

VANESSA DE QUEIROZ

CLONAGEM *IN VITRO* DE GENÓTIPOS ADULTOS DE MACAÚBA (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Martins) VIA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

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

Orientador: Sérgio Yoshimitsu Motoike

Coorientadores: Diego Ismael Rocha
Edgard A. de Toledo Picoli

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2023**

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

T

Q3c
2023

Queiroz, Vanessa de, 1986-

Clonagem in vitro de genótipos adultos de macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Martins) via embriogênese somática / Vanessa de Queiroz. – Viçosa, MG, 2023.

1 tese eletrônica (63 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Sérgio Yoshimitsu Motoike.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Agronomia, 2023.

Referências bibliográficas: f. 56-63.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.614>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Clonagem. 2. Macaúba. 3. Tecidos vegetais - Cultura e meios de cultura. I. Motoike, Sérgio Yoshimitsu, 1967-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Agronomia. Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia. III. Título.

CDD 22. ed. 660.65


VANESSA DE QUEIROZ

CLONAGEM *IN VITRO* DE GENÓTIPOS ADULTOS DE MACAÚBA (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Martins) VIA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA


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

APROVADA: 10 de julho de 2023.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 **VANESSA DE QUEIROZ**
Data: 04/10/2023 13:04:21-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Vanessa de Queiroz
Autora

Documento assinado digitalmente
 **SERGIO YOSHIMITSU MOTOIKE**
Data: 06/10/2023 09:40:56-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Sérgio Yoshimitsu Motoike
Orientador

Ofereço

Aos meus pais Rafael e Luzia, pelo amor incondicional, carinho e incentivo

Aos meus irmãos Valéria, Valdeney, Vanderson e Rafael por todo apoio

A minha avó Anastácia (in memoriam) por tanto amor e carinho

Aos meus sobrinhos Matheus, Gabriella e Micael pela alegria da vida

À todos meus tios e tias, primos e primas, amigos e amigas que torceram por mim

Dedico:

Ao Pai, toda honra e toda a glória, agora e para sempre, Amém!

"Tudo o que fizerem, seja em palavra ou em ação, façam-no em nome do Senhor Jesus, dando por meio dele graças a Deus Pai. Colossenses 3:17"

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, por todas as graças concedidas, por ter me dado força para concretizar meus objetivos e por ter colocado pessoas especiais em minha vida.

À minha amada família por todo apoio e palavras de incentivo que me motivaram, tornando este sonho realidade.

À Universidade Federal de Viçosa em especial ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, pela oportunidade de realizar o doutorado.

Ao meu orientador Sérgio Yoshimitsu Motoike pelos ensinamentos, paciência, confiança, incentivo e oportunidade proporcionada.

Aos coorientadores Diego Ismael Rocha e Edgard Augusto de Toledo Picoli pela ajuda, disponibilidade, dedicação e valiosas contribuições.

Aos membros da banca, Luciana Domiciano Silva Rosado e Manuela Maria Cavalcante Granja pela ajuda e contribuições.

À pesquisadora D. Sc. Kacilda Naomi Kuki pela disposição em ajudar sempre com valiosas sugestões.

À técnica Elaine pela dedicação, seriedade e compromisso com o projeto.

Ao técnico Francisco sempre disposto a ajudar, e colaborando em todos os momentos que precisei.

Aos funcionários Beбето e Sabino por toda a ajuda nos experimentos.

Aos companheiros de laboratório Fernanda, João e Lucas que não mediram esforços e colaboraram no experimento.

As amigas Thaís Cristina e Dayane, pela amizade pelo companheirismo e todas as maravilhosas experiências vividas nesses anos de universidade.

À todos os colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos e Células Vegetais pela contribuição.

Aos funcionários do campo experimental de Araponga e ao Emiliano, que foram essenciais para a realização dos experimentos.

Aos funcionários da empresa Acrotech por todo apoio e em especial a Paula e ao Felipe por toda a ajuda necessária para execução dos experimentos.

À todos do Laboratório de Anatomia Vegetal em especial Elienai e Aurora por dedicarem tempo para ensinar e auxiliar na análises.

À Acrotech pelo apoio financeiro ao projeto e por todas as informações e sugestões concedidas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG),
pela concessão da bolsa de estudos no curso de graduação em Agronomia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES),
pela concessão da bolsa de estudos no mestrado no programa de pós graduação em
Fitotecnia.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq),
pela concessão da bolsa de estudos no doutorado no programa de pós graduação em
Fitotecnia.

BIOGRAFIA

Vanessa de Queiroz, solteira, 37 anos de idade, filha de Rafael Silvério de Queiroz e Luzia Estevão de Queiroz, nasceu em 14 de maio de 1986, em Viçosa, Minas Gerais-Brasil. cursou o ensino básico na Escola Estadual Padre Álvaro Corrêa Borges em Viçosa-MG e o ensino médio no Colégio Anglo de Viçosa, Viçosa-MG, concluindo em 2004. Ingressou em 2007 no curso de Agronomia na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, graduando-se em janeiro de 2012. Em 2015 ingressou no curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia (PPGFIT) da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, concluindo-o em maio de 2017. Em 2019 ingressou no curso de Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia (PPGFIT) da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, submetendo-se à defesa de tese em 10 de julho de 2023.

RESUMO

QUEIROZ, Vanessa de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2023. **Clonagem *in vitro* de genótipos adultos de macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Martins) via embriogênese somática.** Orientador: Sergio Yoshimitsu Motoike. Coorientadores: Diego Ismael Rocha e Edgard Augusto de Toledo Picoli.

A macaúba (*Acrocomia aculeata*) é uma palmeira nativa com grande potencial econômico. O presente trabalho teve como objetivo estabelecer um protocolo eficiente para a clonagem de macaúba, a partir de folhas imaturas de plantas adultas altamente produtivas em óleo e a caracterização anatômica e histoquímica dos calos embriogênicos formados. Foram utilizados 12 materiais genéticos oriundos do município de Araponga-MG e 1 material genético oriundo da empresa Acrotech localizada no município de Viçosa, MG, Brasil. Explantes foliares desses 13 genótipos foram inoculados em meio de indução contendo sais Y3 e H (Hoagland), com concentrações 180, 270, 360, 450, 540, 630 e 720 μM de picloram. Perfazendo um fatorial triplo, formando ao final 182 combinações. Foi realizado 20 repetições por combinação totalizando 3640 unidades experimentais, sendo que cada unidade experimental era composta por cada placa de Petri contendo 5 explante. Foi avaliado o número de explantes calejados e oxidados e realizado a caracterização anatômica e histoquímica dos calos. Os calos obtidos da indução foram submetidos a meios básicos de multiplicação com sais Y3-modificado e C4 com concentrações de 18 e 63 μM de picloram com 1,0 e 2,0 μM de 2iP, respectivamente, e 630 μM de picloram com 10 μM de 2iP, utilizando carvão 3g L⁻¹. Todos os meios testados foram acrescidos de sacarose 20 g L⁻¹, suplementados com 1000 μM de putrescina. As massas embriogênicas obtidas dessa etapa foram submetidas ao meio de regeneração C4, com ausência de picloram acrescido 1000 μM de putrescina e 0,1 μM de 2iP. Os embriões obtidos foram inoculados em meio de germinação C4, suplementados com 0,54 μM de ANA e 1000 μM de putrescina, onde regeneraram plântulas. O meio Y3 foi mais eficiente na formação de calos embriogênicos. O meio C4 foi o mais eficiente nas etapas de multiplicação, regeneração e germinação. A dose de 450 μM de picloram foi a que resultou em maior número de explantes calejados. A dose de 630 μM de picloram foi a que resultou menor número de explantes calejados. Contudo, essa dose foi a que proporcionou calos diferenciados quando inoculados em meio de

multiplicação, regeneração e germinação, com consequente conversão em plântulas. A formação de estruturas pró-embriogênicas se inicia a partir da reativação de células associadas as nervuras foliares dos explantes. As pectinas, polissacarídeos neutros e grãos de amido são diferencialmente distribuídos nos tecidos vegetais ao longo do processo de indução de embriogênese somática. A presença de amido e pectinas nas adjacências dos centros meristemáticos pode estar vinculado à aquisição de potencial embriogênico.

Palavras-chave: Arecaceae. Regeneração *in vitro*. Cultura de Tecidos.

ABSTRACT

QUEIROZ, Vanessa de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2023. **In vitro cloning of adult macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Martins) genotypes via somatic embryogenesis.** Advisor: Sergio Yoshimitsu Motoike. Co-advisers: Diego Ismael Rocha and Edgard Augusto de Toledo Picoli.

The macaúba (*Acrocomia aculeata*) is a native palm tree with great economic potential. The present work aimed to establish an efficient protocol for the cloning of macaúba, from immature leaves of adult genotypes highly productive in oil and the anatomical and histochemical characterization of the embryogenic calli formed. In order to do that, we used 12 cultivated genotypes from the city of Araponga-MG and one genotype from the company Acrotech located in the city of Viçosa, MG, Brazil. Leaf explants of these 13 genotypes were inoculated in induction medium containing Y3 and H salts (Hoagland), with concentrations of 180, 270, 360, 450, 540, 630 and 720 μM of picloram. Calculating a triple factorial $2 \times 7 \times 13$, ultimately forming 182 combinations. Twenty repetitions were performed per combination, totalizing 3640 experimental units, with each experimental unit consisting of each Petri dish containing 5 explants. The number of calloused and oxidized explants was evaluated and the anatomical and histochemical characterization of the calluses was performed. Calli obtained from induction were subjected to basic multiplication media with Y3-modified and C4 salts with concentrations of 18 and 63 μM of picloram with 1.0 and 2.0 μM of 2iP, respectively, and 630 μM of picloram with 10 μM of 2iP, using 3g L^{-1} coal. All media tested were added with 20g L^{-1} sucrose, supplemented with 1000 μM putrescine. The embryogenic masses obtained from this stage were subjected to C4 regeneration medium, with the absence of picloram plus 1000 μM of putrescine and 0.1 μM of 2iP. The embryos obtained were inoculated in C4 twinning medium, supplemented with 0.54 μM ANA and 1000 μM putrescine, where seedlings were regenerated. The Y3 medium was more efficient in the formation of embryogenic callus. The C4 medium was the most efficient in the multiplication, regeneration and germination stages. The dose of 450 μM picloram was the one that resulted in the greatest number of calloused explants. The dose of 630 μM picloram resulted in the lowest number of calloused explants. However, this dose was the one that provided differentiated calli when inoculated in a multiplication, regeneration and germination medium, with consequent

conversion into seedlings. The formation of pro-embryogenic structures begins with the reactivation of cells associated with the leaf veins of the explants. Pectins, neutral polysaccharides and starch grains are differentially distributed in plant tissues throughout the process of induction of somatic embryogenesis. The presence of starch and pectins in the vicinity of meristematic centers may be linked to the acquisition of embryogenic potential.

Keywords: *Areaceae*. *In vitro* regeneration. Tissue culture.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema do processo de extração do palmito em campo no ano de 2019.....	20
Figura 2 - Processo de desinfestação preparo do material para inoculação em laboratório.....	22
Figura 3 - Porcentagem de contaminação em cultivo in vitro por microrganismos fungos e bactérias nos folíolos imaturos de plantas adultas de macaúba para os meios Y3 e H no período de 120 dias de indução.....	30
Figura 4 - Resposta do cultivo in vitro de explantes obtidos a partir de folíolos imaturos da planta BGP 75-1 no meio Y3.....	32
Figura 5 - Resposta morfológica dos calos de macaúba, submetidos ao tratamento de indução no meio de cultura H na presença de diferentes concentrações de picloram (450, 540 e 630 μ M)	37
Figura 6 - Resposta morfológica dos calos de macaúba, submetidos ao tratamento de indução no meio de cultura Y3 na presença de diferentes concentrações de picloram (450, 540 e 630 μ M).	38
Figura 7 - Plântulas do genótipo BGP 7-2 obtidas 90 dias após cultivo in vitro em meio de germinação.....	47
Figura 8 - Indução de embriogênese somática em três plantas de macaúba BGP26-5, BGP70-8 e BGP75-1.....	48
Figura 9 - Ontogenia dos calos embriogênicos de macaúba na planta BGP 75-1.....	51
Figura 10. Histolocalização de compostos de parede e citoplasma durante a indução de embriogênese somática em macaúba após 120 dias em meio de indução da planta BGP 75-1.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Genótipos do Banco de Germoplasma de Macaúba no Município de Araponga-MG.....	18
Tabela 2 - Meios de culturas preparados e utilizados no cultivo <i>in vitro</i> da macaúba.....	23
Tabela 3 - Resumo da Análise de Variância dos Números de Explantes Calejados e Números de Explantes Oxidados em função da concentração de picloram e genótipos após 120 dias em meio de indução Y3.....	33
Tabela 4 - Resumo da Análise de Variância dos Números de Explantes Calejados e Números de Explantes Oxidados em função da concentração de picloram e genótipos após 120 dias em meio de indução H.....	33
Tabela 5 - Resultado médio dos Números de Explantes Calejados para as respectivas combinações de genótipos e concentrações de picloram (μM) para o meio de cultura Y3.....	34
Tabela 6 - Resultado médio dos Números de Explantes Calejados para as respectivas combinações de genótipos e concentrações de picloram (μM) para o meio de cultura H.....	35
Tabela 7 - Equações de regressão ajustadas para Números de Explantes Calejados em função das concentrações para os respectivos genótipos para o meio de cultura Y3 e os respectivos coeficientes de determinação.....	39
Tabela 8 - Equações de regressão ajustadas para Números de Explantes Calejados em função das concentrações para os respectivos genótipos para o meio de cultura H e os respectivos coeficientes de determinação.....	39
Tabela 9 - Resultado médio dos Números de Explantes Oxidados para as respectivas combinações de genótipos e concentrações de picloram (μM) para o meio de cultura Y3.....	41

Tabela 10 - Resultado médio dos Números de Explantes Oxidados para as respectivas combinações de genótipos e concentrações de picloram para o meio de cultura H.....41

Tabela 11 - Equações de regressão ajustadas para Números de Explantes Oxidados em função das concentrações para os respectivos genótipos para o meio de cultura Y3 e os respectivos coeficientes de determinação.....42

Tabela 12 - Equações de regressão ajustadas para Números de Explantes Oxidados em função das concentrações para os respectivos genótipos para o meio de cultura H e os respectivos coeficientes de determinação.....43

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 MATERIAL E MÉTODOS	18
2.1 Seleção das Plantas	18
2.2 Protocolo para a indução da embriogênese somática em explantes de folíolos imaturos de plantas adultas de macaúba	19
<i>2.2.1 Extração do palmito, obtenção e preparação dos explantes foliares</i>	19
<i>2.2.2 Cultivo in vitro das plantas</i>	21
<i>2.2.3 Desinfestação do material vegetal</i>	21
<i>2.2.4 Indução da embriogênese somática</i>	23
<i>2.2.5 Multiplicação de calos</i>	25
<i>2.2.6 Regeneração e maturação dos calos</i>	26
<i>2.2.7 Germinação dos embriões</i>	27
2.3 Microscopia de Luz	28
2.4 Análise Estatística	29
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
3.1 Desinfestação e preparo do material vegetal	30
3.2 Indução e multiplicação de calos embriogênicos	31
3.3 Resultado da análise de variância para a fase de indução	33
<i>3.3.1 Avaliação do Número de Explantes Calejados</i>	34
<i>3.3.1 Avaliação do Número de Explantes Oxidados</i>	40
3.4 Multiplicação dos calos formados	44
3.5 Regeneração e Germinação dos Embriões Somáticos	45
3.6 Resultados morfoanatómicos dos calos obtidos	47
3.7 Análise Histoquímica	52
4 CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS	56

1 INTRODUÇÃO

A macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Martins) é uma palmeira que apresenta notável importância tanto social quanto econômica. No campo essa planta é utilizada para diversas finalidades, sendo que os óleos extraídos tanto do mesocarpo (polpa) quanto de suas sementes (amêndoas) se destacam nessa espécie (ALMEIDA et al., 1998; LORENZI, 2006; LORENZI et al., 2010). Basicamente tudo se aproveita desta palmeira, servindo também de matéria prima nas indústrias, especialmente, nas alimentícias, oleoquímicas e de produção de biodiesel (CESAR et al., 2015; CARDOSO et al., 2017).

A palmeira é nativa de florestas tropicais e produz frutos com elevado teor de óleo (extraído principalmente do mesocarpo) com ampla ocorrência em quase todos os estados do Brasil (LORENZI, 2006; MOTOIKE et al., 2013). A macaúba é uma planta que se adapta muito bem as adversidades edafoclimáticas devido as suas características rústicas (MOTOIKE & KUKI, 2009; ABREU et al., 2011) e possui uma ampla distribuição geográfica, com relatos de ocorrências do sul do México até a Argentina (HENDERSON et al., 1995).

A espécie encontra-se em processo de domesticação (ABREU et al., 2011; LOPES et al., 2018). Apesar de várias pesquisas abordando a cultura (LORENZI et al., 2010; ABREU et al. 2011; LOPES et al., 2018; MEIRA et al. 2020), ainda há que se avançar no desenvolvimento e estabelecimento de plantios comerciais de clones com potenciais capacidade de maximizar a produção de óleo. A clonagem *in vitro* através da técnica de indução da embriogênese somática em plantas elites selecionadas, pode ser a forma mais rápida de propagação para obtenção de cultivares (GRANJA, 2014).

A macaúba é uma palmeira que não perfilha, portanto apresenta dificuldade para ser propagada vegetativamente (MOURA et. al., 2009). A embriogênese somática através da cultura de tecidos, constitui uma técnica fundamental e de grande importância para a propagação tanto dessa espécie quanto de outras que apresentam a mesma característica (LUIS, 2013; MEIRA, 2015). Essa técnica possui vantagens porque permite multiplicação da cultura em grande escala quando comparada a outros processos de propagação, obtendo ao final do processo plantas geneticamente

idênticas à planta-mãe (ZIMMERMAN, 1993), graças à totipotência celular vegetal (DODEMAN et al., 1997; JIMÉNEZ, 2001; SGHAIER et al., 2008).

Protocolos de regeneração vêm sendo desenvolvidos obtendo resultados promissores para a propagação desta espécie. Luis & Scherwinski-Pereira (2014) e Granja et al. (2018) que trabalharam com embriões zigóticos, e Andrade (2014) que trabalhou com explante foliar de planta jovem são grandes contribuições para o processo de propagação *in vitro* de macaúba. Já Meira et al. (2020) assim como o presente trabalho utilizaram como explante folíolos imaturos de planta adulta, como explantes porém, em seu trabalho Meira et al. (2020) relata a necessidade de otimizar as etapas finais do processo, especialmente na etapa de diferenciação de embriões somáticos.

O padrão de desenvolvimento *in vitro* na maioria dos sistemas de cultura de tecidos é determinado pela utilização de reguladores de crescimento (KERBAUY, 1999). A utilização das auxinas no processo e a indução de calos são considerados primordiais para se obter célula com competência e potencial embriogênico (VIÑAS e JIMÉNEZ, 2011). Dentre as auxinas mais utilizadas na indução de embriogênese somática em palmáceas, pode ser citado o 2,4-D (ácido 2,4- diclorofenoxiacético) (LEDO et al., 2002; EKE et al., 2005; SALDANHA et al., 2006; GUEYE et al., 2009). Porém, o Picloram (Ácido 4-amino-3,5,6-tricloro picolínico) tem se mostrado o mais eficiente na indução da embriogênese somática em macaúba (MOURA et al., 2009; ANDRADE, 2014; LUIS E SCHERWINSKI-PEREIRA, 2014; GRANJA et al., 2018; MEIRA et al., 2020).

A citocinina BAP (6-Benzilaminopurina) é o regulador utilizado com maior frequência na indução de embriogênese somática em palmáceas (ZOUINE e HADRAMI, 2007; MACIEL et al., 2010; GUEDES et al., 2011). No entanto, a utilização do 2iP (dimetil-alil-amino-purina) tem sido eficiente na formação de massas pró-embriogênicas em palmáceas (AL-KHAYRIE e AL-BAHRANY, 2012; KHIERALLAH e HUSSEIN, 2013) e, em especial na macaúba, permitindo a geração de linhagens embriogênicas quando combinado com Picloram (ANDRADE, 2014; GRANJA et al., 2018, MEIRA et al., 2020).

No processo embriogênico a seleção e estudos prévios de meios de cultura a serem utilizados são de extrema importância e eles se diferem essencialmente na concentração dos sais fontes de macro e micronutrientes, vitaminas, compostos orgânicos, fonte de carbono e outras substâncias complexas, normalmente

específicas para cada etapa do processo e para a espécie trabalhada. As constituições e composições de elementos para o meio de cultura mais utilizadas na embriogênese somática em palmáceas compreendem os meios MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962; WANG et al., 2006; STEIMACHER et al., 2011; SILVA et al., 2012; BALZON et al., 2013) e o meio Y3 (EEUWENS, 1978; CHAN et al., 1998; FERNANDO et al., 2003; PÉREZ-NÚÑEZ et al., 2009; MOURA et al., 2009).

O meio MS tem sua concentração de nutrientes considerada elevada quando comparado com os demais meios de cultura utilizados na cultura de tecidos, em especial quanto ao fornecimento de nitrogênio. Assim, modificações a nível de macro e micronutrientes têm sido sugeridas com objetivo de maior adaptação e estabelecimento das culturas e também promover a redução de custos (VILLA et al., 2010).

Diante do exposto, este trabalho objetiva o estabelecimento de um protocolo eficiente e a indução da embriogênese somática de plantas adultas de macaúba, sabidamente produtivas. O estabelecimento deste protocolo visa maior independência tecnológica, melhor escolha de genótipos responsivos para formação futura de jardins clonais e a caracterização anatômica e histoquímica dos calos embriogênicos formados.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Células e Tecidos Vegetais do Departamento de Agronomia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em parceria com a empresa Acrotech, ambas localizadas no município de Viçosa-MG, Brasil.

2.1 Seleção das Plantas

Para o experimento foram utilizados explantes foliares de 13 plantas adultas com idades entre 8 e 10 anos (Tabela 1), sendo que 12 são do Banco de Germoplasma instalado no Município de Araponga/MG pertencente a UFV/MG e 1 foi coletado na empresa Acrotech, conforme (Tabela 1). Inicialmente foram coletados dois palmitos em períodos distintos para um primeiro teste e posteriormente foram selecionadas plantas em duplas e os palmitos coletados inoculados 1 por dia (Tabela 1).

As escolhas das plantas foram as que continham cachos volumosos e grande número de frutos atendendo o critério de disponibilidade na época em que foi realizado a coleta do material. Algumas dessas plantas não possuíam identificação e compunham a bordaduras do banco de germoplasma (Tabela 1).

As plantas eram precoces que após 5 anos do plantio iniciaram fase reprodutiva, todas de origem mineira com médias produtivas de aproximadamente 50% para teor de óleo da polpa e aproximadamente 4.000 kg na produção de óleo por hectare (COSER, 2016; CORELLA, 2022).

Tabela 1- Genótipos do Banco de Germoplasma de Macaúba no Município de Araponga-MG

Genótipo	Planta	Origens/MG	Data de Plantio	Inoculação
Gleba 2	87	ND**	2009	13/02/2019
Gleba 1	28	ND**	2009	10/07/2019
Planta 21	-	Acrotech	2010	14/05/2020

BGP 27	-	Abaeté-Cedro do Abaeté	2010	20/05/2020
Borda 3	-	ND*	2010	21/05/2020
BGP 75	1	Bom Despacho	2012	23/06/2020
BGP 69	4	Onça de Pitangui- Pitangui	2011	24/06/2020
BGP 8	5	Entre Rio de Minas	2010	12/08/2020
Borda 1	-	ND*	2010	13/08/2020
BGP 70	8	São João Del Rei	2011	06/10/2020
BGP 26	5	Itaúna-Pará de Minas	2009	07/10/2020
BGP15	4	Barroso	2010	09/12/2020
BGP 7	2	Betim-Esmeralda	2010	10/12/2020

ND* Borda 1 e Borda 3 são bordaduras e não possuem dados da planta, colheita e origem. Porém, foram acompanhadas e as escolhas das plantas foram as que continham cachos volumosos e grande número de frutos. ND** são acessos que não possuem identificação da origem e colheita.

2.2 Protocolo para a indução da embriogênese somática em explantes de folíolos imaturos de plantas adultas de macaúba

2.2.1 Extração do palmito, obtenção e preparação dos explantes foliares

O processo de indução à embriogênese somática foi realizado mediante a utilização de explantes foliares (folíolos) imaturos da região do palmito (Figura 1- a, b, c), os quais foram extraídos da planta matriz doadora com auxílio de um motosserra, sem que houvesse comprometimento do meristema apical, permitindo sua recuperação (Figura 1- d).

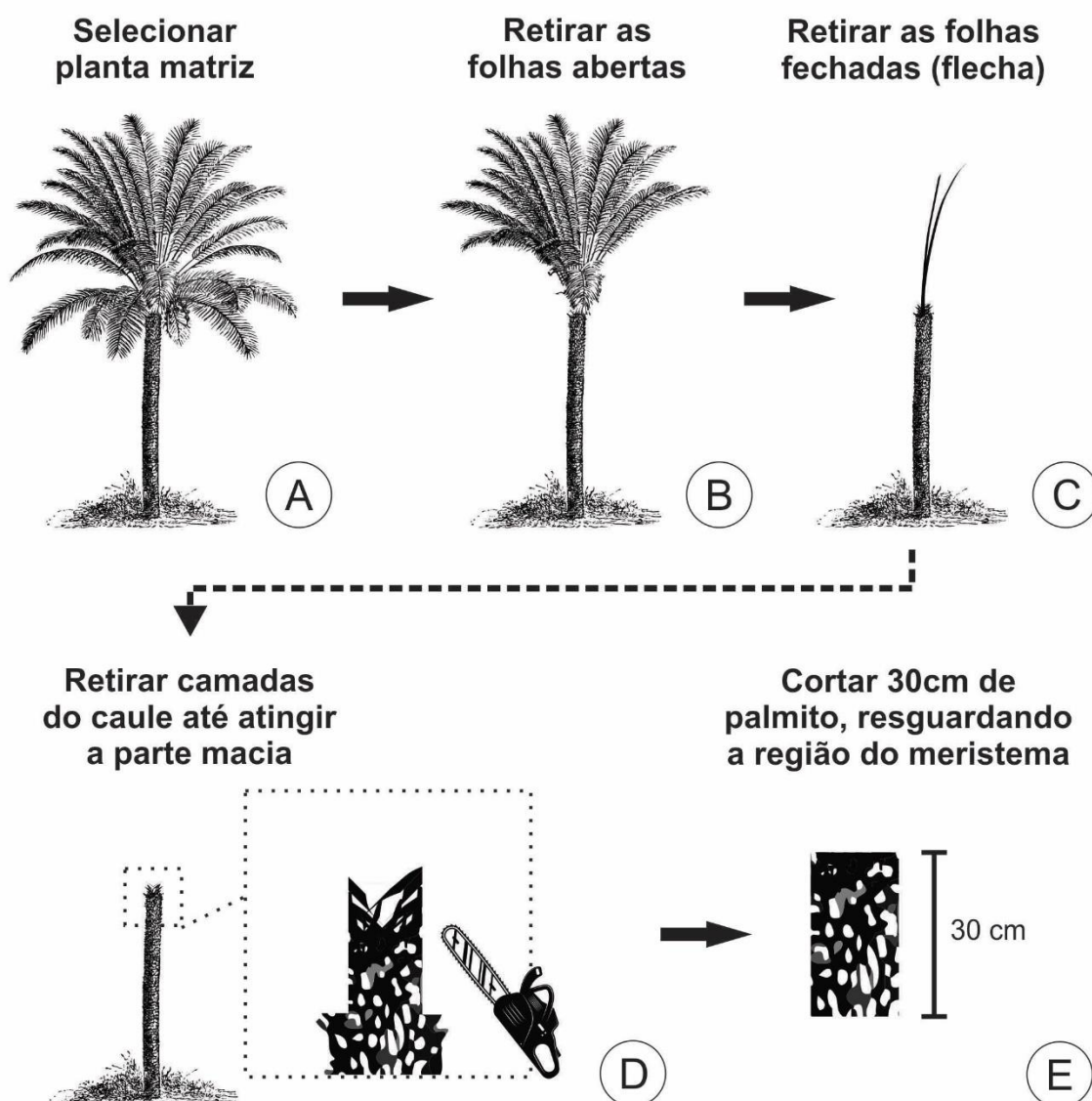


Figura 1. Esquema do processo de extração do palmito em campo no ano de 2019. (A) Planta matriz selecionada. (B) Retirada das folhas abertas para facilitar o acesso a região do caule. (C) Retirada das folhas que compõe as flechas. (D) Retirada de sucessivos cortes para atingir a região macia do palmito com auxílio de um motosserra. (E) Corte do palmito 30cm resguardando a região do meristema no campo.

Para tanto, seguiu-se o protocolo de retirada descrito por Andrade, (2014) para explantes foliares de plantas jovens de macaúba adaptando este protocolo para a retirada em plantas adultas. Foi previamente selecionada a planta adulta e retirado as folhas abertas para facilitar o acesso à região do caule e também procedeu a retirada das folhas que compunham a flecha (Figura 1- a, b, c).

Foram realizados sucessivos cortes de aproximadamente 5cm em direção à base da planta até atingir uma região onde o palmito apresentava uma coloração clara

e aspecto macio e o corte do palmito foi realizado 30cm a partir desse ponto resguardando a região meristemática (Figura 1- d, e).

Em seguida o material foi embalado em plástico resistente, colocado em caixa de isopor com gelo, com objetivo de diminuir a atividade metabólica do palmito evitando a oxidação do mesmo e na sequência encaminhado ao Laboratório de Cultura de Células e Tecidos Vegetais da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa – MG, onde foi acondicionado e conservado à 5°C.

2.2.2 Cultivo in vitro das plantas

2.2.3 Desinfestação do material vegetal

O material vegetal, após transportado para laboratório, foi limpo com álcool 70% (v/v) e foram retiradas as camadas mais externas de folhas “cascas” (Figura 2 - a). O material foi cortado com o auxílio de uma faca de corte comum com maior resistência de fio de corte para não desintegrar o material vegetal e os folíolos imaturos foram retirados cuidadosamente da região do palmito (Figura 2 - b).

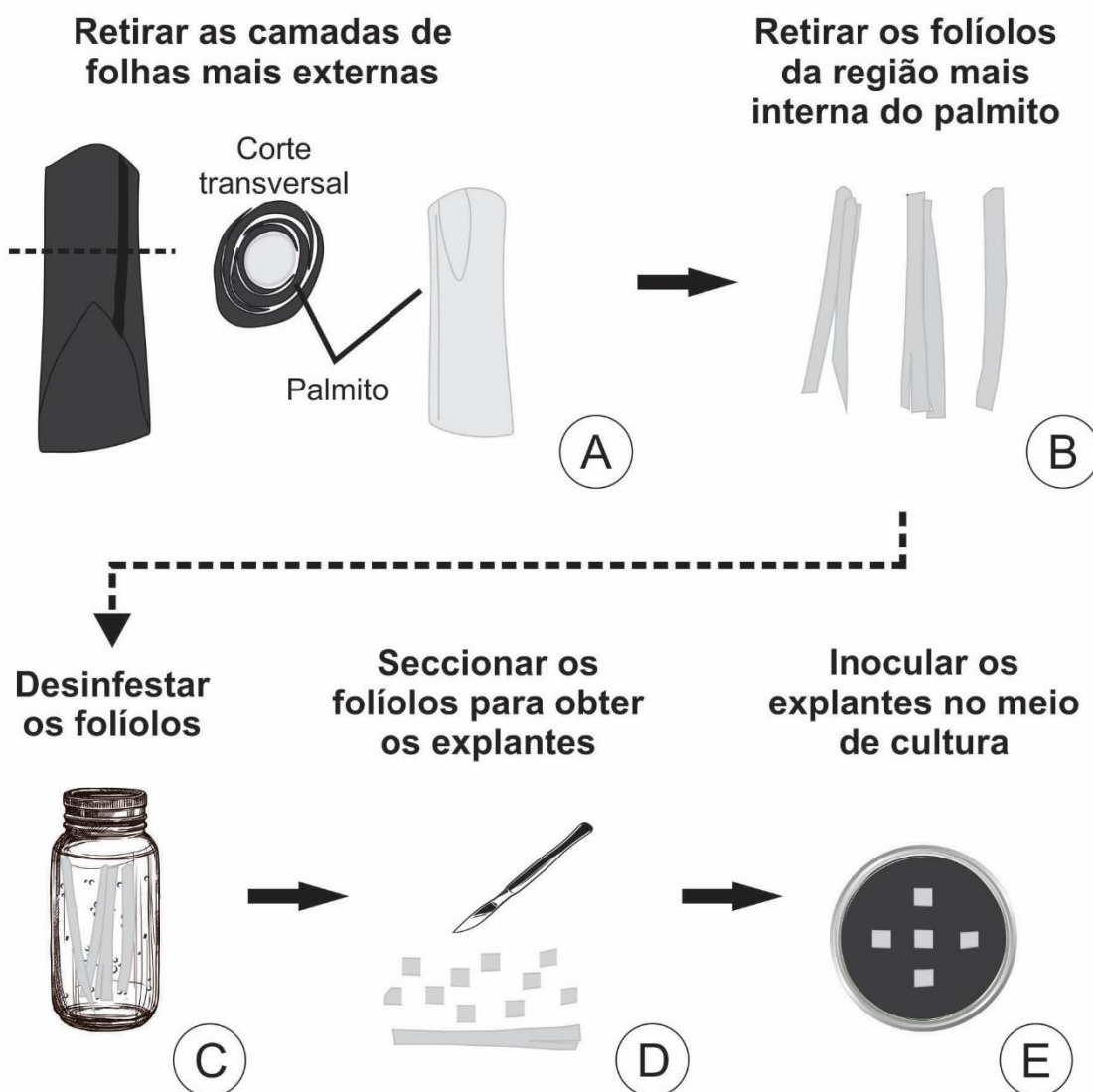


Figura 2. Processo de desinfestação preparo do material para inoculação em laboratório. (A) Retirada de camadas mais externas de folhas “casca”. (B) Retirada dos folíolos da região do palmito. (C) Processo de desinfestação dos folíolos. (D) Folíolos seccionados com auxílio de um bisturi em comprimentos e larguras de aproximadamente 1cm “explantes”. (E) Explantes inoculados em meio de cultura.

Os folíolos imaturos foram submetidos à desinfestação em solução asséptica 0,5% de hipoclorito de sódio NaClO (10% de cloro ativo, v/v). Três gotas de Tween 20 (Vetec®, Brasil) foram adicionadas a cada litro de solução de desinfestação preparada. Sendo as folhas imersas nessa solução por 10 min e agitadas cuidadosamente afim de garantir e aumentar o contato dos folíolos com a solução de desinfestação (Figura 2 – c).

Em seguida, o material foi enxaguado nove vezes com água destilada estéril em câmara de fluxo laminar, a água foi mantida à 5°C até o momento de uso, com o objetivo de reduzir a oxidação dos explantes e também conservar a integridade do

mesmo, a água gelada manteve os explantes com mesma consistência de quando retiradas do interior do palmito, durante todo o processo até à inoculação.

Logo após a desinfestação, os folíolos imaturos foram seccionados com auxílio de bisturi, em segmentos de aproximadamente 1 cm de comprimento com 1 cm de largura (Figura 2 - d).

2.2.4 Indução da embriogênese somática

Os explantes foram inoculados em placas de Petri (J.Prolab®, Brasil) de polietileno (90 x 15 mm) contendo 30 mL de meio de cultura (Figura 2 - e). O primeiro meio foi Y3 (EEUWENS, 1978) conforme (Tabela 2), suplementado com: 30 g L⁻¹ de sacarose (New Química, Brasil), 10 mL L⁻¹ de vitamina MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), 100 mg L⁻¹ de mio-inositol (Sigma-Aldrich®, China), 500 mg L⁻¹ de glutamina (Sigma-Aldrich®, Brasil), 3 g L⁻¹ de carvão ativado (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos) e solidificado com 2,5 g L⁻¹ de Phytigel (Sigma-Aldrich®, China).

Tabela 2 - Meios de culturas preparados e utilizados no cultivo *in vitro* da macaúba.

Componentes	Y3	Y3- modificado	C4	H	MS	M4
Fase*	1 e 2	2	2, 3 e 4	1 e 2	1	4
Concentração	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹
MACRONUTRIENTES						
KNO ₃	2020	2020	2581	505,55	1900	2020
KCL	1492	1492	-	-	-	1492
NH ₄ CL	535	535	-	-	-	-
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	276	276	713	-	-	312
CaCL ₂ .2H ₂ O	294	294	387	-	440	-
MgSO ₄ .7H ₂ O	247	247	786	492,96	370	247
NH ₄ NO ₃	-	-	1021	80,043	1650	800
MgCL ₂ .6H ₂ O	-	-	1275	-	-	-
KH ₂ PO ₄	-	-	-	136,086	170	-
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	-	-	-	944,6	-	472
MICRONUTRIENTES						

FeSO ₄ .7H ₂ O	13,9	-	-	-	27,8	-
FeCl ₃ .6H ₂ O	-	48,654	48,654	48,654	-	48,654
NaEDTA.2H ₂ O	37,2	67,0	67,0	67,0	37,2	67,0
MnSO ₄ .H ₂ O	8,5	8,5	2,3	12,13	22,3	8,5
KI	8,3	8,3	1,7	0,8	0,83	8,3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	7,2	7,2	2,8	8,6	8,6	7,2
H ₃ BO ₃	3,1	3,1	5,0	6,2	6,2	3,1
CoCL ₂ .6H ₂ O	0,24	0,24	0,24	0,05	0,025	0,24
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,24	0,24	0,24	0,25	0,25	0,24
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,16	0,16	1,2	0,05	-	0,16
NiCL ₂ .6H ₂ O	0,024	0,024	0,24	-	-	0,024
VITAMINAS						
Tiamina-HCL	1,0	0,1	10,0	10,0	0,1	0,3
Piridoxina-HCL	1,0	0,5	1,0	1,0	0,5	0,5
Ácido Nicotínico	1,0	0,5	1,0	1,0	0,5	0,86
Glicina	-	2,0	-	-	2,0	-

Fase*: 1-Indução, 2-Multiplicação, 3-Maturação e 4-Germinação

Y3: Meio desenvolvido por Eeuwens, (1978).

Y3-modificado: Modificações realizadas no Y3 a nível de micronutrientes e utilização das vitaminas do meio MS desenvolvido por Murashige & Skoog, (1962).

C4: Adaptação do meio Y3 a nível de macronutrientes e micronutrientes com utilização da vitamina B5 desenvolvido por Gamborg et al. (1968).

H: Meio desenvolvido por Hoagland & Arnon, 1950. Com a utilização de micronutrientes N6 (Chu et al, 1975) e vitaminas B5.

M4: Modificações realizadas no Y3 a nível de macronutrientes, micronutrientes e vitaminas.

Os valores em negrito são as modificações realizadas em cada meio.

O segundo meio foi o H (HOAGLAND & ARNON, 1950) conforme (Tabela 2), suplementado com: 30 g L⁻¹ de sacarose (New Química, Brasil), 10 mL L⁻¹ de micronutrientes N6 (CHU et al, 1975), 10 mL L⁻¹ de vitaminas B5 (GAMBORG et al., 1968), 100 mg L⁻¹ de mio-inositol (Sigma-Aldrich®, China), 500 mg L⁻¹ de glutamina (Sigma-Aldrich®, Brasil), 3g L⁻¹ de carvão ativado (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos) e solidificado com 2,5 g L⁻¹ de Phytigel (Sigma-Aldrich®, China).

O terceiro meio foi o MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) conforme (Tabela 2), suplementado com: 30 g L⁻¹ de sacarose (New Química, Brasil), 100 mg L⁻¹ de mio-inositol (Sigma-Aldrich®, China), 500 mg L⁻¹ de glutamina (Sigma-Aldrich®, Brasil), 3g

L⁻¹ de carvão ativado (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos) e solidificado com 2,5 g L⁻¹ de Phytigel (Sigma-Aldrich®, China).

Foi testado a auxina Picloram (Ácido 4-amino-3,5,6-tricloro picolínico) (Sigma-Aldrich®, Índia) em 7 concentrações 180, 270, 360, 450, 540, 630 e 720 μM. O meio de cultura teve o pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$ antes de ser autoclavado por 20 min. a 121 °C e 1,5 atm. Foram inoculados 5 explantes por placa de petri (Figura 2), que foram vedadas com plástico transparente tipo filme PVC (Rolopac®) e mantidas em sala de crescimento, à temperatura de 27 ± 1 °C na ausência de luz.

2.2.5 Multiplicação de calos

Após período de 30 a 120 dias em meio de indução, os explantes foram avaliados quanto a resposta ao calejamento e oxidação. Para o calejamento foi avaliado a presença de calos nos explantes e para oxidação foram avaliados tanto os explantes com oxidação parcial quanto com oxidação completa levando a morte do explante. Aqueles que calejaram, foram separados e transferidos para o meio de multiplicação, onde permaneceram por cerca de 60 dias no escuro à 27 ± 1 °C.

O meio foi composto pelos seguintes sais Y3, Y3-modificado, C4 e H conforme (Tabela 2), reduzindo a concentração da auxina picloram para 18, 63 μM combinado com 2,0 e 6,3 μM de 2iP (dimetil-alil-amino-purina) (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos), respectivamente. A dose 630 μM de picloram também foi utilizada nessa etapa acrescido do carvão 3 g L⁻¹ (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos) e 10,0 μM 2ip (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos).

A todos os meios testados foram acrescentados sacarose 20 g L⁻¹ (New Química, Brasil), 500 mg L⁻¹ de mio-inositol (Sigma-Aldrich®, China), 500 mg L⁻¹ de glutamina (Sigma-Aldrich®, Brasil), 500 mg L⁻¹ de asparagina (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos), 500 mg L⁻¹ de arginina (Sigma-Aldrich®, Japão) e 100 mg L⁻¹ de caseína (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos) e suplementados com 1000 μM de putrescina (Sigma-Aldrich®, Suíça).

O meio de cultura teve o pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$ antes de ser autoclavado por 20 min. a 121 °C e 1,5 atm. Os calos formados na etapa de indução foram selecionados e inoculados em placas de Petri (J.Prolab®, Brasil) de polietileno (90 x

15 mm) contendo 30 mL de meio de cultura que foram vedadas com plástico transparente tipo filme PVC (Rolopac®).

2.2.6 Regeneração e maturação dos calos

Após o período de multiplicação, os calos foram selecionados em relação as massas embriogênicas produzidas que tinham potencial para se diferenciarem em embriões somáticos, estas apresentavam aspectos morfológicos diferenciados quando colocadas no meio de cultura de multiplicação, as que tinham potencial apresentavam aspectos granulares de coloração bege e as que não possuíam potencial eram compactas de coloração amarelada.

As massas com potenciais embriogênicos que multiplicaram eram selecionadas acondicionadas em meio de maturação para regeneração em embriões somáticos por 45 dias e as que não multiplicaram foram retornadas ao meio de indução onde eram avaliadas a cada 30 dias para a destinação ao meio de multiplicação ou a subcultivos em meio de indução.

O meio de regeneração foi composto pelos sais C4 conforme (Tabela 2), com ausência da auxina picloram (Sigma-Aldrich®, Índia), suplementado com sacarose 30 g L⁻¹ (New Química, Brasil), 500 mg L⁻¹ de mio-inositol (Sigma-Aldrich®, China), 500 mg L⁻¹ de glutamina (Sigma-Aldrich®, Brasil), 500 mg L⁻¹ de asparagina (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos), 500 mg L⁻¹ de arginina (Sigma-Aldrich®, Japão), 100 mg L⁻¹ de caseína (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos), 1000 µM de putrescina (Sigma-Aldrich®, Suíça), 0,1µM de 2iP (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos) e 3g L⁻¹ de carvão ativado (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos).

O meio de cultura teve o pH ajustado para 5,7 ± 0,1 antes de ser autoclavado por 20 min. a 121 °C e 1,5 atm. As massas formadas na etapa de multiplicação foram selecionadas e inoculadas em placas de petri (J.Prolab®, Brasil) de polietileno (90 x 15 mm) contendo 30 mL de meio de cultura que foram vedadas com plástico transparente tipo filme PVC (Rolopac®) e mantidas em sala de crescimento, à temperatura de 27 ± 1 °C na ausência de luz.

2.2.7 Germinação dos embriões

Os embriões somáticos que se diferenciaram no meio de regeneração, foram colocados em meio de germinação C4 e M4 (Tabela 2). As germinações dos embriões foram realizadas em frascos de 300 mL, contendo 30 mL de meio de cultura em duas etapas utilizando o meio C4. A conversão em plântulas, por sua vez foi realizada em tubos de ensaio de 25 x 150 mm, contendo 10 mL de meio M4 (Tabela 2). Sendo a duração de cada etapa de aproximadamente 30 dias.

Na primeira etapa eram transferidos aos frascos os embriões obtidos da regeneração e o meio de cultura utilizado foi o C4, suplementado com sacarose 30 g L⁻¹ (New Química, Brasil), 500 mg L⁻¹ de mio-inositol (Sigma-Aldrich®, China), 500 mg L⁻¹ de glutamina (Sigma-Aldrich®, Brasil), 500 mg L⁻¹ de asparagina (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos), 500 mg L⁻¹ de arginina (Sigma-Aldrich®, Japão), 169 mg L⁻¹ de metionina (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos), 294 mg L⁻¹ de prolina (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos), 0,54 µM de ANA (Sigma-Aldrich®, China) e 1000 µM de putrescina (Sigma-Aldrich®, Suíça).

Na segunda etapa foram transferidos aos frascos os embriões que iniciaram a conversão em plântulas e o meio de cultura utilizado foi o C4, suplementado com sacarose 30 g L⁻¹ (New Química, Brasil), 500 mg L⁻¹ de mio-inositol (Sigma-Aldrich®, China), 500 mg L⁻¹ de glutamina (Sigma-Aldrich®, Brasil), 500 mg L⁻¹ de asparagina (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos), 500 mg L⁻¹ de arginina (Sigma-Aldrich®, Japão), 294 mg L⁻¹ de prolina (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos), 0,54 µM de ANA (Sigma-Aldrich®, China) e 1000 µM de putrescina (Sigma-Aldrich®, Suíça).

As plântulas que iniciaram a formação na etapa anterior foram individualizadas e transferidas para o tubo e o meio utilizado foi o M4, suplementado com sacarose 30 g L⁻¹ (New Química, Brasil), 500 mg L⁻¹ de mio-inositol (Sigma-Aldrich®, China), 500 mg L⁻¹ de glutamina (Sigma-Aldrich®, Brasil), 100 mg L⁻¹ de asparagina (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos), 500 mg L⁻¹ de arginina (Sigma-Aldrich®, Japão), 0,54 µM de ANA (Sigma-Aldrich®, China) e 1000 µM de putrescina (Sigma-Aldrich®, Suíça).

O meio de cultura teve o pH ajustado para 5,7 ± 0,1 antes de ser autoclavado por 20 min. a 121 °C e 1,5 atm. O material foi mantido em sala de crescimento, à temperatura de 27 ± 1 °C sob fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, irradiância de ± 40 µmol m⁻² s⁻¹ provida por lâmpadas fluorescentes (Luz do Dia Especial, 40 W, Osram®, Brasil).

2.3 Microscopia de Luz

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa - MG e consistiu do estudo anatômico e histoquímico dos calos obtidos na etapa de indução desse estudo.

Foram selecionadas após a etapa de indução três genótipos BGP 75-1, BGP 26-5 e BGP 70-8 seguindo o critério de número de explantes calejados. Durante 120 dias, no processo de indução, os explantes foliares imaturos da planta BGP75-1, inoculados em meio de cultivo suplementado com 630 μ M de Picloram, foram mensalmente coletados. Os explantes das plantas BGP26-5 e BGP70-8 foram coletados apenas aos 120 dias de cultivo.

As amostras foram fixadas em FAA (formaldeído, ácido acético glacial, etanol 50%, 1:1:18, volume:volume) por 48 h e conservadas em etanol 70% (JOHANSEN, 1940), posteriormente foram desidratadas em série etanólica e incluídas em 2-hidroxietil-metacrilato (Historesin, Leica, Heidelberg, Alemanha).

Os explantes foram seccionados transversal e longitudinalmente (5 μ m de espessura) pelo micrótomo rotativo de avanço automático (RM2155, Leica Microsystems Inc., Deerfield, EUA), e coradas com azul de toluidina 0,05% pH 4,4 (O'BRIEN et al., 1964) e foi usado para a montagem resina sintética (Permount, Fisher Scientific, Pittsburgh, EUA).

Os explantes fixados em FAA foram incluídos em 2-hidroxietil-metacrilato. E foram submetidas aos seguintes reagentes: vermelho de rutênio (JOHANSEN, 1940) para pectinas; reagente de Schiff (PAS) (FEDER and O'BRIEN, 1968) para polissacarídeos neutros e reagente de Lugol (Johansen, 1940) para amido. O controle foi realizado conduzido conjuntamente para cada teste, de acordo com a metodologia proposta por cada autor.

As análises morfológicas e histoquímica foram obtidas através da imagem da câmera fotográfica digital (AxioCam HRc, Zeiss, Göttinger, Alemanha) com auxílio de um microcomputador com o programa de captura de imagens Axion Vision e estes acoplados a um microscópio de luz (AX-70 TRF, Olympus Optical, Tokyo, Japão).

2.4 Análise Estatística

O experimento foi montado no delineamento inteiramente casualizado (DIC). A etapa de indução foi conduzida em fatorial triplo $2 \times 7 \times 13$ com 2 meios de culturas Y3 e H; com 7 concentrações de picloram (180, 270, 360, 450, 540, 630 e $720 \mu\text{M}$) e 13 genótipos, formando ao final 182 combinações. Foi realizado 20 repetições por combinação totalizando 3640 unidades experimentais.

Cada placa de Petri compunha uma unidade experimental contendo 5 explantes foliares. A formação de calos e a oxidação dos explantes eram acompanhadas a cada 30 dias por 120 dias. Foram analisados para fins estatísticos número de explantes calejados e oxidados em cada unidade experimental.

Os dados foram analisados com auxílio do programa estatístico R. E foram interpretados por meio de análise de variância e as médias foram comparadas utilizando o critério de Skott-Nott ao nível de 5% de probabilidade. Para o fator quantitativo (concentração de Picloram) os dados foram interpretados através de análise de regressão. Os modelos foram escolhidos baseados na significância utilizando se o teste “t” ao nível de 5% de probabilidade, do coeficiente de determinação e no comportamento do fenômeno em estudo.

Para as análises citadas acima foram fixados o meio de cultura e desdobrado os genótipos e concentração de picloram. Independentemente da interação do maior grau ser ou não significativo optou-se pelo desdobramento da mesma devido interesse em estudo.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Desinfestação e preparo do material vegetal

A contaminação de explantes no presente trabalho foi baixa. No total, mais de 80% dos explantes foram estabelecidos *in vitro* sem a ocorrência de contaminações biológicas tanto para o meio Y3 quanto para o H, o que indica que a metodologia para o isolamento do material, tanto em campo quanto em laboratório e a desinfestação dos folíolos imaturos das plantas adultas de macaúba foi eficiente (Figura 3).

Porém, é importante destacar que os genótipos Gleba 2, BGP 70-8, BGP 26-5, BGP 15-4 e BGP 7-2 (Tabela 1) coletadas em períodos chuvosos apresentaram uma variação de 9 a 18% de contaminação por bactérias (Figura 3) quando comparadas com as plantas Gleba 1, Planta 21, BGP 27, Borda 3, BGP 75-1, BGP 69-4, BGP 8-5 e Borda 1 (Tabela 1) coletadas em períodos secos, o índice de contaminação foi menor que 5% (Figura 3). A contaminação por fungos também foi menor que 5% para todos os períodos (Figura 3).

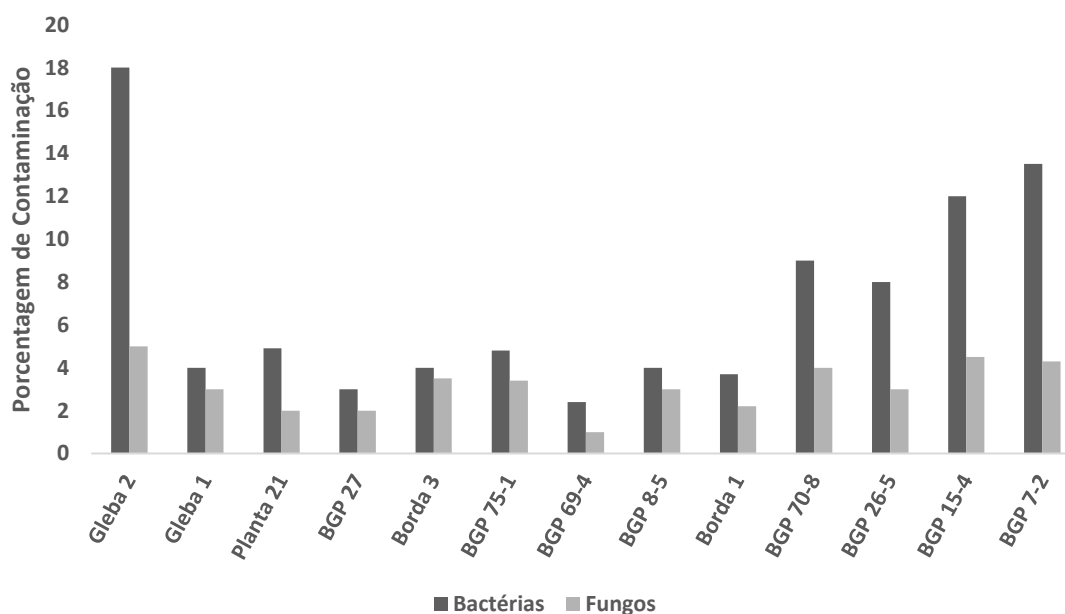


Figura 3. Porcentagem de contaminação em cultivo *in vitro* por microrganismos fungos e bactérias nos folíolos imaturos de plantas adultas de macaúba para os meios Y3 e H no período de 120 dias de indução.

A contaminação por microrganismos considerados endofíticos, são constituídos principalmente por bactérias e fungos (PEIXOTO NETO et al., 2003). No meio de cultura ocasionam perdas significativas em materiais vegetais (TOLEDO, 2011). Dutra et al (2009), destacam que a intensidade de contaminação por microrganismos pode variar de acordo com alguns fatores como o tipo e origem do explante, época do ano e do ambiente onde são coletados.

Em períodos chuvosos aumenta o fluxo de água que pode ser porta de entrada de microrganismos na planta. Quando esses endófitos alcançam o interior das raízes, eles se espalham sistematicamente, na planta percorrendo raízes, caules, folhas, flores, sementes, frutos, entre outros e migram-se tanto através do sistema vascular (xilema e floema) ou do apoplasto. (PICCOLO et al., 2010; COMPANT et al., 2011; QIN et al., 2011, ESPOSITO-POLESI, 2020)

Fatores como a idade da planta, o estágio de desenvolvimento, o status fisiológico, as práticas agrícolas, condições ambientais como temperatura, chuva, nutrição do solo, regime de luz, patógenos, dentre outros também influenciam as populações endofíticas. A contaminação pode variar quanto ao número e espécie apresentando relações ecológicas mais diversas e complexas (HARDOIM et al., 2008; BARROS et al., 2010; COMPANT et al., 2010; ISLAM et al., 2010; DAVITT et al., 2011; ARDANOV et al., 2012; GAGNE-BOURGUE et al., 2013).

3.2 Indução e multiplicação de calos embriogênicos

Os meios de cultura Y3, H e MS (Tabela 2) foram utilizados para indução da calogênese e para o presente trabalho houve resposta apenas para os meios Y3 e H. No meio MS os explantes oxidaram completamente após 30 dias para todos os genótipos e concentrações de picloram testados não ocorrendo a calogênese. A formação de calos foi acompanhada periodicamente a cada 30 dias. As plantas BGP 75-1 e BGP 26-5 iniciaram a formação de calos após 30 dias em meio de cultivo Y3, o que pode ser considerado precoce em palmeiras.

Culturas como o dendê, por exemplo, o início da formação de calos foi observado após 60 dias em meio de indução (SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2010; CORREA et al., 2015). Mesmo em trabalhos realizados com o cultivo *in vitro* da

macaúba o início da formação de calos também foi observado após esse período (LUIZ, 2013; ANDRADE, 2014; MEIRA et al., 2020).

A formação dos calos de macaúba ocorreu de forma mais significativa no período entre 60 e 120 dias em meio de cultura de indução, nas plantas estudadas. Após esse período, a calogênese ocorreu em menor número e foram realizados subcultivos. Esses calos foram formados em regiões de extremidade dos explantes e ficavam mais concentrados nos feixes vasculares das folhas em regiões de nervuras (Figura 4-a). Luis (2013) e Meira et al. (2019) também relataram resultados semelhantes a partir de explantes de folhas imaturas de macaúba, o que corrobora com o presente trabalho.

As extremidades dos explantes que calejaram apresentavam-se intumescidas e com superfícies irregulares Meira et al. (2019) também observou esse evento (Figura 4-a). Os calos estudados apresentavam-se arredondado de coloração bege e amarelado claro e alguns calos com características alongados de cor amarelada que posteriormente originaram os calos nodulares como descrito por Andrade (2014) e Meira et al. (2019) (Figura 4-b).

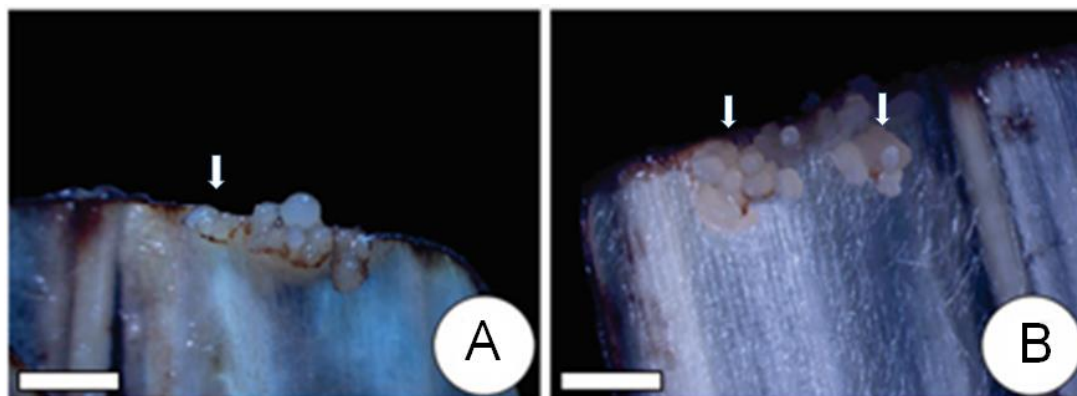


Figura 4. Resposta do cultivo *in vitro* de explantes obtidos a partir de folíolos imaturos da planta BGP 75-1 no meio Y3. (A) Formação de calos nas extremidades do explante após 30 dias em meio de indução (seta indica os calos). (B) Calos com coloração bege e amarelado, com aspectos nodulares (setas indicam os calos). Escala 1mm.

3.3 Resultado da análise de variância para a fase de indução

Para análise de variância foram fixados os meios de cultura de indução Y3 e H em relação aos genótipos e as concentrações de picloram e analisado separadamente.

Verificou-se pela análise de variância que houve interação entre os genótipos e concentração de picloram para os meios Y3 (Tabela 3) e H (Tabela 4). Tanto para o número de explantes calejados quanto para o número de explantes oxidados (Tabela 3 e 4).

Tabela 3 - Resumo da Análise de Variância dos Números de Explantes Calejados e Números de Explantes Oxidados em função da concentração de picloram e genótipos após 120 dias em meio de indução Y3.

Fonte de Variação	G.L.	Nº Expl.	Nº Expl.
		Calejados	Oxidados
		Q.M	QM
Genótipos	12	10,71**	2,95**
Concentração de Picloram (CP)	6	42,17**	5,46**
Genótipos X CP	72	3,19**	1,33**
Resíduo	1729	0,77	1,03
CV (%)		23,15	19,93

** Significativo em nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 4 - Resumo da Análise de Variância dos Números de Explantes Calejados e Números de Explantes Oxidados em função da concentração de picloram e genótipos após 120 dias em meio de indução H.

Fonte de Variação	G.L.	Nº Expl.	Nº Expl.
		Calejados	Oxidados
		Q.M	QM
Genótipos	12	6,51**	6,07**
Concentração de Picloram (CP)	6	33,17**	5,26**
Genótipos X CP	72	2,74**	1,87**
Resíduo	1729	0,75	1,12
CV (%)		18,89	16,37

** Significativo em nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Efeito da interação entre os Genótipos e a Concentração de Picloram para os meios Y3 e H.

3.3.1 Avaliação do Número de Explantes Calejados

Na interação entre os genótipos e a concentração de picloram houve diferença significativa em relação a número de explantes calejados e número de explantes oxidados (Tabela 3 e 4).

Na relação dos genótipos dentro de cada concentração de picloram, tanto para as concentrações 180 μ M quanto para 270 μ M os genótipos foram semelhantes entre eles quanto ao número de explantes calejados quando utilizado o meio Y3 (Tabela 5).

Tabela 5 - Resultado médio dos Números de Explantes Calejados para as respectivas combinações de genótipos e concentrações de picloram (μ M) para o meio de cultura Y3.

Genótipos	Nº Explantes Calejados						
	180	270	360	450	540	630	720
Gleba 2	0,45 A	0,35 A	0,50 B	0,85 D	0,65 B	1,20 C	0,30 B
Gleba 1	0,70 A	0,70 A	0,65 B	1,15 C	0,65 B	1,00 C	0,60 A
Planta 21	0,65 A	0,90 A	0,65 B	1,20 C	0,70 B	0,80 C	1,00 A
BGP 27	0,75 A	0,55 A	1,05 A	0,90 D	0,85 B	1,15 C	0,75 A
Borda 3	0,95 A	0,85 A	0,80 A	0,45 D	0,50 B	0,80 C	0,65 A
BGP75-1	0,85 A	1,05 A	1,30 A	3,70 A	1,65 A	1,95 B	0,80 A
BGP69-4	0,35 A	0,60 A	0,55 B	0,90 D	1,00 B	1,00 C	0,35 B
BGP 8-5	0,45 A	0,50 A	0,30 B	0,85 D	0,90 B	1,10 C	0,25 B
Borda 1	0,40 A	0,35 A	0,40 B	1,00 D	0,95 B	1,80 B	0,30 B
BGP70-8	0,20 A	0,70 A	0,45 B	0,80 D	0,95 B	1,10 C	0,30 B
BGP 26-5	0,30 A	0,50 A	0,30 B	2,45 B	1,30 A	2,00 B	0,20 B
BGP 15-4	0,40 A	0,30 A	0,35 B	1,70 C	1,15 A	1,60 B	0,35 B
BGP 7-2	0,40 A	0,40 A	0,60 B	2,15 B	1,50 A	2,65 A	0,40 B

Os grupos de médias seguidas de mesmas letras na coluna são semelhantes pelo critério de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Para concentração 360 μ M os genótipos BGP 27, Borda 3 e BGP 75-1 foram semelhantes entre eles e superiores aos demais genótipos quanto ao número de explantes calejados (Tabela 5). Para concentração de 450 μ M o genótipo BGP 75-1 foi superior aos demais e já para a concentração 540 μ M os genótipos BGP 75-1, BGP 26-5, BGP 15-4 e BGP 7-2 foram semelhantes entre eles e superiores ao demais (Tabela 5).

Já para a concentração 630 μ M o genótipo BGP 7-2 foi superior aos demais genótipos quanto ao número de explantes calejados (Tabela 5). E para a concentração 720 μ M os genótipos Gleba1, Planta 21, BGP 27, Borda 3 e BGP75-1

foram semelhantes entre eles e superiores aos demais genótipos quanto ao número de explantes calejados (Tabela 5).

Na relação dos genótipos dentro de cada concentração de picloram para o meio H, na concentração 180 μ M de picloram os genótipos Gleba 1, Planta 21, BGP 27, Borda 3 e BGP 75-1 foram semelhantes entre eles quanto ao número de explantes calejados e superiores aos demais (Tabela 6).

Tabela 6 - Resultado médio dos Números de Explantes Calejados para as respectivas combinações de genótipos e concentrações de picloram (μ M) para o meio de cultura H.

Genótipos	Nº Explantes Calejados						
	180	270	360	450	540	630	720
Gleba 2	0,20 B	0,45 B	0,65 A	0,35 D	0,20 C	0,50 C	0,40 B
Gleba 1	0,80 A	0,45 B	0,95 A	1,75 B	0,90 B	0,95 C	0,55 A
Planta 21	1,00 A	0,90 A	1,10 A	0,75 D	0,65 B	1,05 C	1,05 A
BGP 27	0,75 A	0,75 A	1,00 A	0,80 D	0,45 C	0,95 C	0,75 A
Borda 3	0,80 A	0,90 A	0,90 A	0,55 D	0,85 B	1,10 C	0,80 A
BGP75-1	0,70 A	0,80 A	0,70 A	1,80 B	1,20 A	1,30 C	0,75 A
BGP69-4	0,40 B	0,55 B	0,60 A	1,00 C	1,00 B	1,05 C	0,65 A
BGP 8-5	0,25 B	0,35 B	0,35 B	1,10 C	1,55 A	1,15 C	0,20 B
Borda 1	0,15 B	0,35 B	0,30 B	1,05 C	1,00 B	1,30 C	0,15 B
BGP70-8	0,25 B	0,20 B	0,15 B	1,10 C	0,95 B	1,40 C	0,10 B
BGP 26-5	0,35 B	0,30 B	0,25 B	1,70 B	1,40 A	1,85 B	0,20 B
BGP 15-4	0,20 B	0,30 B	0,40 B	1,20 C	1,35 A	1,50 C	0,15 B
BGP 7-2	0,30 B	0,35 B	0,45 B	2,50 A	1,80 A	2,60 A	0,80 A

Os grupos de médias seguidas de mesmas letras na coluna são semelhantes pelo critério de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Para a concentração 270 μ M de picloram Planta 21, BGP 27, Borda 3 e BGP 75-1 foram semelhantes entre eles quanto ao número de explantes calejados e superiores aos demais (Tabela 6). Já para a concentração 360 μ M os genótipos Gleba 2, Gleba 1, Planta 21, BGP 27, Borda 3, BGP 75-1 e BGP 69-4 foram semelhantes entre eles quanto ao número de explantes calejados e superiores aos demais (Tabela 6).

Para a concentração de 450 μ M de picloram o genótipo BGP 7-2 foi superior aos demais genótipos quanto ao número de explantes calejados (Tabela 6). Já para a concentração 540 μ M os genótipos BGP 75-1, BGP 8-5, BGP 26-5, BGP 15-4 e BGP 7-2 foram semelhantes entre eles quanto ao número de explantes calejados e superiores aos demais (Tabela 6).

O genótipo BGP 7-2 também foi superior aos demais genótipos quanto ao número de explantes calejados para a concentração 630 μ M de picloram (Tabela 6). Já para a concentração 720 μ M os genótipos Gleba 1, Planta 21, BGP 27, Borda 3, BGP 75-1 e BGP 69-4 e BGP 7-2 foram semelhantes entre eles quanto ao número de explantes calejados e superiores aos demais (Tabela 6).

Ocorreu calejamento em todas as concentrações de picloram utilizados nos genótipos estudados tanto para o meio Y3 quanto H. Porém, para as concentrações 180, 270, 360, e 720 μ M de picloram os calos formados eram marrons compactos e indiferenciados, que oxidaram completamente entre 30 a 120 dias em meio de cultura de indução. Vasconcelos et al. (2012) relata calos compactos não embriogênicos em “aroeira-do-sertão” com as mesmas características dos calos encontrados nesse estudo com a macaúba.

Para as concentrações 450, 540 e 630 μ M de picloram os calos obtidos apresentaram aspecto nodular, brilhante de coloração bege a amarelo claro que permaneceram com aspecto friável durante toda a fase de indução podendo ser avançado para as demais etapas (Figuras 5 e 6). Calos com mesmas características morfológicas foram descritas por Andrade, (2014) quando trabalhou com plantas jovens de macaúba.

E os genótipos BGP 75-1, BGP 26-5 e BGP 70-8 foram selecionadas pelo critério de número de explantes calejados tanto para o meio de cultura H (Figura 5, a-i) quanto para o Y3 (Figura 6, a-i) para a demonstração dos resultados morfológicos, dentro das concentrações 450, 540 e 630 μ M de picloram que resultaram calos embriogênicos.

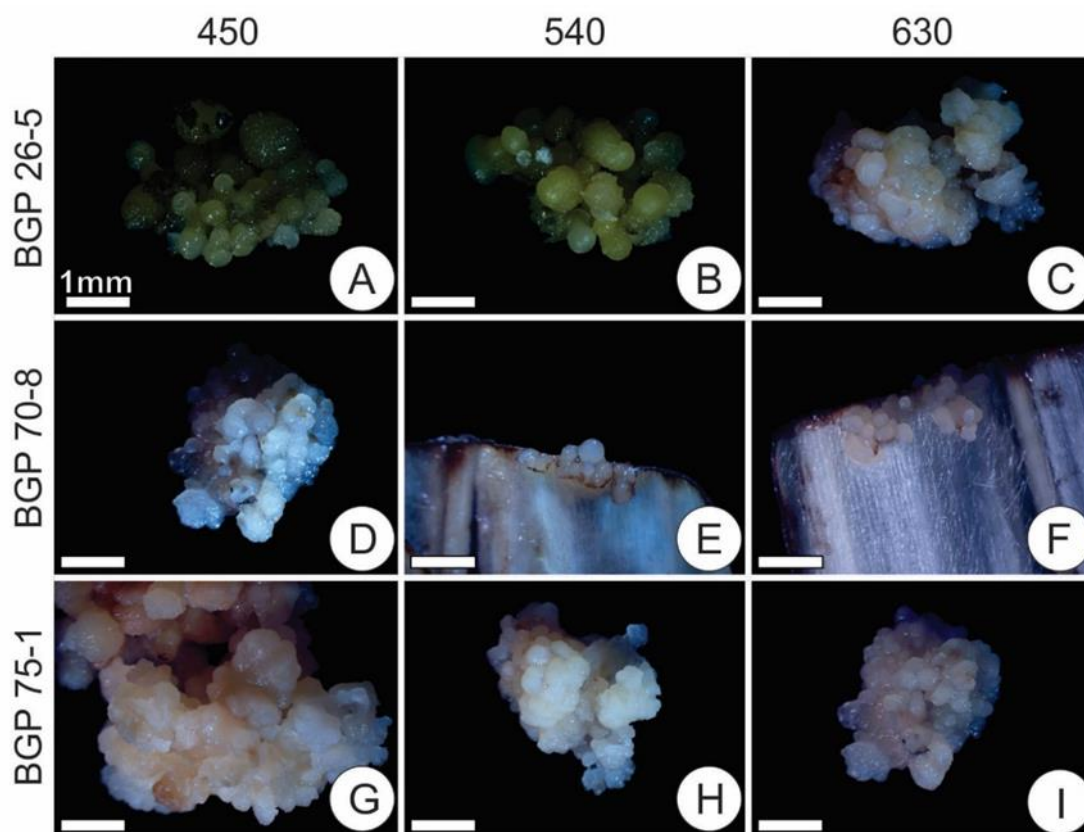


Figura 5. Resposta morfológica dos calos de macaúba, submetidos ao tratamento de indução no meio de cultura H na presença de diferentes concentrações de picloram (450, 540 e 630 μ M). As imagens de A-I mostram a formação dos calos nos explantes das plantas BGP 26-5, BGP 70-8 e BGP 75-1.

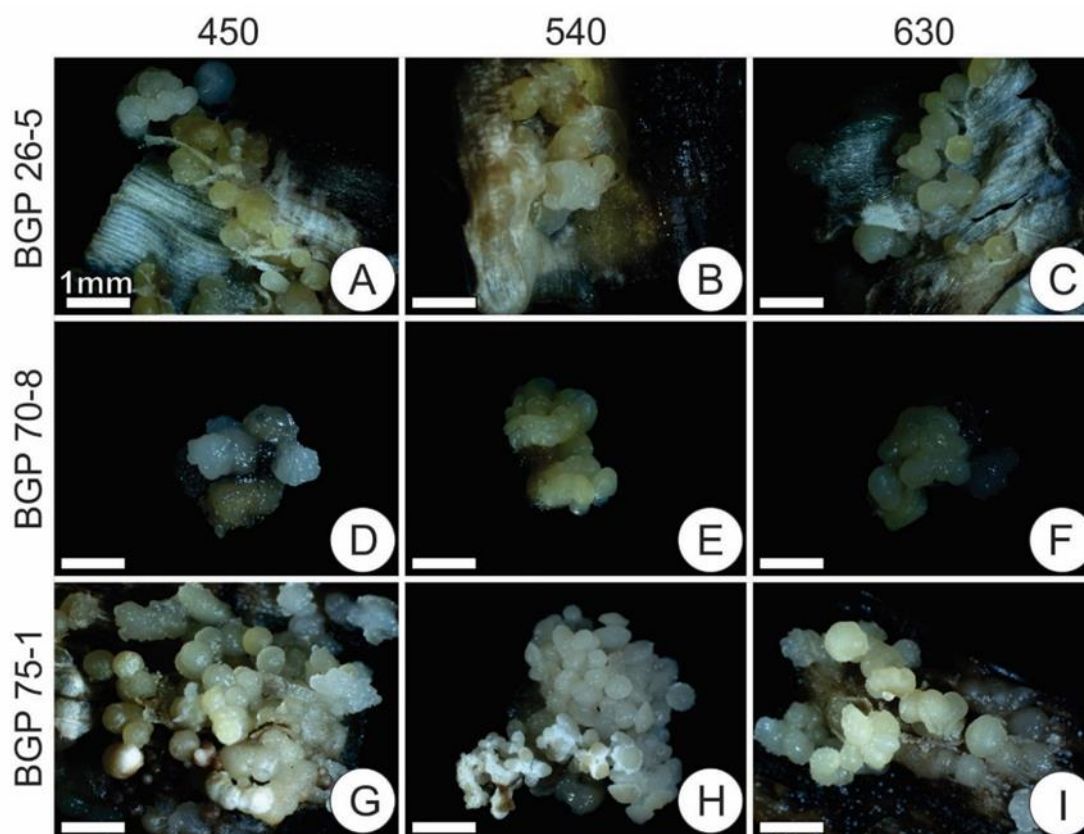


Figura 6. Resposta morfológica dos calos de macaúba, submetidos ao tratamento de indução no meio de cultura Y3 na presença de diferentes concentrações de picloram (450, 540 e 630 μ M). As imagens de A-I mostram a formação dos calos nos explantes das plantas BGP 26-5, BGP 70-8 e BGP 75-1.

A concentração 450 μ M de picloram tanto para o meio de cultura H quanto para Y3 para os genótipos BGP 26-5, BGP 70-8 e BGP 75-1 (Figura 5, a, d, g) e (Figura 6, a, d, g), respectivamente. A concentração de 540 μ M para os genótipos BGP 26-5, BGP 70-8 e BGP 75-1 tanto para meio H (Figura 5, b, e, h) e Y3 (Figura 6, b, e, h) respectivamente e a concentração de 630 μ M para os genótipos BGP 26-5, BGP 70-8 e BGP 75-1 para o meio H (Figura 5, c, f, i) e Y3 (Figura 6, c, f, i) respectivamente.

Quando fixou o meio de cultura Y3 e fixou os genótipos verificou-se que a concentração de picloram não teve efeito para a maioria dos genótipos em relação ao número de explantes calejados, com exceção dos genótipos Borda 3, BGP 69-4 e BGP 70-8 que tiveram comportamento quadrático (Tabela 7). Sendo que para o genótipo Borda 3 o ponto de mínimo 526,3 e para BGP 69-4 e BGP-70 o ponto de máximo foram 485,5 e 494,05 respectivamente.

Tabela 7 - Equações de regressão ajustadas para Números de Explantes Calejados em função das concentrações para os respectivos genótipos para o meio de cultura Y3 e os respectivos coeficientes de determinação.

Genótipos	Equações Ajustadas	R ² /r ²
Gleba 2	$\hat{Y} = 0,6143$	-
Gleba 1	$\hat{Y} = 0,7786$	-
Planta 21	$\hat{Y} = 0,8429$	-
BGP 27	$\hat{Y} = 0,8571$	-
Borda 3	$\hat{Y} = 1,5214 - 0,003558* CP + 0,00000338* CP^2$	0,5913
BGP 75-1	$\hat{Y} = 1,61$	-
BGP69-4	$\hat{Y} = - 0,7321 + 0,006779* CP - 0,000006981* CP^2$	0,6563
BGP 8-5	$\hat{Y} = 0,6214$	-
Borda 1	$\hat{Y} = 0,7429$	-
BGP70-8	$\hat{Y} = -0,8678 + 0,007116* CP - 0,0000072016* CP^2$	0,5530
BGP 26-5	$\hat{Y} = 1,0071$	-
BGP 15-4	$\hat{Y} = 0,8357$	-
BGP 7-2	$\hat{Y} = 1,15$	-

* - Significativo a 5% pelo teste "t".

Quando fixou o meio de cultura H e fixou os genótipos verificou-se que a concentração de picloram não teve efeito para a maioria dos genótipos em relação ao número de explantes calejados, com exceção dos genótipos BGP 69-4 que teve comportamento quadrático (Tabela 8). Sendo para BGP 69-4 o ponto de máximo foi 531,72.

Tabela 8 - Equações de regressão ajustadas para Números de Explantes Calejados em função das concentrações para os respectivos genótipos para o meio de cultura H e os respectivos coeficientes de determinação.

Genótipos	Equações Ajustadas	R ² /r ²
Gleba 2	$\hat{Y} = 0,39$	-
Gleba 1	$\hat{Y} = 0,90$	-
Planta 21	$\hat{Y} = 0,92$	-
BGP 27	$\hat{Y} = 0,77$	-
Borda 3	$\hat{Y} = 0,84$	-

BGP 75-1	$\hat{Y} = 1,03$	-
BGP69-4	$\hat{Y} = - 0,5214 + 0,005548* CP - 0,000005217* CP^2$	0,7685
BGP 8-5	$\hat{Y} = 0,70$	-
Borda 1	$\hat{Y} = 0,61$	-
BGP70-8	$\hat{Y} = 0,59$	-
BGP 26-5	$\hat{Y} = 0,86$	-
BGP 15-4	$\hat{Y} = 0,72$	-
BGP 7-2	$\hat{Y} = 1,25$	-

* - Significativo a 5% pelo teste "t".

Luis, (2013) e Meira et al. (2020) relatam em seus trabalhos com utilização de explantes foliares de macaúba a formação significativa de calos com a utilização da concentração 450 μ M quando combinado ao meio Y3. Luis, (2013) descreve que o aumento da concentração de picloram na ordem de 675 e 900 μ M reduziu a formação de calos quando comparado a concentração de 450 μ M o que corrobora com o presente trabalho.

Essa diferença na resposta do número calos formados em relação a diferentes concentrações de reguladores também foi relatado por Scariot et al. (1991) evidenciando o fato da diversidade genética existente na macaúba por ser propagada por sementes e apresenta sistema reprodutivo do tipo misto (ANDRADE, 2014).

Dentro de uma mesma espécie podem existir diferenças genéticas que podem interferir e comprometer a variabilidade da competência *in vitro* (HENRY et al., 1994). Além disso os níveis de hormônios endógenos nos explantes podem estar relacionados aos genótipos, a fase de desenvolvimento, idade, época do ano entre outros, ocasionando altas variabilidades nas respostas *in vitro* (JIMÉNEZ et al., 2005).

3.3.1 Avaliação do Número de Explantes Oxidados

Foi avaliado também número de explantes oxidados tanto para o meio Y3 quanto para H, uma vez que este fato interfere diretamente na obtenção de calos. Na relação dos genótipos dentro de cada concentração de picloram, tanto para as concentrações 180 μ M quanto para 270 μ M e 360 μ M os genótipos foram semelhantes

entre eles quanto ao número de explantes oxidados quando utilizado o meio Y3 (Tabela 9).

Tabela 9 - Resultado médio dos Números de Explantes Oxidados para as respectivas combinações de genótipos e concentrações de picloram (μM) para o meio de cultura Y3.

Genótipos	Nº Explantes Oxidados						
	180	270	360	450	540	630	720
Gleba 2	2,05 A	1,60 A	1,70 A	1,95 A	1,60 A	1,35 A	1,35 A
Gleba 1	1,70 A	1,40 A	1,05 A	1,30 A	1,00 A	1,20 A	1,10 A
Planta 21	1,40 A	1,40 A	1,40 A	1,05 B	1,30 A	1,05 A	1,70 A
BGP 27	1,35 A	1,45 A	1,70 A	0,40 B	0,94 A	0,60 A	1,60 A
Borda 3	1,50 A	1,60 A	1,45 A	1,10 B	1,00 A	1,25 A	1,15 A
BGP75-1	1,70 A	1,65 A	1,55 A	0,60 B	1,10 A	1,10 A	1,75 A
BGP69-4	1,35 A	1,30 A	1,20 A	1,50 A	1,10 A	1,60 A	1,75 A
BGP 8-5	1,55 A	1,25 A	0,90 A	1,35 A	1,35 A	1,55 A	1,40 A
Borda 1	1,10 A	1,10 A	1,40 A	1,45 A	1,20 A	1,40 A	1,70 A
BGP70-8	1,35 A	2,05 A	1,60 A	1,60 A	1,60 A	1,25 A	1,40 A
BGP 26-5	1,50 A	1,30 A	1,40 A	1,00 B	1,45 A	1,00 A	1,75 A
BGP 15-4	1,65 A	1,50 A	1,85 A	1,60 A	1,20 A	1,40 A	1,70 A
BGP 7-2	1,85 A	1,85 A	1,55 A	1,40 A	1,35 A	1,20 A	1,70 A

Os grupos de médias seguidas de mesmas letras na coluna são semelhantes pelo critério de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Para concentração de $450\mu\text{M}$ o genótipo Gleba 2, Gleba 1, BGP 69-4, BGP 8-5, Borda 1, BGP 70-8, BGP 15-4 e BGP 7-2 foram semelhantes entre eles e superiores ao demais quanto ao número de explantes oxidados (Tabela 9). Para as concentrações $540\mu\text{M}$ quanto para $630\mu\text{M}$ e $720\mu\text{M}$ os genótipos foram semelhantes entre eles quanto ao número de explantes oxidados (Tabela 9).

Na relação dos genótipos dentro de cada concentração de picloram para o meio H, na concentração $180\mu\text{M}$ os genótipos foram semelhantes entre eles quanto ao número de explantes oxidados com exceção do genótipo Gleba 1 que apresentou menor número de explantes oxidados (Tabela 10).

Tabela 10 - Resultado médio dos Números de Explantes Oxidados para as respectivas combinações de genótipos e concentrações de picloram para o meio de cultura H.

Genótipos	Nº Explantes Oxidados						
	180	270	360	450	540	630	720
Gleba 2	1,25 A	1,45 A	1,20 B	1,00 B	0,85 A	1,10 A	1,75 A
Gleba 1	0,50 B	1,10 A	0,80 B	0,95 B	1,20 A	0,90 A	2,05 A
Planta 21	1,25 A	1,60 A	1,40 A	1,25 B	0,85 A	0,95 A	1,65 A
BGP 27	1,60 A	1,90 A	1,20 B	0,45 B	0,80 A	0,60 A	1,75 A

Borda 3	1,60 A	1,65 A	1,35 A	1,90 A	1,25 A	1,35 A	1,95 A
BGP75-1	1,80 A	1,20 A	1,55 A	1,60 A	1,45 A	1,00 A	0,85 B
BGP69-4	1,50 A	1,05 A	0,85 B	1,25 B	1,35 A	1,25 A	1,10 B
BGP 8-5	2,10 A	1,55 A	1,25 B	2,00 A	1,45 A	1,95 A	1,40 B
Borda 1	1,80 A	1,65 A	1,00 B	1,20 B	1,70 A	1,55 A	1,85 A
BGP70-8	1,40 A	1,30 A	0,80 B	1,45 A	1,30 A	1,35 A	1,00 B
BGP 26-5	1,65 A	1,65 A	1,70 A	1,35 B	1,55 A	1,20 A	1,35 B
BGP 15-4	1,75 A	1,70 A	1,90 A	1,65 A	1,50 A	1,40 A	1,90 A
BGP 7-2	1,75 A	1,90 A	1,50 A	1,35 B	1,50 A	1,35 A	1,75 A

Os grupos de médias seguidas de mesmas letras na coluna são semelhantes pelo critério de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Para concentração de picloram, de 270 μ M os genótipos foram semelhantes entre eles quanto ao número de explantes oxidados (Tabela 10). Para concentração 360 μ M os genótipos Planta 21, Borda 3, BGP 75-1, BGP 26-5, BGP 15-4 e BGP 7-2 foram semelhantes entre eles e superiores aos demais genótipos quanto ao número de explantes oxidados (Tabela 10).

Para concentração de 450 μ M o genótipo Borda 3, BGP 75-1, BGP 8-5, BGP 70-8 e BGP 15-4 foram semelhantes entre eles e superiores aos demais genótipos quanto ao número de explantes oxidados e já para as concentrações 540 μ M e 630 μ M os genótipos foram semelhantes entre eles quanto ao número de explantes oxidados (Tabela 10).

Para a concentração 630 μ M de picloram os genótipos Gleba 2, Gleba 1, Planta 21, BGP 27, Borda 3, Borda 1, BGP 15-4 e BGP 7-2 foram semelhantes entre eles e superiores aos demais quanto ao número de explantes oxidados (Tabela 10).

Quando fixou o meio de cultura Y3 e fixou os genótipos verificou-se que a concentração de picloram não teve efeito para a maioria dos genótipos em relação ao número de explantes oxidados (Tabela 11).

A exceção foram os genótipos Gleba 2 e Borda 1 com comportamento linear e Gleba 1, BGP 75-1 e BGP 7-2 que tiveram comportamento quadrático (Tabela 11). Sendo que para o genótipo Gleba 1 o ponto de mínimo 564,7 e para BGP 75-1 e BGP-7-2 o ponto de máximo foram 477,39 e 526,28 respectivamente.

Tabela 11 - Equações de regressão ajustadas para Números de Explantes Oxidados em função das concentrações para os respectivos genótipos para o meio de cultura Y3 e os respectivos coeficientes de determinação.

Genótipos	Equações Ajustadas	R^2/r^2
-----------	--------------------	-----------

Gleba 2	$\hat{Y} = 2,13929 - 0,001071* CP$	0,5955
Gleba 1	$\hat{Y} = 2,3142 - 0,004398* CP + 0,000003894* CP^2$	0,7448
Planta 21	$\hat{Y} = 1,32$	-
BGP 27	$\hat{Y} = 1,15$	-
Borda 3	$\hat{Y} = 1,29$	-
BGP 75-1	$\hat{Y} = 3,325 - 0,0096825* CP + 0,000010141* CP^2$	0,5788
BGP69-4	$\hat{Y} = 1,40$	-
BGP 8-5	$\hat{Y} = 1,33$	-
Borda 1	$\hat{Y} = 0,942857 + 0,000873* CP$	0,6095
BGP70-8	$\hat{Y} = 1,55$	-
BGP 26-5	$\hat{Y} = 1,34$	-
BGP 15-4	$\hat{Y} = 1,0071$	-
BGP 7-2	$\hat{Y} = 2,7678 - 0,005337* CP + 0,0000050705* CP^2$	0,7167

* - Significativo a 5% pelo teste "t".

Quando fixou o meio de cultura H e fixou os genótipos verificou-se que a concentração de picloram não teve efeito para a maioria dos genótipos em relação ao número de explantes oxidados (Tabela 12).

A exceção do genótipo BGP 26-5 com comportamento linear e Gleba 2, BGP 27 e Borda 1 que tiveram comportamento quadrático (Tabela 12). Sendo que para o genótipo Gleba 2 o ponto de mínimo 437,47 e para BGP 27 e Borda 1 o ponto de máximo foram 488,44 e 433,5 respectivamente.

Tabela 12 - Equações de regressão ajustadas para Números de Explantes Oxidados em função das concentrações para os respectivos genótipos para o meio de cultura H e os respectivos coeficientes de determinação.

Genótipos	Equações Ajustadas	R^2/r^2
Gleba 2	$\hat{Y} = 2,3607 - 0,0062367* CP + 0,00000712816* CP^2$	0,5376
Gleba 1	$\hat{Y} = 1,07$	-
Planta 21	$\hat{Y} = 1,27$	-
BGP 27	$\hat{Y} = 3,8785 - 0,01285* CP + 0,000013154* CP^2$	0,5831
Borda 3	$\hat{Y} = 1,57$	-
BGP 75-1	$\hat{Y} = 1,35$	-

BGP69-4	$\hat{Y} = 1,19$	-
BGP 8-5	$\hat{Y} = 1,67$	-
Borda 1	$\hat{Y} = 2,7571 - 0,006818* CP + 0,000007863* CP^2$	0,5847
BGP70-8	$\hat{Y} = 1,22$	-
BGP 26-5	$\hat{Y} = 1,841 - 0,0007738* CP$	0,6113
BGP 15-4	$\hat{Y} = 1,68$	-
BGP 7-2	$\hat{Y} = 1,58$	-

* - Significativo a 5% pelo teste "t".

Em explantes seccionados é comum o acúmulo de polifenóis e produtos de oxidação descritos por Andrade et al. (2000) e Van Winkle et al. (2003), consequentemente modifica o meio de cultura interferindo na absorção de nutrientes, inibindo o crescimento e desenvolvimento dos explantes podendo levar a morte dos mesmos (COSTA et al., 2006).

North et al. (2012) relatam que altas concentrações de reguladores de crescimento podem contribuir para a formação de compostos fenólicos. E o carvão ativado além de adsorver e reduzir os efeitos tóxicos do regulador também reduz o efeito substâncias exógenas como os de compostos fenólicos (SÁENZ et al., 2010; GUEDES et al., 2011).

Para esse estudo a utilização do carvão ativado atuando como um antioxidante essencial para a formação dos calos, multiplicação e diferenciação dos embriões. Os vários subcultivos dos calos repondo nutrientes exauridos ao longo do tempo, permitiu o controle da oxidação à níveis toleráveis o que corrobora com Meira, 2019.

3.4 Multiplicação dos calos formados

Os calos formados foram separados e submetidos ao meio de multiplicação. Foram realizados vários ensaios com meios de culturas diferentes Y3, Y3-modificado, C4 e H (Tabela 2).

As modificações realizadas a nível de macro e micronutrientes em especial N e Fe (Tabela 2), respectivamente, foram bastante responsivas quando utilizado os meios Y3-modificado e C4 (Tabela 2). Pimentel (2012) e Santos (2015) trabalhando

com aspectos nutricionais da macaúba relatam que a espécie requer uma maior quantidade desses nutrientes.

Embora a forma preferencialmente absorvida de nitrogênio pela maioria das plantas seja a forma de NO_3^- (nitrato), quando esta é a única forma disponível há uma tendência a alcalinização do meio com conseqüente interferência na absorção de nutrientes e uma maneira de evitar esse efeito é utilizando formulações de soluções nutritivas contendo tanto NO_3^- quanto NH_4^+ (amônio), (BOSCHIERO et al., 2019).

Em palmáceas é comum altos teores de Fe (WIJEBANDARA, 2004). O maior requerimento de Fe por palmáceas segundo Pires et al (2013) pode estar ligado à maior capacidade fotossintéticas destas espécies. Nas plantas o Fe desempenha a importante função de ativação enzimática na cadeia de transporte de elétrons (MARSCHNER, 1995).

Desse modo, os meios Y3-modificado e C4 (Tabela 2), quando em concentrações reduzidas de picloram 18 e 63 μM com ausência de carvão e acrescidos de 2 e 6,3 μM de 2ip, respectivamente, foram responsivos quanto a multiplicação de calos. Guerra et al. (1999) descrever em seu trabalho sobre a redução de níveis de reguladores de crescimento no meio de cultura permitindo a divisão celular de forma sucessiva e cíclica e o controle dos processos de diferenciação resultando em proliferação de massas de calos.

Quando utilizado o meio C4 (Tabela 2) acrescido da dose de 630 μM na presença de carvão com adição 10 μM de 2ip o resultado foi extremamente importante para manter os calos com as características embriogênicas, para a maioria dos acessos submetidos a esse tratamento. Genótipos como o BGP26-5 e BGP75-1 quando submetidos a esse tratamento chegaram a apresentar ciclos de divisões celulares resultando em pequenas massas de calos. Houve diferenças morfológicas nos calos embriogênicos formados, calos embriogênicos nodulares friáveis e amarelados, sendo que os mais responsivos quanto a multiplicação foram os calos de acessos oriundos da indução com dose de picloram de 630 μM (Figura 5- c, i).

3.5 Regeneração e Germinação dos Embriões Somáticos

As massas embriogênicas formadas na etapa de multiplicação foram transferidas para o meio de regeneração após quatro ciclos de 30 dias em meio de

multiplicação. Foram realizados vários ensaios com meios de culturas diferentes e o C4 (Tabela 2), com ausência da auxina picloram, acrescido 1000 μM de putrescina e 0,1 μM de 2iP foi o que proporcionou com a formação embriões de coloração branca que eram individualizados para conversão em plântulas (Figura 8 a).

Após 45 dias em meio de regeneração esses embriões foram levados para o meio de germinação suplementados com ANA e Putrescina em três etapas. A primeira foi realizada em frascos com meio C4 (Tabela 2). Além dos constituintes descritos foi acrescentado ao meio de cultura os aminoácidos metionina e prolina (Figura 8 b-c). E para a segunda etapa também realizada em frascos com meio C4 eram constituídos dos mesmos elementos da etapa anterior, porém, foi acrescentado apenas a prolina (Figura 8 d-e).

A metionina está diretamente ligada a síntese de etileno, fitormônio gasoso, que é geralmente produzido em respostas a meios com presença de auxina relacionadas a estímulos para senescência, amadurecimento e abscisão de folhas (GASPAR et al., 1996; SANTNER et al., 2009) e este aminoácido vem sendo muito utilizado na maturação de embriões somáticos.

Durante o processo de indução à embriogênese somática ocorre acúmulo de altas concentrações auxinas o que pode estar associado a estresse devido a desprogramação e reprogramação celular ocorrendo acúmulo de prolina (GOMES et al., 2014; SILVA et al., 2014b) este aminoácido atua na integridade das proteínas, melhora a atividade enzimática, exerce a função tampão, e ainda promove a expressão de genes específicos, o que possibilita a adaptação ou até mesmo a recuperação da planta (VERBRUGGEN & HERMANS, 2008; SZABADOS & SAVOURÉ, 2010)

As plântulas formadas da terceira etapa foram individualizadas em tubos de ensaio em meio M4 (Tabela 2) regenerando as primeiras plântulas do experimento (Figura 8). Os tratamentos usados no presente trabalho embora ainda não tenham regenerado plântulas de todos os genótipos estudados, já mostram grandes avanços para o estabelecimento de um protocolo para clonagem de macaúba a partir de folhas imaturas de plantas adultas.

O estudo realizado permitiu a multiplicação de genótipo a partir de explante de planta adulta, o estágio fisiológico do explante utilizado influencia na reposta morfogênica *in vitro*, Andrade (2014) verificou em seu trabalho com macaúba que os explantes oriundos de plantas na fase juvenil tendem a responder favoravelmente à

embriogênese somática, diferente do que ocorre com explantes provenientes de plantas adultas. Gueye et al. (2009) ressaltam a importante aptidão das células para adquirirem competência embriogênica está relacionado a dependência do estágio fisiológico e da diferenciação inicial das mesmas.

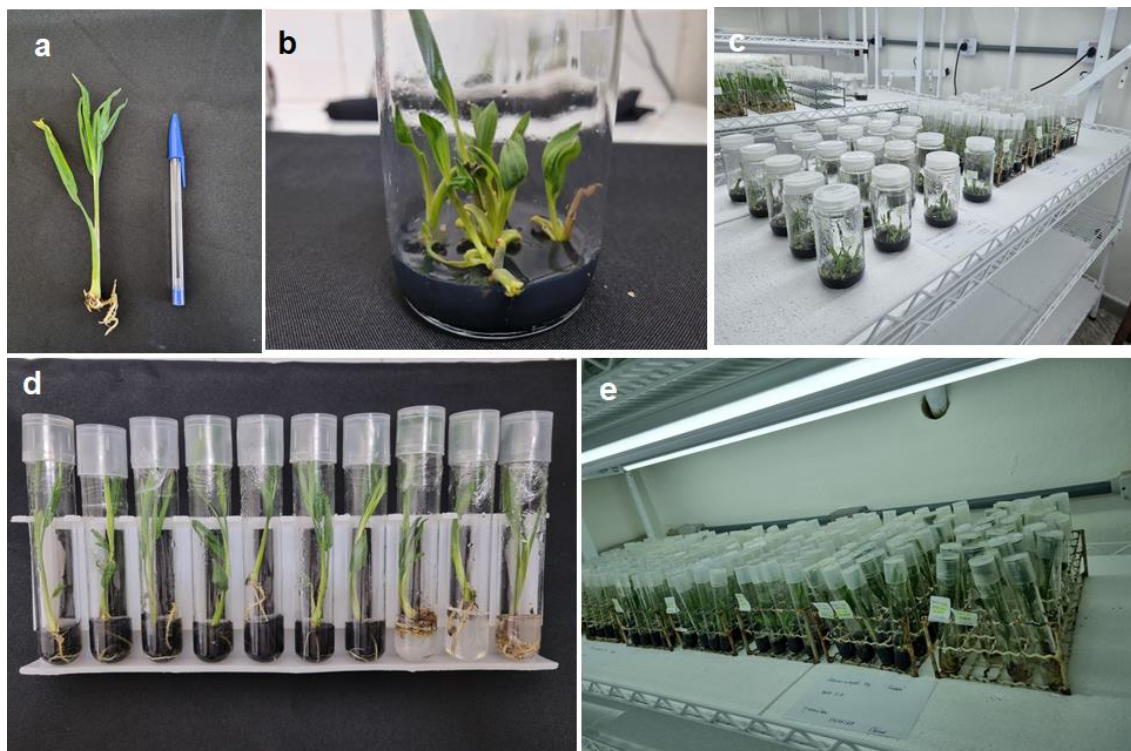


Figura 7. Plântulas do genótipo BGP 7-2 obtidas 90 dias após cultivo *in vitro* em meio de germinação. a: plântula formada ao final do processo. b-c: Plântulas sendo formadas em meio C4 nos frascos a partir de embriões somáticos. d-e: Plântulas sendo individualizadas em meio M4 nos tubos.

3.6 Resultados morfoanatômicos dos calos obtidos

Os resultados dos aspectos morfoanatômicos dos calos obtidos nos explantes em cada planta selecionada BGP 26-5, BGP 70-8 e BGP 75-1 (Figura 9, a-f) após 120 dias. Para as plantas BGP75-1 e BGP26-5 ocorreu a formação de calos embriogênicos que apresentavam coloração branco-amarelada, superfície lisa, formato globular e, aparentemente, eram facilmente destacadas do explante, esses calos eram formados ao longo de toda superfície dos explantes (Figura 9 b, d, f).

Essas superfícies eram constituídas de células do parênquima e na região interna por células meristemáticas formando um feixe este padrão também já foi relatado para palmeiras como o coco (BUFFARD-MOREL et al., 1992), tâmara

(GUEYE et al., 2009) e dendê (GOMES et al., 2017). Calos oriundos de explantes foliares de plantas jovens de macaúba também foram relatados (ANDRADE, 2014).

Autores como Pádua et al. (2013), Luis e Scherwinski-Pereira (2014), Andrade (2014) e Granja et al. (2018) relatam em seus trabalhos que os calos de cor e forma translúcido-alongado, translúcido-aquoso, bege-globular e branco-globular e calos nodulares são os que apresentam maior potencial embriogênico obtendo embriões somáticos oriundos desses calos.

Ao contrário, dos calos observadas na planta BGP70-8 que apresentavam formatos irregulares e elevado grau de fusão entre si, com consistência compacta além de se apresentarem ligadas ao explante (Figura 9 c, d). Segundo Henry et al. (1994), fatores genéticos são capazes de condicionar as respostas obtidas na cultura de tecido *in vitro*, e as variabilidades que ocorrem a nível genético existente dentro de uma mesma espécie podem levar também a variabilidade da competência *in vitro*. El-Din et al. (2007) ao estudar cultivares da família Arecaceae também observou diferenças entre respostas de genótipos à indução da formação de calos.

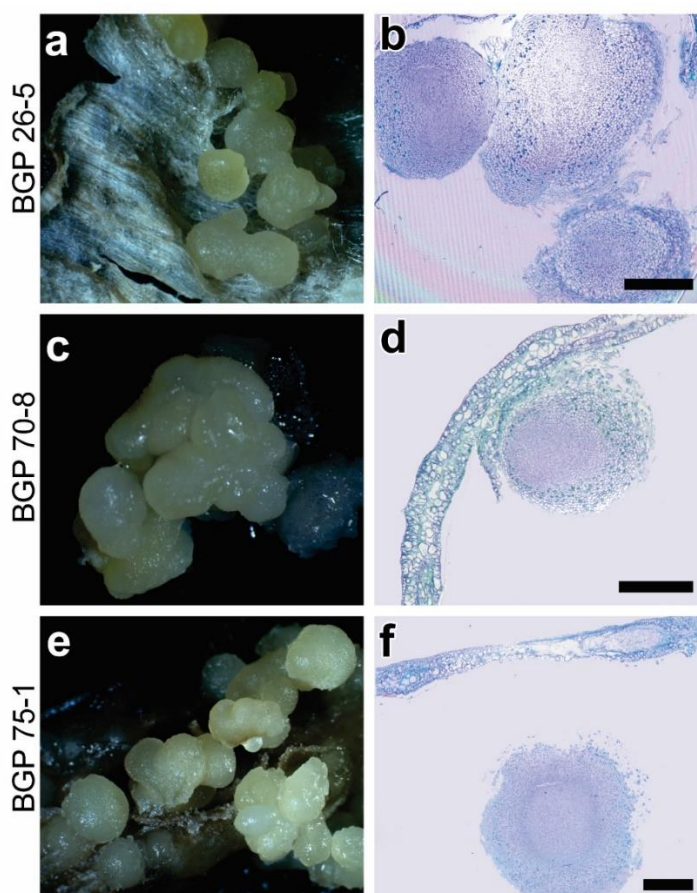


Figura 8. Indução de embriogênese somática em três plantas de macaúba BGP26-5, BGP70-8 e BGP75-1. Aspecto morfológico (a, c, e) e anatômico (b, d, f) dos calos

embriogênicos após 120 dias de cultivo. a, b: BGP26-5. c, d: BGP70-8. Note o elevado grau de fusionamento das estruturas. e, f: BGP75-1. Escala: 1000 μ m.

Estudo foi realizado na planta BGP 75-1 e os explantes foliares de utilizados para a indução de embriogênese somática eram constituídos por epiderme unisseriada em ambas as faces da lâmina foliar com células de tamanho homogêneo e justapostas e hipoestomática, mesofilo dorsiventral com feixes vasculares do tipo colateral fechado (Figura 10-a).

Após 30 dias de cultivo em meio de indução, poucas alterações morfológicas foram observadas, preservando os aspectos iniciais do explante e apresentando células hipertrofiadas na região do parênquima e também na face abaxial da epiderme do explante. Contudo, divisões celulares foram evidentes no parênquima vascular dos explantes (Figura 10-b). Resultado diferente do relatado por Meira et al. (2019) que não observaram sinais de divisão celular e formação de calos.

Aos 60 dias em meio de indução, calos friáveis e amarelados, ainda fixos foram observados próximos as regiões de secção dos explantes. A formação dessas estruturas ocorreu a partir da reativação de células do tecido parenquimático associadas aos tecidos vasculares (Figura 10-c, d). Intensas divisões celulares foram observadas na nervura mediana e em nervuras de menor calibre ao longo explante.

A proliferação de células nessas regiões promoveu o colapso de células do mesofilo adjacentes (Figura 10-c, d), que se acumulavam formando camadas delgadas de células que envolviam a massa de proliferação celular. Essas células apresentavam citoplasma denso, nucléolos visíveis e núcleos evidentes com alta relação núcleo/citoplasma (Figura 10-d). As divisões celulares se intensificaram, e aos 90 dias de cultivo a massa de células em formação ocupavam grande parte do mesofilo foliar e essas células provavelmente foram oriundas das sucessivas divisões mitóticas que ocorriam nas células procambiais (Figura 10-e, f).

Estudos histológicos evidenciaram as características embriogênicas dos calos obtidos nesta primeira etapa do processo que é a fase de indução onde se observa regiões com intensa divisão celular principalmente na região interna dos calos, pequenas células isodiamétricas com citoplasma denso e núcleo volumoso. Esse padrão foi observado em calos embriogênicos obtidos de explantes de embriões zigóticos de macaúba (MOURA et al., 2009) e explantes foliares de palma de óleo

(BALZON et al., 2013; SILVA et al., 2013) e explantes foliares de macaúba (MEIRA et al., 2019).

Nessa fase, a estrutura pró-embriogênica em formação das sucessivas divisões mitóticas ocorridas em diferentes direções, já apresentava formato circular e diferenças citológicas eram evidentes na sua estrutura. Enquanto células da periferia da estrutura apresentavam maior volume e, aparentemente, vacuolizadas, as células centrais possuíam menor volume e citoplasma denso, indicando a possível formação de um centro meristemático (Figura 10-f). Algumas células do mesofilo, adjacentes à estrutura em formação, apresentaram-se hipertrofiadas, característica não observada nos estágios anteriores (Figura 10-f).

Aos 120 dias de cultivo, a estrutura pró-embriogênica em formação extravasou os limites do explante, tornando-se exposta à superfície (Figura 10-g). As células centrais do pró-embrião mantiveram as características similares a de células meristemáticas (Figura 10-g, h), denominando o centro meristemático do calo embriogênico, enquanto as células periféricas apresentavam-se maiores e citoplasma hialino (Figura 10-g).

Inúmeras células hipertrofiadas foram observadas na base e em torno da estrutura embriogênica (Figura 10-g, i). Cordões vasculares do explante foram observados somente na base da estrutura, não sendo observada a diferenciação de tecidos vasculares nas estruturas embriogênicas (Figura 10-g, i).

Células procambiais se diferenciam em células do tecido vascular e pela ação da auxina (ROSE et al., 2006) são reprogramadas induzindo a formação de calos que podem ter potencial embriogênico (ROSE, 2016). A origem dos calos é confirmada por Gomes et al. (2017) que caracteriza as estruturas como originárias de células procambiais, próximo ao tecido vascular.

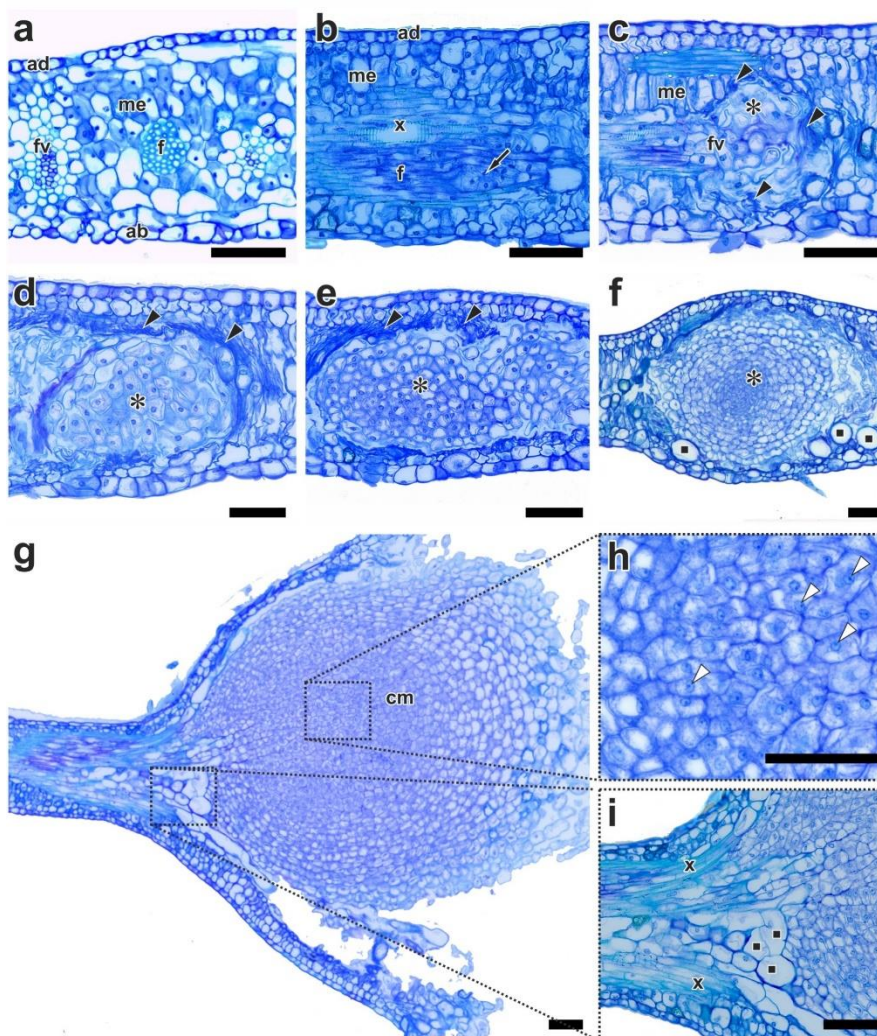


Figura 9. Ontogenia dos calos embriogênicos de macaúba na planta BGP 75-1. a: Explante inicial (retirado no dia da inoculação). b: Divisão de células do parênquima vascular (seta) após 30 dias em meio de indução. c-f: Desenvolvimento das estruturas pró-embriogênicas (*) na região da nervura dos explantes foliares sendo; c-d: após 60 dias em meio de indução e e-f: após 90 dias em meio de indução. Note o colapso das células do mesofilo adjacentes a massa pró-embriogênica (cabeça de seta preta). g: Estrutura pró-embriogênica exposta. Note as diferenças citológicas entre as células do centro meristemático (cm) em relação as células da superfície da estrutura. h: Centro meristemático. Note os núcleos evidentes dessas células (cabeça de seta branca). i: Células hipertrofiadas localizadas na base da estrutura embriogênica (quadrado). g-i: após 120 dias em meio de indução. Abreviações: ad face adaxial da epiderme; ab face abaxial da epiderme; cm centro meristemático; f fibra; fv feixe vascular; me mesofilo; x xilema. Barras: 100 µm.

3.7 Análise Histoquímica

Este estudo foi realizado com explantes foliares da planta BGP 75-1. A coloração com Vermelho de Rutênio (VR) evidenciou a presença de pectina nos tecidos foliares de macaúba (Figura 11 a-d). No explante inicial, todos os tecidos foliares apresentaram-se intensamente corados com VR (Figura 11-a). Contudo, no início de formação das estruturas pró-embriogênicas, as regiões de proliferação celular apresentaram-se fracamente coradas.

Em contrapartida, as camadas de células colapsadas que circundavam a massa de células em divisão apresentaram intensa coloração, em comparação as demais regiões do explante (Figura 11-b). No calo embriogênico, as células do centro meristemático apresentaram coloração menos intensa que o explante foliar (Figura 11-c, d). Nessa fase, as células hipertrofiadas localizadas na base das estruturas embriogênicas apresentaram-se fortemente coradas (Figura 11-c).

Os calos embriogênicos foram envolvidos por células colapsadas do mesofilo conferindo um isolamento a estrutura em relação ao explante. O que também foi relatado por Moura et al. (2009), esse espessamento isolando os pró-embriões, foi sugerido pelos autores como a consequência da liberação de pectinas, provavelmente desintegração e dissolução da lamela média.

Polissacarídeos neutros foram identificados ao longo de todo processo embriogênico a partir de reação histoquímica com ácido periódico + reagente de Schiff (PAS) (Figura 11 e-h). Os tecidos foliares do explante inicial e no início de formação dos calos embriogênicos apresentaram-se intensamente corados (Figura 11-e, f), especialmente na região dos tecidos vasculares, nesse último estágio (Figura 11-f).

Os compostos polissacarídeos neutros evidenciados no teste do PAS, foram confirmados como pectinas pelo teste com vermelho de rutênio. A coloração avermelhada forte, demonstra que as paredes celulares internas são ricas em compostos pécicos. Alguns estudos têm sugerido a relação dessas substâncias com a aquisição da competência embriogênica até o início do estágio embrionário globular de espécies como orvalhinha e milho (PEDROSO e PAIS, 1995; SAMAJ et al., 1995), chicória (CHAPMAN et al., 2000), coco (VERDEIL et al., 2001), flor de colza. (NAMASIVAYAM et al., 2006) e pupunha (STEINMACHER et al., 2012). A presença de polissacarídeos é uma característica frequentemente observada em culturas embriogênicas.

Após a formação das estruturas embriogênicas (Figura 11-g, h), compostos citoplasmáticos de células periféricas dos pró-embriões apresentaram-se coradas ao PAS (Figura 11-h), característica não observada nas células que compunham o centro meristemático da estrutura (Figura 11-h).

Essa observação foi confirmada pelo teste histoquímico com Lugol (Figura 11 i-l). Grãos de amido foram observados somente nas células-guardas do explante inicial (Figura 11-i) e nas células periféricas dos centros meristemáticos das estruturas pró-embriogênicas (Figura 11-k, l). Grãos de amido não foram identificados no início de formação dos calos (Figura 11-j).

Estudos realizados por Moura et al. (2010) em macaúba constataram a presença de amido nas células do embrião somático, porém, não eram abundantes e não possuíam uma distribuição. Segundo Gomes et al., (2014) a diferenciação celular requer energia devido as intensas divisões e a quantidade de amido pode variar a depender da fase de crescimento do embrião. No presente trabalho a mobilização de amido pelas células parenquimáticas adjacentes às células meristemáticas, evidenciada pelas análises histoquímicas, pode representar uma reserva energética para a divisão celular no interior dos centros meristemáticos que apresentam alta atividade celular. Esses resultados poderão contribuir para a melhor compreensão e otimização dos sistemas de regeneração *in vitro*, via embriogênese somática dessa importante espécie oleaginosa.

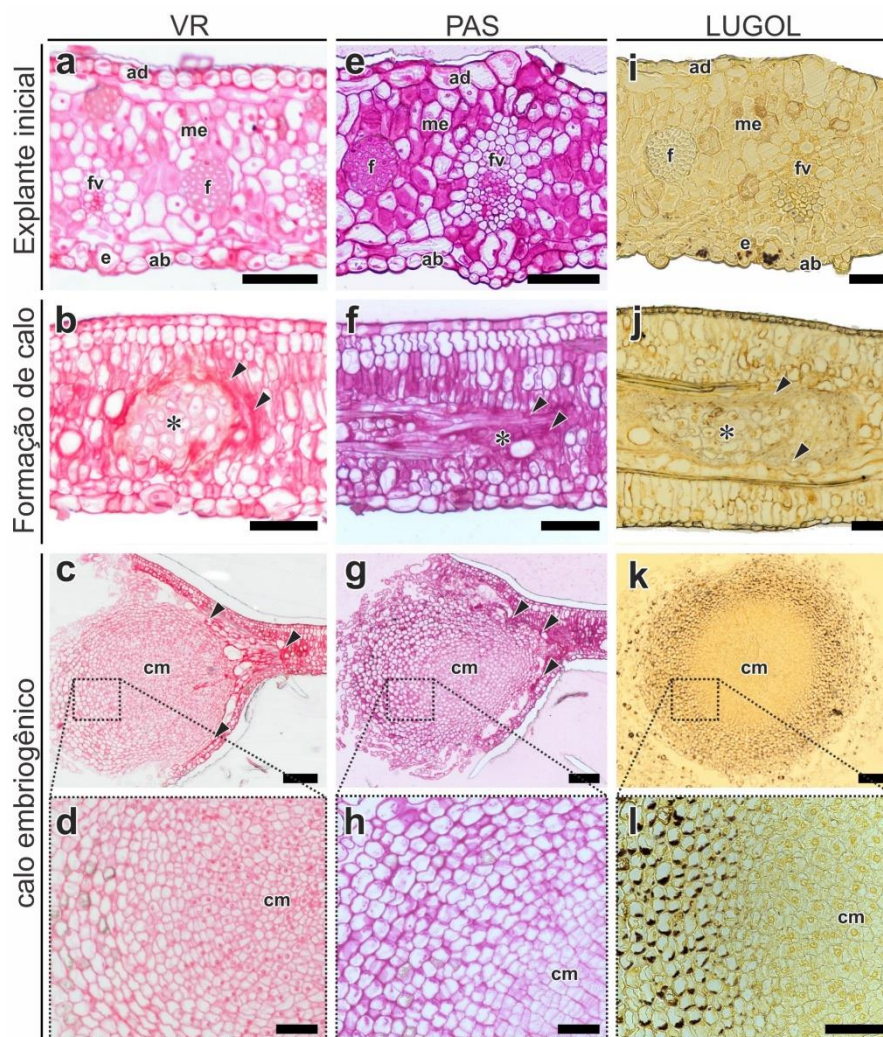


Figura 10. Histolocalização de compostos de parede e citoplasma durante a indução de embriogênese somática em macaúba após 120 dias em meio de indução da planta BGP 75-1. a-d: Vermelho de Rutênio. A reação positiva é demonstrada pela coloração avermelhada evidenciando a presença de pectina. Note a intensa coloração nas células em torno massa de proliferação de células (cabeça de seta) (b) e estrutura embriogênica (c) e-h: Ácido periódico + reativo de Schiff (PAS). A reação positiva é demonstrada pela coloração magenta evidenciando a presença de polissacarídeos neutros. Note a intensa coloração nas células envolvidas no início da formação da massa embriogênica (*) (f). i-l: Teste para detecção de amido com reagente de Lugol; resultado positivo apresenta pontoações escuras. Note a presença de amido nas células periféricas das estruturas embriogênicas e a ausências desses compostos no centro meristemático (cm). Abreviações: ad face adaxial da epiderme; ab face abaxial da epiderme; cm centro meristemático; e estômatos; f fibra; fv feixe vascular; me mesofilo; x xilema. Barras = a, b, d, e, f, h, i, j = 100 μ m; c, g, k = 200 μ m.

4 CONCLUSÃO

O processo de desinfestação e estabelecimento em laboratório do material vegetal foi eficiente;

O melhor período para a coleta do palmito o período seco sem ocorrência de chuvas;

O meio Y3 foi mais eficiente na formação de calos embriogênicos;

O meio de cultura C4 foi mais eficiente quando utilizado nas etapas de multiplicação, regeneração e germinação;

O genótipo BGP75-1 apresentou maior número de explantes calejados;

A concentração de 450 μM de picloram resultou em maior número de explantes calejados para os dois meios Y3 e H;

A concentração de 630 μM de picloram resultou menor número de explantes calejados e foi a concentração que proporcionou calos diferenciados com consequente regeneração em plântulas;

A formação de estruturas de parênquimas vascular, células do periciclo associadas as nervuras foliares dos explantes;

Pectinas, polissacarídeos neutros e grãos de amido são diferencialmente distribuídos nos tecidos vegetais durante todo processo de indução de embriogênese somática.

REFERÊNCIAS

- ABREU, I. S.; CARVALHO, C. R.; CARVALHO, G. M. A; MOTOIKE, S. Y. First karyotype, DNA C-value and AT/GC base composition of macaw palm (*Acrocomia aculeata*, Aracaceae) – a promising plant for biodiesel production. *Australian Journal of Botany*, 59:149-155. 2011.
- 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.
- ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. Cerrado: espécies vegetais úteis. Planaltina: Embrapa - CPAC, 464p. 1998.
- ANDRADE, M. W.; LUZ, J. M. Q.; LACERDA, A. S. Micropropagação da aroeira. 2000.
- ANDRADE, P. S. A. Propagação clonal da palmeira macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lood. ex Mart.) via embriogênese somática e estimativas de parâmetros genéticos. Tese. Viçosa, MG. 2014.
- ARDANOV. P.; SESSITSCH, A.; HAGGMAN, H.; KOZYROVSKA, N.; PIRTTILÄ A. M. Methylobacterium-induced Endophyte Community Changes Correspond with Protection of Plants against Pathogen Attack. *Plos One*, 7: 1-8 (e46802), 2012.
- 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.
- BARROS, I.A.; ARAÚJO. W.L.; AZEVEDO, J. L. The effect of different growth regimes on the endophytic bacterial communities of the fern, *Dicksonia sellowiana* hook (Dicksoniaceae). *Brazilian Journal of Microbiology*, 41:956-965. 2010
- BOSCHIERO, B.N.; MARIANO, E.; AZEVEDO, R.A.; TRIVELIN, P.C.O. Influence of nitrate-ammonium ratio on the growth, nutrition, and metabolism of sugarcane. *Plant Physiology and Biochemistry*, 139:246-255. 2019.
- BUFFARD-MOREL, J.; VERDEIL J. L.; PANNETIER, C. Embryogenese somatique du cocotier (*Cocos nucifera* L) a partir de explantes foliaires: estudos histológicos *Pode. J. Botany*, 70:735 – 741. 1992.
- CARDOSO, A.; LAVIOLA, B.G.; SANTOS, G.S.; SOUSA, H.U.; OLIVEIRA, H.B.; VERAS, L.C.; CIANNELLA, R.; FAVAROA, S.P. Opportunities and challenges for sustainable production of *A. aculeata* through agroforestry systems. *Industrial Crops & Products*, 107:573–580. 2017.
- 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.

CHAPMAN, A.; BLERVACQ, A.-S.; HENDRICKS, T.; SLOMIANNY, C.; VASSEUR, J.; HILBERT, J.-L. Cell wall differentiation during early somatic embryogenesis in plants. II. Ultrastructural study and pectin immunolocalization on chicory embryos. *Canadian Journal of Botany*. 78:824-831. 2000.

CHU, C.C.; WANG, C.C.; SUN, C.S.; HSU, C.; YIN, K.C.; CHU, C.Y. Establishment of an efficient medium for another culture of rice through comparative experiments on the nitrogen source. *Scientia Sinica* 16: 659-668. 1975.

COMPANT, S.; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growthpromoting bacteria in the rhizo and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 42: 669-678. 2010.

COMPANT, S.; MITTER, B.; COLLI-MULL, J.G.; GANGL, H.; SESSITSCH, A. Endophytes of Grapevine flowers, berries, and seeds: identification of cultivable bacteria, comparison with other plant parts, and visualization of niches of colonization. *Microbial Ecology* 62: 188-197. 2011.

CORELLA, D. L. B. Pré-melhoramento da palmeira macaúba: caracterização fenotípica e diversidade genética de acessos conservados em banco de germoplasma. 2022. 192 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2022.

CORREA, F.S.; JUEN, L.; RODRIGUES, L.C.; SILVA-FILHO, H.F.; SANTOS-COSTA, M.C. Effects of oil palm plantations on anuran diversity in the eastern Amazon. *Animal Biology*, 65(3):321–35. 2015.

COSER, S. M. Breeding *Acrocomia aculeata* for vegetative, phenological, reproductive and productive traits. 2016. 53 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento): Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2016.

COSTA, F. H. S. D. A.; JONNY EVERSON, S. P.; PEREIRA, M. A. A. A.; OLIVEIRA, J. P. Efeito Da Interação Entre Carvão Ativado E N 6 -Benzilaminopurina Na Propagação in vitro De Bananeira, Cv. Grand Naine (Aaa) 1 Interaction Effect Between Activated Charcoal and N 6 -Benzylaminopurine in the in vitro Propagation of Banana, Cultivar Grand N. *Rev Bras Frutic* 280–283. 2006.

DAVITT, A.J.; CHEN, C.; RUDGERS, J.A. Understanding context-dependency in plant-microbe symbiosis: The influence of abiotic and biotic contexts on host fitness and the rate of symbiont transmission. *Environmental and Experimental Botany* 71: 137-145. 2011.

DODEMAN, V. L.; DUCREUX, G.; KREIS, M. Zigotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *Journal of Experimental Botany*, 48:1493-1509. 1997.

DUTRA, L.F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G.E. A micropropagação de eucalipto. *Pesquisa Florestal Brasileira* 58: 49-59. 2009.

ESPOSITO-POLESI, N. P. Contaminação versus manifestação endofítica: implicações no cultivo in vitro de plantas. *Rodriguesia*, 71:1-15, 2020.

- 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 (3): 244-246. 2005.
- EL-DIN, Z.; AMAL, F.M.; ABDEL-RASOUL, M.; IBRAHIM, I.S.; ALY, A.S.; SHARAF ELDEEN, H.A.M. Micropropagation of some date palm cultivars: changes constituents relates to embryogenesis. *Acta Horti*. 736, 233-241. 2007.
- FEDER, N.; O'BRIEN, T.P. Plant microtechnique: some principles and new methods. *American Journal of Botany* 55: 123-142. 1968.
- FERNANDO, S.C.; VERDEIL, J.L.; HOCHER, V.; WEERAKOON, L.K.; HIRIMBUREGAMA, K. Histological analysis of plant regeneration from plumule explants of *Cocos nucifera*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 72:281–284. 2003.
- GAGNE-BOURGUE, F.; ALIFERIS, K.A.; SEGUIN, P.; RANI, M.; SAMSON, R. JABAJI, S. Isolation and characterization of indigenous endophytic bacteria associated with leaves of switchgrass (*Panicum virgatum* L.) cultivars. *Journal of Applied Microbiology* 114: 836-853. 2013.
- GAMBORG, O.; MILLER, R.; OJIMA, K. Nutrient requirement suspensions cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Reserach*, 50(1): 151-158. 1968.
- GOMES, H.T.; BARTOS, P.M.C.; SCHERWINSKI-PEREIRA; J.E. Dynamics of morphological and anatomical changes in leaf tissues of an interspecific hybrid of oil palm during acquisition and development of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 131: 269–282. 2017.
- GOMES, H.T.; BARTOS, P.M.C.; SILVA, C.O.; DO AMARAL, LIV.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. Comparative biochemical profiling during the stages of acquisition and development of somatic embryogenesis in African oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Plant Growth Regulation*, 74(2):199–208. 2014.
- GRANJA, M.M.C. Obtenção e manutenção de linhagens embriogênicas in vitro a partir de embriões zigóticos em famílias de *Acrocomia aculeata*. Tese. Viçosa MG. 2014.
- GRANJA, M.M.C.; MOTOIKE, S, Y; ANDRADE, A. P. S.; CORREA, T. R.; PICOLI, E. A. T.; KUKI, K. N. Explant origin and culture media factors drive the somatic embryogenesis response in *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart., an emerging oil crop in the tropics. *Industrial crops and products*, 117:1-12. 2018.
- GASPAR, T.; KEVERS, C.; PENEL, C.; GREPPIN, H.; REID, D.M.; THORPE, T.A. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*(December), 272--289. 1996.
- GUEDES, R.S. Embriogênese somática e regeneração de plantas de dendezeiro. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Acre, Rio Branco. 126p. 2008.

- GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. Embriogênese Somática e Sementes Sintéticas. In: TORRES AC, CALDAS LS, BUSO JA. (eds.) Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas. Brasília, Embrapa-CBAB. 2:533-568. 1999.
- GUEYE, B.; MORCILLO, F.; COLLIN, M.; GARGANI, D.; OVERVOORDE, P.; ABERLENCBERTOSI, F.; TRANBARGER, T.J.; SANE, D.; TREGGAR, J.W.; BORGEL, A.; VERDEIL, J. Acquisition of callogenic capacity in date palm leaf tissues in response to 2,4-D treatment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 99(1): 35- 45. 2009.
- HARDOIM, P.R.; VAN OVERBEEK, L.S.; VAN ELSAS, J.D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology*, 16: 463-471. 2008.
- HENDERSON, A.; GALEANO, G.; BERNAL, R. Field Guide to the Palms of the Americas. New Jersey: Princeton University, 166-167p. 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.
- HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water culture method for growing plants without soil. *Cal Agric. Exp. Stas. Cir.* 1950. 32p.
- ISLAM, S.M.A.; MATH, R.K.; KIM, J.M.; YUN, M.G.; CHO, J.J.; KIM, E.J.; LEE, Y.H.; YUN, H.D. Effect of plant age on endophytic bacterial diversity of balloon flower (*Platycodon grandiflorum*) root and their antimicrobial activities. *Current Microbiology* 61: 346-356. 2010.
- JIMÉNEZ, V. M.; GUEVARA, E.; HERRERA, J.; BANGERTH, F. Evolution of endogenous hormone concentration in embryogenic cultures of carrot during early expression of somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*, 23(8):567–572. 2005.
- 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*. McGraw-Hill, New York, NY, USA. 1940.
- KERBAUY, G.B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Org.). *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. 1ªed. Brasília: Serviço de Produção de Informação-SPI (Embrapa), 2: 519-531. 1999.
- 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.

LOPES, A. D. S.; PACHECO, T. G.; NIMZ, T. The complete plastome of macaw palm [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex-Mart.] and extensive molecular analyses of the evolution of plastid genes in Arecaceae. *Planta*, 247: 1011–1030. 2018.

LORENZI, G. M. A. C. *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. - Arecaceae: Bases Para o Extrativismo Sustentável. 2006. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2006.

LORENZI, H.; NOBLICK, L.; KAHN, F.; FERREIRA, E. *Flora Brasileira: Arecaceae: Palmeiras*. Nova Odessa: Plantarum, 384p. 2010.

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

LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. An improved protocol for somatic embryogenesis and plant regeneration in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from mature zygotic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Published online, may. 2014.

MACIEL, S. A.; FERMINO JUNIOR, P. C. P.; DA SILVA, R. A.; SCHERWINSKI- from immature zygotic embryo of peach palm during somatic embryogenesis. *Acta Scientiarum Agronomy*, 32:263-267. 2010.

MARSCHNER, Horst. *Marschner's mineral nutrition of higher plants*. Academic press, 1995. 889 p.

MCCULLY, M. E. Niches for bacterial endophytes in crop plants: a plant biologist's view. *Functional Plant Biology* 28: 983-990. 2001.

MEIRA, F. S. Embriogênese somática em macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.) a partir de tecidos foliares de plantas adultas. Tese. Brasília, DF. 2015.

MEIRA, F. S.; LUIS, Z. G.; CARDOSO, I. A. S.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Somatic embryogenesis from leaf tissues of macaw palm [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.]. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 92(3):1-16. 2020.

MOTOIKE, S.; KUKI, K. The potential of macaw palm (*Acrocomia aculeata*) as source of biodiesel in Brazil. *International Review of Chemical Engineering* 1: 632-635. 2009.

MOTOIKE, S.Y.; CARVALHO, M.C.; PIMENTEL, L.D.; KUKI, K.N.; PAES, J.M.V.; DIAS, H.C.T.; SATO, A.Y. *A cultura da macaúba: implantação e manejo de cultivos racionais*. Editora UFV, Viçosa-MG. 2013. 61 p.

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.

NORTH, J. J.; NDAKIDEMI, P. A.; LAUBSCHER, C. P. Effects of antioxidants, plant growth regulators and wounding on phenolic compound excretion during micropropagation of *Strelitzia reginae*. *Int J Phys Sci*. 2012.

O'BRIEN, T.P.; FEDER, N.; MCCULLY, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59: 368-373. 1964.

PEDROSO, M. C. E PAIS, M. S. Factors controlling somatic embryogenesis. Cell wall changes as an in vivo marker of embryogenic competence. *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture*.43: 147-154. 1995.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microrganismos endofíticos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, Brasília, 29:70-84. 2003.

PÉREZ-NÚÑEZ, M. T.; SOUZA, R; SÁENZ, L. Detection of a SERK-like gene in coconut and analysis of its expression during the formation of embryogenic callus and somatic embryos. *Plant Cell Rep* 28:11–19. 2009.

PICCOLO, S.L.; FERRARO, V.; ALFONZO, A.; SETTANNI, L.; ERCOLINI, D.; BURRUANO, S.; MOSCHETTI, G. Presence of endophytic bacteria in *Vitis vinifera* leaves as detected by fluorescence in situ hybridization. *Annals of Microbiology* 60: 161-167. 2010.

PIMENTEL, L. D. Mineral nutrition macaw palm: basis for fertilization and cultivation. 2012. 126 f. Tese (Doutorado em Plantas daninhas, Alelopatia, Herbicidas e Resíduos; Fisiologia de culturas; Manejo pós-colheita de) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.

PIRES, T. P.; SOUZA, E. S.; KUKI, K. N.; MOTOIKE, S.Y. Ecophysiological traits of macaw palm: A contribution towards the domestication of a novel oil crop. *Industrial Crops and Products*, 44:200-210. 2013.

QIN, S.; XING, K.; JIANG, J.H.; XU, L.H.; LI, W.J. Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 89: 457-473. 2011.

ROSE, R.J. Genetic reprogramming of plant cells in vitro via dedifferentiation or preexisting stem cells. In: Rose, R.J. (Ed.), *Molecular Cell Biology of the Growth and Differentiation of Plant Cells*. CRC Press, Boca Rato, pp. 320–339. 2016.

ROSE, R.J.; WANG, X.D.; NOLAN, K.E.; ROLFE, B.G. Root meristems in *Medicago truncatula* tissue culture arise from vascular derived procambial-like cells in a process regulated by ethylene. *J. Exp. Bot.* 57:2227–2235. 2006.

- 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.
- SANTNER, A.; CALDERON-VILLALOBOS, L.I.; ESTELLE, M. Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nat Chem Biol*, 5(5), 301-307. 2009.
- SANTOS, R. C. dos. Aspectos nutricionais e resposta da macaúba a adubação com nitrogênio e potássio. 85f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2015.
- SCARIOT, A.; LLERAS, E.; HAY, J. D. Reproductive biology of the palm *Acrocomia aculeata* in Central Brazil. *Biotropica*, 23:12-22. 1991.
- SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; GUEDES, R. S.; FIRMINO JR.; P. C. P.; SILVA, T. L.; COSTA, F. H. S. Somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm using the thin cell layer technique. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 46:378-385. 2010.
- SGHAIER, B.; BAHLOUL, M.; BOUZID, R. G.; DRIRA, N. Development of zygotic and somatic embryos of *Phoenix dactylifera* L. cv. Deglet Nour: Comparative study. *Scientia Horticulturae*. 116: 169-175. 2008.
- 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.
- 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.
- STEINMACHER, D. A.; SAARE-SURMINSKI, K.; LIEBEREI, R. Arabinogalactan proteins and the extracellular matrix surface network during peach palm somatic embryogenesis. *Physiologia Plantarum*. 146:336–349. 2012.
- TOLEDO, C. P. Identificação e controle de microrganismos contaminantes no processo de micropropagação de cana-de-açúcar. 2011. Dissertação. 73p. Piracicaba-ESALQ/USP. 2011.
- VAN WINKLE, S. C.; 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*. 2003.
- VASCONCELOS, J.N.C.; CARDOSO, N.S.N.; OLIVEIRA, L.M.; SANTANA, J.R.F.; FERNANDEZ, L.G.; BELLO KOBLITZ, M.G.; SILVA, M.L.C. Indução, caracterização bioquímica e ultra-estrutural de calos de aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.). *Rev. Bras. Pl. Med.; Botucatu*, 14(4):592-59. 2012.
- VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C. Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids*, 35:753-759. 2008.

VERDEIL, J.L.; HOCHER, V.; HUET, C.; GROSDÉMANGE, F.; ESCOUTE, J.; FERRIERE, N.; NICOLE, M. Ultrastructural changes in coconut calli associated with the acquisition of embryogenic competence. *Annals of Botany*. 88:9-18. 2001.

VILLA, F.; PASQUAL, M.; SOUZA, A.G.; VILELA, X.M.S. Meios de cultura e reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de amoreira-preta. *Scientia Agraria*, 11(2):109- 117. 2010.

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. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf, root and stem-derived callus cultures of *Areca catechu*. *Biologia Plantarum*. 50: 279-282, 2006.

WIJEBANDARA, D. M. D. I.; RANASINGHE, C. S. Response of rapid decline affected coconut (*Cocos nucifera* L.) palms to micronutrients and common salts. *Cocos*, 6:11–21. 2004.

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

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.