ANA PAULA DE SOUZA ANDRADE

PROPAGAÇÃO CLONAL DA PALMEIRA MACAÚBA (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lood. ex Mart.) VIA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E ESTIMATIVAS DE PARÂMETROS GENÉTICOS

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*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2014

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

T

A553p
2014

Andrade, Ana Paula de Souza, 1982-

Propagação clonal da palmeira macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lood. ex Mart.) via embriogênese somática e estimativas de parâmetros genéticos / Ana Paula de Souza Andrade. – Viçosa, MG, 2014.

x, 50f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Sérgio Yoshimitsu Motoike.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Macaúba - Propagação in vitro. 2. Macaúba - Melhoramento genético. 3. Clonagem. 4. Tecidos vegetais - Cultura e meios de cultura. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Fitotecnia. Programa de Pós-graduação em Fitotecnia. II. Título.

CDD 22. ed. 633.851

ANA PAULA DE SOUZA ANDRADE

PROPAGAÇÃO CLONAL DA PALMEIRA MACAÚBA (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lood. ex Mart.) VIA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E ESTIMATIVAS DE PARÂMETROS GENÉTICOS

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: 15 de dezembro de 2014.

Edgard Augusto Toledo Picoli
(Coorientador)

Marcos Deon Vilela de Resende
(Coorientador)

Ana Cláudia Ferreira da Cruz

Elisa Ferreira Moura Cunha

Prof. Sérgio Yoshimitsu Motoike
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, por todas as graças concedidas e por ter colocado pessoas especiais em minha vida.

À minha família, em especial aos meus pais, pela dedicação, educação e amor. Pelo apoio em todos os momentos de minha vida e incentivo nas horas difíceis, de desânimo e cansaço. Ao meu irmão André Luiz, exemplo pela força e incentivo sempre. Vocês são meu porto seguro, amo vocês!

À Universidade Federal de Viçosa, e ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, pela formação e oportunidade de realização do Curso.

À Petrobras pelo financiamento do projeto e concessão da bolsa de estudos.

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

Aos coorientadores Edgard Augusto de Toledo Picoli e Marcos Deon Vilela de Resende pela disponibilidade e confiança em me coorientar, pela experiência de vida compartilhada, profissionalismo, aconselhamentos, sempre com valiosas sugestões.

À pesquisadora D.Sc. Kacilda Naomi Kuki pelas valiosas contribuições nas correções da tese e inúmeros relatórios enviados à Petrobras.

À pesquisadora D.Sc. Ana Cláudia pela honrosa participação na banca de qualificação e defesa, pelas sugestões que contribuíram para o engrandecimento deste trabalho além da ajuda com os estudos anatômicos e histoquímicos.

Às amigas do Laboratório de Cultura de Tecidos e Células Vegetais (Fruticultura), Thais Correa, Manuela Granja, Débora Durso, Maria Clara Martino, Elaine Rocha e Vanessa Queiroz pelo companheirismo e auxílios prestados. Sem a ajuda de vocês esse trabalho não teria sido concretizado.

Às "amigas irmãs" Tássia Alves, Manuela Granja, Aline Pitol e Thais Correa pela amizade, incentivo, companheirismo, apoio e por sempre ouvirem meus desabafos durante esses anos de caminhada.

Às novas colegas do Laboratório de Anatomia Vegetal, Luana de Jesus Pereira e Lays Nery pela ajuda e disponibilidade nos momentos em que precisei.

Ao técnico Francisco Assis que não mediu esforço para ajudar.

Aos colegas do grupo REMAPE, pela parceria, bons momentos compartilhados e troca de conhecimento.

Ao casal Carlos Nick e Fabiana Souza pela ajuda com as análises dos dados e correções, pelo exemplo de profissionalismo. Obrigada por todo carinho, conversas e conselhos, tão importantes para minha vida profissional e pessoal. Vocês são grandes amigos!

A todos os Professores da Universidade Federal de Viçosa pelo conhecimento adquirido que só contribuíram para minha vida profissional. A palavra mestre, nunca fará justiça aos professores dedicados aos quais sem nominar terão os meus eternos agradecimentos.

Enfim, a todos aqueles que, de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, o meu respeito e gratidão.

Muitíssimo obrigada!

BIOGRAFIA

ANA PAULA DE SOUZA ANDRADE, filha de Adanir Coelho de Andrade e Luiza de Souza Tavares, nasceu em 22 de novembro de 1982, na cidade de Coronel Fabriciano, Minas Gerais.

Em outubro de 2006, graduou-se em Engenharia Florestal pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais.

Em março de 2007, ingressou-se no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, em nível de Mestrado na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, tendo defendido a dissertação em 19 de fevereiro de 2009.

Em agosto de 2010, iniciou o curso de doutorado em Fitotecnia na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, submetendo-se à defesa de tese em 15 de dezembro de 2014.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS vi
LISTA DE TABELAS viii
RESUMO ix
ABSTRACT x
1. Introdução Geral 1
2. Referências Bibliográficas 2

CAPÍTULO 1 5
RESUMO 6
ABSTRACT 7
1. Introdução 8
2. Material e métodos 9
2.1. Material vegetal e obtenção dos explantes 9
2.2. Meio de cultura básico 12
2.3. Indução de calos embriogênicos 12
2.4. Obtenção e multiplicação das linhagens embriogênicas 13
2.5. Regeneração e germinação dos embriões somáticos 13
2.6. Anatomia e histoquímica dos calos e linhagens embriogênicas 14
3. Resultados 14
3.1. Indução de calos embriogênicos 14
3.2. Obtenção e multiplicação das linhagens embriogênicas 17
3.3. Regeneração e germinação dos embriões somáticos 22
4. Discussão 23
5. Conclusões 27
6. Referências Bibliográficas 28

CAPÍTULO 2 34
RESUMO 35
ABSTRACT 36
1. Introdução 37
2. Material e métodos 38
3. Resultados e discussão 40
4. Conclusões 47
5. Referências Bibliográficas 48

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Retirada do palmito de macaúba (*A. aculeata*) (Ensaio 2). **(A)** Retirada da maioria das folhas abertas. **(B)** Corte das folhas que compõem a flecha. **(C-D)** Realização de sucessivos cortes de aproximadamente 10 cm em direção à base da planta até atingir uma região de interesse. **(E)** Folhas internas de coloração clara e aspecto macio, responsivas ao processo de indução de calogênese. **(E-F)** Marcação do ponto e realização do corte do palmito. **(H)** Manutenção da integridade do meristema após realização do corte. **(I)** Acondicionamento do palmito para ser transportado.....11

Figura 2. Indução de calos embriogênicos nodulares (tipo II) a partir de explantes foliares de macaúba após 90 dias de cultivo *in vitro*. **(A-B)** Calo embriogênico caracterizado pela coloração bege e amarelo claro, com aspecto nodular (setas indicam o calo). **(C)** Oxidação completa dos explantes, sem a ocorrência de calo. Secções transversais do calo embriogênico coradas com azul de toluidina **(D-F)**, PAS **(G e H)** e vermelho de rutênio **(I)**. **(D)** Calos embriogênicos nodulares com células coradas de azul em intenso processo de divisão celular (setas indicam camada de células colapsadas delimitando o calo). **(E)** Estrutura globular que por vezes se desprendiam do calo de origem **(F)** Calos originados a partir do tecido parenquimático associado ao feixe vascular da folha (seta branca indica o feixe vascular, seta preta indica formação do calo) com presença de centros meristemáticos. **(G)** Presença de polissacarídeos nas células do parênquima que deram origem aos calos (seta). **(H)** Células colapsadas ricas em polissacarídeos circundando os calos obtidos na fase de indução (setas indicam células colapsadas). **(I)** Evidência da presença de pectina nas células colapsadas (seta). **mc**: centros meristemáticos. Barras: A e C = 4 mm; B = 3 mm; D, E, H e I = 400 µm; F = 200 µm; G = 100 µm.....18

Figura 3. Calos embriogênicos após 100 dias em meio de multiplicação. **(A)** Diferenciação de embriões somáticos em meio acrescido de 9,0 µM de Picloram e 1.000 µM de Putrescina (setas indicam os embriões de coloração branca). **(B)** Secção transversal dos embriões diferenciados evidenciando a formação de massas meristemáticas e consequente invaginação da protoderme (seta indica protoderme). **(C)** Formação de linhagens embriogênicas (setas) em meio acrescido de 18,0 µM de Picloram e 1.000 µM de Putrescina. **(D)** Secção transversal do calo que deu origem às linhagens (setas indicam os embriões globulares). **(E)** Detalhe dos pró-embriões somáticos (setas indicam o espessamento aparente da parede celular). **(F)** Embriões globulares com protoderme definida (seta). **(G)** Calo com aspecto desestruturado após a multiplicação em meio acrescido de 36,0 µM de Picloram e 1.000 µM de Putrescina. Barras: A = 2 mm; B = 150 µm; C = 3 mm; D = 300 µm; E = 50 µm; F = 100 µm; G = 2,5 mm.....20

Figura 4. Análise histoquímica das culturas embriogênicas após 100 dias em meio de multiplicação. Reação positiva para polissacarídeos evidenciada pela coloração rosa **(A-E)**. Reação positiva para pectinas evidenciada pela coloração vermelha **(F-H)**. **(A e F)** Detalhe da protoderme dos embriões diferenciados (setas indicam a presença dos compostos polissacarídicos (A) e pectina (F) na parede das células). **(B)** Secção transversal do calo que deu origem às linhagens (setas indicam células ricas em polissacarídeos). **(C)** Detalhe da presença de grãos de amido em células localizadas próximas a regiões de intensa atividade meristemática. **(D)** Detalhe da parede isolando os pró-embriões. **(E, G e H)** Embrião globular

compondo as linhagens embriogênicas (setas indicam formação de protoderme). **eg**: embrião globular. Barras: A = 40 µm; B = 300 µm; C e D = 70 µm; E, F, G e H = 100 µm.....21

Figura 5. Diferenciação das linhagens embriogênicas em plântulas de macaúba. **(A)** Linhagens embriogênicas após três ciclos de multiplicação em meio de cultura MB acrescido de 18,0 µM de Picloram e 1.000 µM de Putrescina (setas indicam os embriões somáticos globulares compondo as linhagens). **(B e C)** Embriões somáticos regenerados após 60 dias de cultivo em meio MB suplementado com 0,1µM de 2,4-D, 1.000 µM de Putrescina e 3,0 g L^{-1} de carvão ativado (setas indicam os embriões somáticos no estádio torpedo). **(D)** Plântulas obtidas a partir da germinação dos embriões somáticos em meio MB suplementado com 0,54 µM de ANA, 1.000 µM de Putrescina e 3,0 g L^{-1} de carvão ativado. **(E)** Detalhe da plântula completa, com mais de uma haste. Barras: A - C = 2 mm; D e E = 1 cm.....22

CAPÍTULO 2

Figura 1. Resposta morfogênica dos explantes foliares de macaúba (*Acrocomia aculeata*) após 60 dias de cultivo *in vitro*. (A) Calogênese em explante cultivado em meio Y3 acrescido de 18,0 µM de Picloram (setas brancas indicam o calo embriogênico). (B) Explante com bordas e aproximadamente 20 % da superfície oxidados. (C) Explante com bordas e 20 % a 80 % da superfície oxidados. (D) Explante com bordas e mais de 80 % da superfície oxidados. Barras: A = 2 mm; B, C e D = 3 mm.....41

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Genótipos utilizados como doadores de explantes foliares para indução de embriogênese somática em macaúba.....10

Tabela 2. Resumo da análise de variância para indução de calos embriogênicos a partir de explantes foliares de macaúba (*Acrocomia aculeata*), para o número de explantes com a presença de calos embriogênicos nodulares e completamente oxidados após 90 dias de cultivo *in vitro*.....15

Tabela 3. Resposta morfogênica dos explantes foliares de macaúba (*Acrocomia aculeata*) após 90 dias de cultivo *in vitro*. Resultados médios da interação Genótipo x Concentração de Picloram na indução de calos embriogênicos nodulares.....15

Tabela 4. Resposta morfogênica dos explantes foliares de macaúba (*Acrocomia aculeata*) após 90 dias de cultivo *in vitro*. Resultados médios da interação Idade x Concentração de Picloram na indução de calos embriogênicos nodulares.....16

Tabela 5. Resposta morfogênica dos explantes foliares de macaúba (*Acrocomia aculeata*) após 90 dias de cultivo *in vitro*. Resultados médios da interação Genótipo x Concentração de Picloram na indução de explantes completamente oxidados.....16

Tabela 6. Resposta morfogênica dos explantes foliares de macaúba (*Acrocomia aculeata*) após 90 dias de cultivo *in vitro*. Resultados médios da interação Idade x Concentração de Picloram na indução de explantes completamente oxidados.....16

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Estimativas de parâmetros genéticos obtidos da análise de 20 indivíduos de macaúba, após 10 e 60 dias de cultivo *in vitro*, para indução de calos embriogênicos, em relação às características contaminação com bactéria (CBAC) e fungo (CFUN), explantes calejados (CAL) explantes oxidados (OXI).....42

Tabela 2. Ordenamento dos 20 indivíduos de macaúba com base nos valores genotípicos preditos (u + g) e médias fenotípicas para o caráter número de explantes calejados, após 60 dias de cultivo *in vitro*.....44

Tabela 3. Classificação com base na soma de *ranks* de 20 indivíduos de macaúba (*A. aculeata*) em relação à CAL (explantes calejados) e OXI (explantes oxidados), após 60 dias de cultivo *in vitro*.....46

Tabela 4. Grupos de similaridade genética entre 20 indivíduos de macaúba cultivados por 60 dias *in vitro*, estabelecidos pelo método de Tocher, com base na distância euclidiana média.....46

RESUMO

ANDRADE, Ana Paula de Souza, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2014. **Propagação clonal da palmeira macaúba (***Acrocomia aculeata* **(Jacq.) Lood. ex Mart.) via embriogênese somática e estimativas de parâmetros genéticos.** Orientador: Sérgio Yoshimitsu Motoike. Coorientadores: Edgard Augusto Toledo Picoli e Marcos Deon Vilela de Resende.

O presente trabalho teve como objetivos, desenvolver um protocolo de embriogênese somática a partir de folíolos imaturos de macaúba, caracterizar o processo de indução através de estudos anatômicos e histoquímicos, estudar a variabilidade genética entre diferentes acessos da espécie bem como obter informações sobre o controle genético de características relacionadas à calogênese. Para indução da embriogênese somática utilizou-se segmentos foliares obtidos a partir de quatro plantas: duas com dois anos e duas com cinco anos de idade. Os calos foram subcultivados para meios de multiplicação o que possibilitou a formação de linhagens embriogênicas em um dos genótipos testados. As linhagens foram multiplicadas e submetidas à regeneração de embriões somáticos que, mais tarde, foram convertidos em dezenas de plântulas com parte aérea e raiz. Análises histológicas permitiram inferir sobre o padrão meristemático dos calos, e a formação de pró-embriões que deram origem às linhagens embriogênicas. Testes histoquímicos revelaram a presença de compostos polissacarídicos, mais precisamente pectina, substância reconhecidamente indicadora da ocorrência do processo de embriogênese somática. O estudo da variabilidade genética e obtenção das estimativas de parâmetros genéticos das características calogênese e oxidação, entre diferentes indivíduos cultivados *in vitro*, foram obtidos pela metodologia de modelos mistos, procedimento REML (Máxima Verossimilhança Restrita) /BLUP (Melhor Predição Linear não Viesada). Utilizou-se a metodologia de seleção pelo índice de *rank* médio com intuito de identificar indivíduos mais equilibrados quanto às características estudadas. O agrupamento pelo método de Tocher elucidou a formação de três grupos distintos, sendo o grupo mais numeroso composto em sua maioria por indivíduos de acessos procedentes do estado de Minas Gerais.

ABSTRACT

ANDRADE, Ana Paula de Souza, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2014. **Cloning propagation of Macaw Palm (***Acrocomia aculeata* **(Jacq.) Lood. ex Mart.) via somatic embryogenesis and estimation of genetic parameters.** Adviser: Sérgio Yoshimitsu Motoike. Co-Advisers: Edgard Augusto Toledo Picoli and Marcos Deon Vilela de Resende.

The present work had as objectives, to develop a protocol of somatic embryogenesis from immature macaw palm leaves, to characterize the process of induction throughout anatomical and histochemical studies, to study the genetic variability among different accesses of the species as well as to obtain information about genetic control of characteristics related to the callogenesis. To induce the somatic embryogenesis were used leave segments obtained from four plants: two with two years and two with five years. The callus were subcultivated in multiplication mediums, what made possible the formation of embryogenic lines in one of the studied genotypes. The lines were multiplied and submitted to regeneration of somatic embryos, that later, were turned into dozens of plants with fully formed shoot and root. Histological analyses permitted to infer about the meristematic pattern of the callus, and the formation of pro-embryos that gave origin to embryogenic lines. Histochemical tests revealed a presence of polysaccharides compounds, more precisely pectyne, recognized substances as indicators of the somatic embryogenesis process occurrence. The study of the genetic variability and obtaining the estimation of genetic parameters of the callogenesis characteristics and oxidation, among different accesses cultivated *in vitro,* were obtained by the methodology of mix models, procedure REML (Restricted Maximum Likelihood) / BLUP (Best Linear Unbiased Prediction). It was used the methodology of selection by the index average *rank* with the aim of identifying individuals more equilibrated for the studied characteristics. The grouping was done by the Tocher method which elucidated the formation of three different groups, being the biggest group composed by, mostly, individuals coming from the state of Minas Gerais.

1. Introdução Geral

A busca por novas matérias-primas para a produção de energia renovável tem sido atualmente um dos principais focos de estudos no Brasil que, nos últimos anos, se destacou pela implementação de programas de incentivo à produção e uso de biocombustíveis. Apesar de possuir características edafoclimáticas favoráveis à produção de biomassa, a inexistência de matéria-prima em quantidade para a produção sustentável, do ponto de vista econômico e ambiental, inviabiliza a obtenção de uma escala adequada de biodiesel e o bioquerosene.

Existe grande expectativa em relação às espécies oleaginosas perenes, sendo a macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lood. ex Martius), apontada como uma planta de destaque, dada a sua elevada produtividade de óleo (extraído principalmente do mesocarpo dos frutos) e por se tratar de uma espécie tropical nativa com ocorrência em quase todo território brasileiro (Lorenzi, 2006; Motoike et al., 2013), constituindo-se em uma espécie típica do estado de Minas Gerais (Bondar, 1964; Tabai, 1992).

Apesar do reconhecido potencial econômico, a exploração da macaúba ainda ocorre de forma extrativista em populações nativas, fazendo-se necessário à realização de estudos que vislumbram a domesticação da espécie bem como o desenvolvimento de plantios comerciais de clones elite com intuito de maximizar a produção.

A embriogênese somática via cultura de tecidos constitui uma técnica promissora e de grande importância para plantas com dificuldade de serem multiplicadas vegetativamente, pois permite a propagação de plantas elite *in vitro* em larga escala com a utilização de pequeno espaço físico. Graças à totipotência celular vegetal, através de estímulos, as células somáticas são induzidas a formarem embriões somáticos morfologicamente semelhantes ao embrião zigótico e geneticamente idênticos às células que lhe deram origem (Sghaier et al., 2008).

Protocolos regenerativos baseados nesse processo têm sido relatados como promissores para a propagação de palmáceas como o açaí (Ledo et al., 2002), coqueiro (Sáenz et al., 2006; Perera et al., 2009), dendê (Kanchanapoom e Domyoas, 1999; Scherinski-Pereira et al., 2010; Thuzar et al., 2011), "palmeira de betel" (Wang et al., 2006), "palmeira garrafa" (Sarasan et al., 2002), palmeira juçara (Guerra e Handro, 1998; Saldanha et al., 2006), pupunha (Steinmacher et al., 2007a,b) e tamareira (Huong et al., 1999; Eke et al., 2005; Othmani et al., 2009).

Experimentos de embriogênese somática em macaúba se iniciaram com Tabai (1992), com a indução de calogênese a partir de embriões zigóticos, testando as auxinas 2,4-D e

Picloram. Apesar de não ocorrer a formação de embriões somáticos, observou-se que o Picloram foi melhor na indução de calos quando comparado ao 2,4-D.

O primeiro relato de obtenção de embriões somáticos de *A. aculeata* foi feito por Moura et al. (2009), que utilizaram embriões zigóticos e testaram diferentes auxinas: 2,4-D, Picloram, NOA e CPA (9,0 μM) combinadas ou não com 1,0 μM de TDZ. A formação de embriões somáticos foi maior com o uso da auxina Picloram.

Dentre os diferentes fatores que podem influenciar na indução de embriogênese somática (Henry et al., 1994; Fehér et al., 2003; Namasivayam, 2007; Silva et al., 2012), o genótipo do material doador é citado como um dos mais importantes (Brown et al., 1995). Diferenças genéticas existentes dentro de uma mesma espécie podem resultar na variabilidade da competência *in vitro* (Henry et al., 1994).

Compreender os fatores genéticos relacionados ao processo de indução da embriogênese somática pode auxiliar na seleção de genótipos mais responsivos à regeneração *in vitro*.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivos a indução da embriogênese somática, caracterização anatômica e histoquímica dos calos e linhagens embriogênicas formadas, bem como o estudo da variabilidade genética e de informações sobre o controle genético de características relacionadas à fase de indução a partir de explantes foliares de macaúba.

2. Referências Bibliográficas

BONDAR, G. O. **Palmeiras do Brasil**. São Paulo: Instituto de Botânica, n. 2, 1964, 554p.

BROWN D. C. W.; FINSTAD K. I.; WATSON E. M. Somatic embryogenesis in herbaceous dicots. In: ThorpeA. T. (ed) ***In vitro*** **embryogenesis in plants**. Kluwer Academic, Dordrecht, p. 345–415, 1995.

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.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T. P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 74:201-228, 2003.

GUERRA, M. P.; HANDRO W. Somatic embryogenesis and plant regeneration in different organs of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae): Control and structural features. **Journal of Plant Research.** 111: 65–71, 1998.

HENRY, Y.; VAIN, P.; DE BUYSER, J. Genetic analysis of *in vitro* plant tissue culture responses and regeneration capacities. **Euphytica**. 79: 45-58, 1994.

HUONG, L. T. L., BAIOCCO, M., HUY, B. P., MEZZETTI, B., SANTILOCCHI, R., ROSATI, P. Somatic embryogenesis in Canary Island date palm. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 56:1-7, 1999.

KANCHANAPOOM, K., DOMYOAS, P. The origin and development of embryoids in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq) embryo culture. **Science Asia.** 25: 195-202, 1999.

LEDO, A. S., LAMEIRA, O. A., BENBADIS, A. K., MENEZES, I. C., OLIVEIRA, M. S. P., MEDEIROS-FILHO, S. Somatic embryogenesis from zygotic embryos of *Euterpe oleraceae* Mart. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 24: 601-603, 2002.

LORENZI, G. M. A. C. ***Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. – Arecaceae: bases para o extrativismo sustentável.** Curitiba, 2006, 156p. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

MOTOIKE, S. Y.; CARVALHO, M.; 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**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2013, 61p.

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.

NAMASIVAYAM, P. Acquisition of embryogenic competence during somaticembryogenesis. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. 90: 1-8, 2007.

OTHMANI, A.; BAYOUDH, C.; DRIRA, N.; MARRAKCHI, M.; TRIFI, M. Somatic embryogenesis and plant regeneration in date palm *Phoenis dactylifera* L., cv Boufeggous is significantly improved by fine chopping and partial desiccation of embryogenic callus. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. 91: 71-79, 2009.

PERERA, P. I. P.; YAKANDAWALA, D. M. D.; HOCHER, V.; VERDEIL, J-L.; WEERAKOON, L. K. Effect of growth regulators on microspore embryogenesis in coconut anthers. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. 96: 171-180, 2009.

SÁENZ, L., AZPEITIA, A., CHUC-ARMENDARIZ, B., CHAN, J. L., VERDEIL, J. L., HOCHER, V., OROPEZA, C. Morphological and histological changes during somatic embryo formation from coconut plumule explants. **In Vitro Cell Development Biology Plants**. 42: 19-25, 2006.

SALDANHA, C. W.; MARTINS-CORDER, M. P.; STEINMACHER, D. A.; GUERRA, M. P. *In vitro* morphogenesis in zygotic embryos and leaf sheats of *Euterpe edulis* Martius (Arecaceae). **Crop Breeding and Applied Biotechnology**. 6: 228-235, 2006.

SARASAN, V.; RAMSAY, M. M.; ROBERTS, A. V.; In vitro germination and induction of direct embryogenesis in “Bottle Palm” [*Hyophorbe lagenicaulis* (L. Bailey) H. E. Moore], a critically endangered Mauritian pal. **Plant Cell Reports**. 20: 1107-1111, 2002.

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.; CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; CLEMENT, C. R.; GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis from peach palm zygotic embryos. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**. 43:124-132, 2007a.

STEINMACHER, D. A.; KROHN, N. G.; DANTAS, A. C. M.; STEFENON, V. M.; CLEMENT, C. R.; GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis in peach palm using the thin cell layer technique: induction, morpho-histological aspects and AFLP analysis of somaclonal variation. **Annals of Botany**. 100:699-709, 2007b.

TABAI, S. A. **Propagação da palmeira macaúba *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Loddiges. através de métodos "*in vitro*".** 1992. 121p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 1992.

THUZAR, M.; VANAVICHIT, A.; TRAGOONRUNG, S.; JANTASURIYARATI, C. Efficient and rapid plant regeneration of oil palm zygotic embryos cv. 'Tenera' through somatic embryogenesis. **Acta Physiology Plant Journal**. 33, 123–128, 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.

CAPÍTULO 1

Obtenção de linhagens embriogênicas em macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lood. ex Mart.) a partir de explantes foliares.

RESUMO

ANDRADE, Ana Paula de Souza, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2014. **Obtenção de linhagens embriogênicas em macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lood. ex Mart.) a partir de explantes foliares.** Orientador: Sérgio Yoshimitsu Motoike. Coorientadores: Edgard Augusto Toledo Picoli e Marcos Deon Vilela de Resende.

A embriogênese somática constitui um método eficiente para a propagação massal de espécies de palmeiras. Nesse trabalho é apresentada a primeira descrição da obtenção e manutenção de linhagens embriogênicas a partir de tecidos foliares de *Acrocomia aculeata*. O objetivo foi desenvolver um protocolo de embriogênese somática a partir de explantes foliares obtidos a partir de quatro genótipos: M1 e M2 com dois anos, e A51 e A56 com cinco anos de idade. Os explantes foram inoculados em meio de cultura básico (MB), constituído de sais e vitaminas Y3 acrescido de diferentes concentrações de Picloram (9,0; 18,0 e 36,0 μM). A indução de calos foi avaliada após 90 dias de cultivo no escuro, com efeito significativo do genótipo, concentração de Picloram, idade e interações testadas na formação de calos embriogênicos nodulares e oxidação completa dos explantes. Tanto para o genótipo M1 quanto M2 (ambos com dois anos de idade), as concentrações de 18,0 e 36,0 μM de Picloram induziram maior formação de calo. Quanto à oxidação os genótipos A51 e A56, aqueles com cinco anos de idade, apresentaram maior número de explantes completamente oxidados quando cultivados em meio de cultura suplementado com 36,0 μM de Picloram. Os calos oriundos de explantes foliares de M1 e M2 foram subcultivados para os meios de multiplicação e após 100 dias, observou-se a diferenciação de embriões somáticos em meio contendo 9,0 μM de Picloram + 1.000 μM de Putrescina, e formação de linhagens embriogênicas em meio suplementado com 18,0 μM de Picloram + 1.000 μM de Putrescina. Para a regeneração dos embriões somáticos, as linhagens foram subcultivadas em meio MB, suplementado com 0,1 μM de 2,4-D, 1.000 μM de Putrescina e 3,0 g L^{-1} de carvão ativado. Dezenas de embriões foram convertidos em plântulas com parte aérea e raiz, após 90 dias em meio de germinação contendo 0,54 μM de ANA, 1.000 μM de Putrescina e 3,0 g L^{-1} de carvão ativado. Análises histológicas revelaram padrão meristemático dos calos e a formação de pró-embriões na região central do calo que deu origem às linhagens embriogênicas. Testes histoquímicos evidenciaram a presença de pectinas nas culturas embriogênicas sugerindo que substâncias dessa natureza podem ser consideradas como marcadores celulares para a aquisição da competência embriogênica em macaúba.

ABSTRACT

ANDRADE, Ana Paula de Souza, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2014. **Obtaining of embryogenic lines in Macaw Palm (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lood. ex Mart.) from leaf explants.** Adviser: Sérgio Yoshimitsu Motoike. Co- Advisers: Edgard Augusto Toledo Picoli and Marcos Deon Vilela de Resende.

The somatic embryogenesis constituted an efficient method for mass propagation of the palm species. In this work is presented the first description of the obtaining and maintaining of embryogenic lines from leaf tissues of *Acrocomia aculeata.* The objective was to develop an embryogenesis somatic protocol from leaf explants obtained from four genotypes: M1 and M2 with two years, and A51 and A56 with five years. The explants were inoculated in basic culture medium (MB), constituted of salts and vitamins Y3 supplemented of different concentrations of Picloram(9,0; 18,0 and 36,0 μM). The callus induction was evaluated after 90 days of cultured in the dark, with a significant effect on the genotype, concentration of Picloram, age and tested interactions in the formation of nod embryogenic callus and complete oxidation of the explants. Both the genotype M1 and M2 (both with two years), the concentrations of 18,0 and 36,0 μM of Picloram induced greater callus formation. As for the oxidation of the genotypes A51 and A56, those with five years, presented greater number of explants completely oxidized when cultivated in culture medium supplemented with 36,0 μM of Putrescine, and formation of embryogenic lines in supplemented medium with 18,0 μM of Picloram + 1.000 μM of Putrescine. For the somatic embryos regeneration, the lines were subcultivated in medium MB, supplemented with 0,1 μM of 2-4-D, 1000 μM of Putrescine and 3,0 g L^{-1} of activated charcoal. Dozens of embryos were turned into plants with shoot and root, after 90 days in germination medium containing 0,54 μM of NAA, 1000 μM of Putrescine and 3,0 g L^{-1} of activated charcoal. Histologic analysis revealed a meristematic pattern of the callus and in the forming of pro-embryos in the central region of the callus that gave origin to the embryogenic lines. Histochemical tests showed the presence of pectins, in the embryogenic cultures suggesting that substances of that nature can be considered as cell markers for the acquisition of embryogenic competence in Macaw Palm.

1. Introdução

Diminuir as emissões dos gases de efeito estufa causadores do aquecimento global, é uma das principais razões para o atual esforço internacional que visa à substituição dos combustíveis fósseis por fontes de energia limpa. Diante do cenário atual, o Brasil se destaca pela implementação de programas de incentivo à produção e uso de biocombustíveis, apontado como detentor de enorme potencial para produção de biomassa, tendo em vista suas condições favoráveis de solo e clima.

O principal entrave que inviabiliza a obtenção de uma escala adequada de biocombustíveis, contribuindo assim, para a construção da matriz brasileira de combustíveis renováveis, sobretudo o biodiesel e o bioquerosene, é a inexistência de matéria-prima em quantidade para a produção sustentável, do ponto de vista econômico e ambiental, desses combustíveis.

Entre as espécies oleaginosas candidatas à produção de biodiesel e bioquerosene, a palmeira macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lood. ex Mart.) se destaca por ser altamente produtiva e nativa de várias regiões do Brasil, apresentando adaptação a diversos ambientes (Lorenzi, 2006; Motoike et al., 2013). O valor econômico da macaúba pode ser avaliado pelas amplas possibilidades de seu aproveitamento, com destaque para o fruto que é rico em óleo, o qual se concentra no mesocarpo e na amêndoa, com vasta aplicação no setor industrial e energético (Teixeira, 2005).

O óleo extraído do mesocarpo apresenta alto teor de ácidos graxos insaturados, sendo o ácido oleico seu principal constituinte (concentração acima de 60%) (Bora e Rocha, 2004; Hiane et al., 2006), o que confere ao óleo da polpa excelente qualidade para a produção de biocombustíveis. O óleo extraído da amêndoa por sua vez, apresenta elevado teor de ácido láurico (38 - 45%) podendo ser utilizado na indústria de cosméticos (Fortes e Baugh, 1999; Bora e Rocha, 2004). Além das propriedades oleaginosas do fruto, o endocarpo da macaúba possui maior rendimento em carvão quando comparado à madeira de eucalipto, fato que se deve à presença de altos teores de lignina, característica geralmente apresentada pelas espécies da família Arecaceae (Oliveira et al., 2006). Aliada a essas características, a arquitetura da planta possibilita a adoção de sistema de cultivo consorciado com forrageiras ou outras espécies agrícolas de ciclo curto, bem como pastagem, tornando a produção de biocombustíveis sustentável (Motoike e Kuki, 2009).

Apesar de todo potencial, sabe-se que a exploração dessa palmeira se dá de forma extrativista em populações nativas com elevada variabilidade genética (Abreu et al., 2011), e

com produção variável de frutos ao longo do ano, uma vez que sua reprodução, até o momento, ocorre via seminífera. Dessa forma, faz-se necessária a domesticação da macaúba com a seleção de genótipos superiores vislumbrando o estabelecimento de plantios comerciais de clones e consequente maximização da produção. Para tanto, alternativas de clonagem devem ser estudadas, uma vez que métodos convencionais de propagação vegetativa são ausentes para esta espécie.

Nesse contexto, embriogênese somática via cultura de tecidos torna-se um método de multiplicação estratégico uma vez que células somáticas podem se diferenciar em embriões somáticos, morfologicamente semelhantes ao embrião zigótico (George et al., 2008) e geneticamente idênticos às células que o geraram (Sghaier et al., 2008).

A clonagem via embriogênese somática mostra-se como técnica promissora para palmáceas como a macaúba (Moura et al., 2009) e demais espécies da família Arecaceae (Huong et. al., 1999; Kanchanapoom e Domyoas, 1999; Ledo et al., 2002; Eke et al., 2005; Saénz et al., 2006; Sané et al., 2006; Steinmacher et al., 2007a, b), devido a dificuldade de propagação das mesmas por outras técnicas.

Experimentos de embriogênese somática em macaúba se iniciaram com Tabai (1992) com formação de agregados pró-embriogênicos e melhor desenvolvimento dos calos em meio de cultura acrescido da auxina Picloram. Os agregados pró-embriogênicos semelhantes a embriões somáticos não progrediram para fases mais avançadas da embriogênese, em detrimento de problemas relacionados com a oxidação fenólica. Moura et al. (2008 e 2009), relataram pela primeira vez o sucesso da embriogênese somática a partir de embriões zigóticos de macaúba. Contudo, para a propagação clonal de genótipos previamente avaliados como potenciais, o desenvolvimento de protocolos que permitem a regeneração de explantes obtidos de plantas adultas é necessário.

Devido à necessidade de uma metodologia para propagação clonal de plantas elites de *A. aculeata*, o objetivo desse trabalho foi desenvolver um protocolo de embriogênese somática a partir de folíolos imaturos, bem como caracterizar o processo através de estudos anatômicos e histoquímicos.

2. Material e métodos

2.1. Material vegetal e obtenção dos explantes

O material vegetal utilizado como fonte de explantes constou de duas mudas da palmeira macaúba com dois anos de idade e duas plantas adultas com cinco anos de idade. As

mudas utilizadas foram obtidas no viveiro do Departamento de Fitotecnia, sendo provenientes de frutos coletados no município de Bocaiúva-MG e Belo Horizonte-MG. Plantas adultas, do Banco de Germoplasma instalado no Município de Araponga/MG, foram provenientes de frutos coletados nos municípios de Pitangui e Abaeté, Minas Gerais. A escolha das mesmas foi aleatória atendendo o critério de disponibilidade na época de realização do trabalho. Os materiais vegetais utilizados foram identificados conforme a Tabela 1.

Tabela 1. Genótipos utilizados como doadores de explantes foliares para indução de embriogênese somática em macaúba.

Identificação	Local de origem	Idade
M1	Bocaiúva/MG	2 anos
M2	Belo Horizonte/MG	2 anos
A51	Pitangui/MG	5 anos
A56	Abaeté/MG	5 anos

As mudas foram dissecadas de forma cuidadosa, com auxílio de uma lâmina inoxidável, até atingir os folíolos imaturos. Na retirada do palmito das plantas adultas, onde os folíolos imaturos se encontravam protegidos, tomou-se o cuidado para que o meristema apical não fosse atingido, permitindo sua recuperação. Após a realização de diversos ensaios com intuito de determinar uma metodologia de corte não destrutivo da planta de macaúba, a coleta dos palmitos procedeu-se da seguinte forma:

- Retirada da maioria das folhas abertas para facilitar o acesso à região do caule. Foram mantidas quatro folhas na região da base para permitir o crescimento continuado da planta após a retirada do palmito (Figura 1A);
- Corte das folhas que compõem a flecha (Figura 1B);
- Realização de sucessivos cortes de aproximadamente 10 cm em direção à base da planta (Figuras 1C-D) até atingir uma região onde o palmito (fonte doadora de folíolos imaturos) apresentasse coloração clara e aspecto macio (Figura 1E);
- O corte do palmito foi realizado 35 cm desse ponto preservando a integridade do meristema (Figuras 1F-H), e foi cuidadosamente embalado em sacos plásticos (Figura 1I) e transportado até o Laboratório de Cultura de Tecidos e Células Vegetais da Universidade Federal de Viçosa para a condução da etapa de desinfestação e obtenção dos explantes.

Figura 1. Retirada do palmito de macaúba (*A. aculeata*) (Ensaio 2). **(A)** Retirada da maioria das folhas abertas. **(B)** Corte das folhas que compõem a flecha. **(C-D)** Realização de sucessivos cortes de aproximadamente 10 cm em direção à base da planta até atingir uma região de interesse. **(E)** Folhas internas de coloração clara e aspecto macio, responsivas ao processo de indução de calogênese. **(E-F)** Marcação do ponto e realização do corte do palmito. **(H)** Manutenção da integridade do meristema após realização do corte. **(I)** Acondicionamento do palmito para ser transportado.

Os folíolos imaturos foram submetidos à desinfestação em solução asséptica (1 % de hipoclorito de sódio) durante 10 min. Em seguida, foram enxaguados oito vezes com água destilada estéril em câmara de fluxo laminar. Após a desinfestação, os folíolos imaturos foram seccionados com auxílio de bisturi, em segmentos de aproximadamente 1 cm de comprimento.

2.2. Meio de cultura básico

O meio de cultura básico (MB) foi composto por sais e vitaminas Y3 (Eeuwens, 1978), 30 g L^{-1} de sacarose, 1 g L^{-1} de caseína hidrolisada, 100 mg L^{-1} de mio-inositol, 100 mg L^{-1} de arginina, 100 mg L^{-1} de asparagina, 100 mg L^{-1} de glutamina, gelificados com 2,5 g L^{-1} de Phytagel® (Sigma, USA). O pH foi ajustado para 5,7 ± 0,1 antes de serem autoclavados por 20 minutos a 121 ºC e 1,5 atm.

2.3. Indução de calos embriogênicos

Os explantes foram inoculados em placas de Petri de poliestireno (90 x 15 mm) contendo 30 mL de meio de cultura básico (MB). Três concentrações de Picloram (9,0; 18,0 e 36,0 μM) foram testadas neste meio. Os experimentos foram instalados em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4 x 3 x 2, constando de 4 genótipos (Tabela 1), 3 concentrações da auxina Picloram (9,0; 18,0 e 36,0 μM) e duas idades (dois e cinco anos). Foram utilizadas 20 repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por uma placa de Petri com quatro explantes.

Após a inoculação dos explantes, as placas foram seladas com filme PVC (Rolopac®) e mantidas em sala de crescimento, à temperatura de 27 ± 1 °C na ausência de luz. Avaliações quanto a presença de contaminantes biológicos (bactérias e fungos) foram realizadas após 10 dias de cultivo. O desenvolvimento dos calos foi acompanhado periodicamente, e após 60 dias, os explantes calejados foram repicados para um novo meio de cultura, de mesma composição, permanecendo por mais 30 dias nessa condição. Após este período, procedeu-se a avaliação do material em resposta a concentração de Picloram. As avaliações realizadas foram: número de explantes por placa com a presença de calos nodulares e número de explantes por placa completamente oxidados, sem formação de calos.

Os dados obtidos foram transformados segundo raiz quadrada de (x + 0,5) e submetidos à análise de variância. Foram testados os 3 fatores isoladamente e as interações Genótipo x Concentração de Picloram e Idade x Concentração de Picloram. O fato de não ter todos os genótipos testados nas diferentes classes de idade, as interações Genótipo x Idade e Genótipo x Concentração de Picloram x Idade não foram testadas. As médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade, utilizando o software estatístico Genes (Cruz, 2013).

2.4. Obtenção e multiplicação das linhagens embriogênicas

Em função da menor frequência de indução de calos dos explantes obtidos das plantas A51 e A56, foram utilizados nessa fase apenas calos oriundos de explantes foliares de M1 e M2.

Os calos obtidos na fase de indução da embriogênese somática foram subcultivados para meios de multiplicação em placas de Petri de poliestireno (90 x 15 mm), contendo 30 mL de meio de cultura basal (MB), suplementado com a mesma concentração de Picloram utilizada na fase de indução, acrescido ou não com 1.000 µM de poliamina Putrescina.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 3 x 2: calos das plantas M1 e M2, 3 concentrações de Picloram (9,0; 18,0 e 36,0 µM) e presença (1.000 µM) ou ausência de Putrescina, com 5 repetições. Cada repetição foi representada por uma placa de Petri com quatro massas calogênicas de aproximadamente 5 mm de diâmetro.

Após a inoculação, as placas foram seladas com filme PVC (Rolopac®) e mantidas em sala de crescimento, à temperatura de 27 ± 1 °C na ausência de luz. A repicagem do material para meio de mesma composição foi realizada após 90 dias e acompanhado até o surgimento das linhagens embriogênicas.

Após o surgimento das linhagens embriogênicas, essas foram subcultivadas em meio de cultura MB suplementado com 18 µM de Picloram e 1.000 µM de Putrescina, sendo repicadas a cada 60 dias. Nessa fase foram realizadas apenas avaliações descritivas.

2.5. Regeneração e germinação dos embriões somáticos

As linhagens embriogênicas foram acondicionadas em meio de regeneração após passarem pelo processo de multiplicação. O meio foi constituído de MB, suplementado com 0,1 µM de 2,4-D, 1.000 µM de Putrescina (Carvalho, 2009; Corrêa, 2014) e 3,0 g L^{-1} de carvão ativado (Sigma, USA). As placas de Petri foram seladas com filme PVC (Rolopac®) e mantidas em sala de crescimento, à temperatura de 27 ± 1 °C na ausência de luz por 60 dias.

Após esse período, os embriões somáticos obtidos foram individualizados e inoculados em tubo de ensaio (150 x 25 mm) contendo 10 mL do meio de germinação. O meio de cultura para germinação consistiu de MB suplementado com 0,54 µM de ANA, 1.000 µM de Putrescina (Carvalho, 2009; Corrêa, 2014) e 3,0 g L^{-1} de carvão ativado (Sigma, USA). Os tubos de ensaio foram mantidos em sala de crescimento à 27 ± 1 °C com fotoperíodo de 16

horas/dia e irradiância de ± 40 µmol m^{-2} s^{-1} provida por lâmpadas tubulares de LED (18 W, Arapeva Iluminação LED). Após 90 dias realizou-se a contagem do número de plântulas completamente formadas, ou seja, aquelas contendo parte aérea e raiz.

2.6. Anatomia e histoquímica dos calos e linhagens embriogênicas

Amostras de calos nodulares obtidos nas fases de indução e multiplicação (9,0 e 18,0 µM de Picloram), e de linhagens embriogênicas foram coletadas para estudo anatômico e histoquímico.

Para a obtenção dos cortes anatômicos o material foi fixado em FAA_{50} (formol: ácido acético: álcool etílico 50 % na proporção de 5: 5: 90) durante 24 h, e estocadas em álcool etílico 70 %. As amostras fixadas foram então desidratadas em série etílica crescente (85 e 95 %) por um período de 2 horas sob vácuo. Em seguida, as amostras foram pré-infiltradas em etanol 95 % e resina (1:1 v/v) durante 2 horas sob vácuo e incluídas em metacrilato (Historesin, Leica) durante 5 dias (2 horas sob vácuo/dia) para serem emblocadas em moldes plásticos. Obtidos os blocos, estes foram seccionados em cortes semifinos de 5 µm de espessura, utilizando-se micrótomo rotativo de avanço automático RM2265 com navalha de vidro.

Os cortes foram corados com azul de toluidina (O'Brien e McCully, 1981) para caracterização estrutural; PAS (ácido periódico-reagente de Schiff; Feder e O'Brien, 1968) para polissacarídeos totais e vermelho de rutênio (Johansen, 1940) para detecção de pectina. As observações e fotomicrografias foram realizadas em fotomicroscópio Olympus Provis AX70, equipado com sistema U-photo, no Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa.

3. Resultados

3.1. Indução de calos embriogênicos

O índice de contaminação no presente estudo foi baixo, com a contaminação de apenas quatro explantes por fungos, indicando que a metodologia para o isolamento e desinfestação das folhas imaturas mostrou-se eficiente permitindo o estabelecimento *in vitro* dos explantes.

O desenvolvimento de calos nodulares foi acompanhado periodicamente e aos 30 dias de cultivo nenhum explante havia calejado, mas, aos 60 dias, pode-se observar o início da formação dos mesmos. Após 90 dias de cultivo, houve efeito significativo do genótipo,

concentração de Picloram, idade e interações testadas na formação de calos embriogênicos nodulares e oxidação completa dos explantes (Tabela 2).

Tabela 2. Resumo da análise de variância para indução de calos embriogênicos a partir de explantes foliares de macaúba (*Acrocomia aculeata*), para o número de explantes com a presença de calos embriogênicos nodulares e completamente oxidados após 90 dias de cultivo *in vitro*.

F.V.	G. L.	S. Q.		Q. M.		F	
		Calo	Oxidação	Calo	Oxidação	Calo	Oxidação
Genótipo	3	14,3167	4,7458	4,7722	1,5819	72,673*	15,899*
Concentração de Picloram	2	1,0083	3,7750	0,5042	1,8875	7,678*	18,970*
Idade	1	12,1500	4,0042	12,1500	4,0042	185,025*	40,243*
Genót. X Conc. de Picloram	6	0,9583	3,0917	0,1597	0,5153	2,432*	5,179*
Conc. de Picloram X Idade	2	0,7750	2,1583	0,3875	1,0792	5,901*	10,846*
Resíduo	225	14,7750	22,3875	0,0657	0,0995		
Média geral		1,2417	1,2125				
CV (%)		20,64	26,02				

*Significativo a 5 % de probabilidade pelo teste F.

Independente da concentração de Picloram testada, o genótipo M1 mostrou-se superior quanto à formação de calos embriogênicos nodulares, não havendo diferença estatística entre os genótipos A51 e A56. Tanto para o genótipo M1 quanto M2, as concentrações de 18,0 e 36,0 µM de Picloram induziram maior formação de calo (Tabela 3). Os calos obtidos apresentaram aspecto nodular, brilhante de coloração bege a amarelo claro e com estruturas globulares isoladas do restante do calo (calo tipo II, figuras 2A e B), caracterizado como embriogênico em ensaios anteriores.

Tabela 3. Resposta morfogênica dos explantes foliares de macaúba (*Acrocomia aculeata*) após 90 dias de cultivo *in vitro*. Resultados médios da interação Genótipo x Concentração de Picloram na indução de calos embriogênicos nodulares.

Genótipo	Concentração de Picloram		
	9,0 µM	18,0 µM	36,0 µM
M1	1,4000 Ab	1,6500 Aa	1,7500 Aa
M2	1,2000 Bb	1,4000 Ba	1,4000 Ba
A51	1,0000 Ca	1,1000 Ca	1,0000 Ca
A56	1,0000 Ca	1,0000 Ca	1,0000 Ca

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, maiúscula na coluna e minúscula na linha, pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade.

Para a interação Idade x Concentração de Picloram, houve maior formação de calo nos explantes com dois anos de idade quando cultivados em meio basal suplementando com 18,0 e 36,0 µM de Picloram (Tabela 4).

Tabela 4. Resposta morfogênica dos explantes foliares de macaúba (*Acrocomia aculeata*) após 90 dias de cultivo *in vitro*. Resultados médios da interação Idade x Concentração de Picloram na indução de calos embriogênicos nodulares.

Idade (anos)	Concentração de Picloram		
	9,0 µM	18,0 µM	36,0 µM
2	1,3000 Ab	1,5250 Aa	1,5750 Aa
5	1,0000 Ba	1,0500 Ba	1,0000 Ba

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, maiúscula na coluna e minúscula na linha, pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade.

Quanto à oxidação os genótipos A51 e A56, aqueles com cinco anos de idade, apresentaram maior número de explantes completamente oxidados quando cultivados em meio de cultura suplementado com 36,0 µM de Picloram (Tabelas 5 e 6) (Figura 2C).

Tabela 5. Resposta morfogênica dos explantes foliares de macaúba (*Acrocomia aculeata*) após 90 dias de cultivo *in vitro*. Resultados médios da interação Genótipo x Concentração de Picloram na indução de explantes completamente oxidados.

Genótipo	Concentração de Picloram		
	9,0 µM	18,0 µM	36,0 µM
M1	1,0000 Aa	1,0500 Aa	1,0000 Aa
M2	1,1000 Aa	1,1000 Aa	1,2500 Aa
A51	1,1500 Ba	1,2000 Ba	1,8000 Bb
A56	1,1500 Ba	1,2500 Ba	1,5000 Bb

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, maiúscula na coluna e minúscula na linha, pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade.

Tabela 6. Resposta morfogênica dos explantes foliares de macaúba (*Acrocomia aculeata*) após 90 dias de cultivo *in vitro*. Resultados médios da interação Idade x Concentração de Picloram na indução de explantes completamente oxidados.

Idade (anos)	Concentração de Picloram		
	9,0 µM	18,0 µM	36,0 µM
2	1,0500 Aa	1,0750 Aa	1,1250 Aa
5	1,1500 Ba	1,2250 Ba	1,6500 Bb

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, maiúscula na coluna e minúscula na linha, pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade.

A análise histológica revelou a presença de células em intenso processo de divisão celular (coradas de azul) no interior dos calos e de uma camada de células colapsadas

delimitando-os (Figura 2D). Os nódulos característicos desse tipo de calo (tipo II) evoluíram para estruturas globulares que por vezes se desprendiam do tecido de origem (Figura 2E). No interior de algumas estruturas, observaram-se a formação de centros meristemáticos formados por grupos de células fortemente coradas pelo azul de toluidina (Figura 2F). Pode-se observar que os calos tiveram origem a partir do tecido parenquimático associado ao feixe vascular da folha (Figura 2F).

A natureza polissacarídica das células do parênquima que deram origem aos calos (Figura 2G) e na camada de células colapsadas delimitando os calos obtidos na fase de indução (Figura 2H) foi evidente dado à reação positiva ao corante PAS. O teste com o corante vermelho de rutênio confirmou que esses compostos correspondiam a pectinas, dada à coloração vermelha das células (Figura 2I).

3.2. Obtenção e multiplicação das linhagens embriogênicas

Aos 100 dias observou-se a diferenciação de embriões somáticos em quatro massas calogênicas do genótipo M1 quando multiplicadas em meio acrescido de 9,0 µM de Picloram e 1.000 µM de Putrescina. Esses embriões apresentaram coloração branca e estavam fortemente soldados uns aos outros e aos calos que lhe deram origem, impossibilitando a separação dos mesmos (Figura 3A). Observou-se que esses embriões se originaram a partir de massas meristemáticas e consequente invaginação da protoderme (Figura 3B). Esses embriões não passaram pelo processo de germinação.

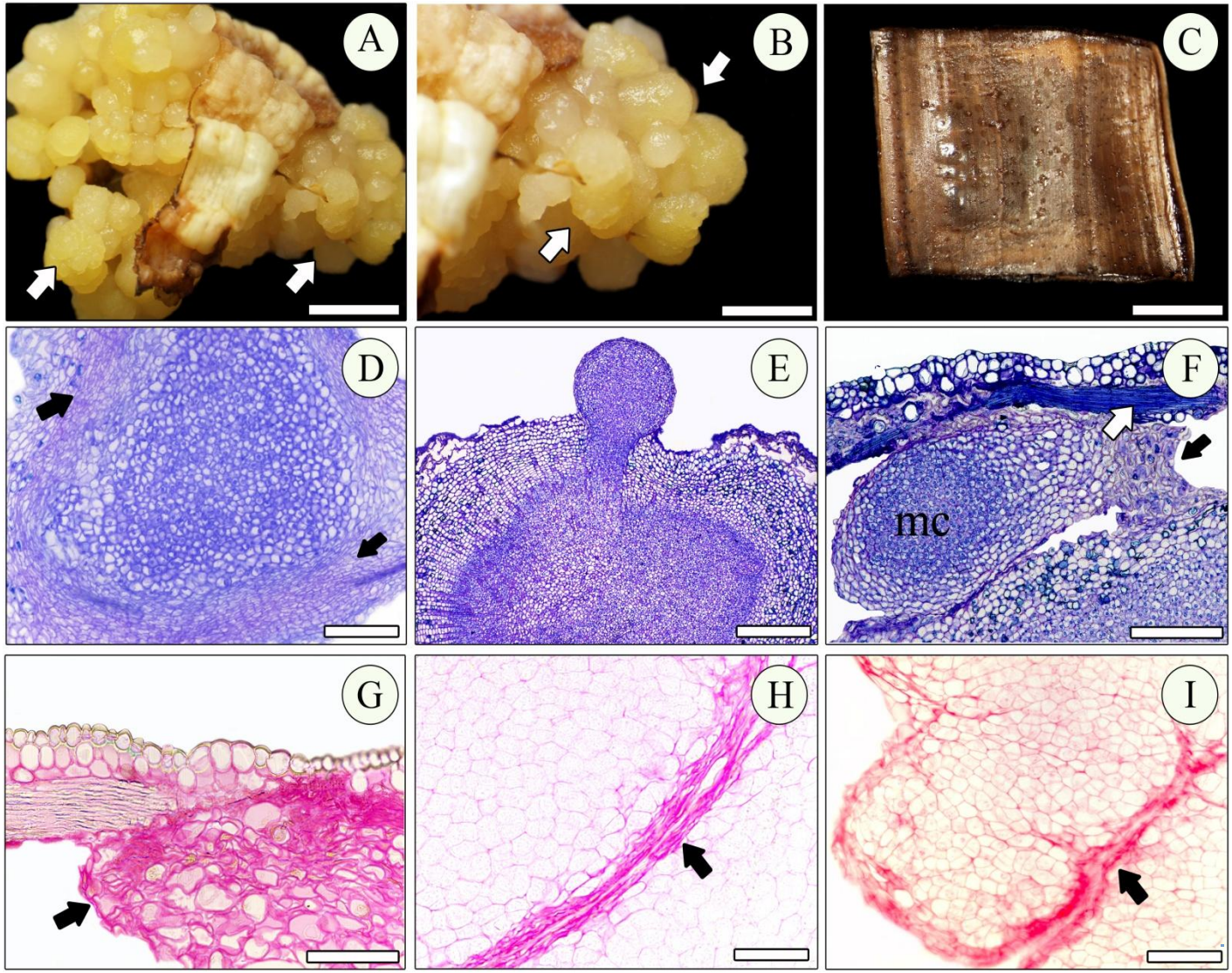

Figura 2. Indução de calos embriogênicos nodulares (tipo II) a partir de explantes foliares de macaúba após 90 dias de cultivo *in vitro*. **(A-B)** Calo embriogênico caracterizado pela coloração bege e amarelo claro, com aspecto nodular (setas indicam o calo). **(C)** Oxidação completa dos explantes, sem a ocorrência de calo. Secções transversais do calo embriogênico coradas com azul de toluidina **(D-F)**, PAS **(G e H)** e vermelho de rutênio **(I)**. **(D)** Calos embriogênicos nodulares com células coradas de azul em intenso processo de divisão celular (setas indicam camada de células colapsadas delimitando o calo). **(E)** Estrutura globular que por vezes se desprendiam do calo de origem **(F)** Calos originados a partir do tecido parenquimático associado ao feixe vascular da folha (seta branca indica o feixe vascular, seta preta indica formação do calo) com presença de centros meristemáticos. **(G)** Presença de polissacarídeos nas células do parênquima que deram origem aos calos (seta). **(H)** Células colapsadas ricas em polissacarídeos circundando os calos obtidos na fase de indução (setas indicam células colapsadas). **(I)** Evidência da presença de pectina nas células colapsadas (seta). **mc**: centros meristemáticos. Barras: A e C = 4 mm; B = 3 mm; D, E, H e I = 400 µm; F = 200 µm; G = 100 µm.

A formação de linhagens embriogênicas (grupo de embriões somáticos globulares), foi observada em apenas uma massa calogênica advinda também do genótipo M1 subcultivada em meio de cultura acrescido de 18,0 µM de Picloram e 1.000 µM de Putrescina. As linhagens apresentaram coloração bege claro com aspecto translúcido (Figura 3C).

Os cortes histológicos evidenciaram a formação dos embriões globulares a partir do calo nodular, caracterizado por células meristemáticas fortemente coradas de azul (Figura 4D). No interior desses calos, observou-se o início da formação dos pró-embriões somáticos delimitados por um espessamento aparente da parede celular, conforme identificado pela coloração com azul de toluidina (Figura 3E). Os embriões globulares apresentaram estrutura típica da protoderme bem definida, delimitando a massa homogênea de células correspondentes ao meristema fundamental (Figura 3F).

Os calos multiplicados em meio acrescido de 36,0 µM de Picloram com presença (1.000 µM) ou ausência de Putrescina apresentaram aspecto desestruturado e coloração marrom após 100 dias de cultivo (Figura 3G), impossibilitando a realização de cortes histológicos dos mesmos. Aqueles multiplicados em meio de cultura contendo 9,0 e 18,0 µM de Picloram (na ausência de Putrescina) apenas aumentaram de tamanho, não havendo nenhuma diferenciação.

A utilização do corante PAS realçou a parede das células dos embriões que se diferenciaram em meio de multiplicação acrescido de 9,0 µM de Picloram e 1.000 µM de Putrescina (Figura 4A), dos pró-embriões e das linhagens originados em meio suplementado com 18,0 µM de Picloram e 1.000 µM de Putrescina (Figuras 4B a E) demonstrando natureza polissacarídica. Além disso, amiloplastos foram detectados nas células dos calos em multiplicação, localizadas próximas a regiões de intensa atividade meristemática (Figuras 4B e C) e a presença de pectatos isolando os pró-embriões das demais células. A confirmação de que estes compostos polissacarídicos correspondiam a pectinas, foi evidenciada pela reação positiva ao corante vermelho de rutênio (Figuras 4F a H).

Após três ciclos de multiplicação das linhagens em meio Y3 acrescido de 18,0 µM de Picloram e 1.000 µM de Putrescina (repicagem a cada 60 dias) obteve-se 40 massas compostas por embriões globulares (Figura 5A), indicando que essa metodologia possibilita a multiplicação massal e a preservação dessas linhagens *in vitro*. As mesmas se encontram em processo contínuo de multiplicação por mais de um ano.

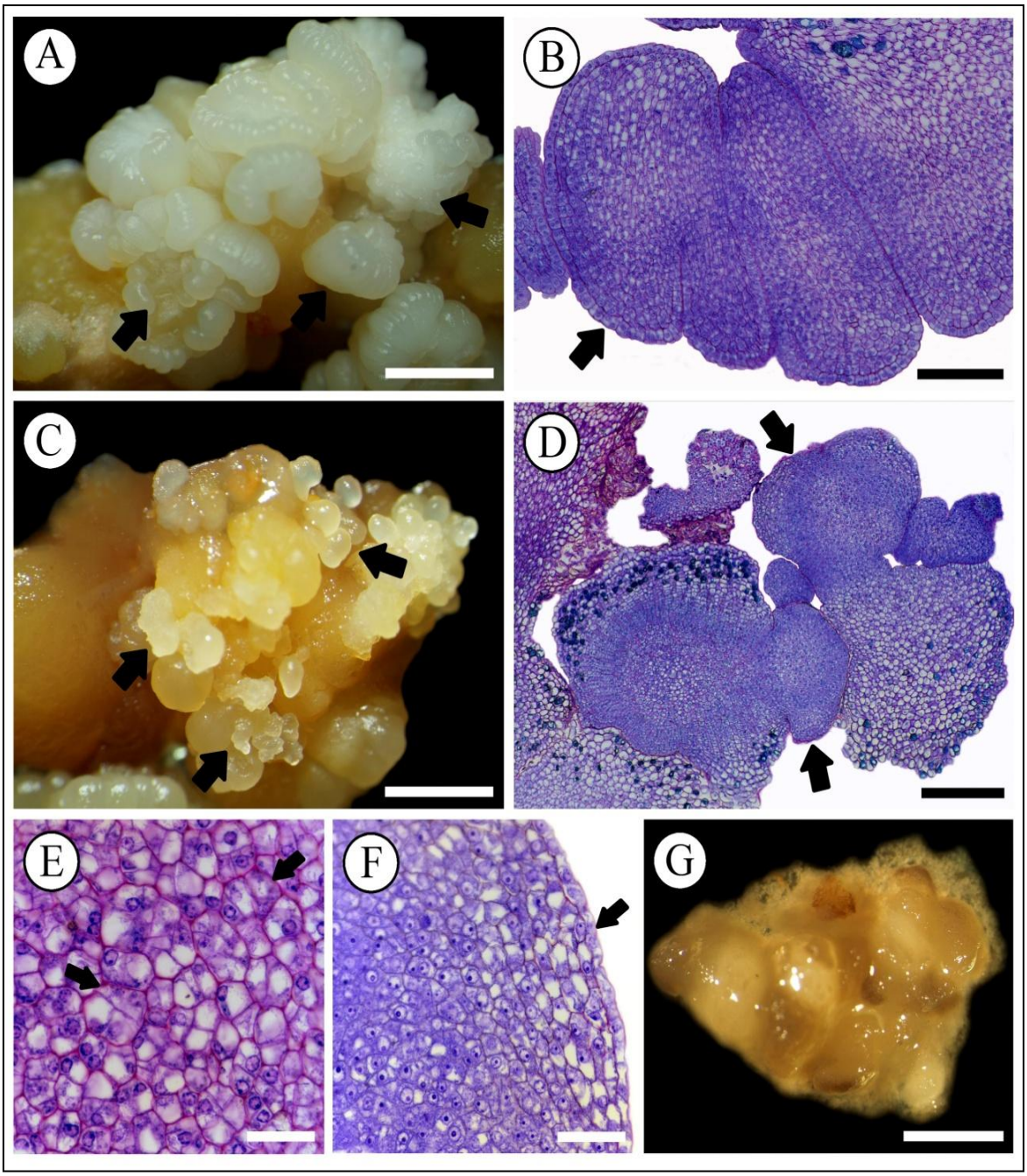

Figura 3. Calos embriogênicos após 100 dias em meio de multiplicação. **(A)** Diferenciação de embriões somáticos em meio acrescido de 9,0 µM de Picloram e 1.000 µM de Putrescina (setas indicam os embriões de coloração branca). **(B)** Secção transversal dos embriões diferenciados evidenciando a formação de massas meristemáticas e consequente invaginação da protoderme (seta indica protoderme). **(C)** Formação de linhagens embriogênicas (setas) em meio acrescido de 18,0 µM de Picloram e 1.000 µM de Putrescina. **(D)** Secção transversal do calo que deu origem às linhagens (setas indicam os embriões globulares). **(E)** Detalhe dos pró-embriões somáticos (setas indicam o espessamento aparente da parede celular). **(F)** Embriões globulares com protoderme definida (seta). **(G)** Calo com aspecto desestruturado após a multiplicação em meio acrescido de 36,0 µM de Picloram e 1.000 µM de Putrescina. Barras: A = 2 mm; B = 150 µm; C = 3 mm; D = 300 µm; E = 50 µm; F = 100 µm; G = 2,5 mm.

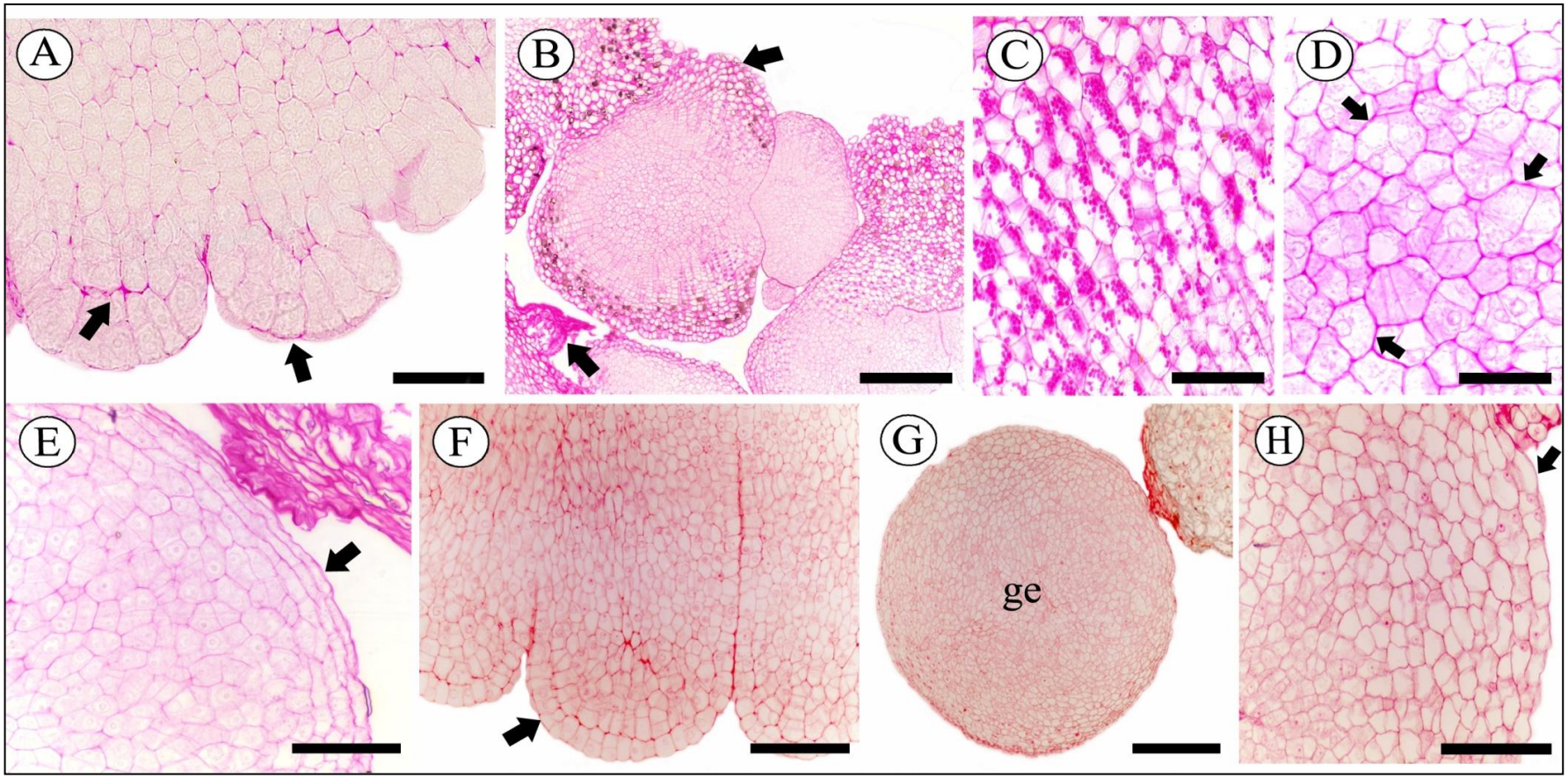

Figura 4. Análise histoquímica das culturas embriogênicas após 100 dias em meio de multiplicação. Reação positiva para polissacarídeos evidenciada pela coloração rosa **(A-E)**. Reação positiva para pectinas evidenciada pela coloração vermelha **(F-H)**. **(A e F)** Detalhe da protoderme dos embriões diferenciados (setas indicam a presença dos compostos polissacarídicos (A) e pectina (F) na parede das células). **(B)** Secção transversal do calo que deu origem às linhagens (setas indicam células ricas em polissacarídeos). **(C)** Detalhe da presença de grãos de amido em células localizadas próximas a regiões de intensa atividade meristemática. **(D)** Detalhe da parede isolando os pró-embriões. **(E, G e H)** Embrião globular compondo as linhagens embriogênicas (setas indicam formação de protoderme). **eg**: embrião globular. Barras: A = 40 µm; B = 300 µm; C e D = 70 µm; E, F, G e H = 100 µm.

3.3. Regeneração e germinação dos embriões somáticos

Os embriões somáticos regenerados a partir das linhagens embriogênicas, apresentaram coloração branca (Figura 5B e C) e, com o auxílio de um bisturi, foram individualizados e transferidos para o meio de germinação. Eventualmente, alguns embriões se desprenderam facilmente, sem haver a necessidade de utilização do bisturi.

Após 90 dias em meio de germinação, dezenas de embriões foram convertidos em plântulas com parte aérea e raiz (Figura 5D). Algumas plântulas apresentaram mais de uma haste (Figura 5E), indicando que alguns embriões não foram isolados totalmente.

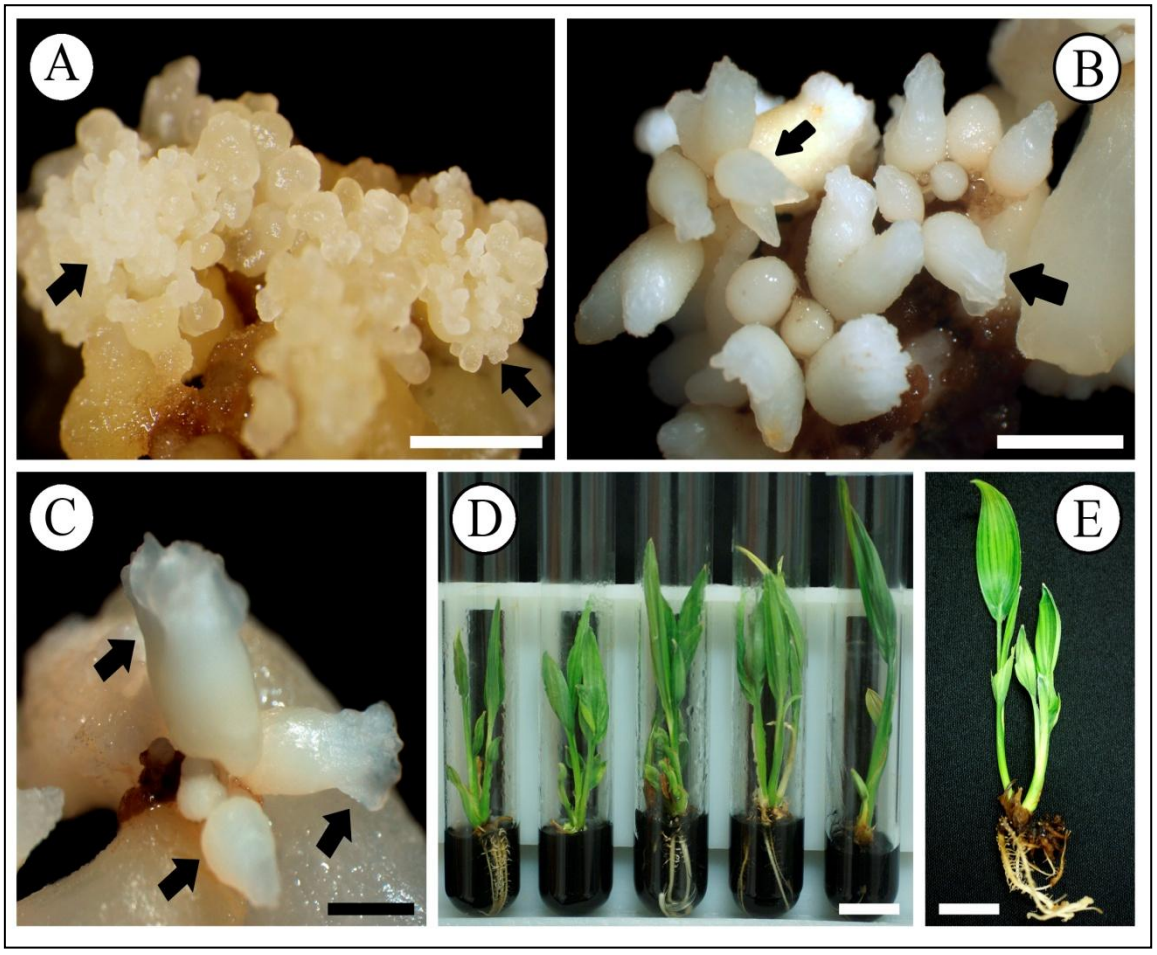

Figura 5. Diferenciação das linhagens embriogênicas em plântulas de macaúba. **(A)** Linhagens embriogênicas após três ciclos de multiplicação em meio de cultura MB acrescido de 18,0 µM de Picloram e 1.000 µM de Putrescina (setas indicam os embriões somáticos globulares compondo as linhagens). **(B e C)** Embriões somáticos regenerados após 60 dias de cultivo em meio MB suplementado com 0,1µM de 2,4-D, 1.000 µM de Putrescina e 3,0 g L^{-1} de carvão ativado (setas indicam os embriões somáticos no estádio torpedo). **(D)** Plântulas obtidas a partir da germinação dos embriões somáticos em meio MB suplementado com 0,54 µM de ANA, 1.000 µM de Putrescina e 3,0 g L^{-1} de carvão ativado. **(E)** Detalhe da plântula completa, com mais de uma haste. Barras: A - C = 2 mm; D e E = 1 cm.

4. Discussão

O presente trabalho apresenta a primeira descrição da obtenção e manutenção de linhagens embriogênicas a partir de tecidos foliares de *Acrocomia aculeata*.

Além de fornecer substâncias essenciais para o desenvolvimento de tecidos e órgão, o meio de cultura deve conter substâncias capazes de induzir a desdiferenciação celular, como por exemplo, as auxinas, que controlam o crescimento e a divisão celular, além de estarem diretamente envolvidas na morfogênese dos tecidos vegetais e na mediação da transição do estádio somático para o embriogênico (Chugh e Khurana, 2002; Fehér et al., 2003).

As concentrações da auxina Picloram testadas foram eficientes na indução de calos, sendo que as concentrações de 18,0 e 36,0 μM induziram maior formação de calos nos explantes obtidos dos genótipos M1 e M2, sendo semelhantes entre si para os genótipos A51 e 56. O Picloram é uma auxina sintética derivada do ácido picolínico e tem sido empregada com sucesso na indução de embriogênese somática de palmáceas: *Acrocomia aculeata* (Moura et al., 2009), *Areca catechu* (Karun et al., 2004), *Bactris gasipaes* (Steinmacher et al., 2007a, 2007b e 2011), *Elaeis guineensis* Jacq. (Scherwinski-Pereira et al., 2010; Balzon et al., 2013; Silva et al., 2013) e *Phoenix canariensis* (Huong et al., 1999).

Dentre os genótipos testados, independente da concentração de Picloram, o genótipo M1 mostrou-se superior quanto à formação de calos embriogênicos nodulares. Os genótipos A51 e A56 mostraram-se significativamente iguais. Essas diferenças podem estar relacionadas à diversidade genética existente na espécie, uma vez que a macaúba é propagada via seminífera e apresenta sistema reprodutivo do tipo misto (Scariot et al., 1991).

De acordo com Henry et al. (1994), diferenças genéticas existentes dentro de uma mesma espécie podem resultar na variabilidade da competência *in vitro*. Em *Elaeis guineensis* Jacq., o efeito do genótipo foi determinante no processo de indução de calos embriogênicos, o que reflete a influência do genótipo na responsividade *in vitro* (Thawaro e Te-Chato, 2009; Silva et al., 2012; Nugroho et al., 2014).

O maior número de explantes que apresentaram formação de calos embriogênicos nodulares correspondeu àqueles com idade de dois anos. Essa observação indica que além do genótipo, outro fator que pode ter influenciado a resposta morfogênica *in vitro*, é o estádio fisiológico do explante utilizado, uma vez que, verificou-se que os explantes de materiais mais jovens responderam de forma favorável à indução de calos e embriogênese somática, diferentemente dos materiais proveniente de plantas adultas. Gueye et al. (2009) afirmam que

a aptidão das células para adquirirem competência embriogênica depende do estádio fisiológico e da diferenciação inicial das mesmas.

Inflorescências jovens de (*Bactris gasipaes* Kunth) foram mais competentes no processo de indução de embriogênese somática do que as mais velhas, que se mostraram completamente oxidadas ao final do cultivo (Steinmacher et al., 2007c). Resultado semelhante foi relatado para *Euterpe edulis* (Guerra e Handro, 1998).

A presença intensa de fibras e esclereídes nos feixes vasculares foram apontadas como causas da baixa indução de calos nodulares em explantes foliares distais de *Phoenix dactylifera* (Gueye et al., 2009). Fato semelhante pode ter ocorrido no presente estudo, uma vez que para os genótipos A51 e A56 a indução de calos nodulares foi menor. Os explantes obtidos a partir desses genótipos provavelmente apresentavam estádio fisiológico mais avançado, o que pode ter contribuído para menor frequência de formação de calos e maior oxidação dos explantes quando cultivados em meio acrescido de 36,0 µM da auxina Picloram.

A indução de calos embriogênicos nodulares a partir da multiplicação de células perivasculares foi observada em explantes foliares de *Elaeis guineensis* (Schwendiman et al., 1988), em *Cocos nucifera* (Buffard-Morel et al., 1992), *Euterpe edulis* (Guerra e Handro, 1998) e *Phoenix dactylifera* (Gueye et al., 2009), corroborando com o presente estudo em que o processo de indução de calos nodulares de macaúba se deu a partir de células do parênquima associadas ao feixe vascular.

Estudos histológicos revelaram características embriogênicas dos calos obtidos na fase de indução: regiões com intensa divisão celular na região interna dos calos, pequenas células isodiamétricas com citoplasma denso e núcleo volumoso. Esse padrão foi observado em calos embriogênicos de *Acrocomia aculeata* (Moura et al. 2009) e *Elaeis guineensis* Jacq. (Balzon et al., 2013; Silva et al., 2013).

No processo de embriogênese somática em Arecaceae, após a obtenção dos calos na fase de indução, a redução da concentração de auxina é comumente requerida para a multiplicação e o desenvolvimento das massas pró-embriogênicas (Karun et al., 2004; Wang et al., 2006; Steinmacher et al., 2007a; Chehmalee e Te-chato, 2008). No presente trabalho, pode-se observar a diferenciação de embriões quando os calos foram multiplicados em menor concentração de Picloram.

Em culturas de ciclo longo, a preservação de linhagens embriogênicas é uma maneira eficiente de manter o genótipo disponível para o processo de regeneração em épocas distintas. E para isso, a determinação de um meio de cultura ideal ao processo de multiplicação contínuo faz-se necessário. Somente a concentração de 18,0 µM de Picloram acrescido da

poliamina Putrescina favoreceu a formação e a multiplicação de forma eficiente das linhagens embriogênicas (Figuras 3C e 5A).

Além das auxinas, alguns trabalhos mostram ser benéfico o uso de poliaminas exógenas nos meios de cultivo (Rajesh et al, 2003; Karun et al, 2004). Em *E. guineensis*, a inclusão da poliamina Putrescina na concentração de 1.000 µM contribuiu para a multiplicação e manutenção das massas pró-embriogênicas e para a regeneração de embriões somáticos (Carvalho, 2009), o qual é condizente com o resultado obtido no presente estudo. Além de estar envolvida em processos como a embriogênese e organogênese (Alcázar et al., 2010), a poliamina Putrescina é citada por conferir proteção à molécula de DNA contra danos causados por espécies reativas de oxigênio (ROS) (Chol Ha et al., 1998) e no controle da metilação do DNA (Brooks et al., 2010).

A análise histológica revelou que os embriões que se diferenciaram a partir de calos multiplicados em meio acrescido de 9,0 µM de Picloram e 1.000 µM de Putrescina, se originaram a partir do desenvolvimento de massas meristemáticas seguida pela invaginação da protoderme. A obtenção de embriões somáticos por esse mesmo processo foi descrita para *C. nucifera* (Fernando et al., 2003).

Os calos embriogênicos que deram origem às linhagens foram constituídos em seu interior por grupo de células isoladas por um espessamento aparente da parede celular (pró-embriões). Resultado semelhante foi observado por Moura et al. (2009), sugerindo que o espessamento isolando os pró-embriões, foi causado pela liberação de pectinas, provavelmente pela dissolução da lamela média. No presente estudo, esse espessamento mostrou-se corado pelos corantes PAS e vermelho de rutênio, evidenciando a presença de pectinas.

Verdeil et al. (2001) acompanharam o surgimento de células embriogênicas de *C. nucifera* e verificaram o isolamento de pró-embriões pelo espessamento da parede celular. Eles observaram alterações da parede celular, tais como o fechamento dos plasmodesmos e deposição de calose, sugerindo que estes acontecimentos levam ao isolamento necessário para a reprogramação celular e o início dos eventos embriogênicos. O espessamento da parede ao redor do pró-embriões também foi observado por Silva et al. (2013) na indução de embriões somáticos de dendê.

O teste histoquímico com o reagente de Schiff (PAS) revelou a presença de células com grãos de amido no calo que deu origem aos pró-embriões, o que está de acordo com o fato de que, o acúmulo de amido nas células adjacentes às regiões com intensas divisões celulares podem estar relacionados com a aquisição de competência embriogênica (Silva et

al., 2013). Verdeil et al. (2001), estudando a embriogênese somática em de *C. nucifera*, observaram a presença de amido nas células adjacentes às células meristemáticas. Resultados semelhantes foram obtidos no processo de indução da embriogênese somática em *A. aculeata* (Moura et al. 2008). Estas observações sugerem que o amido mobilizado na região cortical do calo pode ser utilizado como uma fonte de energia para as células meristemáticas que se encontram em intensa divisão celular, além de contribuir para a formação de carboidratos que delimitaram os setores embriogênicos.

A presença de polissacarídeos nas culturas embriogênicas obtidas a partir de folhas de macaúba, foi também evidenciada pela reação positiva ao corante PAS. Na literatura há relatos da presença de uma matriz extracelular rica em substâncias polissacarídicas na superfície externa das células envolvidas nas etapas iniciais do processo de embriogênese somática até a fase de desenvolvimento embrionário globular de espécies como *Drosera rotundifolia*, *Zea mays* (Pedroso e Pais, 1995; Samaj et al., 1995), *Cichorium intybus* (Chapman et al., 2000), *Cocos nucifera* (Verdeil et al., 2001), *Brassica napus* ssp. (Namasivayam et al., 2006) e *Bactris gasipaes* (Steinmacher et al., 2012).

O teste com corante vermelho de rutênio confirmou que essas substâncias polissacarídicas correspondiam a pectinas. Reação positiva ao corante vermelho de rutênio foi observada em aglomerados de células embriogênicas de banana, evidenciando a presença de substâncias pécticas (Xu et al. 2011). O uso de anticorpos monoclonais específicos identificaram polímeros de pectina em cultura embriogênicas de *Cocos nucifera* (Verdeil et al., 2001), *Actinidia deliciosa* (Popielarska-Konieczna et al., 2008), *Musa* ssp.(Xu et al., 2011) e *Trifolium nigrescens* Viv. (Pilarska et al., 2013), sugerindo a relação dessas substâncias com a aquisição da competência embriogênica até o início do estádio globular.

Diante dos resultados obtidos, sugere-se que compostos dessa natureza podem ser considerados como marcadores celulares para a aquisição da competência embriogênica em macaúba.

A etapa de regeneração dos embriões somáticos foi caracterizada pela troca e redução da concentração de auxina sintética no meio de cultura (redução em 180 vezes) sendo mantida a concentração de Putrescina utilizada na fase de multiplicação, além da suplementação com carvão ativado.

Em dendê (*Elaeis guineensis* Jacq.), foi evidenciada a importância do uso da Putrescina e da redução da concentração de auxina entre as fases de multiplicação e regeneração dos embriões somáticos (Carvalho, 2009 e Corrêa, 2014). No processo de embriogênese somática de dendê, cultivar Tenera, embriões somáticos foram continuamente

regenerados em meio de maturação composto por 0,1 mg L^{-1} de 2,4-D, 0,16 g L^{-1} de Putrescina e carvão ativado (Thuzar et al., 2011).

O carvão ativado é frequentemente adicionado ao meio a fim de adsorver e minimizar a toxicidade do regulador de crescimento ou de substâncias com efeitos deletérios, como os compostos fenólicos (Sáenz et al., 2010; Guedes et al., 2011).

Em trabalho com *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, Paim Pinto et al. (2011) afirmaram que a adição de carvão ativado no meio de maturação foi essencial para a diferenciação dos embriões somáticos. Silva et al. (2013) também observaram completa formação dos embriões somáticos, em meio de maturação contendo carvão ativado.

A germinação dos embriões somáticos se deu em meio de cultura suplementado com carvão ativado, ANA e Putrescina, o que resultou na conversão de dezenas de plântulas com desenvolvimento de parte aérea e raízes. Carvalho (2009) e Corrêa (2014) obtiveram a formação de plântulas completas de dendê utilizando o ANA e Putrescina no meio de germinação nas mesmas concentrações utilizadas no presente trabalho.

A obtenção contínua de linhagens embriogênicas e subsequente regeneração de embriões somáticos bem como a conversão dos mesmos em plântulas completas, indicam o potencial do protocolo aqui apresentado.

5. Conclusões

- O presente trabalho demonstrou avanços em estudos de embriogênese somática de macaúba (*Acrocomia aculeata*) por apresentar a primeira descrição da obtenção e manutenção de linhagens embriogênicas a partir de tecidos foliares de macaúba.

- A auxina Picloram demonstrou ser eficiente na indução de calos nodulares embriogênicos.

- O genótipo e o estádio fisiológico dos explantes podem interferir na reposta morfogênica *in vitro*.

- O uso do Picloram em combinação com Putrescina (18,0 e 1.000 μM respectivamente) favoreceu a formação de linhagens embriogênicas e a manutenção das mesmas em processo cíclico de multiplicação por mais de um ano.

- Análises histológicas e histoquímicas dos calos e linhagens, evidenciaram características típicas do processo de embriogênese somática, como a presença de células em intenso processo de divisão celular, formação de centros meristemáticos no interior dos calos, presença de pectina na camada de células colapsadas delimitando os calos e na parede celular (com aparente espessamento) das células dos pró-embriões.

- A regeneração e germinação de embriões somáticos de *A. aculeata* ocorre após a redução da concentração de auxina no meio de cultura na presença de Putrescina e carvão ativado.

6. Referências Bibliográficas

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*) – a promising plant for biodiesel production. **Australian Journal of Botany**. 59:149-155, 2011.

ALCÁZAR, R.; ALTABELLA, T.; MARCO, F.; BORTOLOTTI, C.; REYMOND, M.; KONCZ, C.; CARRASCO, P.; TIBURCIO, A. F. Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. **Planta**. 231:1237-1249, 2010.

BALZON, T. A.; LUIS, Z. G.; SHERWINSKI-PEREIRA, J. E. New approaches to improve the efficiency of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) from mature zygotic embryos. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**. 49:41-50, 2013.

BORA, P. S.; ROCHA, ROSALYND, V. M. **Macaíba Palm: Fatty and amino acids composition of fruits**. Ciencia y tecnologia alimentaria, galicia, Espanha. 4:158-162, 2004.

BROOKS, W. H; Le DANTEC, C.; PERS, J. O.; YOUINOU, P.; RENAUDINEAU, Y. Epigenetics and autoimmunity. **Journal of Autoimmunity**. 34:207-219, 2010.

BUFFARD-MOREL, J.; VERDEIL, J. L.; PANNETIER, C. Embryogènese somatique du cocotier (*Cocos nucifera* L.) à partir d'explants foliaires: études histologiques. **Canadian Journal of Botany**. 70: 735-741, 1992.

CARVALHO, M. **Embriogênese somática a partir de folhas imaturas e flores desenvolvidas *in vitro* de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.)** 2009. 73f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

CHAPMAN, A.; BLERVACQ, A.-S.; HENDRIKS, 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.

CHEHMALEE, S.; TE-CHATO, S. Induction of somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured zygotic embryo of oil palm. **Journal of Agricultural Technology**. 4: 137-146, 2008.

CHOL Ha, H; YANGER, J. M. D.; WOSTER, P. A.; CASERO, R. A. Structural specificity of polyamine analogues in the protection of DNA from strand breaks induced by reactive oxygen species. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 244:298-303, 1998.

CHUGH, A.; KHURANA, P. Gene expression during somatic embryogenesis- recent advances. **Current Science**. 83:715-730, 2002.

CORRÊA, T. R. **Clonagem e controle genético da embriogênese somática em palma de óleo (***Elaeis guineensis* **Jacq.)** 2014. 57f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.

CRUZ, C. D. GENES, a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**. Agronomy, Maringá. 35:271-276, 2013. doi 10.4025/actasciagron. V35i3.21251

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.

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.

FEDER, N.; O'BRIEN, T. P. Plant microtecnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany**. 55:123-142, 1968.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T.P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 74:201-228, 2003.

FERNANDO, S. C.; VERDEIL, J. L.; 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.

FORTES, I. C. P. & BAUGH, P. J. **Study of analytical on-line pyrolyses of oils from macauba fruit (*Acrocomia sclerocarpa* M)** via GC/MS. Journal of the Brazilian Chemical Society, Campinas. 10:469-477, 1999.

GEORGE, E. F., HALL, M. A., DE KLERK, G. J. Plant propagation by tissue culture. 3rd Edition. Vol. 1 The Background. **Springer**. 2008. 501p.

GUEDES, R. S.; SILVA, T. L.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Initial requirements for embryogenic calluses initiation in thin cell layers explants from immature female oil palm inflorescences. **African Journal of Biotechnology**. 10:10774-10780, 2011.

GUERRA, M. P.; HANDRO W. Somatic embryogenesis and plant regeneration in different organs of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae): Control and structural features. **Journal of Plant Research**. 111: 65–71, 1998.

GUEYE, B.; MORCILLO, F.; COLLIN, M.; GARGANI, D.; OVERVOORDE, P.; ABERLENC-BERTOSSI, F.; TRANBARGER, T. J.; SANE, D.; TREGEAR, J. W.; BORGEL, A.; VERDEIL, J. L. Acquisition of callogenic capacity in date palm leaf tissues in response to 2,4-D treatment. **Plant Cell, Tissue ad Organ Culture**. 99:35–45, 2009.

HENRY, Y.; VAIN, P.; DE BUYSER, J. Genetic analysis of *in vitro* plant tissue culture responses and regeneration capacities. **Euphytica**. 79: 45-58, 1994.

HIANE, P. A., MACEDO, M. L. R., SILVA, G. M., NETO, J. A. B. **Avaliação nutricional da proteína de amêndoas de bocaiúva, *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd., em ratos wistar em crescimento**. Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimento, Curitiba. 24:191-206, 2006.

HUONG, L. T. L., BAIOCCO, M., HUY, B. P., MEZZETTI, B., SANTILOCCHI, R., ROSATI, P. Somatic embryogenesis in Canary Island date palm. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 56:1-7, 1999.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. (McGraw-Hill Books: New York), 1940.

KANCHANAPOOM, K., DOMYOAS, P. The origin and development of embryoids in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq) embryo culture. **Science Asia**. 25: 195-202, 1999.

KARUN, A.; SIRIL, E. A.; RADHA, E.; PARTHASARATHY, V. A. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from leaf and inflorescence explants of arecanut (*Areca catechu* L.). **Current Science**. 86:1623-1628, 2004.

LEDO, A. S., LAMEIRA, O. A., BENBADIS, A. K., MENEZES, I. C., OLIVEIRA, M. S. P., MEDEIROS-FILHO, S. Somatic embryogenesis from zygotic embryos of *Euterpe oleraceae* Mart. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 24: 601-603, 2002.

LORENZI, G. M. A. C**. *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. – Arecaceae: bases para o extrativismo sustentável.** Curitiba, 2006, 156p. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

MOTOIKE, S. Y.; KUKI, K. N. 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.; 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**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2013, 61p.

MOURA, E. F.; VENTRELLA, M. C.; MOTOIKE, S. Y.; SÁ JÚNIOR, A. Q.; CARVALHO, M.; MANFIO, C. E. Histological study of somatic embryogenesis induction on zygotic embryos of macaw palm (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. Ex Martius). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 95: 175-184. 2008.

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

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.

NUGROHO, Y. A.; SUMERTAJAYA, I. M.; WIENDI, N. M. A.; TORUAN-MATHIUS, N. Estimation of genetic parameters for *in vitro* culture traits and selection best progenies for Tenera oil palm tissue culture. **Energy Procedia**. 4: 316 – 322, 2014.

O'BRIEN, T. P., McCULLY, M. E. **The study of plant structure: principles and selected methods**. Melburne- Australia: Termarcarphy Pty Ltd., 45p., 1981.

OLIVEIRA, J., POTIGUARA, R. C. V., LOBATO, L. C. B. **Fibras vegetais utilizadas na pesca artesanal na microrregião do Salgado, Pará**. Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Humanas. 1:113-127. 2006.

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

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.

PILARSKA, M.; KNOX, J. P.; KONIECZNY, R. Arabinogalactan-protein and pectin epitopes in relation to an extracellular matrix surface network and somatic embryogenesis and callogenesis in *Trifolium nigrescens* Viv. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 115: 35-44, 2013.

POPIELARSKA-KONIECZNA, M.; KOZIERADZKA-KISZKURNO, M.; SWIERCZYNSKA, J.; GORALSKI, G.; SLESAK, H.; BOHDANOWICZ, J. Ultrastructure and histochemical analysis of extracellular matrix surface network in kiwifruit endosperm-derived callus culture. **Plant Cell Reports**. 27: 1137-1145, 2008.

RAJESH, M. K., RADHA, E., KARUN, A., PARTHASARATHY, V. A. Plant regeneration from embryo-derived callus of oil palm – the effect of exogenous polyamines. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 75: 41-47. 2003.

SÁENZ, L., AZPEITIA, A., CHUC-ARMENDARIZ, B., CHAN, J. L., VERDEIL, J. L., HOCHER, V., OROPEZA, C. Mophological and histological changes during somatic embryo formation from coconut plumule explants. **In Vitro Cell Development Biology Plants**. 42: 19-25, 2006.

SAÉNZ, L.; HERRERA-HERRERA, G.; UICAB-BALLOTE, F.; CHAN, J. L.; OROPEZA, C. Influence of form of activated charcoal on embryogenic callus formation in coconut (*Cocos nucifera*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 100:301-308, 2010.

ŠAMAJ, J.; BOBÁK, M.; KRIŠTIN, J.; AUXTOVÁ- ŠAMAJOVÁ, O. Developmental SEM observations on an extracellular matrix in embryogenic calli of *Drosera rotundifolia* and *Zea mays.* **Protoplasma**. 186:45-49, 1995.

SANÉ, D. ABERLENC-BERTOSSI, F.; GASSAMA-DIA, Y. K.; SAGNA, M.; TROUSLOT, M. F.; DUVAL, Y.; BORGEL, A. Histocytological analysis of callogenesis and somatic embryogenesis from cell suspensions of date palm (*Phoenix dactylifera*). **Annals of Botany**. 98:301-308, 2006.

SCARIOT, A. O., LLERAS, E., HAY, J. D. Reproductive biology of the palm *Acrocomia aculeata* in Central Brazil. **Biotropica**. 23: 12-22. 1991.

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.

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.

SCHWENDIMAN, J.; PANNETIER, C.; MICHAUX-FERRIERE, N. Histology of somatic embryogenesis from leaf explants of the oil palm *Elaeis guineensis*. **Annals of Botany**. 63: 43-52, 1988.

SILVA, R. C.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Differential responses to somatic embryogenesis of different genotypes of Brazilian oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 111: 59–67, 2012.

SILVA, R. de C.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. The histodifferentiation events involved during the acquisition and development of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Plant Growth Regulation**. 2013. doi: 10.1007/s10725-013-9837-0.

STEINMACHER, D. A.; CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; CLEMENT, C. R.; GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis from peach palm zygotic embryos. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**. 43:124-132, 2007a.

STEINMACHER, D. A.; KROHN, N. G.; DANTAS, A. C. M.; STEFENON, V. M.; CLEMENT, C. R.; GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis in peach palm using the thin cell layer technique: induction, morpho-histological aspects and AFLP analysis of somaclonal variation. **Annals of Botany**. 100:699-709, 2007b.

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

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.

TABAI, S. A. **Propagação da palmeira macaúba *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Loddiges. através de métodos "*in vitro*".** 1992. 121p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 1992.

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

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

THUZAR, M.; VANAVICHIT, A.; TRAGOONRUNG, S.; JANTASURIYARAT, C. Efficient and rapid plant regeneration of oil palm zygotic embryos cv. "Tenera" through somatic embryogenesis. **Acta Physiologiae Plantarum**. 33:123-128, 2011.

VERDEIL, J.L.; HOCHER, V.; HUET, C.; GROSDEMANGE, 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.

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.

XU, C.; ZHAO, L.; PAN, X.; ŠAMAJ, J. Developmental localization and methylesterification of pectin epitopes during somatic embryogenesis of banana (*Musa ssp.* AAA). **PLoS ONE 6**:e22992, 2011.

CAPÍTULO 2

Estudo da variabilidade genética na indução de calogênese em acessos de macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lood. ex Mart.) cultivados *in vitro*.

RESUMO

ANDRADE, Ana Paula de Souza, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2014. **Estudo da variabilidade genética na indução de calogênese em acessos de macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lood. ex Mart.) cultivados *in vitro*.** Orientador: Sérgio Yoshimitsu Motoike. Coorientadores: Edgard Augusto Toledo Picoli e Marcos Deon Vilela de Resende.

A macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lood. ex Mart.), é uma palmácea com grande potencial para a produção de óleo, mas essa produção depende do seu cultivo em escala comercial. A embriogênese somática via cultura de tecidos apresenta-se como alternativa viável para a clonagem de plantas matrizes. A indução de embriões somáticos não depende apenas das condições de cultivo, mas também do genótipo, considerado um dos fatores mais relevantes. O estudo do efeito do genótipo no sucesso da embriogênese somática é importante para a compreensão dos fatores genéticos que influenciam a resposta *in vitro* é de grande importância por auxiliar na seleção de genótipos com capacidade superior de regeneração, contribuindo para os programas de melhoramento genético e clonagem da macaúba. No presente trabalho objetivou-se avaliar a variabilidade genética e obter informações sobre o controle genético de características relacionadas à fase de indução da embriogênese somática. Após dez dias de indução em meio Y3 acrescido de 18,0 μM de Picloram, os explantes foliares foram avaliados quanto à contaminação por bactérias e fungos e aos 60 dias, quanto à formação de calos e oxidação. A estimativa de herdabilidade para contaminação com bactérias foi de 0,0637 e de 0,0202 para contaminação com fungo, revelando que essas características foram altamente influenciadas pelo ambiente e não responderão à seleção. Para calogênese e oxidação, as estimativas de herdabilidade foram de 0,7093 e 0,5789 respectivamente, revelando um alto controle genético. O método de seleção pelo índice de *rank* médio permitiu selecionar indivíduos mais equilibrados em termos de valores favoráveis das características estudadas. O agrupamento pelo método de Tocher elucidou a formação de três grupos distintos quanto a essas características, sendo o Grupo I o mais numeroso, formado por quatorze indivíduos, sendo dez procedentes do estado de Minas Gerais, dois do estado de São Paulo e dois do estado do Mato Grosso do Sul. Os resultados obtidos indicam que existe variabilidade genética passível de exploração nos programas de melhoramento para capacidade de clonagem da macaúba.

ABSTRACT

ANDRADE, Ana Paula de Souza, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2014. **Study of the genetic variability in the callogenesis induction in accesses of Macaw Palm (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lood. ex Mart.) cultivated *in vitro*.** Adviser: Sérgio Yoshimitsu Motoike. Co-Advisers: Edgard Augusto Toledo Picoli and Marcos Deon Vilela de Resende.

The Macaw Palm (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lood. ex Mart.), is a palm with a great potential for oil production, but that production depends on its cultivar at commercial scale. The somatic embryogenesis via tissue culture is presented as a very viable choice to clone matrix plants. The induction of somatic embryos does not depend only on the cultivar conditions, as it depends also on the genotype, being considered as one of the more relevant factors. The study of the genotype effect in the somatic embryogenesis success is important to comprehend the genetic factors that influence the *in vitro* response is of great importance to help in the selection of genotypes with superior regeneration capacity, contributing to plant breeding programs and macaw palm cloning. In the present work, the objective was to evaluate the genetic variability and obtain information about genetic control of the related characteristics to the induction phase of somatic embryogenesis. After 10 days of induction in Y3 medium supplemented with 18,0 μM of Picloram, the leaf explants were evaluated for bacteria and fungus contamination and at 60 days, for callus formation and oxidation. The heritability estimations for bacteria contamination was 0,0637 and 0,0202 for fungus contamination, revealing that those characteristics were highly influenced by the environment and will not respond to selection. For callogenesis and oxidation, the heritability estimations were 0,7093 and 0,5789 respectively, revealing a high genetic control. The selection method by the Index Average *Rank* permitted to select individuals more equilibrated in terms of favorable values of the studied characteristics. The grouping by the Tocher method showed the formation of three different groups for those characteristics, being Group I the biggest in number, formed by fourteen individuals, being ten from the state Minas Gerais, two from the state of Sao Paulo and two from the state of Mato Grosso do Sul. The obtained results indicate that exists a genetic variability liable to exploration in the plant breeding programs for cloning capacity in Macaw Palm.

1. Introdução

A macaúba, *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lood. Ex Martius (Arecaceae), nativa da América do Sul, é considerada como a palmeira de grande dispersão no Brasil com ocorrência de populações naturais em praticamente todo o território brasileiro, constituindo-se espécie típica do estado de Minas Gerais (Bondar, 1964; Tabai, 1992).

Em se tratando da palmeira macaúba, cada parte da planta tem uma importância destacada, mas o fruto é considerado o mais representativo devido, principalmente, ao aproveitamento do óleo que pode ser extraído do mesocarpo, com excelente qualidade para produção de biocombustíveis (Bora e Rocha, 2004; Hiane *et al*., 2006), ou da amêndoa, que pode ser utilizado na indústria de cosméticos (Fortes e Baugh, 1999; Bora e Rocha, 2004).

A exploração racional da macaúba torna-se bastante atrativa, por se tratar de uma espécie perene, adaptada às condições climáticas adversas e com ampla possibilidade de aproveitamento, principalmente no que tange à produção de biodiesel e bioquerosene a partir do óleo extraído da polpa dos frutos.

Uma das soluções para a exploração racional da macaúba seria a clonagem de matrizes elites via embriogênese somática, um processo de regeneração composto por diferentes etapas, que possibilita a propagação em larga escala desta espécie via cultura de tecidos vegetais.

Em condições *in vitro*, praticamente qualquer célula viva com núcleo, pode, após um período de desdiferenciação, iniciar o processo de proliferação na forma de calo, brotos, raízes ou de embriões somáticos (Ezhova, 2003). Isso se deve ao fato de que as células vegetais podem exibir diferentes aspectos do seu potencial genético em diferentes momentos se estimuladas de forma adequada (Silva et al. 2012). A capacidade da célula vegetal de regenerar organismos inteiros, idênticos à matriz doadora sob condições físicas e nutricionais adequadas é conhecida como totipotência (Ezhova, 2003; Verdeil et al., 2007; Silva et al., 2012).

O processo indireto da embriogênese somática inicia-se com a formação de calo seguido pela diferenciação dos embriões, maturação e regeneração das plantas (Zimmerman, 1993; Arnold et al., 2002).

Fatores como o genótipo do material doador, estado fisiológico do explante, tipo e a concentração de reguladores de crescimento no meio de cultura, afetam a indução da embriogênese somática (Henry et al., 1994; Fuentes et al., 2000; Namasivayam, 2007; Silva et al., 2012). Brown et al. (1995) relatam que o genótipo do material doador é um dos fatores

mais importantes que afetam as respostas morfogênicas *in vitro*. Diferenças genéticas existentes dentro de uma mesma espécie podem resultar na variabilidade da competência *in vitro* (Henry et al., 1994).

Compreender os fatores genéticos que afetam a resposta *in vitro* poderá fornecer informações para o desenvolvimento e seleção de materiais elite com capacidade superior de regeneração, contribuindo para o avanço dos programas de melhoramento genético e clonagem da palmeira macaúba.

O objetivo deste trabalho foi estudar a variabilidade genética entre indivíduos de dez acessos macaúba e obter informações sobre o controle genético de características relacionadas à fase de indução da embriogênese somática identificando aqueles que apresentem a melhor combinação para características relativas à fase de indução de calos a partir de explantes foliares jovens cultivados *in vitro*.

2. Material e métodos

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Células e Tecidos Vegetais, do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa em Minas Gerais.

Foram avaliados vinte indivíduos obtidos de dez acessos de macaúba, com aproximadamente dois anos de idade, oriundos dos seguintes locais: A1 e A2: Três Marias-MG; A3 e A4: Lavras-MG; A5 e A6: São João Del Rei-MG; A7 e A8: Montes Claros-MG; A9 e A10: Luz-MG; A11 e A12: Santa Luzia-MG; A13 e A14: Descalvado-SP; A15 e A16: São Carlos-SP; A17 e A18: São José do Rio Pardo-SP; A19 e A20: Campo Grande-MS. A escolha das mesmas foi aleatória atendendo o critério de disponibilidade na época de realização do trabalho

Folhas imaturas foram submetidas à desinfestação em solução asséptica (1 % de hipoclorito de sódio) durante 10 minutos e enxaguadas oito vezes com água destilada estéril em câmara de fluxo laminar. Em seguida foram seccionadas transversalmente em segmentos de 1 cm e inoculadas em placas de poliestireno (90 x 15 mm) contendo 30 mL de meio de cultura basal composto por sais e vitaminas Y3 (Eeuwens, 1978), 30 g L^{-1} de sacarose, 1 g L^{-1} de caseína hidrolisada, 100 mg L^{-1} de mio-inositol, 100 mg L^{-1} de arginina, 100 mg L^{-1} de asparagina, 100 mg L^{-1} de glutamina, gelificados com 2,5 g L^{-1} de Phytagel® (Sigma, USA). O pH foi ajustado para 5,7 ± 0,1 antes de serem autoclavados por 20 minutos a 121 ºC e 1,5 atm.

Com base em testes preliminares, utilizou-se a concentração de 18,0 μM da auxina Picloram para indução de calos. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, com 10 repetições, sendo cada repetição composta por uma placa de Petri com cinco explantes.

Após a inoculação dos explantes, as placas foram seladas com filme PVC (Rolopac®) e mantidas em sala de crescimento, à temperatura de 27 ± 1 °C na ausência de luz. Após dez dias de cultivo procedeu-se a avaliação quanto à presença de contaminantes: número de explantes contaminados com bactéria (CBAC) e fungo (CFUN). Aos 60 dias as características avaliadas foram: número de explantes calejados (CAL) (Figura 1A) e oxidados, atribuindo-se notas da seguinte forma: nota 1 para os explantes que apresentaram as bordas e aproximadamente 20 % da superfície oxidada (Figura 1B); nota 2 para os explantes com bordas e 20 % a 80 % da superfície oxidada (Figura 1C) e nota 3 para aqueles com as bordas e mais de 80 % da superfície oxidada (Figura 1D).

Os dados foram analisados por meio da metodologia de modelos mistos, procedimento REML (Máxima Verossimilhança restrita) /BLUP (Melhor Predição Linear não Viesada) (Resende, 2007), segundo o seguinte modelo.

Modelo:

$y = Xb + Zg + e$, em que:

y, b, g, e : vetores de dados, de efeitos fixos (média geral), de efeitos genotípicos totais (aleatórios) e de erros aleatórios, respectivamente.

X e Z : matrizes de incidência para b e g , respectivamente.

Equações de Modelo Misto:

$$\begin{bmatrix} X'X & X'Z \\ Z'X & Z'Z + A^{-1}\left((1-h^2)/h^2\right) \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \hat{b} \\ \hat{g} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} X'y \\ Z'y \end{bmatrix}$$

$h^2 = \hat{\sigma}_g^2 / (\hat{\sigma}_g^2 + \hat{\sigma}_e^2)$: herdabilidade individual no sentido amplo.

Estimadores dos Componentes de Variância via Algoritmo EM

$\hat{\sigma}_e^2 = [y'y - \hat{b}'X'y - \hat{g}'Z'y] / [N - r(X)]$

$\hat{\sigma}_g^2 = \left[\hat{g}'A^{-1}\hat{g} + \sigma_e^2 \; tr \; C^{22}\right] / N_g$, em que:

r(X): posto ou número de colunas linearmente independentes de X.

C^{22} é da forma $\begin{bmatrix} C^{11} & C^{12} \\ C^{21} & C^{22} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} X'X & X'Z \\ Z'X & Z'Z + A^{-1}(\sigma_e^2 / \sigma_g^2) \end{bmatrix}^{-1}$.

N_g: número de elementos aleatórios (indivíduos).
A: matriz de parentesco genético aditivo.
tr: operador traço matricial, dado pela soma dos elementos da diagonal da matriz.
N: número total de dados.

Os valores genotípicos preditos foram usados para calcular o índice de seleção, com base na média de *ranks* (Mulamba e Mock, 1978), bem como na realização da análise multivariada para cômputo de distâncias genéticas entre os genótipos e agrupamento pelo método de Tocher.

Foi utilizado o software Selegen-Reml/Blup (Resende, 2007) para realização das análises estatísticas.

3. Resultados e discussão

A cultura de tecidos através da embriogênese somática é uma alternativa atrativa para a propagação em massa de genótipos de macaúba, contudo, a eficiência de resposta *in vitro* está fortemente associada às condições de cultivo, tais como os reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura, mas também aos genótipos utilizados como fonte de explante (Jiménez, 2001).

A compreensão dos fatores genéticos relacionados ao processo de indução da embriogênese somática é importante, pois auxilia na seleção de genótipos mais responsivos à regeneração *in vitro*.

Um dos parâmetros genéticos de elevada importância nos estudos de melhoramento de plantas é o coeficiente de variação relativa (CVr). O CVr pode ser empregado como um índice indicativo do grau de facilidade de seleção de genótipos com base nos caracteres avaliados. Quando a razão estimada for igual ou maior que 1,0, tem-se situação favorável ao processo de seleção, uma vez que reflete uma maior proporção de variabilidade genotípica em relação a ambiental (Vencovsky e Barriga, 1992; Yokomizo e Farias Neto, 2003).

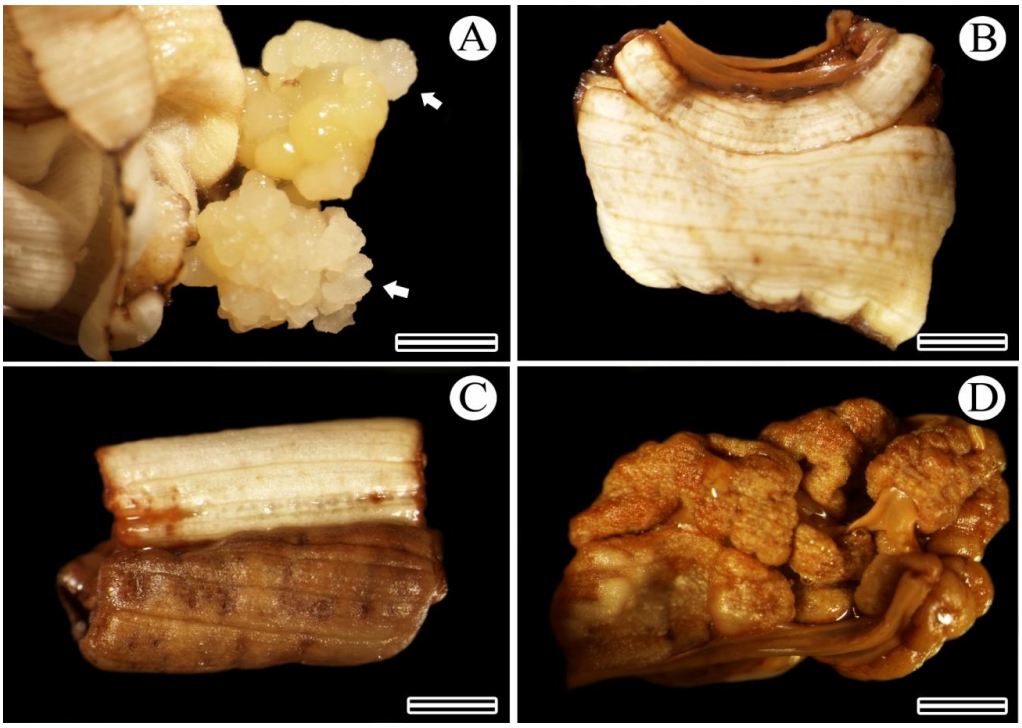

Figura 1. Resposta morfogênica dos explantes foliares de macaúba (*Acrocomia aculeata*) após 60 dias de cultivo *in vitro*. (A) Calogênese em explante cultivado em meio Y3 acrescido de 18,0 µM de Picloram (setas brancas indicam o calo embriogênico). (B) Explante com bordas e aproximadamente 20 % da superfície oxidados. (C) Explante com bordas e 20 % a 80 % da superfície oxidados. (D) Explante com bordas e mais de 80 % da superfície oxidados. Barras: A = 2 mm; B, C e D = 3 mm.

Os resultados obtidos para as características avaliadas indicam a presença de variabilidade genética entre os indivíduos estudados. Para as características CBAC e CFUN foram encontrados valores de coeficiente de variação relativa abaixo da unidade (0,2610 e 0,1435 respectivamente), e para as características CAL e OXI os valores foram superiores a unidade (1,5622 e 1,1725 respectivamente), indicando a presença de maior variação genética disponível para a seleção de genótipos promissores ao cultivo *in vitro* com base nessas duas características (Tabela 1).

As características CBAC e CFUN apresentaram baixos valores de média (0,0450 e 0,2850) indicando que a metodologia utilizada no isolamento e desinfestação dos explantes mostraram-se eficientes. Assim como os valores de média, a herdabilidade individual no sentido amplo (h^2_g) foi baixa para CBAC (0,0637) e CFUN (0,0202), revelando que essas características foram altamente influenciadas pelo ambiente (Tabela 1) e não responderão à seleção. Esse resultado era esperado, visto que a presença de contaminantes biológicos no cultivo *in vitro*, se deve muitas vezes à falta de habilidade para o estabelecimento de culturas assépticas (Cassells, 2000) ou por introdução de materiais contaminados com microrganismos endofíticos ou resistentes ao processo de desinfestação (Herman, 1990; Cassells, 2000).

Tabela 1. Estimativas de parâmetros genéticos obtidos da análise de 20 indivíduos de macaúba, após 10 e 60 dias de cultivo *in vitro*, para indução de calos embriogênicos, em relação às características contaminação com bactéria (CBAC) e fungo (CFUN), explantes calejados (CAL) explantes oxidados (OXI).

Parâmetros	CBAC	CFUN	CAL	OXI
Vg	0,0028	0,0208	0,0542	0,1092
Ve	0,0406	1,0091	0,0222	0,0794
Vf	0,0433	1,0299	0,0764	0,1886
CVr	0,2610	0,1435	1,5622	1,1725
h^2g	0,0637 ± 0,0505	0,0201 ± 0,0284	0,7093 ± 0,1827	0,5789 ± 0,1651
Acurácia	0,2525	0,1421	0,9515	0,9346
h^2mc	0,0638	0,0202	0,9053	0,8735
M	0,0450	0,2850	0,1915	1,5160

Vg: variância genotípica entre indivíduos; Ve: variância residual; Vf: variância fenotípica individual; CVr: coeficiente de variação relativa; h^2_g: herdabilidade de plantas individuais no sentido amplo; h2mc: herdabilidade no sentido amplo ao nível de médias de clones; M: média geral do experimento.

Para CAL e OXI a herdabilidade foi elevada (0,7093 e 0,5789 respectivamente), o que caracteriza elevado controle genético dessas características e a grande possibilidade de serem transmitidas para gerações futuras no contexto de programas de melhoramento genético (Tabela1).

Estimativas de herdabilidade foram obtidas para diferentes características avaliadas durante o processo de regeneração *in vitro* de girassol. Os valores obtidos variaram de 0,45 a 0,74 sendo que para o percentual de explantes calejados o valor da herdabilidade foi de 0,57 (Nestares et al., 2002), o qual é condizente com aquele obtido no presente estudo.

Em estudo do controle genético da regeneração *in vitro* de *Eucalyptus grandis*, os autores obtiveram elevada herdabilidade no sentido restrito entre as médias das unidades (0,94) indicando forte controle genético na regeração *in vitro* dentro da população (Bravo et al., 2008). As herdabilidades ao nível de médias de clone do presente estudo foram também de magnitudes similares equivalendo a valores em torno de 0,90 para CAL e OXI.

Estudo de análise genética da resposta *in vitro* de quatro cultivares de berinjela, revelou valor de herdabilidade no sentido amplo de 0,42 para calogênese total e de 0,92 para frequência de calos embriogênicos sugerindo que estas características podem ser facilmente transferidas para cultivares de importância econômica, mas recalcitrantes ao processo de regeneração (Chakravarthi et al., 2010).

Elevadas estimativas de herdabilidade no sentido amplo foram obtidas para percentuais de calogênese e de calos embriogênicos (0,49 e 0,77 respectivamente) a partir de

explantes foliares de dendê (*Elaeis guineensis* Jacq.). Apesar dessas características não apresentarem correlação genotípica (rg = 0,09ns), os autores afirmaram que elas podem ser utilizadas com intuito de selecionar progênies mais responsivas (Nugroho et al. 2014). De acordo com Paranjothy et al. (1989) os genótipos que iniciam o processo de calogênese mais rapidamente terão maiores chances de formar culturas embriogênicas. Esse fato corrobora a importância de estudos genéticos com a variável CAL.

O método utilizado na estimação ou predição dos valores genotípicos deve propiciar a inferência mais precisa e realista possível, e para tanto, a acurácia seletiva mostra-se como parâmetro de grande importância (Henderson, 1984). Este parâmetro refere-se à correlação entre os valores genéticos preditos e os valores genéticos verdadeiros dos indivíduos (Resende e Duarte, 2007).

Os valores obtidos de acurácia seletiva para as características CAL e OXI foram elevados (acima de 0,9) os quais refletem maior confiança na avaliação e precisa inferência do valor genotípico predito dos indivíduos (Tabela 1).

A precisão experimental em estudo da calogênese em segmentos caulinares apicais e internodais de *Satureja hortensis* foi medida através da acurácia seletiva. Valor moderado de acurácia (0,66) foi obtido para calos rizogênicos e alta a muito alta (0,85 – 0,93) para calos friáveis (Navroski et al., 2012).

Devido à presença de variabilidade genética e da importância da variável CAL para o presente estudo, obtiveram-se os valores genotípicos (u + g) dos vinte indivíduos para tal característica (Tabela 2).

Os indivíduos A16 e A15, do município de São Carlos/SP, ocuparam as posições 1 e 2 no ranking, com valores genotípicos iguais a 0,7184 e 0,6460 respectivamente, os quais retratam porcentagens altas de calogênese. As duas últimas posições foram ocupadas pelos indivíduos A12 e A11, ambos do município de Santa Luzia/MG. Verifica-se que dos vinte, apenas os sete primeiros indivíduos apresentaram valores genotípicos superiores à média geral (Tabela 2). Observa-se ainda que, os valores genotípicos são bem próximos dos valores das médias fenotípicas, conforme esperado dadas as altas herdabilidades ao nível de médias de clone e baixas influências ambientais sobre esse caractere.

A especificidade genotípica durante o processo de indução da embriogênese somática tem sido relatada para algumas espécies de palmáceas, mas até o momento, o controle genético das características avaliadas durante esse processo não foi relatado para a macaúba.

Tabela 2. Ordenamento dos 20 indivíduos de macaúba com base nos valores genotípicos preditos (u + g) e médias fenotípicas para o caráter número de explantes calejados, após 60 dias de cultivo *in vitro*.

Ordem	Indivíduo	u + g	Média Fenotípica
1	A16	0,7184	0,7400
2	A15	0,6460	0,6667
3	A18	0,5610	0,5778
4	A17	0,4694	0,4857
5	A19	0,2805	0,2857
6	A20	0,2234	0,2250
7	A7	0,1996	0,2000
8	A13	0,1805	0,1800
9	A6	0,1523	0,1500
10	A2	0,0916	0,0857
11	A14	0,0652	0,0600
12	A5	0,0569	0,0500
13	A3	0,0508	0,0444
14	A1	0,0434	0,0333
15	A8	0,0296	0,0222
16	A10	0,0268	0,0200
17	A4	0,0106	0,0000
18	A9	0,0083	0,0000
19	A12	0,0083	0,0000
20	A11	0,0075	0,0000

Os sete primeiros indivíduos (marcados de cinza) correspondem aqueles que apresentaram valores genotípicos preditos (u + g) superiores à média geral (u = 0,1915).

De acordo com Soh et al. (2011), a indução e a taxa de crescimento de calos de *E. guineensis* é lenta em comparação com outras espécies, e as respostas entre os diferentes genótipos são comuns mesmo em condições semelhantes de cultivo.

Silva et al. (2012) também observaram diferentes respostas em termos de formação de calo ao avaliarem genótipos comerciais de *E. guineensis*. Os resultados mostraram que dos nove genótipos testados por esses pesquisadores, dois tiveram maior potencial para formação de calos embriogênicos.

Para a palmeira *Phoenix dactylifera L.*, produtora de tâmaras, o genótipo também é um fator relevante para o processo de indução de calos, tendo em vista a comparação da capacidade calogênica entre quatro cultivares (Sané, 2012).

Utilizando o índice de média de *ranks* de Mulamba e Mock (1978), os indivíduos foram classificados em relação aos caracteres CAL e OXI em ordem favorável de melhoramento (Tabela 3).

Quanto à oxidação, os genótipos que ocuparam as duas últimas posições, foram os indivíduos A9 e A10, ambos do município de Luz/MG, indicando que eles são mais suscetíveis à oxidação fenólica.

A oxidação de compostos fenólicos liberados pelo tecido injuriado pode dificultar o estabelecimento inicial do cultivo *in vitro*, uma vez que algumas enzimas oxidam compostos fenólicos levando à formação de quinonas, as quais são responsáveis pela coloração marrom das culturas, além de causarem a inibição do crescimento e até mesmo a morte dos explantes em grande número de espécies (Monaco et al., 1977).

De acordo com Teixeira (2001), a oxidação fenólica é altamente dependente do tipo de explante e do genótipo utilizado.

Com base nos critérios estabelecidos para os dois caracteres, a média de *ranks* variou de 3,0 a 19,0 para os indivíduos A18 (São José do Rio Pardo/SP) e A9 (Luz/MG), respectivamente. O menor valor indica uma combinação mais favorável entre os caracteres estabelecidos e o maior valor uma combinação desfavorável. Pode-se verificar que dos sete acessos que apresentaram valores genotípicos superiores à média quanto à capacidade calogênica (Tabela 2), seis estão entre os melhores classificados de acordo com o índice (marcados de cinza, Tabela 3) sendo estes em ordem crescente da média de *ranks*: A18 (São José do Rio Pardo/SP), A15, A16 (São Carlos/SP), A20 (Campo Grande/MS), A5 (São João Del Rei-MG), A17 (São José do Rio Pardo) e A7 (Montes Claros/MG). O indivíduo A5 apesar de apresentar valor genotípico para calogênese abaixo da média (Tabela 3) ocupou a quinta posição com base no índice de média de *ranks*. Isto é devido à sua melhor classificação quanto ao caractere oxidação.

Os resultados do presente trabalho sugerem que a seleção de genótipos com capacidade calogênica superior e menor suscetibilidade à oxidação (como àqueles pertencentes aos municípios de São Carlos/SP, São José do Rio Prado/SP e Campo Grande/MS), proporcionam maior probabilidade de sucesso no estabelecimento de protocolos embriogênicos para a palmeira macaúba. Embora não tenha sido feito um estudo de correlação entre os genótipos com elevado índice de calejamento e aqueles mais sensíveis à diferenciação dos embriões somáticos, os resultados indicam que existe variabilidade genética passível de exploração nos programas de melhoramento e clonagem da espécie.

Tabela 3. Classificação com base na soma de *ranks* de 20 indivíduos de macaúba (*A. aculeata*) em relação à CAL (explantes calejados) e OXI (explantes oxidados), após 60 dias de cultivo *in vitro*.

Ordem	Indivíduo	CAL	OXI	*Rank* Médio
1	A18	3	3	3
2	A15	2	5	3,5
3	A16	1	9	5
4	A20	6	4	5
5	A5	12	2	7
6	A17	4	10	7
7	A7	7	8	7,5
8	A2	10	7	8,5
9	A14	11	6	8,5
10	A13	8	11	9,5
11	A19	5	14	9,5
12	A11	20	1	10,5
13	A6	9	13	11
14	A8	15	12	13,5
15	A3	13	16	14,5
16	A1	14	18	16
17	A4	17	15	16
18	A10	16	19	17,5
19	A12	19	17	18
20	A9	18	20	19

Com base nos valores da matriz de distância euclidiana média dos vinte indivíduos, verificou-se por meio do método de agrupamento de Tocher, a formação de três grupos distintos (Tabela 4). O Grupo I foi o mais numeroso, formado por quatorze indivíduos, sendo dez procedentes do estado de Minas Gerais, dois do estado de São Paulo (município de Descalvado) e dois do estado do Mato Grosso do Sul (município de Campo Grande). O Grupo II foi formado por quatro indivíduos do Estado de São Paulo (municípios de São Carlos e São José do Rio Pardo), e o Grupo III pelos indivíduos A9 e A10 ambos do município de Luz/MG.

Tabela 4. Grupos de similaridade genética entre 20 indivíduos de macaúba cultivados por 60 dias *in vitro*, estabelecidos pelo método de Tocher, com base na distância euclidiana média.

Grupo	Acessos
I	1 2 3 4 5 6 7 8 11 12 13 14 19 20
II	15 16 17 18
III	9 10

O método de Tocher apresenta a distância média dentro dos grupos sempre menor que a distância média entre os grupos (Cruz e Carneiro, 2006), portanto haverá mais homogeneidade entre os indivíduos de um mesmo grupo do que entre indivíduos de diferentes grupos.

Apesar de relatos de estudos de diversidade genética com base em características relacionadas ao processo de indução de embriogênese somática serem desconhecidos para a palmeira macaúba, em estudo a partir de caracteres avaliados na fase juvenil, o método de agrupamento de Tocher possibilitou a formação de grupos que mais se assemelharam com a origem geográfica, resultado importante para a conservação e o melhoramento genético da espécie (Manfio, 2012).

Desse modo, estudos que visem o conhecimento da variabilidade genética de indivíduos de macaúba procedentes de diferentes acessos, com base também em caracteres morfogênicos, são importantes para o melhoramento genético da espécie, pois possibilitam a seleção de materiais com capacidade superior de regeneração, além de permitir a obtenção de heterose quando se cruzar progênies pertencentes a grupos diferentes.

4. Conclusões

- Houve variabilidade genética entre os indivíduos de macaúba para as características associadas à propagação vegetativa *in vitro*.

- Calogênese (CAL) e oxidação (OXI) são características importantes para a seleção *in vitro* de macaúba, pois apresentam elevado controle genético (herdabilidade).

- Com base nos critérios de seleção estabelecidos para as características CAL e OXI, a média de *ranks* variou de 3,0 a 19,0 para os indivíduos A18 (São José do Rio Pardo/SP) e A9 (Luz/MG) respectivamente.

- Os resultados sugerem que a seleção de genótipos com capacidade calogênica superior e menor suscetibilidade à oxidação (pertencentes aos municípios de São Carlos/SP, São José do Rio Prado/SP e Campo Grande/MS), proporcionam maior probabilidade de sucesso no estabelecimento de protocolos embriogênicos para a palmeira macaúba.

- A existência de variabilidade genética entre os indivíduos permitiu separá-los pelo método de Tocher em três grupos distintos tendo por base todas as variáveis simultaneamente.

5. Referências Bibliográficas

ARNOLD, S. V.; SABALA, I.; BOZHKOV, P.; DYACHOK, J.; FILONOVA, L. Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 69: 233–249, 2002.

BONDAR, G. **Palmeiras do Brasil. São Paulo: Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo**. Boletim n. 2, 1964, 159 p.

BORA, P. S.; Rocha, Rosalynd, V. M. **Macaíba Palm: Fatty and amino acids composition of fruits.** Ciencia y tecnologia alimentaria. 4: 158-162, 2004.

BRAVO, C. D. V.; GONÇALVES, A. N.; DIAS, C. T. S.; VENCOVSKY, R. Controle genético da regeneração *in vitro* em progênies de *Eucalyptus grandis.* **Ciência Rural.** 38: 2181-2185, 2008.

BROWN D. C. W.; FINSTAD K. I.; WATSON E. M. Somatic embryogenesis in herbaceous dicots. In: ThorpeA. T. (ed) ***In vitro*** **embryogenesis in plants**. Kluwer Academic, Dordrecht, p. 345-415, 1995.

CASSELLS, A. C. **Contamination detection and elimination.** In: SPIER, R. E. (Ed.). Encyclopedia of plant cell biology. Chichester:Wiley, 2000. P. 577-586.

CHAKRAVARTHI, D. V. N.; RAO, Y. V.; RAO, M. V. S.; MANGA, V. Genetic analysis of in vitro callus and production of multiple shoots in eggplant. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. 102: 87-97, 2010.

CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético.** 2.ed. Viçosa: UFV, 2006. 585p.

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.

EZHOVA, T. A. Genetic Control of Totipotency of Plant Cells in an *in vitro* Culture. **Russian Journal of Developmental Biology**. 34: 197–204, 2003.

FORTES, I. C. P. E BAUGH, P. J. Study of analytical on-line pyrolyses of oils from macauba fruit (*Acrocomia sclerocarpa* M). **Journal of the Brazilian Chemical Society.** 10: 469-477, 1999.

FUENTES, S. R. L.; CALHEIRO, M. B. P.; MANETTI-FILHO, J.; VIEIRA, L. G. E. The effects of silver nitrate and different carbohydrate sources on somatic embryogenesis in *Coffea canhephora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 60: 5-13, 2000.

HIANE, P. A., MACEDO, M. L. R., SILVA, G. M., NETO, J. A. B. **Avaliação nutricional da proteína de amêndoas de bocaiúva, *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd., em ratos wistar em crescimento**. Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimento, Curitiba. 24:191-206, 2006.

HENDERSON, C. R. **Aplications of linear models in animal breeding**. University of Guelph, Guelph. 462 p. 1984.

HENRY, Y.; VAIN, P.; DE BUYSER, J. Genetic analysis of *in vitro* plant tissue culture responses and regeneration capacities. **Euphytica**. 79: 45-58, 1994.

HERMAN, E. B. Non-axenic plant tissue culture: possibilities and opportunities. **Acta Horticulturae**. 280: 112-117, 1990.

JIMÉNEZ, V. M. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. **Brazilian Journal of Plant Physiology.** 13: 196–223, 2001.

MANFIO, C. E.; MOTOIKE, S. Y.; RESENDE, M. D. V.; SANTOS, C. E. M. DOS.; SATO, A. Y. Avaliação de progênies de macaúba na fase juvenil e estimativas de parâmetros genéticos e diversidade genética. **Pesquisa Florestal Brasileira**. 32: 63-68, 2012.

MONACO, L. C.; SÖNDAHL, M. R.; CARVALHO, A.; CROCOMO, O. J.; SHARP, W. R. Applications of tissue culture in the improvement of coffee. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y.P.S. **Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture**. Berlin: Springer-Verlag, 1977. p.109-126.

MULAMBA, N. N.; MOCK, J. J. Improvement of yield potential of the Eto Blanco maize (*Zea mays* L.) population by breending for plant traits. **Egyptian Journal of Genetics and Cytology**. 7: 40-51, 1978.

NAMASIVAYAM, P. Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. 90:1-8, 2007.

NAVROSKI, M. C.; WALDOW, D. A. G.; PEREIRA, M. de O.; PEREIRA, A. de O. Calogênese *in vitro* de segmentos apicais caulinares e internodais em segurelha (*Satureja hortensis* L.). **Revista Agroambiente On-line**. 6: 228-234, 2012.

NESTARES, G.; ZORZOLI, R.; MROGINSKI, L.; PICARDI, L. Heritability of *in vitro* plant regeneration capacity in sunflower. **Plant Breeding**. 121: 366-368, 2002.

NUGROHO, Y. A.; SUMERTAJAYA, I. M.; WIENDI, N. M. A.; TORUAN-MATHIUS, N. Estimation of genetic parameters for *in vitro* culture traits and selection best progenies for Tenera oil palm tissue culture. **Energy Procedia**. 4: 316 – 322, 2014.

PARANJOTHY, K.; ROHANI, O.; TARMIZI, A. H.; TAN, C. S.; TAN. C. C. **Current status and strategies of oil palm tissue culture research**. In: PORIM International Palm Oil Development Conference; 1989. p. 109 – 121.

RESENDE, M. D. V. **Matemática e estatística na análise de experimentos e no melhoramento genético**. Colombo: Embrapa Florestas, 2007. 435 p.

RESENDE, M. D. V.; DUARTE, J. B. Precisão e controle de qualidade em experimentos de avaliação de cultivares. **Pesquisa Agropecuária Tropical**. 37: 182-194, 2007.

SANÉ, D.; BERTOSSI, F. A.; DIATTA, L. I. D.; GUÉYE, B.; DAHER, A.; SAGNA, M.; DUVAL, Y.; BORGEL, A. Influence of Growth Regulators on Callogenesis and Somatic Embryo Development in Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) Sahelian Cultivars. **The ScientificWorld Journal**. 2012. doi:10.1100/2012/837395

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.

SOH, A.C.; WONG, G.; TAN, C. C.; CHEW, O. S.; CHONG, S. P.; HO, Y. W.; WONG, C. K.; CHOO, C. N.; NOR AZURA, H.; KUMAR, K. Commercial-scale propagation and planting of elite oil palm clones: research and development towards realization. **Journal of Oil Palm Research**. 23:935–952, 2011.

STEINMACHER, D. A.; CLEMENT, C. R.; GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis from immature peach palm inflorescence explants: towards development of an efficient protocol. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 89: 15–22, 2007.

TABAI, S. A. **Propagação da palmeira macaúba *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Loddiges. através de métodos "*in vitro*".** 1992. 121p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

TEIXEIRA, J. B. **Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas.** Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia, simpósios. 2001.

VENCOVSKY, R.; BARRIGA, P. **Genética biométrica no fitomelhoramento**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. 486 p.

VERDEIL, J-L.; ALEMANNO, L.; NIEMENAK, N.; TRANBARGER, T. J. Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? **Trends in Plant Science**. 12: 245-252, 2007.

YOKOMIZO, G. K-I.; FARIAS NETO, J. T. Caracterização fenotípica e genotípica de progênies de pupunheira para palmito. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 38: 67-72, 2003.

ZIMERMANN, J. L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **The Plant Cell**. 5: 1141-1423, 1993.