

ANTONIA MAIARA MARQUES DO NASCIMENTO

**PROTOCOLO DE INDUÇÃO DA CALOGÊNESE *IN VITRO* A PARTIR DE
FOLÍOLOS IMATUROS DE PLANTAS ADULTAS DE MACAÚBA**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2018

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

T

N244p
2018

Nascimento, Antonia Maiara Marques do, 1995-
Protocolo de indução da calogênese *in vitro* a partir de
folíolos imaturos de plantas adultas de macaúba / Antonia
Maiara Marques do Nascimento. – Viçosa, MG, 2018.
ix, 37 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndices.

Orientador: Sérgio Yoshimitsu Motoike.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Macaúba - Propagação *in vitro*. 2. Macaúba -
Embriologia. 3. Palmeira. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação
em Genética e Melhoramento. II. Título.

CDD 22. ed. 633.8513

ANTONIA MAIARA MARQUES DO NASCIMENTO

PROTOCOLO DE INDUÇÃO DA CALOGÊNESE *IN VITRO* A PARTIR DE FOLÍOLOS IMATUROS DE PLANTAS ADULTAS DE MACAÚBA

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

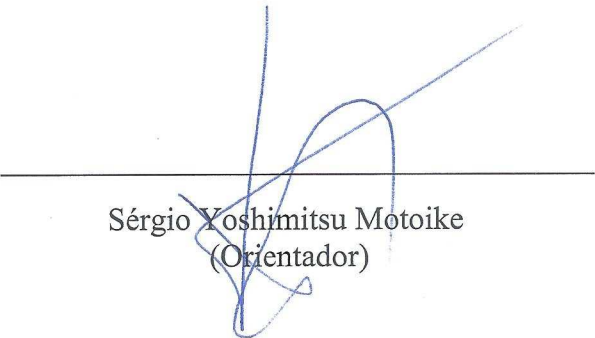
APROVADA: 07 de março de 2018



Rachel Soares Ramos



Renato Dominicano Silva Rosado


Sérgio Yoshimitsu Motoike
(Orientador)

*A Deus por todas as oportunidades e graças concedidas.
Aos meus pais: Raimunda e Manoel.
Aos meus irmãos: Manoel e Marciel, e a minha irmã: Aldiana.
A Rubén.*

Dedico e ofereço

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as graças concedidas, e por todas as oportunidades a mim concedidas, assim como a Nossa Senhora pela intercessão de mãe.

Aos meus pais, Raimunda e Manoel, pela educação e amor que sempre me ofertaram. Eles sempre serão minha motivação. Ao meu tio José, por todo o apoio até hoje me dado.

Posteriormente, agradeço aos meus irmãos: Junior, Aldiana e Marciel, por sempre acreditarem e confiarem nos meus projetos.

A toda minha família, especialmente a: Ribamar, meus tios e tias (Tia Penha, as Marias, e a Francisca), primos e primas (Jôsy, Claudinha, Josevania, Laísa e Larissa), e aos meus avós (Elvira, Anízio e Antônio).

Ao Rubén, pela confiança, paciência, carinho e cumplicidade. Sou imensamente grata por tudo.

Neste sentido de família, fui conhecendo pessoas as quais pude compartilhar momentos tão especiais da vida: Bruna, Joelson, Sammara, Islânia, Priscila, Lu, Naysa, Well, Maira, Josué, Laís, Lucimar, Thays, Riane e Naty. Assim como as que conheci em Viçosa: Ciene, Márcia (e aos seus-meus pais), Fernanda, Thais, Mariana, Cris e Renata.

A Bruna, Joelson, Priscila e Vanessa, por toda a disponibilidade em todos os momentos que precisei.

A Thais e a Mariana, por toda a disponibilidade, companheirismo, amizade e suporte nos trabalhos e na vida.

As minhas companheiras de república: Luciana, Dreice, Marina, Poly, Érika e Camila, Luana e Marty. Vocês foram muito especiais nos meus dias.

A Rachel Ramos por me ajudar a crescer pessoalmente e profissionalmente. Os seus conselhos são válidos por toda a minha vida.

Ao meu orientador Sérgio Yoshimitsu Motoike pela oportunidade de orientar-me, confiança e incentivo na pesquisa e no curso.

Aos coorientadores Edgard Augusto de Toledo Picoli e Cosme Damião Cruz, pela confiança em me coorientar e pela oportunidade de desenvolver parte dos trabalhos nos laboratórios em que são coordenadores.

Ao Renato Rosado, por ser tão prestativo nos momentos em que o procurei e pelas valiosas contribuições na defesa.

A todos os meus companheiros de laboratório e do REMAPE: Geís, Fernando, Romário, Romeres, Francisco, Elaine, Zete, Franciele, Débora, Sebastián, Pedro e Suzy.

A todos os amigos da pós-graduação: Itamar, Maycon, Iana, Alexandre, Bruno, Ivan, Daiana, Raissa, Rafael e Iosody.

À Universidade Federal de Viçosa, e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento pela oportunidade de formação no mestrado.

Aos secretários, Marco Túlio e Odilon, por serem sempre prestativos.

Ao CNPq pela concessão da bolsa e à ACROTECH pelo financiamento do projeto.

Enfim, muito obrigada a cada um de vocês que todos os dias me fizeram crescer: que Deus nos ilumine sempre e que Ele os conceda muito sucesso.

BIOGRAFIA

Antonia Maiara Marques do Nascimento, filha de Manoel Nascimento da Silva e Raimunda Marques Nascimento, nasceu em 12 de julho de 1995, na cidade de Remígio, Paraíba - Brasil.

Em julho de 2016, graduou-se em Licenciatura Plena em Ciências Biológicas pela Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Areia, Paraíba - Brasil.

Em agosto de 2016, iniciou o curso de mestrado em Genética e Melhoramento na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, submetendo-se à defesa de dissertação em 07 de março de 2018.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	2
2.1. Objetivos específicos.....	2
3. REVISÃO DE LITERATURA	2
3.1. A espécie <i>Acrocomia aculeata</i>	2
3.2. Importância econômica	3
3.3. Programa de melhoramento da macaúba na UFV	4
3.4. Propagação <i>in vitro</i> ou micropropagação	5
3.5. Reguladores de crescimento	5
3.6. Embriogênese somática	6
4. MATERIAL E MÉTODOS	8
4.1. Local do experimento e apoio financeiro	8
4.2. Material vegetal	8
4.3. Desinfestação dos explantes	9
4.4. Experimento I.....	9
4.4.1. Meio de cultura	9
4.4.2. Inoculação dos explantes e indução da calogênese	10
4.4.3 Multiplicação dos calos embriogênicos	12
4.5. Experimento II.....	12
4.6. Variáveis analisadas	15
4.7. Anatomia e microscopia de luz	16
5. RESULTADOS	16
5.1. Experimento I.....	16
5.2. Experimento II.....	19
5.3. Multiplicação dos calos	21
5.4. Estudo anatômico dos calos.....	21
6. DISCUSSÃO	23
7. CONCLUSÕES	26

8. AGRADECIMENTOS	26
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
10. APÊNDICES.....	35

RESUMO

NASCIMENTO, Antonia Maiara Marques do, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2018. **Protocolo de indução da calogênese *in vitro* a partir de folíolos imaturos de plantas adultas de macaúba.** Orientador: Sérgio Yoshimitsu Motoike. Coorientadores: Cosme Damião Cruz e Edgard Augusto de Toledo Picoli.

A macaúba (*Acrocomia aculeata*) tem despertado interesse econômico devido ao seu elevado teor de óleo. Entretanto, problemas na propagação desta espécie limitam seu uso em larga escala, sendo necessários estudos que viabilizem a sua produção em escala comercial. Por conseguinte, a micropropagação se apresenta como uma excelente alternativa para esta finalidade. A embriogênese somática é uma ferramenta promissora para esta espécie. Porém, balanços hormonais adequados são requisitos fundamentais para a indução da calogênese. Com isso, este trabalho teve por objetivo estabelecer um protocolo de calogênese *in vitro* a partir de folíolos imaturos de plantas adultas de macaúba. Foram realizados dois experimentos. No primeiro foi avaliada a influência de acessos, meios de cultura e auxinas. No segundo, além da influência dos acessos, também foram avaliadas diferentes vitaminas e concentração de sacarose. Para o primeiro experimento, aos 90 dias após a inoculação, os explantes foram avaliados. Uma amostra dos explantes com calos foi avaliada anatomicamente, sendo os demais transferidos para um meio de multiplicação contendo ou não citocinina. Para o segundo experimento, aos 75 dias após a inoculação, foi realizada a avaliação da resposta dos explantes ao meio de cultivo. Os resultados mostraram que diferentes acessos de *A. aculeata* respondem de forma distinta às mesmas condições de cultivo, para o primeiro experimento. O meio de indução contendo 17,34 mM de nitrogênio acrescido de vitaminas B5 modificadas, 135 μM de Picloram e 20 ou 30 g L⁻¹ de sacarose foi o melhor para a indução de calos em explantes foliares de plantas adultas de macaúba. Para a multiplicação, o meio com citocinina aumentou a proliferação dos calos. Segundo os estudos anatômicos, no primeiro experimento, não houve a formação de calos embriogênicos. Dessa maneira, foi estabelecido o meio de cultura para a calogênese, sendo necessários estudos para confirmar a resposta eficiente do meio independentemente do acesso.

ABSTRACT

NASCIMENTO, Antonia Maiara Marques do, M.Sc., Federal University of Viçosa, March, 2018. **A protocol for *in vitro* callogenesis induction from immature leaflets of adult macaw palm plants.** Advisor: Sérgio Yoshimitsu Motoike. Co-advisors: Cosme Damião Cruz and Edgard Augusto de Toledo Picoli.

Macaw palm (*Acrocomia aculeata*) has awakened great economic interest due to its high oil content. Nevertheless, propagation issues affecting this species impose limitations on its widespread use, being desirable studies focusing on making feasible its production on a commercial scale. In this sense, micropropagation is an excellent alternative. Somatic embryogenesis is a promising tool for this species, but it requires a proper balance of hormones for inducing callogenesis accordingly. Taking this into account, the goal of this study is to establish a protocol for *in vitro* callogenesis induction from immature leaflets of adult macaw palm plants. To this end, two experiments were undertaken. In the first one, the influence of two different genotypes, culture media, and auxins was assessed. In the second one, in addition to the influence of genotypes, several vitamins as well as sucrose concentrations were assessed too. For the first experiment, 90 days after inoculation, the explants' response was evaluated. A sample was chosen, from those explants that generated calli, for being anatomically assessed. The remaining explants were transferred to two different multiplication media, containing or not cytokinin. For the second experiment, 75 days after inoculation, the evaluation of the explants' response to the culture medium was performed. The results showed different responses for the selected genotypes from *A. aculeata* when the same treatment was applied. The best medium for callus' induction, in foliar explants coming from adult macaw palm plants, was the one containing 17.34 mM of nitrogen with modified B5 vitamins, 135 μM of Picloram, and 20 or 30 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of sucrose added on it. Regarding multiplication, the medium with cytokinin increased calli proliferation. As reported by the anatomic study, no embryogenic calli formation appeared in the first experiment. In conclusion, this work established a culture medium for callogenesis induction, even if further studies should be conducted to verify the efficient response of the proposed medium irrespectively of the genotype.

1. INTRODUÇÃO

A macaúba é uma palmeira de extrema importância devido à quantidade e propriedades dos óleos que seus frutos produzem. Isto implica na possibilidade de uso para diversos fins na indústria farmacêutica (LESCANO et al., 2015), alimentar (FAVARO et al., 2018) e de biocombustíveis (VIEIRA et al., 2012).

Esta palmeira tem um sistema de acasalamento misto, com alta taxa de alogamia e sua propagação é dada por sementes (SCARIOT et al., 1991; NUCCI, 2007), ocasionando uma heterogeneidade nos plantios. Com isso, existe a necessidade de obtenção de plantios uniformes sendo a embriogênese somática uma alternativa promissora (MOURA et al., 2009).

Assim, são necessárias pesquisas visando desenvolver protocolos para a embriogênese somática a partir de acessos adultos, e com características agronomicamente superiores. Meira (2015), trabalhando com o palmito de plantas adultas de macaúba, conseguiu induzir embriões, mas não reportaram sucesso com a formação de plântulas. Sendo assim, é necessário estudar todos os fatores que influenciam na indução da embriogênese somática, pois as células necessitam mudar sua rota de desenvolvimento para a formação de um embrião somático iniciando com a formação de calos (FEHÉR, 2015).

Os calos são formados pela desdiferenciação celular. Esta é uma das etapas mais críticas da embriogênese somática, pois as células tem que adquirir uma competência celular para formar os embriões, através de estímulos ambientais e genéticos (FEHÉR, 2015; SHERIF et al., 2018).

Diversos fatores atuam no processo de formação de calos (calogênese). Na macaúba, o genótipo e a idade fisiológica do explante são fatores que exercem grande influência na formação de calos competentes (ANDRADE, 2014). Além disso, o meio de cultura tem de fornecer as condições essenciais para a formação destes, sendo necessárias concentrações balanceadas de macronutrientes e micronutrientes, de reguladores de crescimento e fontes de carbono (BHOJWANI et al., 2013).

Neste sentido, existe a necessidade do desenvolvimento de um meio de cultura específico para a indução da embriogênese somática na macaúba, visando à

propagação clonal de acessos superiores e adultos. Para isto, são necessários estudos que contemplem todos os fatores atuantes na micropropagação desta espécie.

2. OBJETIVO

Desenvolver um protocolo para a indução *in vitro* da calogênese a partir de folíolos imaturos oriundos de plantas adultas de macaúba (*Acrocomia aculeata*).

2.1. Objetivos específicos

- Estabelecer a melhor concentração de nitrogênio no meio de indução para calogênese.
- Verificar os efeitos de diferentes auxinas, assim como selecionar a mais eficiente para a indução de calos.
- Estabelecer as vitaminas que são fundamentais para a indução da calogênese, e estabelecer a melhor concentração de sacarose para a indução da calogênese *in vitro*.
- Avaliar a resposta de diferentes acessos de *A. aculeata* ao meio de cultura de indução da calogênese.
- Definir um meio de cultura para a multiplicação dos calos pré-induzidos.
- Identificar anatomicamente a origem dos calos nos folíolos imaturos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. A espécie *Acrocomia aculeata*

A espécie *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart., conhecida popularmente com macaúba, pertence à família Arecaceae e, recentemente, estudos filogenéticos a incluíram na mesma tribo que o gênero *Elaeis*: a tribo Cocoseae (DE SANTANA LOPES et al., 2018). Oriunda da América Latina, o Brasil é o país com maior área potencial para a produção desta palmeira (PLATH et al., 2016). Dentro do território nacional, a macaúba é também conhecida como macaíba, coco catarro e mocajuba (HIANE et al., 2006) e pode ser encontrada, principalmente, nos estados de Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e São Paulo (AMARAL, 2007).

A *A. aculeata* é uma palmeira que pode atingir alturas entre 10 e 15 metros. Apresenta caule do tipo estipe ereto com diâmetro de 20 a 30 centímetros coberto por bainhas foliares remanescentes que possuem espinhos escuros e afiados em sua superfície (LORENZI, 2004; LORENZI, 2006).

3.2. Importância econômica

Em virtude da grande quantidade de óleo produzida, a macaúba pode ser comparada com a principal cultura produtora de óleo, o dendê (*Elaeis guineensis* Jacq.) (MOTOIKE & KUKI, 2009), o que torna o fruto da macaúba promissor para a indústria de alimentos e seus derivados. O óleo da polpa da macaúba tem uma proporção alta de monoinsaturados, semelhante à oliva (*Olea europaea*) (FAVARO et al., 2018), essencial para a redução do colesterol ruim (LDL). Além disso, os frutos da macaúba também são utilizados na fabricação de bolos, sorvetes e outros produtos comestíveis (CICONINI et al., 2013).

Na indústria farmacêutica, a amêndoa pode ser utilizada por ser rica em óleos nobres (LESCANO et al., 2015). Nunes et al. (2017), estudando o efeito do óleo da amêndoa em ratos diabéticos, concluíram que este pode ser utilizado como fonte de energia, substituindo parcialmente carboidratos em dietas para controlar a diabetes. A macaúba é também rica em carotenoides (SCHEX et al., 2018), que são precursores de vitamina A. Dário et al. (2018), estudaram a atividade fotoprotetora do óleo da macaúba e concluíram que este pode ser utilizado na fabricação de protetores solares.

O fruto produz mais de 50% de ácido oleico (COIMBRA & JORGE, 2011), o que torna o fruto desta espécie promissor para a indústria de biocombustíveis (VIEIRA et al., 2012; AGUIEIRAS et al., 2014; CAVALCANTI-OLIVEIRA et al., 2015).

O endocarpo da macaúba pode ser utilizado como carvão em caldeiras ou até para a produção de carvão ativado (RIOS et al., 2015). Após o processamento, os resíduos dos frutos podem ser geradores de calor (DOURADO et al., 2018). Os frutos após a extração do óleo da polpa e da amêndoa tem alto teor de proteína, permitindo a utilização na alimentação de animais (TRENTINI et al., 2016).

A macaúba possui alta potencialidade para geração de renda. Por este motivo, é uma espécie tradicionalmente submetida ao extrativismo, sendo

amplamente utilizada em âmbito doméstico. A comercialização acontece de forma tímida nas regiões brasileiras (DE CARVALHO LOPES et al., 2013; SILVA & DE ANDRADE, 2014). Com o intuito de facilitar e incentivar o cultivo, a extração, a comercialização, o consumo e a transformação da macaúba, o governo de Minas Gerais regulamentou a Lei n. 19.485/2011 – Pró-Macaúba. A mesma promove a integração das comunidades, incentiva o uso e manejo racional e a transformação da atividade em alternativa para a agricultura familiar e o agronegócio (BRASIL, 2011).

O desenvolvimento de tecnologias para uniformização da cultura no campo é de suma importância para a exploração comercial da macaúba. Por esse motivo, pesquisas com a macaúba na área de seleção de clones e sua propagação têm sido desenvolvidas e descritas. A propagação de genótipos superiores com a mesma identidade genética através de técnicas convencionais é laboriosa, devido à ausência do meristema axilar (MOURA et al., 2009). Além disso, a germinação da semente em condições naturais pode demorar de um a dois anos (LUIS & SCHERWINSKI-PEREIRA, 2014). Assim, as técnicas de cultivo *in vitro* apresentam-se como ferramenta valiosa para a produção de mudas, além de permitir a obtenção de plantas livres de patógenos e acelerar os programas de melhoramento da macaubeira.

3.3. Programa de melhoramento da macaúba na UFV

Em 2005, iniciou-se no Departamento de Fitotecnia (DFT) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), o projeto intitulado por “Domesticação da palmeira Macaúba”, que desenvolve pesquisas para a melhoria no desenvolvimento da macaúba como uma cultura.

Em 2007, estudos sobre propagação permitiram a geração da patente sobre a tecnologia da germinação de sementes e produção de mudas da macaúba (PI 0703180-7 A2- INPI). Neste mesmo ano, Moura (2007) conseguiu induzir a embriogênese somática em macaúba através de embriões zigóticos com a formação de plântulas.

Manfio (2010), visando o melhoramento da macaúba, avaliou geneticamente 145 matrizes de seis estados brasileiros, o qual deu subsídio para a formação do Banco Ativo de Germoplasma da UFV (BAG – UFV (CGEN nº: 084/2013)) em 2011. O BAG apresenta uma diversidade genética que é alvo de diversos estudos fisiológicos (BICALHO, 2011; SANTOS, 2015), moleculares

(MENGISTU, 2015) e de genética e melhoramento (MANFIO, 2010; LANES, 2014; RUEDA, 2014; GRANJA, 2014).

3.4. Propagação *in vitro* ou micropropagação

Os métodos de propagação das plantas são diversos. Existem plantas que se multiplicam sexuadamente, enquanto outras apenas assexuadamente. Na agricultura, as formas de propagação são de extrema importância, pois vão nortear a forma de cultivo de uma dada espécie. Para o cultivo de escala comercial das plantas, o ideal é que estas sejam idênticas geneticamente e que se tenha uniformidade nos plantios, otimizando a produção.

A propagação *in vitro* surge como importante alternativa para espécies que apresentam dificuldades na propagação convencional. Os explantes são as partes das plantas utilizadas para o cultivo *in vitro*, sendo comumente usados como explantes: tecidos embrionários, meristemáticos ou maduros, como os embriões zigóticos e folíolos imaturos (SHAHZAD et al., 2017).

A macaúba é propagada por via seminífera, no entanto, existe heterogeneidade nos plantios. Com isso, são necessárias técnicas que viabilizem a produção de clones em escala comercial (SOARES et al., 2011), tais como a micropropagação.

Várias são as etapas para estabelecer um protocolo eficiente de propagação *in vitro* de uma dada espécie. Inicialmente, devem-se escolher genótipos elites buscando a propagação de plantas superiores, assim como estabelecer todas as condições de cultivo, tais como o meio de cultura e todos os seus constituintes (BHOJWANI et al., 2013; SHAHZAD et al., 2017). Diversos meios de cultura já foram estabelecidos para a propagação de muitas espécies, especialmente os meios MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) e Y3 (EEUWENS, 1976), sendo este último utilizado para palmeiras.

3.5. Reguladores de crescimento

Os reguladores de crescimento ou fitorreguladores são substâncias sintetizadas em laboratórios com efeitos semelhantes aos dos fitormônios. Naturalmente, os fitormônios são sintetizados em pequenas concentrações e em determinadas regiões das plantas, sendo distribuídas para diferentes órgãos, nos quais

exercem suas funções, inibindo ou estimulando processos fisiológicos e/ou bioquímicos vitais (TAIZ & ZEIGER, 2017).

Com auxílio do cultivo *in vitro*, é possível induzir a formação de novos órgãos e tecidos através da adição de reguladores de crescimento ao meio nutritivo. A competência, determinação e diferenciação celular são influenciadas e determinadas normalmente pela presença dos reguladores de crescimento no meio de cultura (FEHÉR, 2015).

Os reguladores mais utilizados na cultura de tecidos são as auxinas e citocininas, cujo balanço nas concentrações controla eficientemente o crescimento e a diferenciação das culturas *in vitro* (SKOOG & MILLER, 1957).

As auxinas promovem divisão, alongamento e diferenciação celular, além de serem responsáveis pela dominância apical (TAIZ & ZEIGER, 2017). Quando em excesso no meio de cultura, a auxina apresenta tanto efeito inibitório quanto favorece a formação de calos. De modo contrário, baixas concentrações favorecem o crescimento normal de embriões (RAGHAVAN & SRIVASTAVA, 1982; PILET & SAUGY, 1987). Já as citocininas além de serem atuantes na divisão celular, também promovem a proliferação celular (GUTIÉRREZ-MORA et al., 2012).

Para obtenção de embriões somáticos, as auxinas são de importância fundamental. O regulador ácido 2,4 - diclorofenoxiacético (2,4-D) é um dos mais utilizados para indução do processo da embriogênese somática (PINTO et al., 2010; PINTO et al., 2011), assim como a auxina Picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropiridina-2-carboxílico), que promove alta indução de calos (PACHECO et al., 2012) e de embriões somáticos (CORREDOIRA et al., 2015).

3.6. Embriogênese somática

A regeneração de plantas por meio de calos embriogênicos pode ser de grande utilidade, especialmente nas espécies de importância econômica ou variedades com características agrônomicas desejáveis (PINTO et al., 2011; ROCHA et al., 2015; ALVES DE FIGUEIREDO CARVALHO et al., 2015; SHAHZAD et al., 2017).

O processo para a embriogênese indireta consiste basicamente de dois ciclos repetitivos característicos: produção de calos e suspensões celulares. Após o explante ser submetido aos tratamentos que induzem competência embriogênica, é necessário

que ocorra a desdiferenciação e posterior rediferenciação celular, através de uma reprogramação genética (WERNER et al., 2012). Os calos formados, quando cultivados em meios de regeneração adequados, podem originar embriões em grandes quantidades. Em muitos casos, os reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura são essenciais no processo de calogênese (ROSA & DORNELAS, 2012).

Além do balanço hormonal, diversos fatores atuam diretamente na indução de calos *in vitro*. Dentre os principais fatores envolvidos neste processo, para a macaúba, o genótipo e a idade fisiológica do material vegetal são os mais importantes (ANDRADE, 2014). Estes fatores estão diretamente associados às respostas fisiológicas geradas a partir do contato com o meio de indução.

Para que os processos de indução e regeneração sejam eficientes é primordial que o meio de cultivo tenha um balanço correto, tanto de reguladores quanto de nutrientes, para que seja capaz de suprir todas as necessidades fisiológicas do explante ao longo do seu crescimento e desenvolvimento (BHOJWANI et al., 2013).

O nitrogênio, podendo ser encontrado nas formas de nitrato, amônio ou aminoácidos, é um dos macronutrientes essenciais no meio de cultura, devido a sua importante função na formação de aminoácidos e proteínas (CAPALDI, 2002).

A fonte de carbono, necessária para as atividades metabólicas das células vegetais, é um fator atuante na micropropagação. A sacarose é a mais utilizada, em concentrações de 2 a 5%, servindo de fonte de energia, além de ser o maior componente osmótico do meio (BHOJWANI et al., 2013).

Devido à produção meristemática da *A. aculeata* ser restrita as regiões apicais, a embriogênese somática é a mais utilizada dentre as técnicas de micropropagação (MOURA et al., 2009; LUIS & SCHERWINSKI-PEREIRA, 2014; GRANJA, 2014; PADILHA et al., 2015). No entanto, os protocolos estabelecidos foram oriundos de embriões zigóticos (MOURA et al., 2009; LUIS & SCHERWINSKI-PEREIRA, 2014; GRANJA, 2014) ou a partir de plantas jovens (MEIRA, 2015).

Todavia, o uso de plantas adultas é mais interessante, pois é possível identificar os melhores acessos em relação à produção de óleo. Dessa forma, depois de estabelecido um protocolo eficiente para a produção de embriões somáticos destes

acessos, provavelmente a produção de clones será maximizada e certamente contribuirá para o aumento significativo na produção de óleo devido à uniformização dos plantios no campo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local do experimento e apoio financeiro

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos e Células Vegetais (LCTCV) do setor de Fruticultura do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV) em Viçosa, Minas Gerais (MG), Brasil, com o auxílio de funcionários cedidos pela ACROTECH. A ACROTECH é a empresa responsável por distribuição de mudas de macaúba no Brasil.

4.2. Material vegetal

Foram utilizados explantes obtidos das ráquis e dos folíolos imaturos de acessos adultos de macaúba do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Universidade Federal de Viçosa. O BAG – UFV localiza-se no município de Araponga/MG (20°40'01" S e 42°31'15" W) – Minas Gerais.

Os folíolos foram extraídos sem a destruição dos acessos adultos. Para isto, retirou-se a maioria das folhas abertas com o auxílio de uma foice. Deixou-se quatro folhas na região basal para permitir o crescimento dos acessos mediante a retirada do palmito. Após isto, foram realizados cortes sucessivos com 10 cm aproximadamente, até a região dos folíolos imaturos (palmito). Posteriormente, cortou-se 35 cm do palmito (mantendo o meristema no acesso) e o embalou em sacos plásticos, sendo transportado ao Laboratório de Cultura de Tecidos e Células Vegetais no setor de Fruticultura da UFV.

Foram selecionados quatro acessos superiores (A01, A02, A06 e A07) baseado no seu potencial produtivo anual, em média (52000 Kg/ha de frutos) (Dado cedido pelo curador do BAG - UFV) (Figura 1).



Figura 1: Material vegetal de *Acrocomia aculeata* utilizado para a indução de calos. **A** – Planta adulta de *A. aculeata* BAG-UFV. **B** – Palmito onde foram retirados os folíolos imaturos para a inoculação. **C** – Folíolos separados para a inoculação. **D** – Explantes foliares em meio de indução de calos.

4.3. Desinfestação dos explantes

O palmito foi levado ao LCTCV – UFV, e em câmara de fluxo laminar, os explantes foram imersos em solução de cloro ativo a 0,5% (v/v) acrescida de Tween 20 a 0,01% (v/v) por dez minutos, posteriormente enxaguados oito vezes em água ultrapura.

4.4. Experimento I

4.4.1. Meio de cultura

Foram utilizados dois meios de indução. O primeiro (MI1) foi baseado nos teores nutricionais (macronutrientes e micronutrientes) encontrados no palmito da macaúba (SANTOS, 2015), tendo como referência a concentração basal do nitrogênio inorgânico (17,34 mM). Já o segundo meio (MI2) foi o Y3 (EEUWENS, 1976) com modificações conforme os macronutrientes do palmito da macaúba (SANTOS, 2015), distribuindo a concentração de 72,92 mM de nitrogênio em inorgânico (NO_3 : NH_4) e orgânico (aminoácidos), conforme Tabela 1.

Tabela 1: Distribuição dos nutrientes utilizados nos meios de cultura.

Composição do meio de	Meio de Indução 1	Meio de Indução 2
-----------------------	-------------------	-------------------

cultura	(17,34 mM de N)	(72,92 mM de N)	
	mM.L ⁻¹	mM.L ⁻¹	
Macronutrientes	NH ₄ NO ₃	400,29	1380,59
	KNO ₃	303,47	1212,33
	MgSO ₄ .7H ₂ O	155,33	463,52
	MgCl ₂ .6H ₂ O	111,79	335,38
	NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	195,03	583,52
	Ca(NO ₃) ₂ .2H ₂ O	354,27	1056,07
	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,93	Y3 (EEUWENS, 1976)*
	Na ₂ EDTA	1,37	
Micronutrientes	ZnSO ₄ .4H ₂ O	0,96	Y3 (EEUWENS, 1976)*
	NiCl ₂ .6H ₂ O	0,024	
	NaMoO ₄ .4H ₂ O	0,24	
	MnSO ₄ .4H ₂ O	0,67	
	KI	8,3	
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,24	
	H ₃ BO ₃	3,1	
	CuSO ₄ .7H ₂ O	0,46	
	Aminoácidos	L-Arginina	
L-Glutamina		20,47	365,41
L-Metionina		31,06	186,50
L-Prolina		47,99	287,80
L-Asparagina		70,12	247,82
Inositol	200	200	
Vitaminas	B5 (GAMBORG et al., 1968)* (2x)	(STABA, 1969)* (2x)	

*Elementos presentes nos meios de cultura propostos por Eeuwens (1976), Gamborg et al. (1968) e Staba (1969), respectivamente.

4.4.2. Inoculação dos explantes e indução da calogênese

Explantes foliares (1x1 cm) desinfestados dos acessos A06 e A07 foram inoculados em dois meios: meio de indução um (MI1) e no meio de indução dois (MI2), distribuído em suas respectivas fontes (Tabela 1), ambos suplementados com 30 g.L⁻¹ de sacarose, 2,5 g.L⁻¹ de carvão ativado e solidificado com 2,5 g.L⁻¹ de Phytigel. Foram utilizadas duas auxinas em cada meio: O ácido diclorofenóxiacético (2,4-D) na concentração de 800 µM, e o Picloram na concentração de 135 µM. Além deles, foi utilizado o tratamento controle, onde não se utilizou nenhuma auxina no meio (Tabela 2).

O pH dos meios foi ajustado para 5,7 ± 0,01, antes da inclusão do agente gelificante e da autoclavagem. Foram vertidos 30 mL do meio de cultura em placas

de Petri (90x15 mm) após a autoclavagem (120°C e 1,5 atm por 15 minutos). Foram inoculados cinco explantes por placa, e posteriormente as placas foram seladas com filme PVC (Rolopac®) e mantidas em sala de crescimento, à temperatura de 27 ± 1 °C na ausência de luz. Semanalmente, foi analisado o aparecimento de contaminações.

Tabela 2: Tratamentos utilizados para a inoculação de folíolos imaturos de *Acrocomia aculeata*.

Experimento I – E1						
	Acessos		Meio		Auxinas	
	A06	A07	MI1	MI2	Sem auxina	800 µM de 2,4-D
T1	x		x		x	
T2	x		x			x
T3	x		x			x
T4	x			x	x	
T5	x			x		x
T6	x			x		x
T7		x	x		x	
T8		x	x			x
T9		x	x			x
T10		x		x	x	
T11		x		x		x
T12		x		x		x

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), em fatorial 2x2x3, totalizando 12 tratamentos (dois acessos, dois meios, auxinas: ausência de auxina, 2,4 D ou Picloram) e 10 repetições para cada um. Foi realizada a análise de variância e a comparação das médias feita pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Para as interações foi realizado o desdobramento de médias. Para a análise destes dados foi utilizado o software R.

A análise de variância foi realizada conforme o modelo a seguir:

$$Y_{i,j,k,m} = \mu + A_i + M_j + X_k + A_iM_j + A_iX_k + M_jX_k + A_iM_jX_k + \varepsilon_{i,j,k,m}$$

Em que:

$Y_{i,j,k,m}$: valor observado no fator resposta correspondendo ao acesso i, meio j, auxina k e repetição m;

μ : média geral;

A_i , M_j e X_k : efeitos dos fatores acesso, meio e auxina, respectivamente;

$A_iM_j + A_iX_k + M_jX_k$: efeitos das interações de primeira ordem entre acesso e meio, acesso e auxina, e meio e auxina;

$A_iM_jX_k$: efeito da interação tripla entre acesso, meio e auxina;

$\varepsilon_{i,j,k,m}$: erro aleatório.

Os dados foram representados em gráficos, gerados a partir do procedimento “Boxplot”, obtendo a média e o erro padrão para cada tratamento utilizando-se o programa computacional GENES (Cruz, 2013).

4.4.3 Multiplicação dos calos embriogênicos

Os calos formados foram inoculados em meio com formulação contendo 17,34 mM de Nitrogênio acrescido de 18 μ M de Picloram, 1000 μ M da poliamina putrescina, contendo ou não a citocinina dimetil-alil-amino-purina (2-iP). Os meios foram suplementados com vitaminas B5 modificado (GAMBORG et al., 1968), 30 g.L⁻¹ de sacarose, 2,5 g.L⁻¹ de carvão ativado e solidificado com 2,5 g.L⁻¹ de Phytigel.

Foram vertidos 30 mL do meio de cultura em placas de Petri (90x15 mm) após a autoclavagem (120°C e 1,5 atm por 15 minutos). Posteriormente, as placas foram seladas com filme PVC (Rolopac®) e mantidas em sala de crescimento, à temperatura de 27 \pm 1 °C na ausência de luz.

Este experimento foi realizado em DIC, contendo dois tratamentos (0 ou 10 μ M de 2-iP), com cinco repetições, sendo cada repetição composta por uma placa de Petri com cinco explantes cada uma. Nesta fase foram realizadas apenas avaliações descritivas quanto a proliferação ou oxidados dos calos.

4.5. Experimento II

Conforme resultado do primeiro experimento, explantes foliares e das ráquis (0,5 x 0,5 cm) de dois acessos foram desinfestados e inoculados no meio MII1, variando as vitaminas utilizadas e as concentrações de sacarose. Os meios foram

acrescidos de 135 μM de Picloram e 2,5 g.L^{-1} de carvão ativado. O tratamento controle foi composto por sais e vitaminas do meio Y3 (EEUWENS, 1976), sem a adição de carvão ativado, e acrescido com 18 μM de Picloram (ANDRADE, 2014) (Tabela 3). Ambos os meios foram solidificados com 2,5 g.L^{-1} de Phytigel.

Tabela 3: Tratamentos utilizados para a inoculação de folíolos imaturos de *Acrocomia aculeata*. **C1** – Controle um; **C2** – Controle dois.

Experimento II – E2								
	Acessos		Vitaminas			Sacarose		
	A01	A02	Sem vitaminas	B5 (GAMBORG et al., 1968)	B5 (GAMBORG et al., 1968) - (2x)	Staba (1969)	20 g.L ⁻¹	
T1	x		x				x	
T2	x		x					x
T3	x			x			x	
T4	x			x				x
T5	x				x		x	
T6	x				x			x
T7	x					x	x	
T8	x					x		x
T9		x	x				x	
T10		x	x					x
T11		x		x			x	
T12		x		x				x
T13		x			x		x	
T14		x			x			x
T15		x				x	x	
T16		x				x		x
C1	x				x			x
C2		x			x			x

O pH dos meios foi ajustado para $5,7 \pm 0,01$, antes da inclusão do agente gelificante e da autoclavagem. Foram vertidos 30 mL do meio de cultura em placas de Petri (90x15 mm) após a autoclavagem (120°C e 1,5 atm por 15 minutos). Foram inoculados cinco explantes por placa, e posteriormente as placas foram seladas com filme PVC (Rolopac®) e mantidas em sala de crescimento, à temperatura de 27 ± 1

°C na ausência de luz. Semanalmente, foi analisado o aparecimento de contaminações.

O delineamento utilizado foi o DIC em fatorial, com 18 tratamentos (dois acessos, quatro tipos de vitaminas, duas concentrações de sacarose, além de mais dois tratamentos controle), tendo 10 repetições cada um. Foi realizada a análise de variância e a comparação das médias feita pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Para as interações foi realizado o desdobramento de médias. Para a análise destes dados foi utilizado o software R.

A análise de variância foi realizada conforme o modelo a seguir:

$$Y_{i,j,k,m} = \mu + A_i + V_j + S_k + A_iV_j + A_iS_k + V_jS_k + A_iV_jS_k + \varepsilon_{i,j,k,m}$$

Em que:

$Y_{i,j,k,m}$: valor observado no fator resposta correspondendo ao acesso i, vitamina j, nível de sacarose k e repetição m;

μ : média geral;

A_i , V e S : efeitos dos fatores acesso, meio e auxina, respectivamente;

$A_iV_j + A_iS_k + V_jS_k$: efeitos das interações de primeira ordem entre acesso e vitamina, vitamina e nível de sacarose, e vitamina e nível de sacarose;

$A_iV_jS_k$: efeito da interação tripla entre acesso, vitamina e nível de sacarose;

$\varepsilon_{i,j,k,m}$: erro aleatório.

Os dados foram representados em gráficos, gerados a partir do procedimento “Boxplot”, obtendo a média e o erro padrão para cada tratamento. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa computacional GENES (Cruz, 2013).

Em função do período de inoculação, apenas os calos obtidos no primeiro experimento foram utilizados na multiplicação.

4.6. Variáveis analisadas

Aos 90 dias após a inoculação no primeiro experimento (E1) foi contabilizado o número de explantes: com calos (EC), expandidos (EE), clorofilados (ECL), oxidados (EO) e não responsivos (ENR). No segundo experimento (E2), após 75 dias da inoculação foi contabilizado apenas o número de EC, EO e ENR, pois as características ECL e EE não apareceram neste experimento.

4.7. Anatomia e microscopia de luz

Amostras de calos nodulares obtidos em cada tratamento da fase de indução foram coletadas para estudo anatômico. No Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa, o material foi fixado em FAA₅₀ (JOHANSEN, 1940) durante 24 horas, e estocadas em álcool etílico 70 %. As amostras fixadas foram então desidratadas em séries etílicas crescentes e, em seguida, pré-infiltradas em etanol 95 % e resina (1:1 v/v) e incluídas em metacrilato (Historesin, Leica) durante cinco dias para serem emblocadas em moldes plásticos. Após isto, estes foram seccionados em cortes transversais e longitudinais com 5µm de espessura, utilizando-se um micrótomo rotativo de avanço automático (modelo RM2265, Leica Microsystems Inc., Deerfield, USA).

Posteriormente, os cortes foram corados com azul de toluidina (O'BRIEN & MCCULLY, 1981) para caracterização estrutural. As observações e fotomicrografias foram realizadas em fotomicroscópio Olympus Provis AX70, equipado com sistema U-photo.

5. RESULTADOS

5.1. Experimento I

Não foi observada contaminação dos folíolos imaturos inoculados com 0,5% (v/v) de cloro ativo. No entanto, quando se inocularam as ráquis sob as mesmas condições de desinfestação, houve total contaminação por bactérias endógenas nos primeiros dias da inoculação (Tabela 4).

Tabela 4: Porcentagem de contaminação de explantes oriundos de folíolos imaturos e das ráquis de plantas adultas de macaúba sob desinfestação com 0,5% (v/v) de cloro ativo.

Explantes	Contaminação (%)
Folíolos imaturos	0
Ráquis	100

Para a variável EC a análise de variância mostrou diferenças significativas em todas as fontes de variação, exceto para AC x AU e ME x AU. Para a variável EO houve diferenças significativas em todas as fontes de variação (Apêndice I).

Aos 30 dias de cultivo evidenciou-se o surgimento de calos nas nervuras dos explantes foliares, enquanto aos 90 dias todos os tratamentos induziram calos (Figura 2), exceto os tratamentos T4, T7 e T10 (Figura 3A). Assim, o meio MI1 foi o melhor para a indução de calos na presença das duas auxinas, e ao contrário, no meio MI2, a calogênese dos explantes foi maior na presença do Picloram (Apêndice II), e neste caso o acesso A06 superior ao A07 (Apêndice III) (Figura 3A).

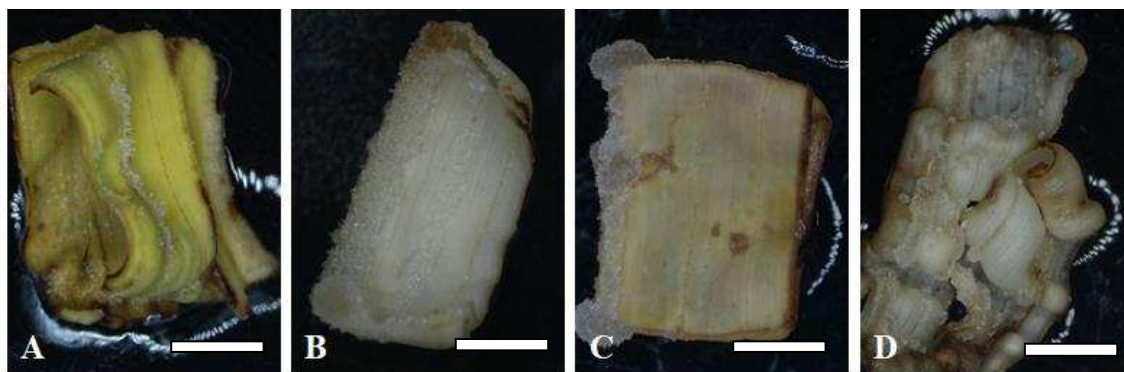


Figura 2: Explantes inoculados a partir de folíolos imaturos do acesso A06 de macaúba. **A**, **B** e **C** – Calos induzidos em meio de indução um (MI1), sem auxina, acrescidos de 135 μ M de Picloram e de 800 μ M de 2,4-D, respectivamente. **D** – Calos induzidos em meio de indução dois (MI2), acrescido de 135 μ M de Picloram. Barras: A-D correspondem a 4 mm.

Notavelmente, no tratamento na ausência de auxinas, houve uma expansão total dos folíolos nos meios MI2 e MI1, para os acessos A06 e A07, respectivamente, apresentando comportamento similar e inverso para os meios MI1 e MI2 para os acessos A06 e A07, respectivamente (Figura 3B).

Explantes clorofilados foram observados em cinco tratamentos, sendo que no tratamento na ausência de auxinas (T1) foi mais evidente a mudança de coloração (Figura 2A, 3C).

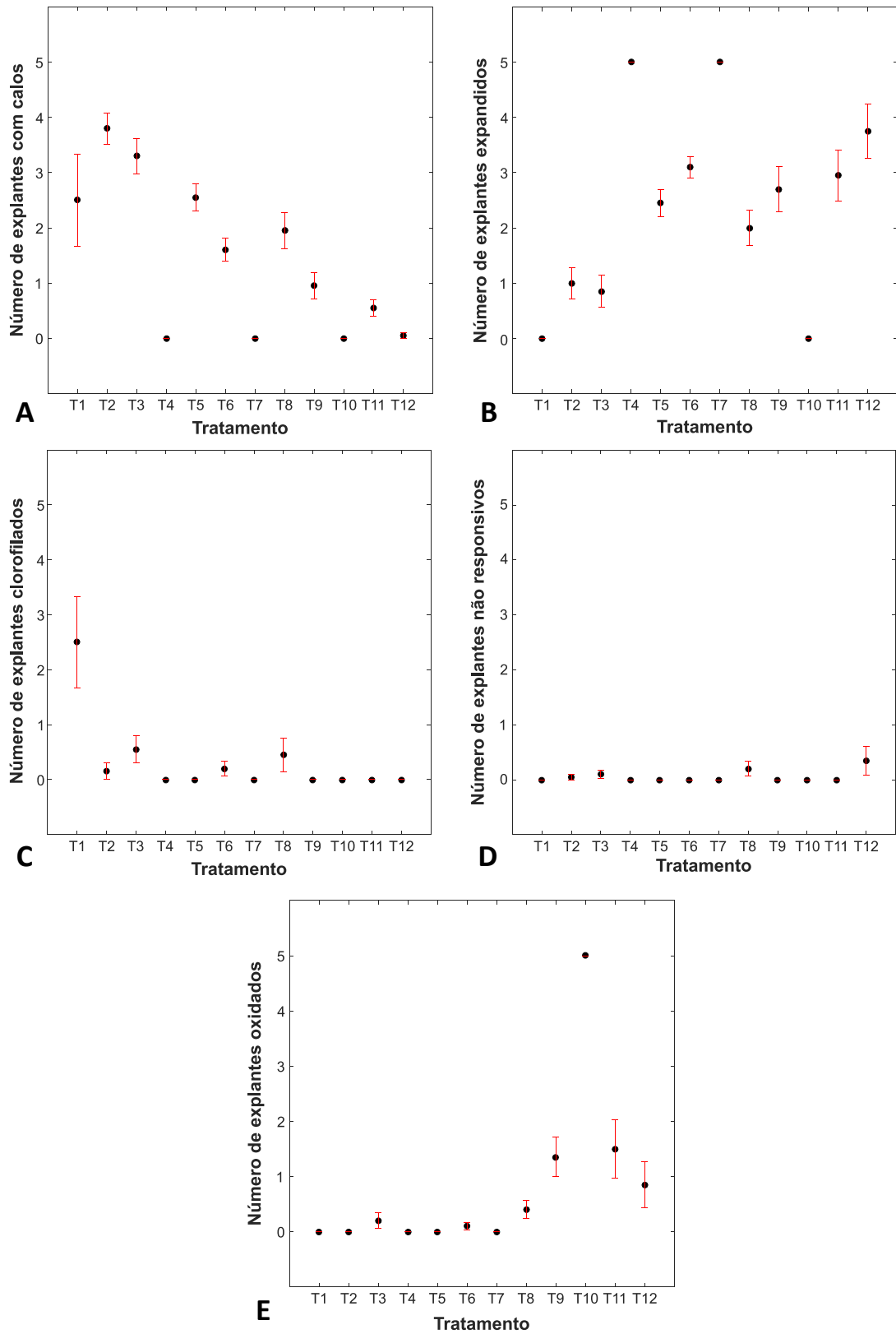


Figura 3: Médias e erro padrão para as variáveis analisadas na inoculação de explantes foliares de *A. aculeata*. Gráficos correspondem a tratamentos utilizando diferentes

acessos, meios e auxinas. **A** – Número de explantes com calos. **B** – Número de explantes expandidos. **C** – Número de explantes clorofilados. **D** – Número de explantes não responsivos. **E** – Número de explantes oxidados. Acessos: A06 – T1 à T6; A07 – T7 à T12. Meios: MI1 – T1 ao T3 e T7 ao T9; MI2 – T4 ao T6 e T10 ao T12. Ausência de auxinas: T1, T4, T7 e T10. Auxinas: 135 μ M de Picloram – T2, T5, T8 e T11; 800 μ M de 2,4-D – T3, T6, T9 e T12.

Nos tratamentos T2, T3, T8 e T12, observou-se a presença de explantes que não apresentaram uma responsividade *in vitro* (Figura 3D).

Como se pode observar na Figura 3E, houve maior oxidação nos explantes oriundos do A07, sendo os tratamentos T9, T10, T11 e T12, os que mais provocaram a oxidação.

5.2. Experimento II

Para a variável EC a análise de variância mostrou diferenças significativas em todas as fontes de variação, exceto para AC e AC x SA. Para a variável EO houve diferenças significativas em todas as fontes de variação. Na variável ENR houve diferenças significativas em todas as fontes de variação, exceto para SA (Apêndice IV).

Aos 15 dias após a inoculação, iniciou-se a proliferação de calos na maioria dos explantes, sendo que aos 75 dias foi observada a formação de calos em todos os tratamentos, exceto nos tratamentos T11, T12 e T16 (Figura 4A). Os melhores tratamentos para a indução de calos foram semelhantes em ambos os acessos (T5, T6, T13 e T14) (Apêndice V). O surgimento de calos foi maior no meio com a vitamina B5 (GAMBORG et al., 1968) modificada, em ambas as concentrações de sacarose (Apêndices VI e VII).

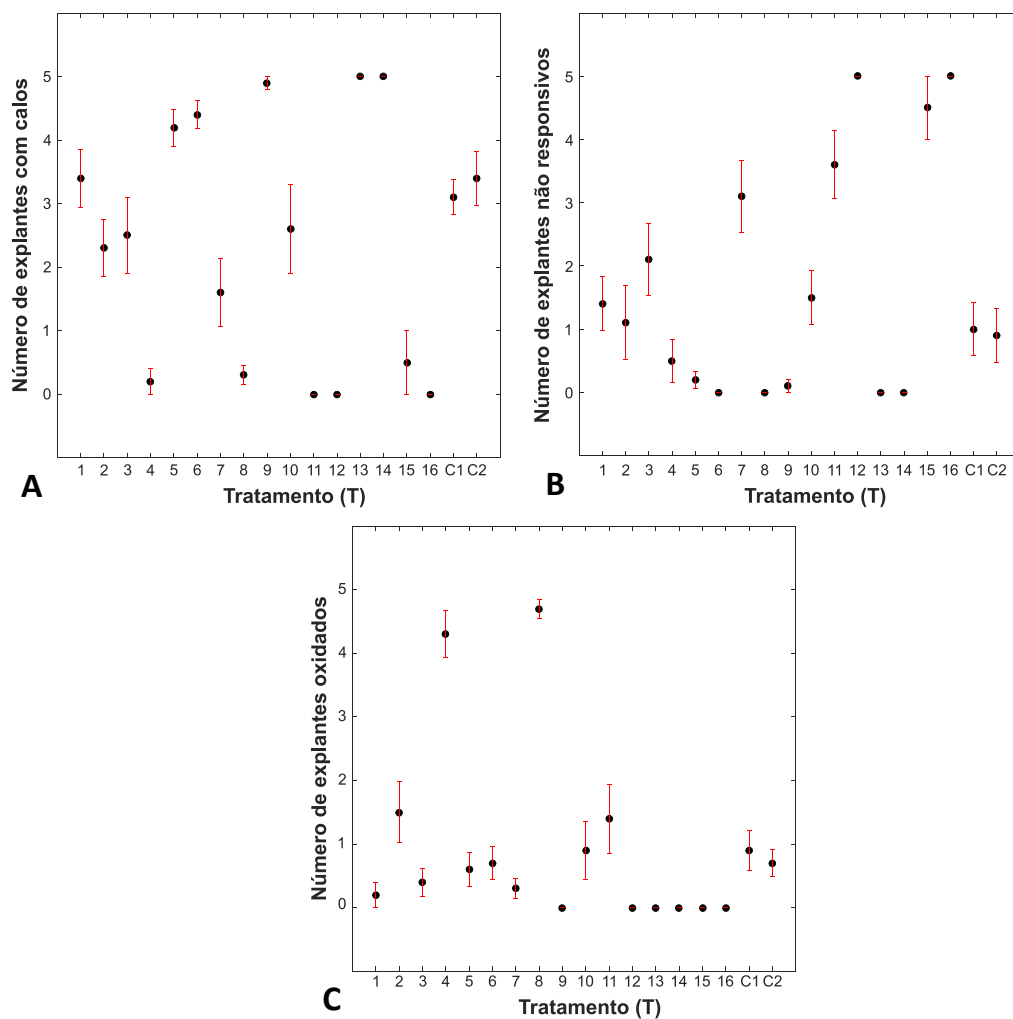


Figura 4: Médias e erro padrão para as variáveis analisadas na inoculação de explantes foliares de *A. aculeata* sob diferentes concentrações de vitaminas e sacarose, sendo avaliado: (A) o número de explantes com calos, (B) o número de explantes não responsivos e (C) o número de explantes oxidados. Acessos: A01 – T1 ao T8 e C1; A02 – T9 ao T16 e C2. Ausência de vitaminas: T1, T2, T9 e T10. Vitaminas: B5 – T3, T4, T11 e T12; B5 (2x) – T5, T6, T13 e T14; Staba – T7, T8, T15 e T16. Sacarose: 20g.l⁻¹ – T1, T3, T5, T7, T9, T11, 13 e T15; 30g.l⁻¹ – T2, T4, T6, T8, T10, T12, T14 e T16.

Em alguns tratamentos (T12, T15 e T16), observou-se explantes que não apresentaram responsividade *in vitro* (Apêndice 5) (Figura 4B). As vitaminas B5 (GAMBORG et al., 1968) e Staba (1969), na concentração original, não induziram resposta *in vitro* nos explantes.

Resultados similares ao primeiro experimento, quanto aos acessos, foram encontrados no segundo experimento, pois as maiores médias de oxidação foram

para o acesso A01, sendo observado nos tratamentos T4 e T8, ambos com 30 g.L⁻¹ de sacarose (Figura 4C).

5.3. Multiplicação dos calos

Observou-se aumento no número de calos com a adição de 2-iP ao meio de cultura. Em contrapartida, no meio sem adição de citocinina não houve multiplicação das massas calogênicas, mas apenas oxidação destas (Figura 5).

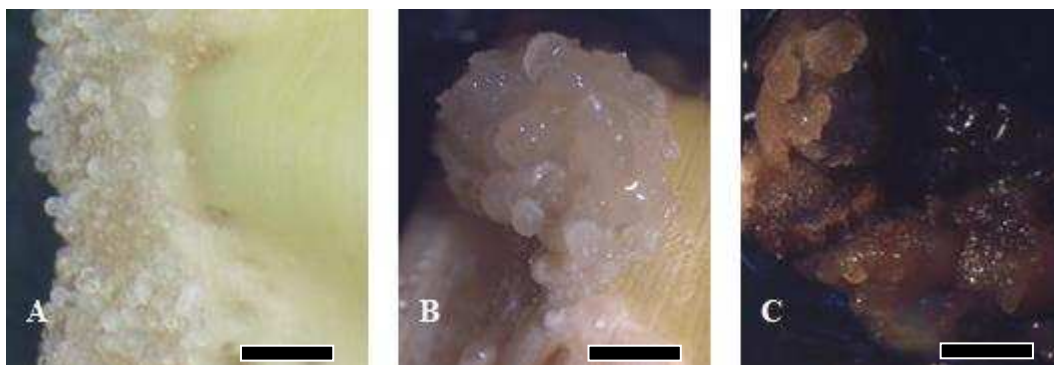


Figura 5: Multiplicação de calos a partir de explantes foliares de macaúba. **A**– Calos em meio de indução aos 90 dias após a inoculação; **B** e **C**– Calos em meio de multiplicação acrescidos ou não de 2-iP, respectivamente, após 30 dias de proliferação. Barras: A-D correspondem a 3 mm.

5.4. Estudo anatômico dos calos

Observou-se que as células calogênicas são bem vacuoladas, oriundas da epiderme e dos feixes vasculares (Figura 6B - E). Observou-se também o rompimento da epiderme em vários locais dos explantes onde os calos surgiram (Figura 6D), além de observou-se uma área de intensa divisão celular (Figura 6C).

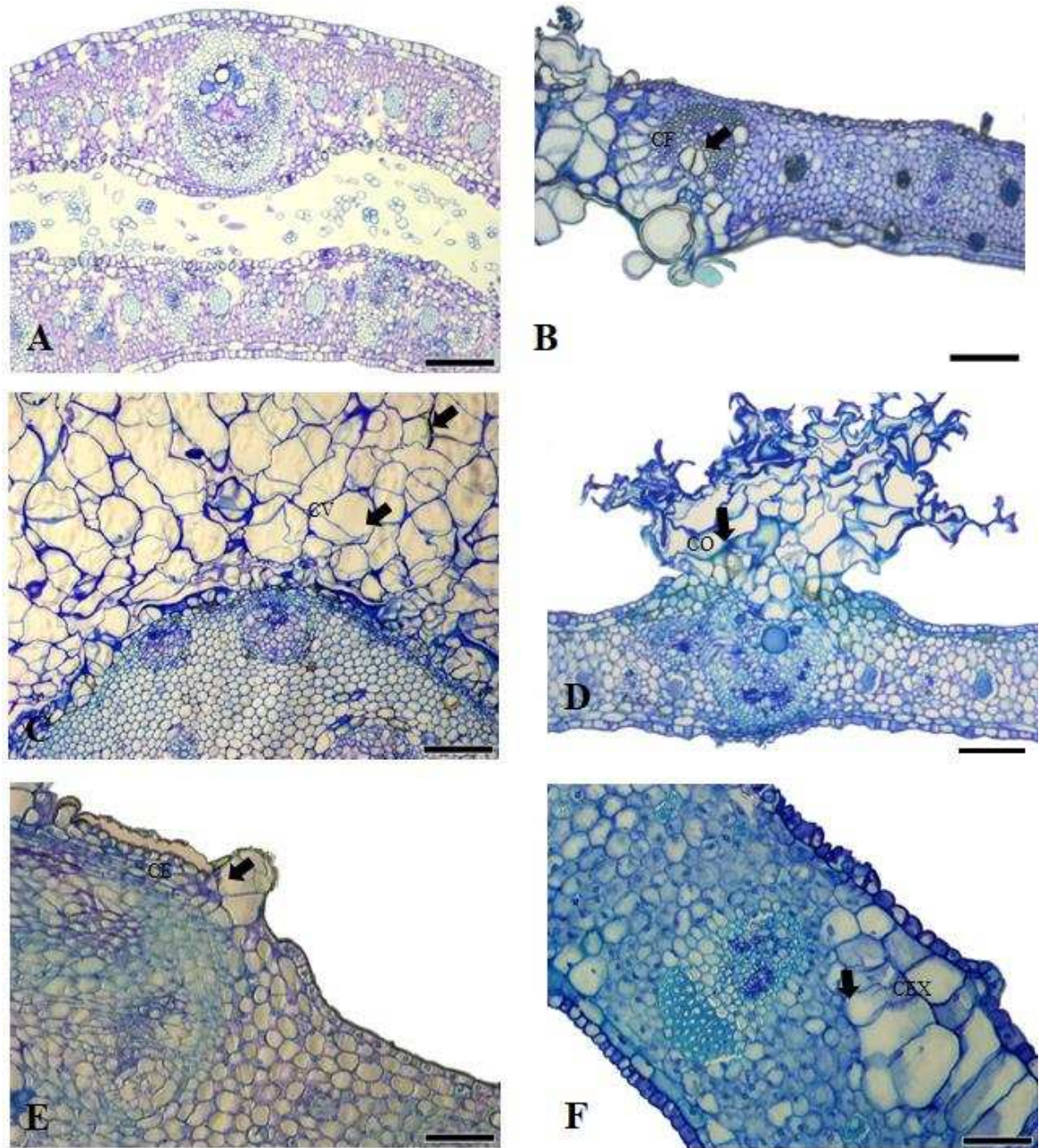


Figura 6: Indução de calos a partir de folíolos imaturos de plantas adultas de *A. aculeata*. **A** – Explante sem formação calogênica (tratamento sem auxina). **B** – Formação de calos a partir dos feixes vasculares (seta indica células do feixe). **C** – Células calogênicas bem vacuoladas originadas a partir da epiderme foliar (seta indica células com vacúolo grande e denso). **D** – Calos contendo compostos fenólicos e colapsados (seta indica células com compostos fenólicos). **E** – Calos originando-se a partir da epiderme foliar (seta indica células da epiderme). **F** – Células do explante em expansão (indicado pela seta). Barras: A-D equivalentes a 120 μm ; E e F equivalentes a 60 μm .

Vale ressaltar que as células calogênicas se dividem várias vezes, no entanto, oxidam pela presença de compostos fenólicos e em seguida, se rompem (Figura 6D). Desta forma, verificou-se que o processo de divisão ocorre, mas não o processo de diferenciação, descaracterizando estruturas embriogênicas.

Foi possível observar também que existem células com estruturas fenolizadas e que não estão em divisão (Figura 6D), além de outras células do explante estarem em expansão (Figura 6F).

6. DISCUSSÃO

Este trabalho é pioneiro no desenvolvimento de um meio específico para a calogênese em macaúba, e esta é uma das etapas mais importantes na indução da embriogênese somática indireta. Isto porque é depois da proliferação e desdiferenciação celular que se consegue a competência embriogênica, com a posterior formação de embriões e regeneração de plantas (FEHÉR, 2015; SHERIF et al., 2018).

O processo de calogênese depende de muitos fatores como a desinfestação, o genótipo da planta, a idade do explante e as condições de cultivo. A micropropagação de plantas adultas de *A. aculeata* exige processos de desinfestação que não danifiquem os folíolos imaturos, e os permita responder às condições de cultivo utilizadas. Metodologias de desinfestação descritas na literatura (CORRÊA et al., 2016; ZANCA et al., 2016), e inicialmente utilizadas nesse estudo, provocaram uma taxa de oxidação elevada, inibindo o processo de calogênese nos explantes. Sendo assim, houve a necessidade de utilizar um protocolo específico para estes explantes nessas condições de cultivo, o que permitiu a indução de calos nos folíolos, utilizando 0,5% (v/v) de cloro ativo.

O nitrogênio é constituinte de aminoácidos, vitaminas, ácidos nucleicos e proteínas, afetando diretamente a proliferação dos calos, sendo que este elemento na forma amoniacal (NH_4^+) influencia o pH do meio (BHOJWANI et al., 2013). O meio de cultura formulado conforme a relação de macronutrientes e micronutrientes do palmito da macaúba (SANTOS, 2015) foi o melhor para a proliferação de calos. No entanto, observou-se uma maior oxidação dos explantes ao aumentar a concentração de nitrogênio no experimento I. Ou seja, para a indução da calogênese em macaúba,

a concentração de 17,34 mM de nitrogênio é favorável, porém altas concentrações deste elemento é contrário à indução de calos.

Embora as vitaminas Staba (1969) tenham mais constituintes que a vitamina B5 (GAMBORG et al., 1968), esta última, na sua concentração aumentada 2x, foi melhor para a indução da calogênese em ambos os experimentos. Constituintes das vitaminas B5, como o ácido nicotínico e a tiamina, tem papéis importantes na calogênese. Já o ácido nicotínico aumenta o processo embriogênico, através da reação de oxirredução (BARWALE et al., 1986), enquanto a tiamina participa da biossíntese de aminoácidos, podendo aumentar o peso dos calos (AL-KHAYRI, 2001).

Ambas as doses de sacarose utilizadas são boas na responsividade dos explantes quanto à formação de calos. Uma concentração menor de sacarose é importante do ponto de vista econômico, já que a produção massal de clones é interessante para empresas que visem à multiplicação clonal desta espécie.

Os acessos em estudo apresentaram respostas *in vitro* diferentes. Andrade (2014) reportou o elevado controle genético existente na calogênese, além de fatores epigenéticos como a metilação do DNA, desacetilação de histonas e ubiquitinação, os quais podem interferir na fase inicial da embriogênese somática (FEHÉR, 2015; WINKELMANN, 2016). Sendo assim, a partir do estabelecimento de um protocolo abrangendo todos os constituintes do meio de cultura, são necessários estudos genéticos que viabilizem a escolha do melhor genótipo associado ao meio de cultura.

Para o acesso A06, no meio contendo 17,34 mM de nitrogênio e sem auxina, foi possível observar a formação de calos nos locais de excisão, o que indica que pode existir um fator de transcrição que induz a proliferação celular no local em que o tecido é injuriado, assim como acontece com o fator de transcrição AP2 / ERF (WIND1) em *Arabidopsis* (IWASE et al., 2011).

As auxinas são consideradas um dos elementos mais importantes na embriogênese somática, por produzirem polaridade celular e divisão assimétrica (GUTIÉRREZ-MORA et al., 2012) com a formação de calos. A concentração da auxina Picloram (135 µM) foi mais eficiente na indução de calos do que o 2,4-D (800 µM).

Meira (2015) utilizando, em macaúba, sais e vitaminas do meio Y3 adicionado de 2,4- D e Picloram na concentração de 450 µM, também observou a

superioridade do Picloram em relação ao 2,4-D na formação de calos. Em contrapartida, Moura et al. (2009), ao testar essas duas auxinas em macaúba, reportaram não haver diferenças entre as auxinas na formação de calos, embora o Picloram fosse mais efetivo na fase de diferenciação dos embriões somáticos.

As citocininas são importantes para a divisão celular, e ao reduzir a concentração de Picloram a 18 μM em combinação com 10 μM de 2-iP, houve um aumento na massa calogênica, isto porque, a combinação de auxinas com citocininas promovem a proliferação celular (GUTIÉRREZ-MORA et al., 2012).

Ao observar células clorofiladas, expandidas e sem responsividade *in vitro*, percebe-se que tratamentos iguais podem afetar de formas distintas o desenvolvimento de células semelhantes, e que necessitam de uma reprogramação genética preliminar (FEHÉR, 2015).

Nos estudos anatômicos observou-se a origem dos calos a partir dos vasos condutores, assim como reportado por Moura (2007) e Meira (2015). Semelhante a resultados encontrados por Pádua et al. (2018), as células calogênicas apresentaram grandes vacúolos e as paredes celulares estavam rompidas, possivelmente devido à apoptose celular.

Nos explantes observaram-se células contendo compostos fenólicos, e estes surgem em resposta ao estresse em que as células são submetidas como forma de proteção do tecido (MANQUIÁN-CERDA et al., 2018).

Diante do exposto, é notável que problemas inerentes à idade fisiológica dos explantes (ANDRADE, 2014), genótipos diferentes e vários constituintes do meio interferem na elaboração de um protocolo eficiente visando à indução da embriogênese somática de macaúba. No entanto, neste trabalho já foram estabelecidos constituintes importantes na indução da calogênese, que é a primeira fase da embriogênese somática *in vitro*.

As pesquisas associadas a esta dissertação ainda está em andamento, a fim de obter um protocolo completo e eficiente para a propagação clonal de plantas adultas de macaúba, estabelecendo o meio de cultura para a indução, maturação e germinação dos embriões somáticos, além da regeneração das plântulas.

7. CONCLUSÕES

Diferentes acessos de *A. aculeata* respondem de forma distinta às mesmas condições de cultivo.

O meio de indução contendo 17,34 mM de nitrogênio acrescido de vitaminas B5 (GAMBORG et al., 1968) modificada 2x (MI) e com 135 µM de Picloram, com 20 ou 30 g.L⁻¹ de sacarose, é o melhor para a indução de calos em explantes foliares de plantas adultas de *A. aculeata*.

O meio MI acrescido com 2-iP e com 18 µM de Picloram favorece a proliferação dos calos previamente induzidos.

Novos investimentos são necessários para o ajuste do meio de cultura com a formação de calos embriogênicos viáveis.

8. AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela concessão da bolsa e à ACROTECH pelo financiamento do projeto.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIEIRAS, E. C. G.; CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D.; DE CASTRO, A. M.; LANGONE, M. A. P.; FREIRE, D. M. G. Biodiesel production from *Acrocomia aculeata* acid oil by (enzyme/enzyme) hydroesterification process: use of vegetable lipase and fermented solid as low-cost biocatalysts. **Fuel**, v. 135, p. 315-321, 2014.

AL-KHAYRI, J. M. Optimization of biotin and thiamine requirements for somatic embryogenesis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 37, n. 4, p. 453-456, 2001.

ALVES DE FIGUEIREDO CARVALHO, M.; PAIVA, R.; HERRERA, R. C.; ALVES, E.; CASTRO, E. M.; DE OLIVEIRA PAIVA, P. D.; VARGAS, D. P. Indução, análises morfológicas e ultraestruturais de calos de maracujazeiro nativo. **Revista Ceres**, v. 62, n. 4, p. 340-346, 2015.

AMARAL, F. P. Estudo das características físico-químicas dos óleos da amêndoa e polpa da macaúba [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart]. 52 p.

Dissertação (Mestrado em Agronomia/Energia na Agricultura) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP. 2007.

ANDRADE, A. P. S. Propagação clonal da palmeira macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.) via embriogênese somática e estimação de parâmetros genéticos relacionados à fase de indução da calogênese *in vitro*. 63 p. **Tese (Doutorado em Fitotecnia)** - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. 2014.

BARWALE, U. B.; KERNS, H. R.; WIDHOLM, J. M. Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis. **Planta**, v. 167, n. 4, p. 473-481, 1986.

BICALHO, E. M. Germinação e mobilização de reservas de sementes de macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Martius). **Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)** - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. 2011.

BHOJWANI, S. S.; DANTU, P. K. Tissue and cell culture. In: **Plant Tissue Culture: An Introductory Text**. Springer, India, 2013. p. 39-50.

BRASIL. Decreto n. 19.485, de 13 de jan. de 2011. **Incentivo ao cultivo, à extração, à comercialização, ao consumo e à transformação da macaúba e das demais palmeiras oleaginosas** - Pró-Macaúba, Brasília, jan. 2011.

CAPALDI, F. R. Avaliação de diferentes fontes de nitrogênio em explantes de *Cryptomeria japonica* D.Don. "elegans" cultivados *in vitro*: análises bioquímicas e relações entre reguladores vegetais. 65 p. **Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais)** - Universidade de São Paulo - ESALQ/USP, Piracicaba-SP. 2002.

CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D.; SILVA, P. R.; ROSA, T. S.; MOURA, N. M. L.; SANTOS, B. C. P.; CARVALHO, D. B.; SOUSA, J. S.; CARVALHINHO, M. T. J. E.; CASTRO, A. M.; FREIRE, D. M. G. Methods to prevent acidification of Macauba (*Acrocomia aculeata*) fruit pulp oil: a promising oil for producing biodiesel. **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 703-707, 2015.

CICONINI, G.; FAVARO, S. P.; ROSCOE, R.; MIRANDA, C. H. B.; TAPETI, C. F.; MIYAHIRA, M. A. M.; BEARARI, L.; GALVANI, F.; BORSATO, A. V.; COLNAGO, L. A.; NAKA, M. H. Biometry and oil contents of *Acrocomia*

aculeata fruits from the Cerrados and Pantanal biomes in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Industrial Crops and Products**, v. 45, p. 208-214, 2013.

COIMBRA, M. C.; JORGE, N. Characterization of the pulp and kernel oils from *Syagrus oleracea*, *Syagrus romanzoffiana*, and *Acrocomia aculeata*. **Journal of food science**, v. 76, n. 8, 2011.

CORRÊA, T. R.; MOTOIKE, S. Y.; ANDRADE, A. P. S.; COSER, S. M.; QUEIROZ, V.; GRANJA, M. M. C.; CAETANO, D. D. N.; PEÑA, C. N. M.; PICOLI, E. A. T. Accelerated *in vitro* propagation of elite oil palm genotypes (*Elaeis guineensis* Jacq.) by substituting cytokinin with putrescine. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 50, p. 2767-2775, 2016.

CORREDOIRA, E.; BALLESTER, A.; IBARRA, M.; VIEITEZ, A. M. Induction of somatic embryogenesis in explants of shoot cultures established from adult *Eucalyptus globulus* and *E. saligna* × *E. maidenii* trees. **Tree physiology**, v. 35, n. 6, p. 678-690, 2015.

CRUZ, C. D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 35, n. 3, p. 271-276, 2013.

DARIO, M. F.; OLIVEIRA, F. F.; MARINS, D. S. S.; BABY, A. R.; VELASCO, M. V. R.; LÖBENBERG, R.; BOU-CHACRA, N. A. Synergistic photoprotective activity of nanocarrier containing oil of *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. Ex. Martius—Arecaceae. **Industrial Crops and Products**, v. 112, p. 305-312, 2018.

DE CARVALHO LOPES, D.; NETO, A. J. S.; MENDES, A. A.; PEREIRA, D. T. V. Economic feasibility of biodiesel production from Macauba in Brazil. **Energy Economics**, v. 40, p. 819-824, 2013.

DE SANTANA LOPES, A.; PACHECO, T. G.; NIMZ, T.; DO NASCIMENTO VIEIRA, L.; GUERRA, M. P.; NODARI, R. O.; DE SOUZA, E. M.; DE OLIVEIRA PEDROSA, F.; ROGALSKI, M. 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**, p. 1-20, 2018.

DOURADO, D. C.; RABELO, G. F.; SCHIRMER, W. N.; STROPARO, E. C.; BARSI, F. V.; NETO, P. C. Determinação do poder calorífico e análise elementar do fruto da Macaubeira (*Acrocomia aculeata*). **Revista ESPACIOS**, v. 39, n. 3, p. 14, 2018.

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**, v. 36, n. 1, p. 23-28, 1976.

FAVARO, S. P.; MIRANDA, C. H. B.; MACHADO, F.; SOARES, I. P.; JENSEN, A. T.; MEDEIROS, A. M. M. S. Oleaginous Biomass for Biofuels, Biomaterials, and Chemicals. In: **Biomass and Green Chemistry**. Springer, Cham, 2018. p. 31-68.

FEHÉR, A. Somatic embryogenesis—stress-induced remodeling of plant cell fate. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1849, n. 4, p. 385-402, 2015.

GAMBORG, O. L.; MILLER, R.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental cell research**, v. 50, n. 1, p. 151-158, 1968.

GRANJA, M. M. C. Obtenção e manutenção de linhagens embriogênicas *in vitro* a partir de embriões zigóticos em famílias de *Acrocomia aculeata*. 65p. **Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento)** - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. 2014.

GUTIÉRREZ-MORA, A.; GONZÁLEZ-GUTIÉRREZ, A. G.; RODRÍGUEZ-GARAY, B.; ASCENCIO-CABRAL, A.; LI-WEI, L. Plant somatic embryogenesis: some useful considerations. In: **Embryogenesis**. InTech, 2012.

HIANE, P. A.; BALDASSO, P. A., MARANGONI, S., MACEDO, M. L. R. Chemical and nutritional evaluation of kernels of bocaiúva, *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. **Food Science and Technology**, v. 26, n. 3, p. 683-689, 2006.

IWASE, A.; MITSUDA, N.; KOYAMA, T.; HIRATSU, K.; KOJIMA, M.; ARAI, T.; INOUE, Y.; SEKI, M.; SAKAKIBARA, H.; SUGIMOTO, K.; OHMETAKAGI, M. The AP2/ERF transcription factor WIND1 controls cell dedifferentiation in *Arabidopsis*. **Current Biology**, v. 21, n. 6, p. 508-514, 2011.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. McGraw-Hill Book Company Inc., London, 523p., 1940.

LANES, E. C. M. Variabilidade molecular e sistema de reprodução de macaúba (*Acrocomia aculeata*). 128 p. **Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento)** - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. 2014.

LESCANO, C. H.; IWAMOTO, R. D.; SANJINEZ-ARAGANDOÑA, E. J.; KASSUYA, C. A. L. Diuretic and anti-inflammatory activities of the microencapsulated *Acrocomia aculeata* (*Arecaceae*) oil on Wistar rats. **Journal of medicinal food**, v. 18, n. 6, p. 656-662, 2015.

LORENZI, H.; SOUZA, H. D.; COSTA, J. D. M.; CERQUEIRA, L. D.; FERREIRA, E. **Palmeiras Brasileiras e exóticas cultivadas**, Instituto Plantarum, Nova Odessa, 416p., 2004.

LORENZI, G. M. A. C. *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd ex Marti. – *Arecaceae*: bases para o desenvolvimento sustentável. 166p. **Tese (Doutorado em Agronomia/Produção Vegetal)** - Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR. 2006.

LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. An improved protocol for somatic embryogenesis and plant regeneration in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from mature zygotic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 118, n. 3, p. 485-496, 2014.

MANFIO, C. E. Análise genética no melhoramento da macaúba. 65p. **Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento)** - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. 2010.

MANQUIÁN-CERDA, K.; CRUCES, E.; ESCUDEY, M.; ZÚÑIGA, G.; CALDERÓN, R. Interactive effects of aluminum and cadmium on phenolic compounds, antioxidant enzyme activity and oxidative stress in blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) plantlets cultivated *in vitro*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 150, p. 320-326, 2018.

MEIRA, F. S. Embriogênese somática em Macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.) a partir de tecidos foliares de plantas adultas. 75 p. **Dissertação (Mestrado em Botânica)** - Universidade de Brasília, Brasília. 2015.

MENGISTU, F. G. Cross-species amplification of microsatellite markers and genetic diversity in the macaw palm (*Acrocomia aculeata*). 100 p. **Tese (Doutorado em Fitotecnia)** – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. 2015.

MOTOIKE, S. Y.; KUKI, K. N. The Potential of Macaw Palm (*Acrocomia aculeata*) as Source of Biodiesel in Brazil. **International Review of Chemical Engineering**, v. 1, n. 6, p. 632-635, 2009.

MOURA, E. F. Embriogênese somática em bocaiúva: indução, regeneração e caracterização anatômica. 66p. **Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento)** - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. 2007.

MOURA, E. F.; MOTOIKE, S. Y.; VENTRELLA, M. C.; SÁ, A. Q.; CARVALHO, M.. Somatic embryogenesis in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from zygotic embryos. **Scientia Horticulturae**, v. 119, n. 4, p. 447-454, 2009.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NUCCI, S. M. Desenvolvimento, caracterização e análise da utilidade de marcadores microssatélites em genética de população de macaúba. 84 p. **Dissertação (Mestrado em Genética)** - Instituto Agrônomo, Campinas-SP, 2007.

NUNES, Â. A.; BUCCINI, D. F.; JAQUES, J. A. S.; PORTUGAL, L. C.; GUIMARÃES, R. C. A; FAVARO, S. P.; CALDAS, R. A.; CARVALHO, C. M. E. Effect of *Acrocomia aculeata* Kernel Oil on Adiposity in Type 2 Diabetic Rats. **Plant Foods for Human Nutrition**, p. 1-7, 2017.

O'BRIEN, T. P.; MCCULLY, M. E. **The study of plant structure: principles and selected methods**. Termarcarphy Pty. Ltd., Melbourne, 45p., 1981.

PACHECO, G.; GARCIA, R.; LUGATO, D.; VIANNA, M.; MANSUR, E. Plant regeneration, callus induction and establishment of cell suspension cultures of *Passiflora alata* Curtis. **Scientia Horticulturae**, v. 144, p. 42-47, 2012.

PADILHA, J. H. D.; RIBAS L. L. F.; AMANO, É.; QUORIN, M. Somatic embryogenesis in *Acrocomia aculeata* Jacq.(Lodd.) ex Mart using the thin cell layer technique. **Acta Botanica Brasilica**, v. 29, n. 4, p. 516-523, 2015.

PÁDUA, M. S., SANTOS, R. S., LABORY, C. R. G., STEIN, V. C., MENDONÇA, E. G., ALVES, E., & PAIVA, L. V. Histodifferentiation of oil palm somatic embryo development at low auxin concentration. **Protoplasma**, v. 255, n. 1, p. 285-295, 2018.

PILET, P. E.; SAUGY, M. Effect on root growth of endogenous and applied IAA and ABA: a critical reexamination. **Plant Physiology**, v. 83, n. 1, p. 33-38, 1987.

PINTO, D. L. P.; DE ALMEIDA BARROS, B.; VICCINI, L. F.; DE CAMPOS, J. M. S.; DA SILVA, M. L.; OTONI, W. C. Ploidy stability of somatic embryogenesis-derived *Passiflora cincinnata* Mast. plants as assessed by flow cytometry. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 103, n. 1, p. 71-79, 2010.

PINTO, D. L. P.; DE ALMEIDA, A. M. R.; RÊGO, M. M.; DA SILVA, M. L.; DE OLIVEIRA, E. J.; OTONI, W. C. Somatic embryogenesis from mature zygotic embryos of commercial passionfruit (*Passiflora edulis* Sims) genotypes, **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 107, n. 3, p. 521-530, 2011.

PLATH, M.; MOSER, C.; BAILIS, R.; BRANDT, P.; HIRSCH, H.; KLEIN, A. M.; WALMSLEY, D.; WEHRDEN, H. A novel bioenergy feedstock in Latin America? Cultivation potential of *Acrocomia aculeata* under current and future climate conditions. **Biomass and Bioenergy**, v. 91, p. 186-195, 2016.

RAGHAVAN, V.; SRIVASTAVA, P. S. Embryo culture. In: **Experimental embryology of vascular plants**. (Ed.) Johri, B.M. Springer Verlag, Berlin, 1982. p. 195- 230.

RIOS, R. D. F.; FONSECA, R. M.; CREN, E. C.; ANDRADE, M. H. C.. Adsorção de fenol no carvão ativado produzido a partir do endocarpo do fruto da macaúba. In: **XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, Blucher Chemical Engineering Proceedings, Florianópolis-SC, 2015.

ROCHA, D. I.; MONTE-BELLO, C. C.; DORNELAS, M. C. Alternative induction of de novo shoot organogenesis or somatic embryogenesis from *in vitro* cultures of mature zygotic embryos of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) is

modulated by the ratio between auxin and cytokinin in the medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 120, n. 3, p. 1087-1098, 2015.

ROSA, Y. B. C. J.; DORNELAS, M. C. *In vitro* plant regeneration and de novo differentiation of secretory trichomes in *Passiflora foetida* L. (Passifloraceae). **Plant Cell Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 108, n. 1, p. 91-99, 2012.

RUEDA, R. A. P. Avaliação de germoplasma para o melhoramento e a conservação da macaúba. 58 p. **Tese (Doutorado em Fitotecnia)** - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. 2014.

SANTOS, R. C. Aspectos nutricionais e resposta da macaúba a adubação com nitrogênio e potássio. 95 p. **Tese (Doutorado em Fitotecnia)** - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. 2015.

SCARIOT, A. O.; LLERAS, E.; HAY, J. D. Reproductive biology of the palm *Acrocomia aculeata* in Central Brazil. **Biotropica**, p. 12-22, 1991.

SCHEX, R.; LIEB, V. M.; JIMÉNEZ, V. M.; ESQUIVEL, P.; SCHWEIGGERT, R. M.; CARLE, R.; STEINGASS, C. B. HPLC-DAD-APCI/ESI-MSn analysis of carotenoids and α -tocopherol in Costa Rican *Acrocomia aculeata* fruits of varying maturity stages. **Food Research International**, v. 105, p. 645-653, 2018.

SHAHZAD, A.; SHARMA, S.; PARVEEN, S.; SAEED, T.; SHAHEEN, A.; AKHTAR, R.; YADAV, V.; UPADHYAY, A.; AHMAD, Z. Historical perspective and basic principles of plant tissue culture. In: **Plant Biotechnology: Principles and Applications**. Springer, Singapore, 2017. p. 1-36.

SHERIF, N. A.; BENJAMIN, J. H. F.; KUMAR, T. S.; RAO, M. V. Somatic embryogenesis, acclimatization and genetic homogeneity assessment of regenerated plantlets of *Anoectochilus elatus* Lindl., an endangered terrestrial jewel orchid. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 132, n. 2, p. 303-316, 2018.

SILVA, G. C. R.; DE ANDRADE, M. H. C. Extração dos óleos do fruto da macaúba no norte de Minas Gerais: Rota de processamento e viabilidade econômica. **Revista de Economia Agrícola**, v. 61, n. 1, p. 23-34, 2014.

SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured. **Symp. Soc. Exp. Biol.**, v. 11, p. 118-130, 1957.

SOARES, J. D. R.; RODRIGUES, F. A.; PASQUAL, M.; NUNES, C. F.; ARAUJO, A. G. Germinação de embriões e crescimento inicial *in vitro* de macaúba. **Ciência Rural**, v. 41, n. 5, p. 773-778, 2011.

STABA, E. J. Plant tissue culture as a technique for the phytochemist. **Recent advances in phytochemistry**, v. 2, n. 80, p. 75-105, 1969.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Artmed Editora, Porto Alegre, 888p., 2017.

TRENTINI, C. P.; OLIVEIRA, D. M.; ZANETE, C. M.; SILVA, C. Low-pressure solvent extraction of oil from macaw (*Acrocomia aculeata*) pulp: characterization of oil and defatted meal. **Ciência Rural**, v. 46, n. 4, p. 725-731, 2016.

VIEIRA, S. S.; MAGRIOTIS, Z. M.; SANTOS, N. A. V.; CARDOSO, M. G.; SACZK, A. A. Macaw palm (*Acrocomia aculeata*) cake from biodiesel processing: an efficient and low cost substrate for the adsorption of dyes. **Chemical Engineering Journal**, v. 183, p. 152-161, 2012.

WERNER, E. T.; LIMA, A. B. P.; AMARAL, J. A. T., Expressão gênica na embriogênese somática vegetal. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, n. 14, p. 552-580, 2012.

WINKELMANN, T. Somatic versus zygotic embryogenesis: learning from seeds. In: **In Vitro Embryogenesis in Higher Plants**. Humana Press, New York, NY, 2016. p. 25-46.

ZANCA, S. S.; COSTA, R. C.; NUNEZ, C. V. *In Vitro* Callus Induction of *Duroia Macrophylla* Huber, Chemical Prospection and Biotechnological Potentialities of Its Extracts. **Scientific Pages Bot**, v. 1, n. 1, 2016.

10. APÊNDICES

APÊNDICE I

Resumo da análise de variância para as três variáveis relacionadas ao cultivo *in vitro* de explantes de *Acrocomia aculeata*.

F. V	G. L	QM	
		EC	EO
AC	1	162,00**	79,38**
ME	1	84,50**	18,00**
AU	2	34,64**	8,29**
AC x ME	1	7,22*	20,48**
AC x AU	2	1,89 ^{ns}	9,61**
ME x AU	2	0,02 ^{ns}	26,18**
AC x ME x AU	2	5,86*	24,44**
Resíduo	188	1,31	1,27
Total	199		
Médias		1,60	0,69
C. V (%)		107,07	228,06

**; * significativo a 1% e 5% pelo teste F, respectivamente. ^{ns} - não significativo. AC – Acesso; ME – Meio de cultura; AU – Auxina. EC= Explantes com calos, ENR= explantes não responsivos, EO= explantes oxidados.

APÊNDICE II

Agrupamento de médias para a interação meio de cultura (ME) x auxina (AU).

Interação		Média da variável	
ME	AU	EC	EO
MI1	Sem	1,25b	0,00b
MI1	Picloram	2,88a	0,20b
MI1	2,4-D	2,13a	0,78b
MI2	Sem	0,00c	2,50a
MI2	Picloram	1,55b	0,75b
MI2	2,4-D	0,83b	0,48b

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na vertical constituem grupo estatisticamente homogêneo pelo teste de Scott e Knott a 5% de probabilidade.

APÊNDICE III

Agrupamento de médias para a interação acesso (AC) x meio de cultura (ME).

Interação		Média da variável	
AC	ME	EC	EO
A06	MI1	3,34a	0,08c
A06	MI2	1,66b	0,04c
A07	MI1	1,16b	0,70b
A07	MI2	0,24c	1,94a

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na vertical constituem grupo estatisticamente homogêneo pelo teste de Scott e Knott a 5% de probabilidade.

APÊNDICE IV

Resumo da análise de variância fatorial para as três variáveis relacionadas ao cultivo *in vitro* de explantes de *Acrocomia aculeata*.

F. V	G. L	QM		
		EC	EO	ENR
AC	1	0,51 ^{ns}	67,60 ^{**}	79,81 ^{**}
VI	3	160,71 ^{**}	12,01 ^{**}	86,37 ^{**}
SA	1	33,31 ^{**}	52,90 ^{**}	2,26 ^{ns}
AC x VI	3	11,87 ^{**}	9,32 ^{**}	38,24 ^{**}
AC x SA	1	1,81 ^{ns}	65,03 ^{**}	45,16 ^{**}
VI x SA	3	5,67 ^{**}	7,75 ^{**}	5,96 ^{**}
AC x VI x SA	3	5,57 ^{**}	18,01 ^{**}	5,69 ^{**}
Resíduo	144	1,26	0,71	1,27
Total	159			
Médias		2,31	0,94	1,76
C. V (%)		95,30	175,29	121,12

**; * significativo a 1% e 5% pelo teste F, respectivamente. ^{ns} - não significativo. AC – Acesso; VI - Vitamina; SA – Sacarose. EC= Explantes com calos, ENR= explantes não responsivos, EO= explantes oxidados.

APÊNDICE V

Agrupamento de médias para a interação acesso (AC) x vitamina (VI) x sacarose (SA).

AC	Interação		Média da variável		
	VI	SA	EC	EO	ENR
A01	Sem	20 g.L ⁻¹	3,40b	0,20d	1,40c
A01	Sem	30 g.L ⁻¹	2,30b	1,50b	1,10c
A01	B5(2x)	20 g.L ⁻¹	4,20a	0,60c	0,20d
A01	B5(2x)	30 g.L ⁻¹	4,40a	0,70c	0,00d
A01	Staba	20 g.L ⁻¹	1,60c	0,30d	3,10b
A01	Staba	30 g.L ⁻¹	0,30d	4,70a	0,00d
A01	B5	20 g.L ⁻¹	2,50b	0,40d	2,10c
A01	B5	30 g.L ⁻¹	0,20d	4,30a	0,50d
A02	Sem	20 g.L ⁻¹	4,90a	0,00d	0,10d
A02	Sem	30 g.L ⁻¹	2,60b	0,90c	1,50c
A02	B5(2x)	20 g.L ⁻¹	5,00a	0,00d	0,00d
A02	B5(2x)	30 g.L ⁻¹	5,00a	0,00d	0,00d
A02	Staba	20 g.L ⁻¹	0,50d	0,00d	4,50a
A02	Staba	30 g.L ⁻¹	0,00d	0,00d	5,00a
A02	B5	20 g.L ⁻¹	0,00d	1,40b	3,60b
A02	B5	30 g.L ⁻¹	0,00d	0,00d	5,00a

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na vertical constituem grupo estatisticamente homogêneo pelo teste de Scott e Knott a 5% de probabilidade.

APÊNDICE VI

Agrupamento de médias utilizando como fator dependente as diferentes vitaminas (VI), avaliando as três variáveis de resposta.

Vitaminas	Médias das Variáveis		
	EC	EO	ENR
Sem	3,30b	0,65b	1,03b
B5(2x)	4,65a	0,33b	0,05c
Staba	0,60c	1,25a	3,15a
B5	0,68c	1,53a	2,80a

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na vertical constituem grupo estatisticamente homogêneo pelo teste de Scott e Knott a 5% de probabilidade. EC= Explantes com calos, ENR= explantes não responsivos, EO= explantes oxidados.

APÊNDICE VII

Agrupamento de médias para a interação vitamina (VI) x sacarose (SA).

Interação		Média da variável		
VI	SA	EC	EO	ENR
Sem	20 g.L ⁻¹	4,15a	0,10c	0,75b
Sem	30 g.L ⁻¹	2,45b	1,20b	1,30b
B5(2x)	20 g.L ⁻¹	4,60a	0,30c	0,10c
B5(2x)	30 g.L ⁻¹	4,70a	0,35c	0,00c
Staba	20 g.L ⁻¹	1,05c	0,15c	3,80a
Staba	30 g.L ⁻¹	0,15d	2,35a	2,50a
B5	20 g.L ⁻¹	1,25c	0,90b	2,85a
B5	30 g.L ⁻¹	0,10d	2,15a	2,75a

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na vertical constituem grupo estatisticamente homogêneo pelo teste de Scott e Knott a 5% de probabilidade.