterization of embryogenic calluses from immature zygotic embryo of peach palm during somatic embryogenesis. **Acta Scientiarum Agronomy**, 32:263-267, 2010.
- Manfio, C. E.; Motoike, S. Y.; Resende, M. D. V.; Santos, C. E. M.; Sato, A. Y. Avaliação de progênies de *A. aculeata* na fase juvenil e estimativas de parâmetros genéticos e diversidade genética. **Pesquisa Florestal Brasileira**, 32:63-68, 2012.
- Manfio, C. E.; Motoike, S. Y.; Santos, C. E. M.; Pimentel, L. D.; Queiroz, V.; Sato, A. Y. Repetibilidade em características biométricas do fruto de *A. aculeata*. **Ciência Rural**, 41:70-76, 2011.
- Motta, P. E. F.; Curi, N.; Oliveira-Filho, A. T.; Gomes, J. B. V. Ocorrência da *A. aculeata* em Minas Gerais: relação com atributos climáticos, pedológicos e vegetacionais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 37:1023-1031, 2002.
- Moura, E. F.; Ventrella, M. C.; Motoike, S. Y.; Sá Júnior, A. Q.; Carvalho, M.; Manfio, C. E. Histological study of somatic embryogenesis induction on zygotic embryos of macaw palm (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lood. Ex Martius). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 95:175-184, 2008.
- Moura, E. F.; Motoike, S. Y.; Ventrella, M. C.; Sá Júnior, A. Q.; Carvalho, M. Somatic embryogenesis in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from zygotic embryos. **Scientia Horticulturae**, 119:447-454, 2009.
- Murashige, T.; Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissues cultures. **Physiologia Plantarum**, 15:473-497, 1962.
- Namasivayam, P.; Skepper, J.; Hanke, D. Identification of a potential structural marker for embryogenic competency in the *Brassica napus* ssp. *Oleifera* embryogenic tissue. **Plant Cell Reports**, 25:887-895, 2006.

Negreiros, J. R. S.; Bergo, C. L.; Miqueloni, D. P.; Lunz, A. M. P. Divergência genética entre progênies de pupunheira quanto a caracteres de palmito. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 48:496-503, 2013.

O'Brien, T. P.; Feder, N.; McCully, M. E. Pylchromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, 59:368-373, 1964.

Oliveira, M. S. P.; Ferreira, D. F.; Santos, J. B. Divergência genética entre acessos de açazeiro fundamentada em descritores morfo-agronômicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 42: 501-506, 2007.

Pérez-Núñez, M. T.; Chan, J. L.; Sáenz, L.; González, T.; Verdeil, J. L.; Oropeza, C. Improved somatic embryogenesis from *Cocos nucifera* (L.) plumule explants. **In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant**, 42:37-43, 2006.

Paim Pinto, D. L. P.; Almeida, A. M. R.; Rêgo, M. M.; Silva, M. L.; Oliveira, E. J.; Otoni W. C. Somatic embryogenesis from mature zygotic embryos of commercial passionfruit (*Passiflora edulis* Sims) genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 107:521-530, 2011.

Pimentel Gomes, F.; Garcia, C. H. **Estatística aplicada a experimentos agrônômicos e florestais**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 309 p.

Rajesh, M. K.; Radha, E.; Karun, A.; Parthasarathy, V. A. Plant regeneration from embryo-derived callus of oil palm - The effect of exogenous polyamines. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 75:41- 47, 2003.

Raju, C. S.; Kathiravan, K.; Aslam, A.; Shajahan, A. An efficient regeneration system via somatic embryogenesis in mango ginger (*Curcuma amada* Roxb.) **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 112:387-393, 2013.

Ribeiro, L. M.; Oliveira, D. M. T.; Garcia, Q. S. Structural evaluations of zygotic embryos and seedlings of the macaw palm (*Acrocomia aculeata*, Arecaceae) during in vitro germination. **Trees**, 26:851-863, 2012.

Ribeiro, F. E.; Soares, A. R.; Ramalho, M. A. Divergência genética entre populações de coqueiro-gigante-do-Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 34:1615-1622, 1999.

- Saénz, L.; Herrera-Herrera, G.; Uicab-Ballote, F.; Chan, J. L.; Oropeza, C. Influence of form of activated charcoal on embryogenic callus formation in coconut (*Cocos nucifera*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 100:301-308, 2010.
- Saldanha, C. W.; Martins-Corder, M. P.; Steinmacher, D. A.; Guerra, M. P. In vitro morphogenesis in zygotic embryos and leaf sheaths of *Euterpe edulis* Martius (Arecaceae). **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 6:228-235, 2006.
- Sané, D.; Borgel, A.; Verdeil, J-L.; Gassama-Dia, Y. K. Plantlet regeneration via somatic embryogenesis in immature zygotic embryo callus from a tree species adapted to arid lands: *Acacia tortilis* subsp. *raddiana* (Savi.) Brenan, **Acta Botanica Gallica**, 147:257–266, 2000.
- Sané, D.; Bertossi, F. A.; Diatta, L. I. D.; 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**, Article ID 837395, 2012.
- Sanputawong, S.; Te-chato, S. Analysis of somaclonal variation of callus, somatic embryo and plant regeneration of in vitro oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Journal of Agricultural Technology**, 7:531-545, 2011.
- Scariot, A.; Lleras, E.; Hay, J. D. Reproductive biology of the palm *Acrocomia aculeata* in Central Brazil. **Biotropica**, 23:12-22, 1991.
- Scherwinsk-Pereira, J. E.; Guedes, R. S.; Silva, R. A.; Fermino Jr, 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, R. C.; Luis, Z. G.; Scherwinski-Pereira, J. E. The histodifferentiation events involved during the acquisition and development of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Plant Growth Regulation**, 2013

Singh, D. The relative importance of characters affecting divergence. **Indian Journal of Genetics and Plant Breeding**, 41:237-245, 1981.

Steinmacher, D. A.; Krohn, N. G.; Dantas, A. C. M.; Stefenon, V. M.; Clement, C. R.; Guerra, M. P. Somatic Embryogenesis in Peach Palm Using the Thin Cell Layer Technique: Induction, Morpho-histological Aspects and AFLP Analysis of Somaclonal Variation. **Annals of Botany**, 100:699-709, 2007a.

Steinmacher, D. A.; Clement, C. R.; Guerra, M. P. Somatic embryogenesis from immature peach palm inflorescence explants: towards development of an efficient protocol. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 89:15-22, 2007b.

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.

Sudré, C.P., Rodrigues, R., Riva, E.M., Karasawa, M., Amaral Júnior, A.T. Divergência genética entre acessos de pimenta e pimentão utilizando técnicas multivariadas. **Horticultura Brasileira**, 23:22-27, 2005.

Sun, Y. L.; Hong, S. K. **Recent advances of in vitro embryogenesis of monocotyledon and dicotyledon**. In: Embryogenesis, Sato, K. I. (Ed.), ISBN: 978-953-51-0466-7, InTech, p.269-296, 2012. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/embryogenesis/recent-advances-of-in-vitro-embryogenesis-ofmonocotyledon-and-dicotyledon>.

Suranthran, P.; Sinniah, U. R.; Subramaniam, S.; Aziz, M. A.; Romzi, N.; Gantait, S. Effect of plant growth regulators and activated charcoal on in vitro growth and development of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq. var. Dura) zygotic embryo. **African Journal of Biotechnology**, 10:10600-10606, 2011.

Taiz, L.; Zeiger, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004, 719 p.

Thawaro S.; Te-chato S. Effect of genotypes and auxins on callus formation from mature zygotic embryos of hybrid oil palms. **Journal of Agricultural Technology**, 5:167-177, 2009.

Thuzar, M.; Vanavicht, A.; Tragoonrung, S.; Jantasuriyarat, T. C. Efficient and rapid plant regeneration of oil palm zygotic embryos cv. “Tenera” through somatic embryogenesis. **Acta Physiologiae Plantarum**, 33:123-128, 2011.

Van Winkle, S.; Johnson, S.; Pullman, G.S. The impact of Gelrite and activated carbon on the elemental composition of two conifer embryogenic tissue initiation media **Plant Cell Reports**, 21:1175-1182, 2003.

Verdeil, J. L.; Hocher, V.; Huet, C.; Grosdemange, F.; Escoute, J.; Ferrière, N.; Nicole, M. Ultrastructural Changes in Coconut Calli Associated with the Acquisition of Embryogenic Competence. **Annals of Botany**, 88: 9-18, 2001.

Viñas, M.; Jiménez, V. M. Factores que influyen en la embriogénesis somática in vitro de palmas (Arecaceae). **Revista Colombiana de Biotecnología**, 8:229-242, 2011.

Wang, H. C.; Chen, J. T.; Chang, W. C. Morphogenetic routes of long-term embryogenic callus culture of *Areca catechu*. **Biologia Plantarum**, 54:1-5, 2010.

Yang, J. L.; Seong, E. S.; Kim, H. J.; Ghimire, B. K.; Kang, W. H.; Yu, C. Y.; Li, C. H. Direct somatic embryogenesis from pericycle cells of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) root explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 100:49-58, 2010.

Zouine, J.; El Bellaj, M.; Meddich, A.; Verdeil, J. L.; El Hadrami, I. Proliferation and germination of somatic embryos from embryogenic suspension cultures in *Phoenix dactylifera*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 82:83-92, 2005.

Zouine, J.; Hadrami, I. E. Effect of 2,4-D, glutamine and BAP on embryogenic suspension culture of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). **Scientia Horticulturae**, 112:221-226, 2007.

8. ANEXOS

Análise de variância (ANOVA) das fases subsequentes a indução de embriogênese somática em *A. aculeata*.

Tabela 1. Resumo da análise de variância (ANOVA) em relação ao caráter crescimento da massa pró-embriogênica, em quatro famílias de *A. aculeata*, avaliados aos 45 dias em meio de multiplicação

FV	GL	Q.M.
		Crescimento das MPEs
Concentração	1	1.501
Auxina	1	0.002
Família	3	0.513
Conc x Auxi	1	0.420
Conc x Fam	3	1.676*
Aux x Fam	3	0.230
Conc x Aux x fam	3	0.005
Resíduo	32	0.309
Média		6.43
CV(%)		8.64

CV = Coeficiente de variação; ^{ns} Não significativo; * e ** significativo a 5 e 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 2. Resumo da análise de variância (ANOVA) em relação ao número de embriões regenerados (NER) e número de embriões que germinaram precocemente (GP), em quatro famílias de *A. aculeata*, avaliados aos 60 dias em meio de maturação

FV	GL	Q.M.	
		NER	GP
Famílias	3	348.96*	59.24*
Tratamentos	1	1912.68*	172.52*
Família x Tratamento	3	646.46*	55.138*
Resíduo	35	47.91	9.76
Média		21.77	2.77
CV(%)		31.79	112.77

CV = Coeficiente de variação; ^{ns} Não significativo; * e ** significativo a 5 e 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 3. Resumo da análise de variância (ANOVA) na primeira etapa de germinação, em relação ao número de embriões germinados em quatro famílias de *A. aculeata*, avaliados após 30 dias de incubação em meio de germinação

FV	GL	Q.M. NEG
Famílias	3	96.22*
Tratamentos	3	17.89
Famílias x Tratamentos	9	45.51*
Resíduo	48	15.60
Média		13.39
CV(%)		29.50

CV = Coeficiente de variação; ^{ns} Não significativo; * e ** significativo a 5 e 1% de probabilidade pelo teste F.