

JOÃO HENRIQUE DELFRATE PADILHA

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM *Acrocomia aculeata* (JACQ.) LODD. EX
MART. UTILIZANDO A TÉCNICA DO TCL (“THIN CELL LAYER”)

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Botânica, no Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Marguerite Quoirin

Co-orientadora: Luciana L. F. Ribas

CURITIBA

2013

Dedico

A minha mãe, Luciângela Delfrate

A minha tia, Ana Maria Delfrate

Aos meus avós, Juracy B. Delfrate e Ozires Delfrate

Vocês que sempre serão minha fonte de sabedoria

“Quem sabe concentrar-se numa coisa e insistir nela como único objetivo, obtém, ao cabo, a capacidade de fazer qualquer coisa”.

Mahatma Gandhi

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

Primeiramente aos meus pais pela ajuda em todos esses anos, principalmente agradecer minha mãe, que sempre me apoiou em todas as minhas escolhas e me ajudou a superar todos os meus problemas.

Às professoras Marguerite Quoirin e Luciana L. F. Ribas pela orientação durante todo o trabalho, pelas correções e oportunidades.

À professora Érika Amano pela orientação e por toda a ajuda durante a avaliação histológica e pela disponibilização do material necessário

À Dr. Gisele Lorenzi, que ajudou na obtenção dos frutos utilizados nesse trabalho e pela amizade.

Ao Luiz Sérgio, administrador da Fazenda Bodoquena, pela coleta e pelo transporte dos frutos de bocaiuva até Curitiba.

À Ana Silveira pelas caronas e pelo transporte dos frutos até a universidade, pela amizade e parceria.

Aos amigos e colegas de mestrado do laboratório de Micropropagação Vegetal: Rodrigo Cordeiro, Silvia Almeida, Cristina Batista e Sheila Silveira pela ajuda durante a realização do trabalho, pelos conselhos, pelas discussões, pelas conversas e risadas nos cafés e nos almoços durante esses dois anos. Também agradeço a Bruno Reis e Tamires Burda pela ajuda durante o trabalho.

Aos colegas do laboratório de Anatomia Vegetal: Ligia Piazza, Paulo Carvalho e Deni Flores pela ajuda, dicas e empréstimo de materiais, principalmente a Ligia, que me ajudou na discussão e na confecção das pranchas anatômicas, pela parceria e amizade. Também quero agradecer ao técnico Nilson pela ajuda e pelas conversas.

Aos colegas do mestrado pela amizade, principalmente a Juliana Wojciechowski, Ana Paula Cardoso e Mônica Bolson.

A todos os professores do programa de pós-graduação pelas disciplinas que assisti e a Poliana Cardoso por ministrar a disciplina de técnicas histológicas.

Agradeço a Roseli Bassi e Thiago Domingos pelos conselhos, amizade e oportunidade de ajudar as pessoas e me fazer sentir parte do mundo.

Agradeço ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

RESUMO

Acrocomia aculeata é uma palmeira com potencial para a produção de óleo, mas essa produção depende do seu cultivo em larga escala. *A. aculeata* tem uma taxa de germinação baixa (3%) e é preciso desenvolver um sistema eficiente de propagação vegetativa para essa espécie. A embriogênese somática constitui um método eficiente para propagação massal de espécies de palmeiras. O objetivo desse estudo foi estabelecer um protocolo de embriogênese somática por meio da técnica do TCL (“Thin Cell Layer”). Folhas de plântulas produzidas *in vitro* foram transversalmente seccionadas em oito TCLs a partir da base. O meio de cultura básico constituiu-se dos sais do meio Y3, vitaminas de Morel e Wetmore, 30 g.L⁻¹ de sacarose, 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativado, 500 mg.L⁻¹ de glutamina e 2 g.L⁻¹ de Gelzan (Sigma®). A indução de calos ocorreu após 90 dias no escuro, sem subcultivos. Nas etapas seguintes, de multiplicação e conversão, aumentou-se a concentração de glutamina para 1 g.L⁻¹ e foi adicionado 0,5 g.L⁻¹ de caseína hidrolisada em todos os meios. Os calos foram subcultivados no mesmo meio de cultura a cada quatro semanas. Na etapa de indução de calos estudou-se: o efeito da origem do TCL (1 a 8), dos sais do MS e Y3, do picloram (de 150 a 600 µM) e do nitrato de prata. Na etapa de multiplicação, comparou-se o efeito de combinações de picloram com 2-iP e BAP e o efeito de picloram ou do nitrato de prata, interagindo com 2-iP, na formação de embriões somáticos. Na fase de conversão, o material foi cultivado na luz e testou-se o efeito dos tratamentos anteriores de BAP e 2-iP interagindo com ANA. Na etapa de indução de calos, a produção dos mesmos foi maior nos explantes da base, do 1 ao 5, nos meios com 300 e 600 µM de picloram (82,0-40,1% de explantes formando calos) e do 1 ao 7 em 150 µM (96,6-42,6%). O meio Y3 mostrou-se superior ao MS na formação de calos (80% e 58%, respectivamente) e 150 µM de picloram (47,0%) foi melhor que 300 µM (29,5%). O teste com nitrato de prata mostrou que 1 µmol.L⁻¹ do mesmo tem efeito negativo na calogênese. Na etapa de multiplicação, no teste com BAP e 2-iP, houve maior formação de embriões somáticos na menor concentração dos mesmos (12,5 µM). Não houve formação de embriões somáticos nos calos cultivados em meio MS, na presença de nitrato de prata e 2-iP, mas sim na presença de picloram e 2-iP em meio Y3. A taxa média de conversão dos embriões somáticos em plantas foi de 7%. O estudo anatômico permitiu definir que os calos se originam de parênquima perivasculare e os embriões somáticos de células da periferia do calo. Esse trabalho mostrou que o protocolo de embriogênese somática a partir de TCLs é promissor para *A. aculeata*, mas ainda requer otimização e maiores estudos anatômicos e bioquímicos.

Palavras-chave: bocaiuva, macauba, calogênese, picloram

ABSTRACT

Acrocomia aculeata has potential for oil production, but this production depends on its large scale culture. This palm species has low germination rate (3%) and a vegetative propagation system is needed for its large scale production. Somatic embryogenesis is an efficient method for plant massal propagation. The aim of this study was to establish a somatic embryogenesis protocol from TCL (Thin Cell Layer). Leaves of plants produced *in vitro* were transversally cut in eight TCLs from the base and placed in culture medium for callus induction. The basal culture medium was composed by Y3 salts, Morel and Wetmote vitamins, 30 g.L⁻¹ sucrose, 1,5 g.L⁻¹ activated charcoal, 500 mg.L⁻¹ glutamine and 2,0 g.L⁻¹ Gelzan (Sigma®). The callus formation was obtained after 90 days in the dark, without any subculture. In the next steps, the calli were subcultured each four weeks, glutamine concentration was increased to 1 g.L⁻¹ and 0,5 g.L⁻¹ hydrolysed casein added into the culture medium. During the callus induction stage the effect of TCL origin, of picloram concentrations (150-600 µM), the salts of culture medium (MS e Y3) and the silver nitrate were studied. During multiplication stage, the effect of BAP and 2-iP and of silver nitrate or picloram with 2-iP on somatic embryo formation were evaluated. During conversion stage, the material was transferred to light conditions and the effect of BAP or 2-iP with NAA was evaluated. Histological analyses were also carried out in order to study the tissue alterations related to somatic embryogenesis. In the callus induction step, the highest primary callus induction rate was observed in the first to the fifth TCLs cultured in media containing 300 or 600 µM picloram (82,0-40,1% of explants forming callus) while, in those containing 150 µM, the first to the seventh ones had a better response (96,6-42,6%). The Y3 salts gave better result than MS salts for callus induction (80% e 58%, respectively) and 150 µM picloram (47,0%) was better than 300 µM (29,5%). It was observed that 1 µmol.L⁻¹ silver nitrate has a negative effect on callogenesis and somatic embryo formation. During multiplication stage, the BAP and 2-iP test showed that somatic embryo formation was higher in the presence of 12.5 µM 2-iP or BAP. Only 7% of somatic embryos converted into plants. The histological studies defined the callus origin from cells of perivascular parenchyma and somatic embryo origin from callus peripheral cells division and the cause of low conversion rate was elucidated. This study showed that TCL embryogenesis protocol is promising for *A. aculeata*, although it still requires optimization and further histological and biochemical analysis.

Keywords: bocaiuva, macaw palm, callogenesis, picloram

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – TIPOS DE CALOS FORMADOS EM TCLs DE <i>Acrocomia aculeata</i> APÓS 150 DIAS DE CULTIVO <i>IN VITRO</i> EM MEIO Y3 ADICIONADO DE 0,5 µM DE ANA E TRÊS CONCENTRAÇÕES DE 2-iP.	33
TABELA 2 -EFEITO DO MEIO DE CULTURA E DE DUAS CONCENTRAÇÕES DE PICLORAM SOBRE A INDUÇÃO DE CALOS EM TCLS FOLIARES DE <i>Acrocomia aculeata</i> AOS 90 DIAS DE CULTIVO <i>IN VITRO</i>	34
TABELA 3 -EFEITO DO MEIO DE CALOGÊNESE SOBRE A CONSISTÊNCIA DOS CALOS FORMADOS EM TCLS FOLIARES DE <i>Acrocomia aculeata</i> AOS 120 DIAS DE CULTIVO <i>IN VITRO</i> EM MEIO CONTENDO PICLORAM E 2-iP (25 µM).	35
TABELA 4 -EFEITO DO MEIO DE CALOGÊNESE SOBRE A FORMAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS (ES) EM TCLS FOLIARES DE <i>Acrocomia aculeata</i> AOS 180 DIAS DE CULTIVO <i>IN VITRO</i> EM MEIO DE MULTIPLICAÇÃO DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS.	35
TABELA 5 -EFEITO DA COMBINAÇÃO DE PICLORAM (75 µM) E DUAS CITOCININAS SOBRE OS TIPOS DE CALOS FORMADOS EM TCLS FOLIARES DE <i>Acrocomia aculeata</i> AOS 120 DIAS DE CULTIVO <i>IN VITRO</i> EM MEIO DE FORMAÇÃO DE MASSAS EMBRIOGÊNICAS	36
TABELA 6 EFEITO DO TIPO DE CITOCININA COMBINADA COM 0,5 µM DE ANA SOBRE A FORMAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS (ES) EM TCLS FOLIARES DE <i>A. ACULEATA</i> AOS 180 DIAS DE CULTIVO <i>IN VITRO</i> EM MEIO DE CONVERSÃO.	37
TABELA 7 EFEITO DO NITRATO DE PRATA E DO PICLORAM SOBRE PERCENTAGEM DE CALOS FORMADOS EM TCLS FOLIARES DE BOCAIUVA AOS 90 DIAS DE CULTIVO <i>IN VITRO</i> EM MEIO DE INDUÇÃO DE CALOS PRIMÁRIOS.	37
TABELA 8 EFEITO DO PICLORAM E NITRATO DE PRATA SOBRE CONSISTÊNCIA DOS CALOS EM TCLS FOLIARES DE BOCAIUVA AOS 150 DIAS DE CULTIVO <i>IN VITRO</i> EM MEIO DE MULTIPLICAÇÃO COM 25 µM DE 2-iP.	38

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. ASPECTO GERAL DE <i>Acrocomia aculeata</i>	13
FIGURA 2. DETALHES DE <i>Acrocomia aculeata</i>	15
FIGURA 3 ESQUEMA MOSTRANDO A POSIÇÃO DOS CORTES NA PARTE AÉREA DE PLÂNTULAS DE <i>Acrocomia aculeata</i>	25
FIGURA 4. ASPECTOS MORFOLOGICOS DE CALOS E EMBRIOES SOMÁTICOS.....	32
FIGURA 5 – EFEITO DA POSIÇÃO DO CORTE E DA CONCENTRAÇÃO DE PICLORAM SOBRE A INDUÇÃO DE CALOS EM TCLS FOLIARES DE A. <i>aculeata</i> AOS 90 DIAS DE CULTIVO IN VITRO.....	33
FIGURA 6. ANATOMIA DOS CALOS	39
FIGURA 7. ANATOMIA DOS EMBRIÕES SOMÁTICOS	42
FIGURA 8 – PROTOCOLO DE EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM <i>ACROCOMIA ACULEATA</i> ATRAVÉS DA TÉCNICA DO TCL.	49

LISTA DE SIGLAS

ABA – ácido abscísico

AIA – ácido indol-acético

AIB – ácido indol-butírico

ANA – ácido naftalenoacético

CPA – ácido clorofenóxiacético

NOA – ácido naftóxiacético

TCL – “Thin Cell Layer”

tTCL – “transversal Thin Cell Layer”

TDZ - thidiazuron

2-iP – 2-isopentenil-adenina

GA₃ – Ácido giberélico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 <i>Acrocomia aculeata</i> (JACQ.) LODD. EX MART.	12
2.2 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA	16
2.3 A TÉCNICA DO TCL (“THIN CELL LAYER”)	19
2.4 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM PALMEIRAS	21
3 MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 MATERIAL VEGETAL	24
3.2 EFEITO DA ORIGEM DO CORTE E DE TRÊS CONCENTRAÇÕES DE PICLORAM NA INDUÇÃO DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS	25
3.3 EFEITO DO MEIO DE CULTURA E DE DUAS CONCENTRAÇÕES DE PICLORAM NA INDUÇÃO DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS	26
3.4 EFEITO DE BAP E 2-IP NA MULTIPLICAÇÃO DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS	27
3.5 EFEITO DO NITRATO DE PRATA NA INDUÇÃO DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS	27
3.6 AVALIAÇÕES.....	28
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
3.8 CONDIÇÕES DE CULTIVO	29
3.9 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA.....	29
4 RESULTADOS	30
4.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS CALOS E EMBRIÕES SOMÁTICOS.....	30
4.2 EFEITO DA POSIÇÃO DO CORTE E DE TRÊS CONCENTRAÇÕES DE PICLORAM NA INDUÇÃO DE CULTURAS	32
4.3 EFEITO DO MEIO DE CULTURA E DE DUAS CONCENTRAÇÕES DE PICLORAM NA INDUÇÃO DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS	34
4.5 EFEITO DO NITRATO DE PRATA NA INDUÇÃO DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS	37
4.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA DE CALOS E EMBRIÕES SOMÁTICOS	38
5 DISCUSSÃO	43
6 CONCLUSÕES	49
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
APÊNDICES	66

1 INTRODUÇÃO

A palmeira *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart, conhecida como bocaiuva ou macauba, é uma espécie tropical encontrada em vários Estados do Brasil, principalmente em Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Goiás e possui potencial para a produção de biodiesel, de óleo comestível e de farelo para produção de rações, os quais são retirados dos seus frutos, que são o produto de maior valor econômico nesta espécie. Ela possui alta produção de frutos e adaptabilidade a regiões semi-áridas, mas a sua utilização depende da domesticação da espécie, para obter maior homogeneidade no plantio, na produção e no produto final (MOURA, 2007). Além disso, a produção de bocaiuva em lavouras familiares para o uso do óleo representa uma alternativa importante para a erradicação da pobreza no campo, uma vez que utiliza um grande número de pessoas.

A domesticação depende da seleção de genótipos superiores na população natural de *A. aculeata*, que é dificultada pela impossibilidade de propagação por técnicas convencionais, já que a mesma não tem meristemas axilares (MOURA *et al.*, 2009). Além disso, a espécie possui baixa taxa de germinação das sementes (menos de 3%) e alta heterogeneidade das mudas, devendo ser propagada mediante técnicas de cultivo *in vitro*.

A embriogênese somática, ou formação de embriões a partir de tecidos somáticos, é um método promissor para propagação massal de plantas selecionadas e para a transformação genética. Esse método de propagação massal é o mais utilizado em palmeiras, devido à falta de mecanismos naturais de propagação vegetativa e ao fato da germinação das sementes ser lenta e irregular.

Experimentos de embriogênese somática em *A. aculeata* se iniciaram com Tabai (1992). A técnica foi utilizada com sucesso na produção de embriões somáticos a partir de embriões zigóticos maduros por Moura *et al.* (2009), sendo que esse explante não gera plantas com o mesmo genótipo da planta doadora, sendo necessária a produção de embriões somáticos a partir de tecidos adultos. Trabalhos com o uso de outras fontes de explantes que não sejam embriões zigóticos ainda não foram relatados para essa espécie, assim sendo novas

investigações estão sendo realizadas, a fim de desenvolver novos protocolos de embriogênese somática a partir de outras fontes de explantes, aprimorando a técnica para a obtenção de um número maior de plantas de *A. aculeata*, frente a seu potencial de regeneração e seu valioso poder econômico.

A técnica do TCL (“Thin Cell Layer”) consiste no isolamento de pequenos segmentos com cerca de 1 mm de espessura, que são utilizados como explantes, podendo ser obtidos de diferentes órgãos vegetais e excisados tanto longitudinalmente como transversalmente (TRAN THANH VAN, 1980). Essa cultura, dependendo das condições de crescimento (luz, temperatura, pH, presença de reguladores vegetais) e do estado genético, pode acarretar a indução *in vitro* de rotas morfogênicas específicas (NHUT e SILVA, 2009). A técnica é eficiente na produção de embriões somáticos em várias espécies, devido ao uso de pouco material vegetal e o menor tempo utilizado para a produção dos mesmos e pode levar a uma otimização do processo de obtenção de embriões somáticos em *A. aculeata*. Em palmeiras, a técnica foi utilizada com sucesso em pupunha (*Bactris gasipaes*), por Steinmacher *et al.* (2007) e no dendezeiro (*Elaeis guineensis*), por Scherwinski-Pereira *et al.* (2010).

Devido à necessidade da propagação de *A. aculeata* para a produção em larga escala, o objetivo desse trabalho foi estabelecer um protocolo de regeneração dessa espécie visando a produção de mudas por meio da embriogênese somática com uso da técnica do tTCL- “transversal Thin Cell Layer”, a partir de explantes de tecidos foliares de plântulas germinadas *in vitro*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Acrocomia aculeata* (JACQ.) LODD. EX MART.

A palmeira bocaiuva, pertencente à família Arecaceae, foi descrita primeiramente por Jacquin (1763) e denominada de *Cocos aculeatus* Jacq. Em 1824, Martius a transferiu para o gênero *Acrocomia*, denominando-a de *Acrocomia sclerocarpa* e Loddiges (1845) designou-a posteriormente como *Acrocomia aculeata* (MISSOURI, 2005; LORENZI, 2006; LISENGEN e CERVI, 2009).

O gênero *Acrocomia* é composto por duas espécies, *A. aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. e *A. hassleri* (B. Rodr.) W. J. Hahn, sendo que a diferença entre as duas é o tamanho dos indivíduos. *A. aculeata* é de maior porte e distribuída nas regiões tropicais da América e *A. hassleri* possui pequeno porte e é restrita ao cerrado no Brasil e Paraguai (HENDERSON *et al.*, 1995; LORENZI, 2006; LISERGEN e CERVI, 2009). *A. aculeata* possui ampla dispersão, ocorrendo desde o México até a Argentina, Bolívia, Paraguai, Antilhas, exceto Peru e Equador. No Brasil, é encontrada do Pará até São Paulo, Rio de Janeiro e Mato Grosso do Sul, sendo que as populações concentram-se nos Estados de Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, principalmente nas regiões não urbanizadas (MARTINS, 1983; LORENZI, 2006).

Conhecida popularmente como macauba, macauva, bocaiuva, coco-de-catarro, chiclete-de-baiano, mucajá, macajuba, macacauba, coco-baboso, mucaia, a palmeira caracteriza-se por um estipe de 10 a 15 m de altura e 20 a 30 cm de diâmetro com a região dos nós coberta de espinhos escuros pontiagudos com cerca de 10 cm de comprimento (FIGURA 1A). Os frutos são esféricos ou um pouco achatados, em forma de drupa globosa com diâmetro variando de 2,5 a 5,0 cm (FIGURA 1B). O epicarpo é marrom-esverdeado e quebra facilmente quando maduro. O mesocarpo é fibroso, oleoso, de sabor adocicado, rico em glicerídeos, de coloração amarelo ou esbranquiçado, comestível (FIGURA 1B). O endocarpo é fortemente aderido à polpa, duro e enegrecido, com cerca de 3 mm de espessura e envolve uma ou duas amêndoas (FIGURA 1C), oleaginosas e também comestíveis

(LORENZI, 2006). Os embriões são claviformes, ligeiramente achatados e com duas regiões distintas: o pecíolo cotiledonar, região mais estreita, de cor amarela, que fica na periferia da semente, adjacente ao tegumento; e a lâmina cotiledonar, dilatada, esbranquiçada, inserida no endosperma (FIGURA 2A). Estômatos foram encontrados nos embriões, e isso pode indicar uma alta demanda de oxigênio nas fases iniciais da germinação, explicando a baixa taxa de germinação das sementes (RIBEIRO *et al.*, 2012).



FIGURA 1 – A: ESPÉCIMES DE *Acrocomia aculeata*, EM BODOQUENA, MATO GROSSO DO SUL. B: FRUTOS MADUROS DE *Acrocomia aculeata*, COM EPICARPO VERDE-AMARELADO E ALGUNS MOSTRANDO O MESOCARPO AMARELO FIBROSO (SETAS) (BARRA=1,2 CM). C: FRUTOS SECOS QUEBRADOS DE *Acrocomia aculeata*, COM O MESOCARPO REMOVIDO, MOSTRANDO O ENDOCARPO DURO (SETA) E AS AMÊNDOAS (BARRA=0,94 CM). FOTO A: G.M.A. LORENZI; B E C: J.H.D. PADILHA.

A floração da *A. aculeata* (FIGURA 2B) varia entre os anos e a frutificação inicia-se após cinco anos de idade e possui um rendimento anual médio de quatro cachos por planta. Cada cacho pode conter de 12 a 15 Kg de frutos. Os frutos imaturos permanecem na palmeira quase todo o ano, amadurecendo entre setembro e dezembro (SALIS e MATOS, 2009).

O valor econômico da bocaiuva pode ser avaliado pelas amplas possibilidades de seu aproveitamento. A começar pelo estipe, que no meio rural é utilizado na confecção de calhas, mourões ou ripas na construção civil. Do cerne do estipe obtêm-se o palmito e uma fécula nutritiva, que cozida e fermentada produz um vinho, consumido em países da América Central. As folhas são usadas como forrageiras nos períodos de seca e na obtenção de fibras para produção de linhas, cordas, redes e no artesanato, na confecção de cestos, balaios e chapéus (LORENZI, 2006; GONZÁLEZ-MARÍN *et al.*, 2012).

Quando se fala dos frutos, a palmeira adquire maior representatividade. Da polpa, que pode ser consumida *in natura*, extrai-se o óleo (FIGURA 2C) com boas características para o processamento industrial, utilizado na indústria de sabões (BHERING, 2009). Segundo Pinto *et al.* (2010), também pode ser produzido um óleo comestível de qualidade, podendo substituir o uso do azeite. O farelo obtido da polpa tem alto valor protéico e é utilizado na alimentação animal e também na fabricação de bolos e bolachas, tendo ótimas características nutricionais e boa palatabilidade (RAMOS, 2008). O endocarpo, como o de outras palmeiras, é duro e resistente; é utilizado para queima em fogões a lenha, além de poder ser usado como carvão em gasogênios, operações metalúrgicas e siderúrgicas, por possuir um poder calorífico de 5104 Kcal/Kg (SILVA, 1986). A amêndoa é comestível e também possui alto teor de óleo (55%), como ácido láurico (50,9%) e oléico (17,9%), com composição semelhante ao de óleo de oliva, sendo seu uso potencial na indústria farmacêutica e alimentícia (FORTES e BAUGH, 1999; BELÉN-CAMACHO *et al.*, 2005).

Quanto ao valor nutricional dos frutos, a polpa de bocaiuva é considerada fonte de cobre para crianças e adultos (71 e 27% da ingestão diária recomendada de referência, respectivamente) e também fonte de potássio e zinco, sendo que a concentração de potássio é duas vezes maior que a da banana (766,37 mg.100g⁻¹

de polpa) (RAMOS *et al.*, 2008). A polpa de bocaiuva mostrou-se rica em β -caroteno ($49,0 \pm 2,0 \mu\text{g/g}$), podendo ser uma fonte natural desse nutriente e de vitamina A (RAMOS *et al.*, 2007).

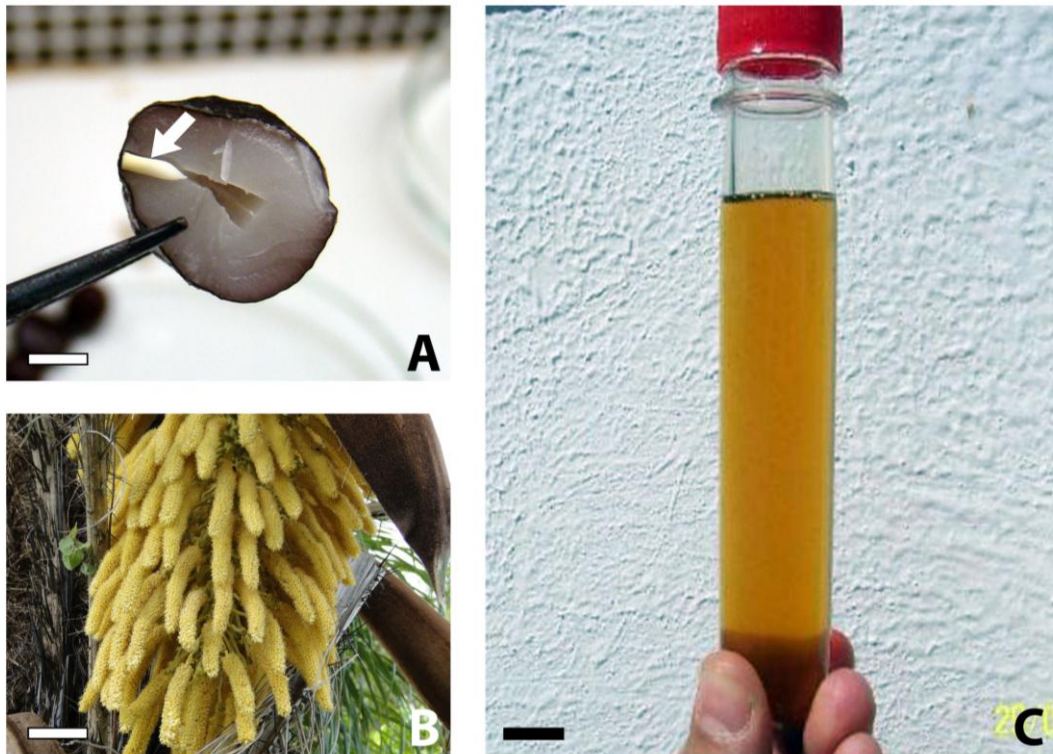


FIGURA 2- A: SEMENTE SECCIONADA DE *A. aculeata*, MOSTRANDO O ENDOSPERMA ESBRANQUIÇADO E O EMBRIÃO ZIGÓTICO (SETA) (BARRA= 3,5 mm) B: INFLORESCÊNCIA DE *A. aculeata* (BARRA= 11,24 cm) . C: AMOSTRA DO ÓLEO RETIRADO DO MESOCARPO DE *A. aculeata* (BARRA= 10 mm).

Além do valor nutricional, da bocaiuva se extrai combustíveis renováveis – o óleo da polpa, o óleo da amêndoa e o carvão vegetal - sendo que os óleos da polpa e da amêndoa possuem boas características para fabricação de biodiesel. Segundo Melo *et al.* (2009), o óleo da amêndoa possui características mais refinadas, como menor viscosidade ($28 \text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) e menor acidez ($14,16 \text{ mg KOH/g}$), quando comparado com o óleo extraído da polpa. A baixa viscosidade é importante para o bom funcionamento do motor e a baixa acidez aumenta o rendimento da extração de ésteres metílicos e etílicos. Sendo assim, o óleo da amêndoa apresenta melhores qualidades para a produção de biodiesel (VIEIRA, 2009). Além disso, ocorre a geração da torta como co-produto, que pode ser utilizada para a adsorção de resíduos de corantes de efluentes industriais, devido ao baixo custo e à rápida adsorção (VIEIRA *et al.*, 2012).

Os plantios racionais da palmeira permitem cultivos intercalares consorciados, com espaçamento suficiente entre as filas, aumentando o valor econômico no seu cultivo. Esses cultivos podem ser de alimentos, forrageiras ou oleaginosas de ciclo curto, como girassol, gergelim, nabo forrageiro ou mamona, dentre outras (MOTTA *et al.*, 2002).

2.2 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

A embriogênese somática é o processo pelo qual células somáticas ou não gaméticas mudam sua rota de desenvolvimento e entram em uma via embriogênica, culminando na formação de embriões somáticos (ELHITI e STASOLLA, 2011). A técnica mostra-se importante para a multiplicação de clones elite; além disso, as culturas embriogênicas podem ser utilizadas na transformação genética, indução e seleção de mutações e regeneração de plantas haplóides, visando o desenvolvimento de cultivares com características selecionadas para a produção em escala comercial como: maior produtividade; teor elevado e boa qualidade dos produtos e também porte menor das plantas (CANGAHUALA-INOCENTE *et al.*, 2007; MOURA, 2007).

A embriogênese somática é um exemplo da totipotência das células vegetais, onde uma única célula é capaz de regenerar uma planta inteira, sendo importante na propagação de plantas cuja reprodução sexuada é ausente, como no caso de híbridos, ou quando as sementes apresentam dormência e baixa taxa de germinação, como ocorre em várias espécies de palmeiras (MOURA, 2007).

Os embriões somáticos possuem um desenvolvimento muito parecido com o embrião zigótico, morfológicamente, apresentando no início uma diferenciação estrutural bipolar, que consiste do ápice caulinar e radicular, passando pelos estádios de desenvolvimento embrionários: globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar (GUERRA *et al.*, 1999). No caso das monocotiledôneas, os embriões somáticos surgem como estruturas globulares, que crescem e se desenvolvem, assemelhando-se a um escutelo e um coleóptilo (GEORGE, 1996).

O início da embriogênese somática se dá com a formação de células com competência embriogênica, seguida pela formação do embrião somático, maturação, conversão e regeneração completa da plântula (VON ARNOLD *et al.*, 2002). A competência embriogênica celular é a capacidade de responder a sinais específicos, tais como condições de cultura e concentração de reguladores vegetais, sendo que a indução de embriões somáticos é a resposta a esses sinais (YEUNG, 1995). A embriogênese somática pode ser considerada como uma opção mais apropriada para a regeneração de palmeiras, devido à dificuldade de propagação das mesmas por meio de outras técnicas (LEDO *et al.*, 2002; EKE *et al.*, 2005; SANÉ *et al.*, 2006; STEINMACHER *et al.*, 2007a,b).

A embriogênese somática ainda necessita de maiores estudos para a definição dos sinais que dão o início a esse processo. A aquisição da competência embriogênica e desenvolvimento do embrião parecem ser controlados por uma combinação da regulação espacial e temporal de genes específicos. Esses genes podem ser divididos em dois grupos: promotores e repressores da embriogênese somática, sendo que, entre os promotores, já foram caracterizados o SERK (“somatic embryogenesis receptor kinase”), isolado de células embriogênicas de cenoura (SCHMIDT *et al.* 1997; KOEHLER, 2010), o pickle (pkl), LEC1 e LEC2, BABY BOOM, *clavata1* (clv1) e *clavata3* (clv3) (QUIROZ-FIGUEROA *et al.*, 2006; NAMASIVAYAM, 2007).

Para obtenção de embriões somáticos, dois caminhos são possíveis: a via direta e a via indireta. A embriogênese pode ocorrer diretamente no tecido, na ausência de qualquer calo ou indiretamente a partir deste, que apresenta células em divisão desorganizadas, em diferentes estádios de diferenciação, das quais se originam os pró-embriões, geralmente com o uso de altas concentrações de auxinas (TISSERAT, 1991; GUERRA *et al.*, 1999).

O genótipo da planta doadora e o meio de cultura utilizado influenciam o sucesso da embriogênese somática. Os meios de cultura devem fornecer as substâncias essenciais para o desenvolvimento das culturas embriogênicas e são compostos por macro e micronutrientes em diferentes concentrações, vitaminas, aminoácidos, fontes de carbono e reguladores vegetais, além de outras substâncias como mio-inositol, sorbitol e agentes geleificantes (SLATER *et al.*, 2003).

A lista de minerais incluídos na maioria dos meios de cultura utilizados hoje foi definida por White em 1934. Durante anos, o meio de cultura desse autor foi o meio básico utilizado para a cultura de tecidos de diferentes espécies. Na tentativa de otimizar o crescimento de calos *in vitro*, modificações do meio White foram feitas por Murashige e Skoog (1962). O meio MS, junto com o B5 (GAMBORG *et al.*, 1968), são os mais utilizados na cultura de tecidos da grande maioria das espécies (CALDAS, 1998), além do WPM (LLOYD e McCOWN, 1980), elaborado para espécies lenhosas. Para o coqueiro (*Cocos nucifera*) e tamareira (*Phoenix dactylifera*), Eeuwens (1976) desenvolveu o meio de cultura Y3. Além desses, há outros meios desenvolvidos para outros grupos de plantas, sendo que a resposta a cada um deles varia de espécie para espécie e também depende do tipo de explante utilizado.

Além de fornecer substâncias essenciais para o desenvolvimento dos tecidos e órgãos, o meio de cultura deve conter substâncias capazes de induzir a desdiferenciação celular como, por exemplo, as auxinas. Elas são substâncias capazes de controlar o crescimento e a divisão celular e estão envolvidas na morfogênese dos tecidos vegetais. A auxina natural mais detectada nos tecidos vegetais é o AIA (ácido 3-indol-acético) (GEORGE, 1996). As auxinas sintéticas são compostos com atividade similar ao AIA, mas não possuem a mesma estrutura. As mais utilizadas na cultura de tecidos são 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), ANA (ácido 1-naftalenoacético), AIB (ácido 3-indolbutírico) e picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico) (ARTECA, 1996).

Um das auxinas utilizadas na indução da embriogênese somática é o picloram, que mostrou bons resultados na indução de calos em mandioca (GROLL *et al.*, 2001), tulipa (PTAK e BACH, 2007), dendezeiro (TEIXEIRA *et al.*, 1995; SCHERWINSKI-PEREIRA *et al.*, 2010), pupunha (STEINMACHER *et al.*, 2007) e bocaiuva (MOURA *et al.*, 2009).

Foi postulado que um dos principais responsáveis que modelam a transição de célula somática para um estado embriogênico seria o nível de estresse ao qual essas células são submetidas, já que as mesmas são provenientes de explantes cultivados em condições não-balanceadas, e a embriogênese somática seria possivelmente o resultado da adaptação dessas células a esse novo ambiente (DUDITS *et al.*, 1995; FEHER *et al.*, 2003).

Além das auxinas, outros fatores atuam na capacidade embriogênica, como a fonte do explante, que pode ser qualquer parte viva da planta. Em geral, os explantes que melhor respondem são os provenientes de tecidos jovens e de estruturas reprodutivas, como embriões zigóticos, hipocótilos, cotilédones e inflorescências.

Esforços para induzir embriogênese somática têm sido descritos para muitas espécies de interesse econômico, em que as metodologias utilizadas envolvem mudanças no meio de cultura, estabelecimento de diferentes tipos e concentrações de reguladores vegetais e outras condições de cultura, como densidade das células, nutrientes e iluminação (TITON *et al.*, 2007).

2.3 A TÉCNICA DO TCL (“THIN CELL LAYER”)

A técnica do TCL, ou Fina Camada Celular, caracteriza-se pelo uso de pouco material biológico como fonte de explante. Esses explantes tem cerca de 1 mm de espessura e são excisados de diferentes órgãos vegetais (caule, folhas, inflorescências, botão floral, cotilédones, hipocótilos e embriões), podendo ser longitudinais (ITCL), com um tipo de tecido, ou transversais (tTCL), com tipos diferentes de tecidos no mesmo corte (TRAN THANH VAN, 1980). Essa técnica foi desenvolvida para estudar, nos níveis celular, bioquímico e molecular, os mecanismos que controlam a morfogênese *in vitro* das dicotiledôneas (TRAN THANH VAN, 1973). Primeiramente foi utilizada em tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) por Tran Thanh Van (1973) que cultivou cortes transversais de caule (tTCL) de diferentes partes da planta e obteve rapidamente a organogênese direta de botões florais, que se originaram da epiderme dos tTCLs, mostrando a eficiência da técnica na regeneração de órgãos de uma maneira rápida, a partir de diferentes regiões da planta e com uma pequena quantidade de material vegetal inicial. Mais tarde, esse método ajudou a superar a regeneração recalcitrante em monocotiledôneas (JULLIEN e TRAN THANH VAN, 1994).

As rotas morfogênicas (calogênica, caulogênica, rizogênica, embriogênica somática e floral) de um explante são manipuladas, de uma forma controlada e

repetível, com a técnica do TCL. Essa capacidade é devida a aquisição de competência pelas células, resultado da desdiferenciação celular em resposta a um estímulo (NHUT *et al.*, 2003). Isso depende de inúmeros fatores, como o estado fisiológico e a origem do TCL e fatores de estresse aplicados ao TCL (SILVA e NHUT, 2009).

Um dos fatores de estresse relacionados aos TCLs pode ser a mudança na comunicação simplástica entre as células. Essa comunicação via conexões simplásticas pode influenciar divisões pré-determinadas em plantas (BOUGET *et al.*, 1998). Cantrill *et al.* (2001) observaram mudanças na comunicação simplástica de TCLs de tabaco em resposta ao estresse da excisão e das novas condições do ambiente de cultivo e também diferenças de permeabilidade simplástica entre células regenerantes e não regenerantes durante o cultivo *in vitro*.

Essas rotas morfogênicas podem ser reguladas e direcionadas para a formação de diferentes órgãos e a técnica usada na produção controlada de embriões somáticos e seu uso subsequente como semente sintética. Além disso, pode ser usada no aumento da produção de metabólitos secundários e farmacêuticos por meio da cultura de órgãos transgênicos e no aumento da eficiência e controle da regeneração de tecidos transformados (SILVA, 2003).

Trabalhos envolvendo embriogênese somática a partir de TCLs foram relatados em *Bambusa glaucescens*, com calogênese a partir de TCLs de folhas jovens (JULLIEN e TRAN TRANH VAN, 1994); sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench.), a partir de tTCLs de raízes ou epicótilos (GENDY *et al.*, 1996); *Panax ginseng* C.A. Mey., a partir de tTCLs de cotilédones, pecíolos e raízes, com a ocorrência de embriogênese direta (AHN *et al.*, 1996); *Psophocarpus tetragonolobus* (L.) D.C., a partir de tTCLs provenientes de folhas cultivadas *in vitro* (AHMED *et al.*, 1996); *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop., com tTCLs de diferentes regiões da planta (LE *et al.*, 1997); *Citrus* sp., onde tTCLs provenientes do estigma da flor produziram embriões somáticos em cinco espécies e os tTCLs provenientes do ovário em duas espécies (CARIMI *et al.*, 1999); *Oryza sativa* L. (NHU *et al.*, 2000); girassol (*Helianthus annuus* L.), embriogênese direta a partir de camadas epidérmicas do hipocótilo (BOLANDI *et al.*, 2000); espinafre (*Spinacia oleracea* L.), a partir de tTCLs de cotilédones, hipocótilos e raízes (LEGUILLON *et al.*, 2003); cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), com cultura de tTCLs de folhas de híbridos

interespecíficos, ocorrendo embriogênese somática e organogênese direta (LAKSHMANAN *et al.*, 2006).

2.4 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM PALMEIRAS

Inúmeras justificativas têm sido reportadas ao uso de técnicas de cultura *in vitro* em palmeiras como uma prática auxiliar para estudos morfogenéticos e para acelerar programas de melhoramento genético. Os programas de melhoramento em palmeiras são demorados e complexos devido ao longo ciclo, hábito de crescimento e ausência de métodos convencionais de propagação vegetativa. Nesse contexto, a cultura de tecidos torna-se um instrumento valioso na propagação vegetativa *in vitro* para clonagem rápida de genótipos superiores, na preservação e intercâmbio de germoplasma e no melhoramento genético (LEDO *et al.*, 2002).

Vários trabalhos de embriogênese somática envolvendo palmeiras são relatados, devido ao potencial dessas espécies e à dificuldade de propagação convencional, sendo que as três espécies mais estudadas são o dendezeiro (*E. guineensis*), o coqueiro (*Cocos nucifera* L.) e a tamareira (*Phoenix dactilifera* L.). (SILVA, 2007).

Trabalhos envolvendo embriogênese somática de dendezeiro (*E. guineensis*) foram realizados a partir de embriões zigóticos (TEIXEIRA *et al.*, 1995; RAJESH *et al.*, 2003; CHEHMALEE E TE-CHATO, 2008; ANGELO *et al.*, 2009; THUZAR *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2012), inflorescências (TEIXEIRA *et al.*, 1994; GUEDES *et al.*, 2011) e folhas jovens (SCHERWINSKI-PEREIRA *et al.*, 2010).

Trabalhos de embriogênese somática com o coqueiro (*Cocos nucifera* L.) foram iniciados com embriões zigóticos imaturos e maduros utilizando como reguladores vegetais o 2,4-D (SAMOSIR, 1998), o 2,4-D e o ABA (FERNANDO E GAMAGE, 2000) e o 2,4-D associado ao ABA para indução de embriões somáticos e o GA₃ nos estádios de desenvolvimento e conversão de embriões somáticos (MONTERO-CÓRTEZ *et al.*, 2010), com eixos embrionários (GOMES *et al.*, 2004). Já Verdeil e Huet (1994), cultivando inflorescências imaturas em meio com 2,4-D, obtiveram calos brancos com estruturas globulares, regenerando novas plantas. Chan *et al.* (1998), Pérez-Nunez *et al.* (2006) e Sáenz *et al.* (2006, 2010) utilizaram

como explante plúmulas provenientes de embriões maduros de coqueiro. Embriões somáticos de coqueiro foram obtidos cultivando ovários não fertilizados em meio com 2,4-D (PERERA *et al.*, 2007; 2009).

Para tamareira (*Phoenix dactilifera* L.), um protocolo de embriogênese somática a partir de ápices caulinares foi descrito por Al-Khayri (2005), incluindo a preparação dos explantes, calogênese, desenvolvimento de embriões somáticos, regeneração de plantas e aclimatização. Taha *et al.* (2002) obtiveram embriões somáticos cultivando meristemas apicais e primórdios foliares da variedade Zaghlool. Outros explantes utilizados foram ápices caulinares (BHASKARAM e SMITH, 1992; AL-KHAYRI, 2010), inflorescências (BHASKARAM e SMITH, 1992; FKI *et al.*, 2003); folhas jovens (FKI *et al.*, 2003; OTHMANI *et al.*, 2009), meristema apical e rebentos jovens (EKE *et al.*, 2005) e gemas apicais (BHARGAVA *et al.*, 2003). Sané *et al.* (2006) e Zouine e Hadrami (2006) obtiveram embriões somáticos em cultura de células em suspensão, com explantes provenientes de folhas jovens e ápices caulinares.

No caso da pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth), foram utilizados embriões zigóticos (ARIAS, 1985; VALVERDE *et al.*, 1987; STEINMACHER, *et al.*, 2007a) e inflorescências (ALMEIDA e KERBAUY, 1996; STEINMACHER, 2005) e folhas (STEINMACHER *et al.*, 2007b; 2011). Guerra e Handro (1998) induziram a embriogênese somática em jussara (*Euterpe edulis* Mart.) a partir de embriões zigóticos, inflorescências e folhas.

Experimentos de embriogênese somática em bocaiuva se iniciaram com os de Teixeira *et al.* (1986) e Tabai (1992), que induziram a calogênese a partir de embriões zigóticos, testando duas auxinas: 2,4-D e picloram. Não ocorreu a formação de embriões somáticos, mas observou-se que o picloram foi melhor na indução de calos do que o 2,4-D, que induziu calogênese em concentrações superiores a 250 μM ; entretanto, esses calos não apresentaram capacidade embriogênica.

A técnica do TCL foi aplicada em pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth) por Steinmacher *et al.* (2007b). Nesse trabalho foram utilizados cortes transversais de folhas jovens, cultivados em meio MS com diferentes concentrações de picloram e obteve-se um aumento da produção de embriões somáticos, comparado com trabalhos anteriores com o emprego da embriogênese a partir de embriões

zigóticos. Scherwinski-Pereira *et al.* (2010) aplicaram a técnica em dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.), utilizando explantes provenientes de folhas jovens de plantas cultivadas *in vitro*, obtendo embriões somáticos em meio MS com picloram ou 2,4-D. A técnica também foi utilizada em inflorescências imaturas de dendezeiro, com a obtenção de calos embriogênicos em meio MS ou Y3, com uso de 2,4-D (GUEDES *et al.*, 2011).

Os primeiros relatos da obtenção de embriões somáticos de *A. aculeata* foram feitos por Moura (2007) e Bandeira (2008), que utilizaram embriões zigóticos e testaram diferentes auxinas: 2,4-D, picloram, NOA e CPA (9 μ M) e também as mesmas auxinas em combinação com 1 μ M de TDZ. As auxinas que promoveram a melhor indução de calos com características embriogênicas foram o picloram e o 2,4-D, em combinação com TDZ, sendo que a formação de embriões somáticos foi maior com o uso do picloram sem TDZ. A conversão dos embriões somáticos em plantas foi obtida por Moura *et al.* (2009).

O uso da técnica do TCL foi promissora para o dendê e para a pupunha e pode ser também promissora para a embriogênese somática em *A. aculeata*. A técnica pode permitir o uso de outras fontes de explantes, além dos embriões zigóticos, que apesar de responderem melhor à embriogênese somática, não podem ser utilizados para a produção de clones-elite. Além disso, a definição desse protocolo pode facilitar estudos posteriores de maturação e conversão, aclimatização, estudos bioquímicos e genéticos, para entender melhor o processo e melhorar a o número e a qualidade dos embriões somáticos produzidos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

As mudas de *A. aculeata* foram obtidas a partir da germinação *in vitro* de embriões zigóticos de frutos maduros, coletados entre agosto e dezembro de 2010, provenientes da Fazenda Campanário, localizada em Bodoquena, Mato Grosso do Sul. Os frutos foram quebrados, as sementes desinfestadas em câmara de fluxo laminar, com etanol 70% por um minuto, seguido de uma solução de hipoclorito de sódio 6% com 1% de Tween 20[®] por quinze minutos em agitação. Após três lavagens com água destilada autoclavada, os embriões foram removidos com auxílio de pinça e bisturi e inoculados em tubos de ensaio com 10 ml de meio de cultura de germinação constituído de sais do meio Y3 (EEUWENS, 1976), vitaminas de Morel (MOREL e WETMORE, 1951), 30 g.L⁻¹ de sacarose, 1,0 g.L⁻¹ de carvão ativado e 5,8 g.L⁻¹ de ágar (Vetec[®]).

Mudas de 2-4 cm de altura após 90 dias de cultivo *in vitro* tiveram suas raízes e pecíolo cotiledonar removidos, restando o primórdio foliar. Este foi seccionado transversalmente a partir da base em cinco ou oito segmentos de aproximadamente 1 mm de espessura (TCLs) (Steinmacher *et al.*, 2007b), que foram utilizados como explantes para a embriogênese somática (FIGURA 3).

O meio de cultura básico (MB) para os experimentos constituiu-se dos sais do meio Y3, vitaminas de Morel, 30 g.L⁻¹ de sacarose, 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativado, 500 mg.L⁻¹ de glutamina e 2,0 g.L⁻¹ de Gelzan (Sigma[®]).



FIGURA 3 ESQUEMA MOSTRANDO A POSIÇÃO DOS CORTES NA PARTE AÉREA DE PLÂNTULAS DE *Acrocomia aculeata* (BARRA CLARA= 3,75 mm; BARRA ESCURA= 2 mm).

3.2 EFEITO DA ORIGEM DO CORTE E DE TRÊS CONCENTRAÇÕES DE PICLORAM NA INDUÇÃO DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS

Oito segmentos de primórdios foliares foram inoculados em ordem, a partir da base, no meio de indução de calos (MIC), constituído do MB, adicionado de picloram (150, 300 e 600 μM). Os explantes foram mantidos no escuro por 90 dias para formação dos calos primários. Foi avaliado o efeito das três concentrações de picloram e das oito posições dos cortes.

O delineamento experimental foi totalmente casualizado, em esquema fatorial (8x4). Cada placa de Petri conteve oito explantes provenientes de uma mesma planta, com cinco repetições com quatro placas por parcela, ou seja 20 placas por tratamento. Esse experimento foi repetido duas vezes e para a análise foi utilizada a média das repetições.

Após esse período, os calos foram transferidos para o meio de multiplicação de culturas embriogênicas, constituído do MB, aumentando a glutamina para 1 g.L^{-1} e adicionando 500 mg.L^{-1} de caseína hidrolisada. Foram testadas três

concentrações de 2-iP (6,25; 12,5 e 25 μM) e um controle sem 2-iP, em combinação com 0,5 μM de ANA. Foi feito um subcultivo a cada quatro semanas para o mesmo meio por 12 semanas. Nessa etapa, o delineamento experimental foi totalmente casualizado, com dez placas (repetições) contendo cinco explantes em cada placa de Petri.

3.3 EFEITO DO MEIO DE CULTURA E DE DUAS CONCENTRAÇÕES DE PICLORAM NA INDUÇÃO DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS

Neste experimento, foram escolhidos os cinco primeiros segmentos de primórdios foliares, que foram inoculados no MIC, em duas formulações salinas: do meio de cultura Y3 ou do MS, adicionados das vitaminas de Morel, 30 g.L^{-1} de sacarose, 2 g.L^{-1} de gelzan (Sigma[®]), 1,5 g.L^{-1} de carvão ativado e 500 mg.L^{-1} de glutamina. Duas concentrações de picloram (150 e 300 μM) foram comparadas. Os explantes foram mantidos no escuro por 90 dias para formação dos calos primários. O delineamento experimental foi totalmente casualizado, em esquema fatorial (2x2) com dez placas (repetições) contendo cinco explantes em cada placa de Petri.

Após esse período, os calos foram transferidos para o meio de multiplicação de culturas embriogênicas. Os meios de cultura foram os mesmos descritos acima, reduzindo o carvão ativado para 0,3 g.L^{-1} , adicionando 500 mg.L^{-1} de caseína hidrolisada, 75 μM de picloram e 25 μM de 2-iP. Os calos foram mantidos nesse meio por oito semanas.

Somente os calos cultivados em meio Y3 apresentaram formação de “clusters” embriogênicos e foram transferidos para o meio de conversão, que consistiu do meio básico, acrescido de 500 mg.L^{-1} de caseína hidrolisada, de 0,5 μM de ANA e 25 μM de 2-iP, sem carvão ativado. Foi feito um subcultivo a cada quatro semanas em meio novo da mesma composição e o material foi mantido no escuro.

3.4 EFEITO DE BAP E 2-iP NA MULTIPLICAÇÃO DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS

Na fase de indução, foi utilizado o meio básico (MB) com 150 μM de picloram e utilizados como explantes os 5 primeiros segmentos . Os explantes foram mantidos no escuro por 90 dias para formação dos calos primários.

Os calos que se formaram foram transferidos para o meio de multiplicação de culturas embriogênicas. Nessa etapa, foi utilizado o MB, com o carvão ativado reduzido para 0,3 g.L^{-1} , acrescido de 500 mg.L^{-1} de caseína hidrolisada, de 75 μM de picloram e foram testadas duas citocininas, 2-iP e BAP, nas concentrações de 12,5 e 25 μM . Foi feito o subcultivo a cada quatro semanas por 12 semanas.

O delineamento experimental foi totalmente casualizado, com dez placas (repetições) contendo cinco explantes em cada placa.

O restante dos calos foram passados para o meio de conversão, que consistiu do MB , acrescido de 500 mg.L^{-1} de caseína hidrolisada, de 0,5 μM de ANA e de BAP e 2-iP nas concentrações de 12,5 e 25 μM . O material foi mantido na luz e foi feito um subcultivo a cada quatro semanas. Os embriões somáticos formados foram colocados no meio de conversão para completarem o desenvolvimento.

3.5 EFEITO DO NITRATO DE PRATA NA INDUÇÃO DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS

Nesse experimento foi utilizado como meio de indução o MB, acrescido de 150 ou 300 μM de picloram, com 1 μM AgNO_3 ou sem. O material foi mantido no escuro por 90 dias e em seguida, os calos que se formaram foram transferidos para o meio de multiplicação. Nessa etapa, foram comparados dois meios: meio básico, com o carvão ativado reduzido para 0,3 g.L^{-1} , acrescido de 500 mg.L^{-1} de caseína hidrolisada, de 75 μM de picloram e 25 μM de 2-iP e o outro foi o meio básico, com o carvão ativado reduzido para 0,3 g.L^{-1} , acrescido de 500 mg.L^{-1} de caseína

hidrolisada, sem picloram e com $1 \mu\text{M}$ AgNO_3 . Foi feito um subcultivo a cada quatro semanas no mesmo meio. O delineamento experimental foi totalmente casualizado, em esquema fatorial (2×2), com dez placas (repetições) contendo cinco explantes em cada placa.

Os calos cultivados no meio com $75 \mu\text{M}$ de picloram e $25 \mu\text{M}$ de 2-iP foram transferidos para o meio de conversão, que consistiu do MB, acrescido de 500 mg.L^{-1} de caseína hidrolisada, com $0,5 \mu\text{M}$ de ANA e $25 \mu\text{M}$ de 2-iP e o carvão ativado reduzido para $0,3 \text{ g.L}^{-1}$.

3.6 AVALIAÇÕES

As avaliações na etapa de indução de calos foi feita aos 90 dias, observando-se a percentagem de formação de calos primários. Na fase de multiplicação de culturas embriogênicas, a avaliação foi a cada 30 dias e seguiu os seguintes critérios: percentagem de formação de calos compactos não embriogênicos, friáveis não embriogênicos e nodulares (calos com formação de massas embriogênicas), o número de embriões somáticos formados por calo nodular e a percentagem de embriões somáticos por tratamento.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi avaliada a homogeneidade das variâncias dos tratamentos pelo teste de Bartlett e, quando necessário, os dados originais foram transformados por arco seno $(X/100)^{0,5}$. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 95% de significância, com auxílio do programa STATISTICA 7. Os experimentos foram repetidos pelo menos uma vez.

3.8 CONDIÇÕES DE CULTIVO

O pH do meio de cultura foi ajustado para 5.8 antes da autoclavagem em 121°C por 20 min. Os explantes foram inoculados em placas de Petri contendo 30 mL de meio de cultura e vedadas com filme plástico PVC e mantidas em sala de crescimento com temperatura de $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ (dia) e $18\pm 2^{\circ}\text{C}$ (noite). Os explantes foram mantidos na ausência de luz nas etapas iniciais, sendo cultivados na luz, com irradiância de $40\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ na fase de conversão de embriões somáticos em plantas.

3.9 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

Os calos e/ou embriões somáticos foram analisados anatomicamente durante as diferentes etapas da embriogênese para observar a origem da calogênese e dos embriões somáticos. As amostras foram coletadas e fixadas em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965). Posteriormente, as amostras foram desidratadas em série etílica, de 5 até 95% com duração de 60 minutos para cada tratamento. Após a desidratação, o material foi infiltrado em historesina (LEICA[®]) seguindo as determinações do fabricante. Secções longitudinais seriadas de 5-7 μm de espessura foram realizadas com auxílio de micrótomo de rotação. O material foi corado com solução de azul de tolúidina diluído em tampão fosfato 0,1M, pH 6,8 (O'BRIEN *et al.*, 1964).

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS CALOS E EMBRIÕES SOMÁTICOS

Com quatro semanas de cultivo, calos primários começaram a aparecer sobre os explantes. Eles eram de coloração amarelada e com aspecto friável. Após os calos serem transferidos para o meio de multiplicação de massas, cerca de 120 dias após a indução, houve diferenciação morfológica dos calos. Quatro tipos morfológicos de calos foram caracterizados: calos compactos, calos friáveis, calos friáveis mucilaginosos e calos nodulares. Os calos compactos (FIGURA 4A) eram amarelados a marrons, duros. Os calos friáveis (FIGURA.4B) eram de coloração branco-amarelado, macios, não embriogênicos. Os calos friáveis mucilaginosos eram esbranquiçados, com textura semi-compacta, brilhantes, não embriogênicos e com uma massa mucilaginosa envolvendo os mesmos (FIGURA 4C). Os calos nodulares eram compactos com crescimento de regiões embriogênicas de aspecto nodular (FIGURA 4D). Nessas regiões nodulares ocorreu o início da formação de proembriões (FIGURA 4E).

Após 180 dias em meio de maturação, os pró-embriões aumentaram de tamanho e passaram para o estágio globular, de coloração amarelada. Aos 210 dias, pode-se observar a formação de embriões globulares, bem formados, de coloração esbranquiçada (FIGURA 4F).

Alguns embriões foram transferidos para o meio de conversão e apresentaram alongamento do pecíolo cotiledonar, o que caracteriza o início da germinação de embriões zigóticos, mas os mesmos não emitiram radícula nem plúmula (FIGURA 4G).

Alguns embriões completaram a conversão, ficando verdes, emitindo radícula e plúmula e foram transferidos para o meio básico sem reguladores vegetais (FIGURA 4H). As plântulas não sobreviveram após a transferência para a casa de vegetação, sendo necessários mais estudos das condições necessárias que permitam o seu desenvolvimento.

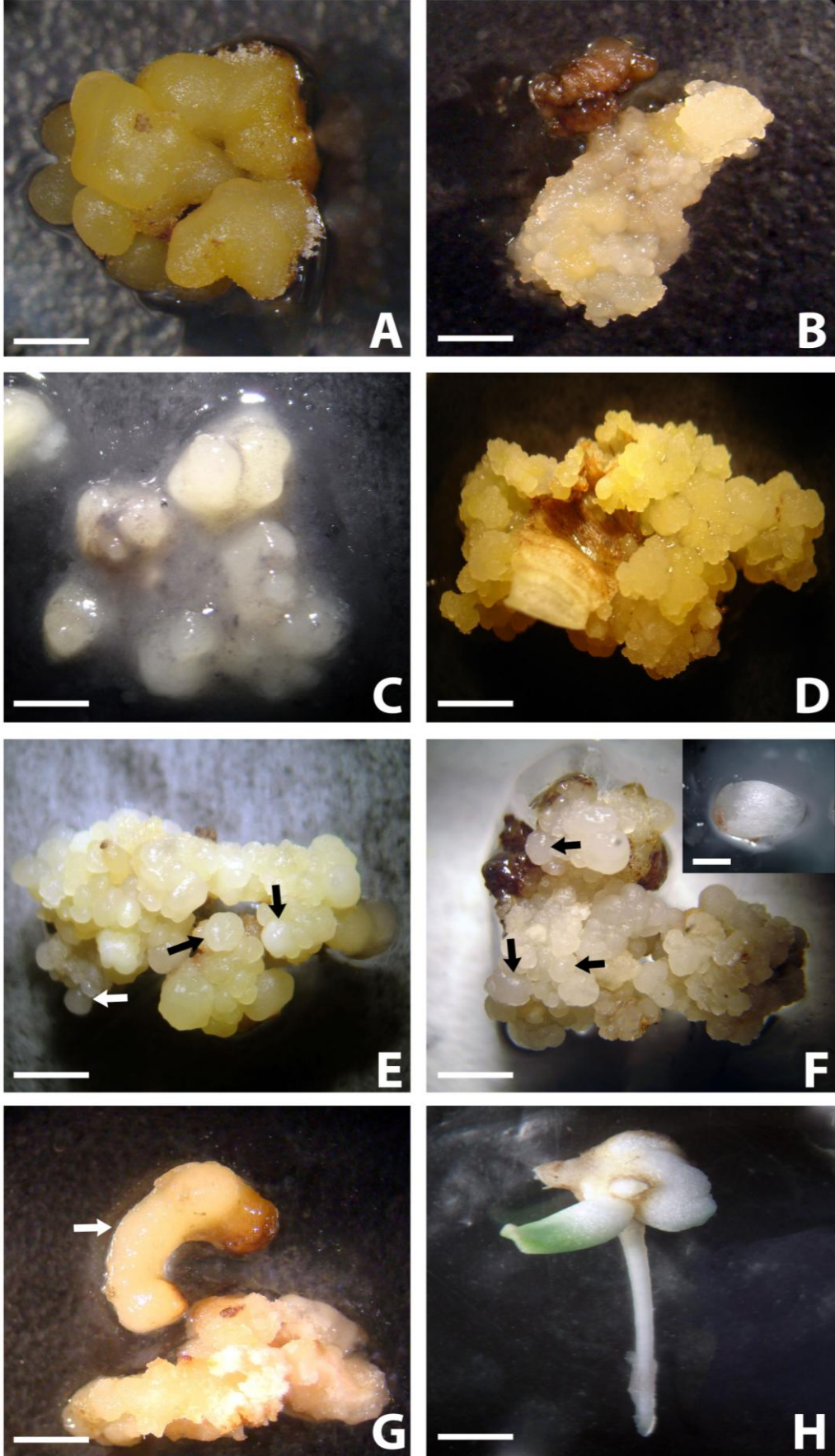


FIGURA 4 – A: CALO COMPACTO FORMADO AOS 120 DIAS DE CULTIVO *IN VITRO* (BARRA= 3,8 MM). B: CALO FRIÁVEL FORMADO AOS 120 DIAS DE CULTIVO *IN VITRO* (BARRA= 4,8 MM). C: CALO MUCILAGINOSO FORMADO AOS 150 DIAS DE CULTIVO *IN VITRO* (BARRA= 5,2 MM). D: CALO NODULAR FORMADO AOS 150 DIAS DE CULTIVO *IN VITRO* (BARRA=4,5 MM). E: EMBRIÕES GLOBULARES (SETA) FORMADOS SOBRE O CALO NODULAR AOS 210 DIAS DE CULTIVO *IN VITRO* (BARRA= 4,0MM). F: CALO NODULAR COM EMBRIÕES GLOBULARES BRANCOS (SETAS), APÓS 240 DIAS DE CULTIVO *IN VITRO* (BARRA= 5,0 MM). NO DETALHE UM EMBRIÃO SOMÁTICO ISOLADO DO CALO (BARRA= 3,3 MM). G: EMBRIÃO EM MEIO DE CONVERSÃO AOS 240 DIAS DE CULTIVO *IN VITRO*, COM ALONGAMENTO DO PECÍOLO COTILEDONAR, MAS SEM EMISSÃO DA PLÚMULA E RADÍCULA (BARRA= 4,4 MM). H: EMBRIÃO CONVERTIDO AOS 250 DIAS DE CULTIVO *IN VITRO* COM EMISSÃO DE PLÚMULA E RADÍCULA (BARRA= 2,5 MM).

4.2 EFEITO DA POSIÇÃO DO CORTE E DE TRÊS CONCENTRAÇÕES DE PICLORAM NA INDUÇÃO DE CULTURAS

Houve interação significativa entre os dois fatores analisados (APÊNDICE 1) e, de acordo com a Figura 5, os cortes da posição 1 à 4 foram os melhores na indução de calos nas concentrações de 300 μM de picloram, de 1 à 5 na concentração de 600 μM e do 1 ao 7 na de 150 μM .

Os explantes apresentaram início de calogênese a partir dos 15 dias de cultivo, principalmente os provenientes dos cortes basais. Após 90 dias de indução, observou-se diferença significativa entre as concentrações de picloram, sendo o melhor resultado obtido com o tratamento de 300 μM , que não diferiu do resultado obtido com 150 μM , mas diferiu do 600 μM na posição 6. Quanto à posição dos cortes, verificou-se que os cortes basais apresentaram maiores taxas de calogênese, sendo que nos cinco primeiros cortes observou-se as maiores percentagens de explantes formando calos (FIGURA 5). Os calos primários apresentaram coloração esbranquiçada ou amarelada e tinham consistência compacta.

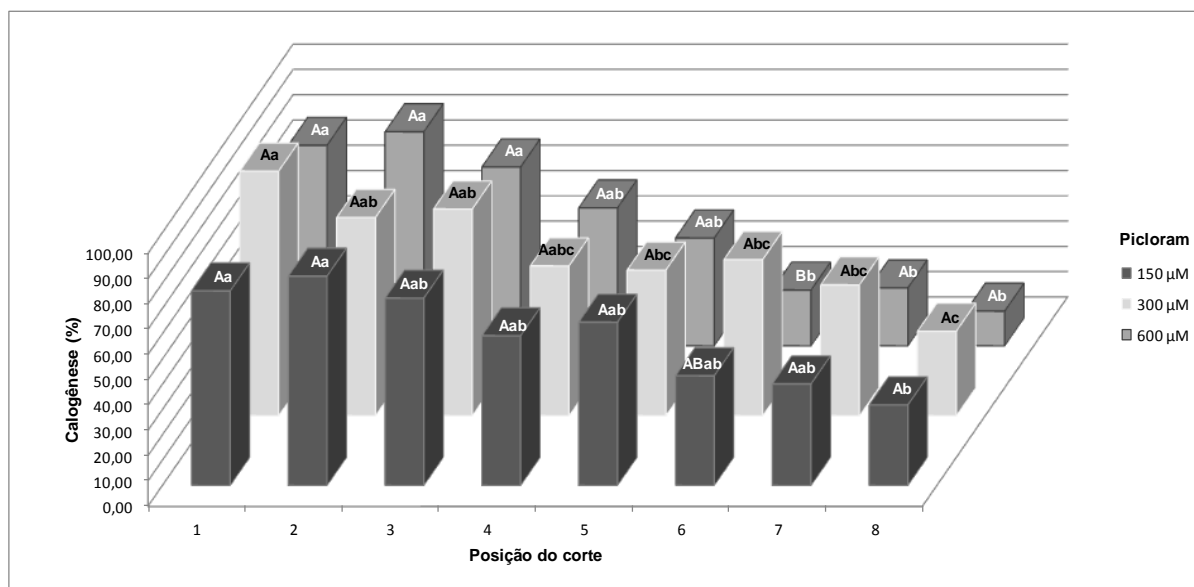


FIGURA 5 – EFEITO DA POSIÇÃO DO CORTE E DA CONCENTRAÇÃO DE PICLORAM SOBRE A INDUÇÃO DE CALOS EM TCLS FOLIARES DE *Acrocomia aculeata* ÀOS 90 DIAS DE CULTIVO *IN VITRO*. LETRAS MAIÚSCULAS REPRESENTAM DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE PICLORAM (PARA CADA POSIÇÃO DE CORTE) E LETRAS MINÚSCULAS REPRESENTAM DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS ENTRE AS POSIÇÕES DE CORTE (PARA CADA CONCENTRAÇÃO DE PICLORAM) DE ACORDO COM O TESTE DE TUKEY Á 5% DE PROBABILIDADE.

Os calos formados foram transferidos para o meio de multiplicação de culturas embriogênicas após 90 dias e avaliou-se os tipos de calos formados após 150 dias. Não houve diferenças estatísticas entre os tipos de calos formados (APÊNDICES 2, 3 E 4), mas pode-se observar um aumento na porcentagem de calos nodulares conforme aumentou-se a concentração de 2-iP (TABELA 1). Apesar de surgirem calos nodulares, o material foi oxidando pouco a pouco e não houve formação de embriões somáticos em nenhum dos tratamentos.

TABELA 1 – TIPOS DE CALOS FORMADOS EM TCLs DE *Acrocomia aculeata* APÓS 150 DIAS DE CULTIVO *IN VITRO* EM MEIO Y3 ADICIONADO DE 0,5 µM DE ANA E TRÊS CONCENTRAÇÕES DE 2-iP.

2-iP (µM)	FRIÁVEL (%)	NODULAR (%)	COMPACTO (%)
0	41,33 ns	4,00 ns	54,67 ns
6,25	53,83 ns	4,50 ns	41,67 ns
12,5	52,67 ns	8,00 ns	39,33 ns
25	34,00 ns	12,00 ns	54,00 ns
MÉDIA	45,46	7,13	47,42

ns= não significativo.

4.3 EFEITO DO MEIO DE CULTURA E DE DUAS CONCENTRAÇÕES DE PICLORAM NA INDUÇÃO DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS

Após 90 dias de indução, observou-se uma diferença entre o número de calos gerados no meio Y3 comparado ao meio MS e entre as duas concentrações de picloram (APÊNDICE 5). De acordo com a Tabela 2, houve diferença significativa entre as duas concentrações de picloram, sendo a melhor concentração 300 μM e entre os meios de cultura, onde o Y3 foi superior ao MS.

TABELA 2 - EFEITO DO MEIO DE CULTURA E DE DUAS CONCENTRAÇÕES DE PICLORAM SOBRE A INDUÇÃO DE CALOS EM TCLS FOLIARES DE *Acrocomia aculeata* AOS 90 DIAS DE CULTIVO *IN VITRO*.

CONCENTRAÇÃO DE PICLORAM (μM)/MEIO DE CULTURA	EXPLANTES FORMANDO CALO (%)		
	150 μM	300 μM	Média
Y3	72,0	88,0	80,0 a
MS	48,0	68,0	58,0 b
MÉDIA	60,0 B	78,0 A	

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

Após transferência dos calos para os meios de multiplicação, observou-se oxidação de alguns calos, levando à necrose dos mesmos. A necrose foi maior nos calos formados na presença de 300 μM de picloram, independente do meio de cultura utilizado na subcultura (dados não mostrados). Quanto aos tipos de calos, não houve diferenças nos tratamentos, para calo compacto e friável (APÊNDICE 6, 7 e 8), só observou-se um maior número de calos nodulares no tratamento com 150 μM de picloram. Em relação ao meio de cultura, no MS não ocorreu formação de calos nodulares, independente da concentração de picloram (TABELA 3).

TABELA 3 - EFEITO DO MEIO DE CALOGÊNESE SOBRE A CONSISTÊNCIA DOS CALOS FORMADOS EM TCLS FOLIARES DE *Acrocomia aculeata* AOS 120 DIAS DE CULTIVO *IN VITRO* EM MEIO CONTENDO PICLORAM E 2-iP (25 μ M).

MEIO DE CULTURA	CONCENTRAÇÃO DE PICLORAM (μ M)								
	COMPACTO (%)			FRIÁVEL (%)			NODULAR (%)		
	150	300	MÉDIA	150	300	MÉDIA	150	300	MÉDIA
Y3	56,0	92,0	74,0 ns	36,0	4,0	10,0 ns	8,0 Aa	4,0 Ba	6,0
MS	80,0	92,0	86,0 ns	20,0	8,0	14,0 ns	0,0 Ab	0,0 Ab	0,0
MÉDIA	68,0 ns	92,0 ns		28,0 A	6,0 B		4,0	4,0	

ns = não-significativo.

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

O número de calos nodulares foi avaliado após 180 dias (TABELA 4). Não houve formação de calos nodulares em meio MS até 180 dias. No meio Y3, a percentagem de calos nodulares foi baixa (28% no meio contendo 150 μ M de picloram e 8% no meio com 300 μ M). Embriões somáticos globulares se formaram no meio Y3 e o número médio foi maior no meio contendo 150 μ M de picloram (TABELA 4).

TABELA 4 - EFEITO DO MEIO DE CALOGÊNESE SOBRE A FORMAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS (ES) EM TCLS FOLIARES DE *Acrocomia aculeata* AOS 180 DIAS DE CULTIVO *IN VITRO* EM MEIO DE MULTIPLICAÇÃO DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS.

MEIO DE CULTURA DE CALOGÊNESE (PICLORAM)	EXPLANTE COM CALO NODULAR (%)	NÚMERO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS/CALO NODULAR
Y3 (150 μ M)	28,0	7,0 (4,97*)
Y3 (300 μ M)	8,0	1,5 (1,34*)
MS (150 μ M)	0,0	0,0 (0,0*)
MS (300 μ M)	0,0	0,0 (0,0*)

* Desvio-padrão.

Após 180 dias, todos os calos restantes foram repicados para o meio de conversão, sem passar pela fase de maturação, sendo deixados no escuro. Os embriões somáticos formados nesse meio não converteram a plantas e oxidaram. O material perdeu a competência embriogênica e a maioria dos calos oxidou após 240 dias; os calos que não oxidaram formaram uma massa gelatinosa em sua volta.

4.4 EFEITO DE BAP E 2-iP COMBINADOS COM PICLORAM NA INDUÇÃO DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS

Houve formação de calos em 87% dos explantes cultivados em meio de cultura Y3 contendo 150 μM de picloram por 90 dias (dados não apresentados). Os calos formados foram colocados em meio de cultura para formação de massas embriogênicas por 60 dias. Não houve diferença entre as percentagens de tipos de calos formados (TABELA 5). Cerca de metade dos calos oxidou após 60 dias no segundo meio.

TABELA 5 - EFEITO DA COMBINAÇÃO DE PICLORAM (75 μM) E DUAS CITOCININAS SOBRE OS TIPOS DE CALOS FORMADOS EM TCLS FOLIARES DE *Acrocomia aculeata* AOS 120 DIAS DE CULTIVO *IN VITRO* EM MEIO DE FORMAÇÃO DE MASSAS EMBRIOGÊNICAS

2-iP (μM)	BAP (μM)	CALOS NÃO OXIDADOS		CALOS OXIDADOS (%)
		FRIÁVEL (%)	COMPACTO (%)	
12,5	0	53,8	46,1	48,0
25	0	31,8	68,2	56,0
0	12,5	41,4	58,6	42,0
0	25	50,1	49,9	52,0

Após transferência dos calos para o meio de conversão, as estruturas globulares aumentaram de tamanho e se assemelharam a embriões somáticos em estágio globular. A percentagem de calos formando embriões somáticos foi baixa (TABELA 6). O maior número de embriões somáticos por calo foi obtido em meio acrescido de 12,5 μM de 2iP. Os embriões foram transferidos para o meio de conversão e somente alguns ficaram verdes e se converteram em plantas (7%)

TABELA 6 EFEITO DO TIPO DE CITOCININA COMBINADA COM 0,5 μM DE ANA SOBRE A FORMAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS (ES) EM TCLS FOLIARES DE *A. ACULEATA* AOS 180 DIAS DE CULTIVO *IN VITRO* EM MEIO DE CONVERSÃO.

2-iP (μM)	BAP (μM)	EXPLANTES COM CALO NODULAR (%)	Nº ES/CALO NODULAR
12,5	0	15,4	9,5 (38)
25	0	9,1	2,5 (5)
0	12,5	18,5	5 (25)
0	25	8,33	4 (4)

4.5 EFEITO DO NITRATO DE PRATA NA INDUÇÃO DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS

Após os 90 dias de cultura dos explantes em meio de indução, foi possível observar diferenças significativas na interação do picloram com o AgNO_3 (APÊNDICE 9). O maior número de calos foi obtido no tratamento com 150 μM de picloram sem nitrato de prata, diferindo significativamente dos demais tratamentos (TABELA 7). Visualmente, observou-se maior oxidação dos explantes nos tratamentos com AgNO_3 a partir dos 30 dias de indução, levando à necrose dos mesmos. O mesmo foi observado no tratamento com 300 μM de picloram, a partir dos 60 dias.

TABELA 7 EFEITO DO NITRATO DE PRATA E DO PICLORAM SOBRE PERCENTAGEM DE CALOS FORMADOS EM TCLS FOLIARES DE BOCAIUVA AOS 90 DIAS DE CULTIVO *IN VITRO* EM MEIO DE INDUÇÃO DE CALOS PRIMÁRIOS.

NITRATO DE PRATA (μM)	CONCENTRAÇÃO DE PICLORAM		Média
	150 μM	300 μM	
0	68,0 Aa	25,0 Bb	46,5
1	26,0 Ba	34,0 Aa	30,0
MÉDIA	47,0	29,5	

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

Após a transferência dos calos para o meio de cultura contendo 75 μM de picloram e 25 μM de 2-iP ou 1 μM de nitrato de prata e 25 μM de 2-iP, não houve diferença significativa entre os resultados de formação de calos friáveis e compactos (TABELA 8).

TABELA 8 EFEITO DO PICLORAM E NITRATO DE PRATA SOBRE CONSISTÊNCIA DOS CALOS EM TCLS FOLIARES DE BOCAIUVA AOS 150 DIAS DE CULTIVO *IN VITRO* EM MEIO DE MULTIPLICAÇÃO COM 25 μM DE 2-iP.

CONCENTRAÇÃO (μM)		CALOS NÃO OXIDADOS		OXIDADOS (%)
PICLORAM	AgNO ₃	FRIÁVEL (%)	COMPACTO (%)	
75	0	54,43	45,57	21
0	1	50,88	49,12	33

Os calos que estavam no meio sem picloram foram descartados, devido ao aumento da oxidação e também porque não apresentaram formação dos clusters embriogênicos. Após 180 dias, 6% dos calos compactos apresentaram formação de calos com aspecto nodular e foram transferidos para o meio de conversão, mas os embriões formados (média de 8,5 embriões por calo nodular) oxidaram quando colocados na luz.

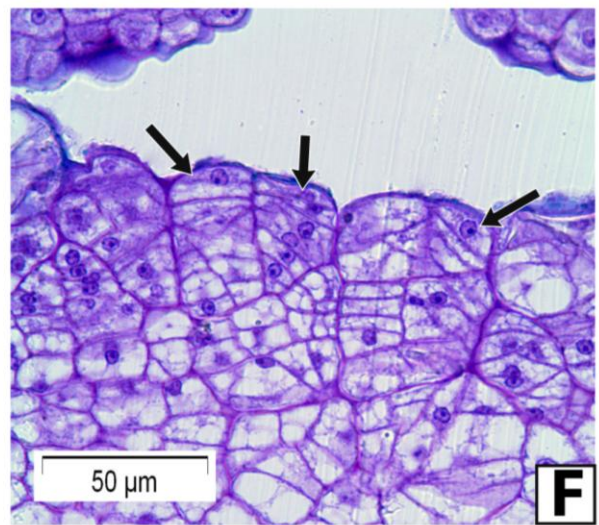
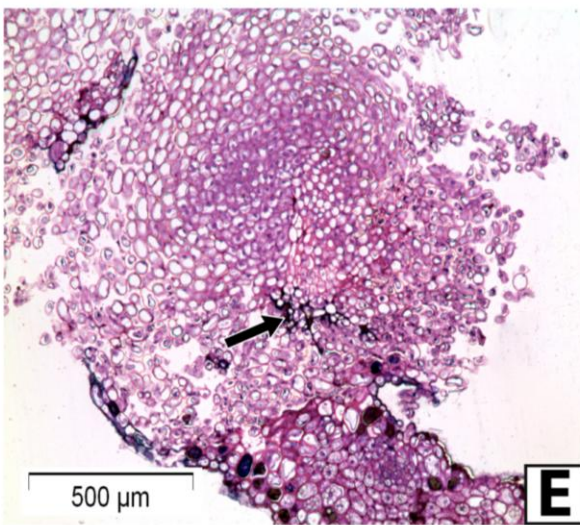
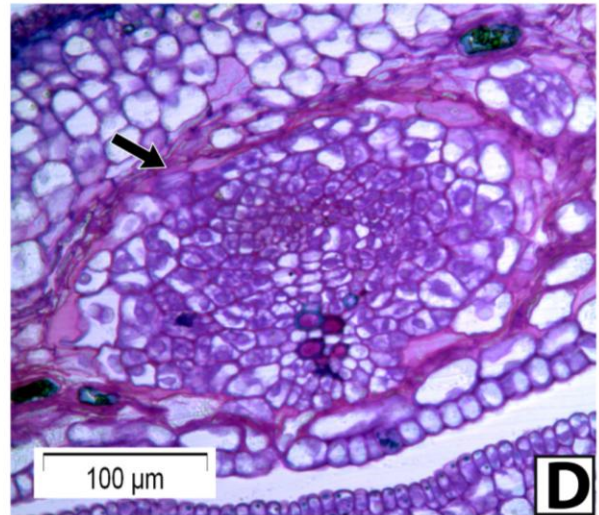
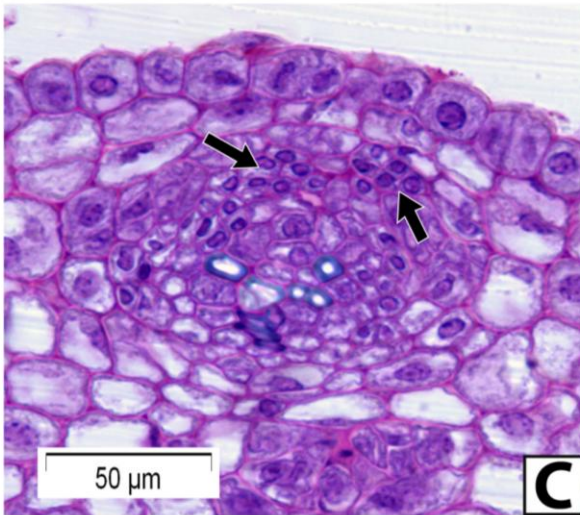
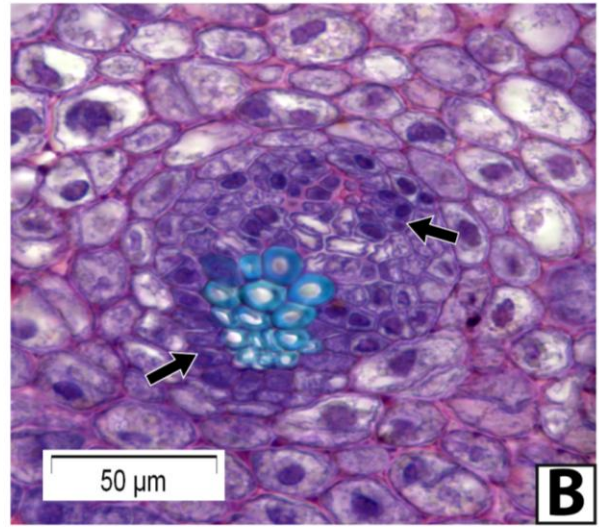
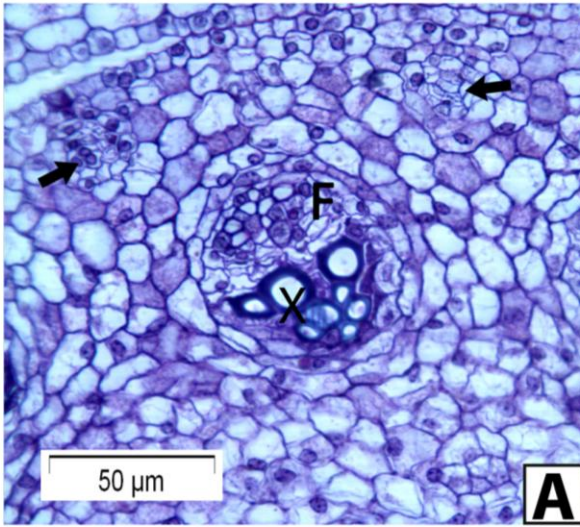
4.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA DE CALOS E EMBRIÕES SOMÁTICOS

A análise histológica do TCL no início do tratamento mostrou células em diferenciação celular e pode-se observar vários feixes vasculares colaterais distribuídos ao longo do primórdio foliar. Foram identificados feixes vasculares maiores, com xilema e floema diferenciados e feixes menores em diferenciação (FIGURA 6A). Após dois dias de cultivo *in vitro*, observou-se a formação de células localizadas no parênquima perivascular (FIGURA 6B). Essas células eram de menor diâmetro, com núcleo bem evidente e citoplasma denso. Aos cinco dias já apareciam grupos de células em divisão no parênquima perivascular, principalmente nas células próximas ao floema, que apresentava-se desorganizado, com os elementos de tubo crivado colapsados (FIGURA 6C). Com quinze dias de cultivo *in vitro*, as células apresentavam divisões tanto periclinais quanto anticlinais,

indicando um crescimento radial que comprimiu as células do parênquima do explante (FIGURA 6D).

Com quatro semanas de cultivo, os calos primários emergiram do explante original e aumentaram de volume formando duas zonas: a central, com células meristemáticas em divisão e uma zona periférica, com células em diferentes graus de diferenciação, frouxas, apresentando um aspecto friável (FIGURA 6E). Em 12 semanas, o calo nodular surgiu sobre o calo primário, com um crescimento celular diferente, as células em divisão se encontravam na periferia do calo e não na região central. E nesse tipo de calo, os pro-embriões começaram a aparecer após 180 dias, com divisões das células na periferia do calo (FIGURA 6F).

FIGURA 6 – A: SECÇÃO TRANSVERSAL DA PLÂNTULA DE *A. ACULEATA* ANTES DA OBTENÇÃO DOS TCLs, MOSTRANDO UM FEIXE VASCULAR MAIOR, COM O XILEMA E O FLOEMA DIFERENCIADOS E FEIXES MENORES (SETAS). B: SECÇÃO TRANSVERSAL DO TCL COM DOIS DIAS DE CULTIVO *IN VITRO*, MOSTRANDO O APARECIMENTO DE CÉLULAS PEQUENAS COM NÚCLEOS GRANDES E CITOPLASMA DENSO NO PARÊNQUIMA PERIVASCULAR (SETAS). C: SECÇÃO TRANSVERSAL DO TCL COM CINCO DIAS DE CULTIVO *IN VITRO*, MOSTRANDO GRUPO DE CÉLULAS COM CARACTERÍSTICAS EMBRIOGÊNICAS (SETAS). D: SECÇÃO TRANSVERSAL DO TCL COM QUINZE DIAS DE CULTIVO *IN VITRO*, MOSTRANDO O CALO EM FORMAÇÃO E O COLAPSO DAS CÉLULAS DO PARÊNQUIMA DO EXPLANTE (SETA). E: SECÇÃO TRANSVERSAL DO TCL COM TRINTA DIAS DE CULTIVO *IN VITRO*, MOSTRANDO O CALO FORMADO, COM CÉLULAS MERISTEMÁTICAS LOCALIZADAS INTERNAMENTE E EXTERNAMENTE CÉLULAS DIFERENCIADAS DESAGREGADAS, DANDO UM ASPECTO FRIÁVEL AO CALO. NA SETA, O RESQUÍCIO DOS VASOS DO XILEMA. F: INÍCIO DA FORMAÇÃO DOS EMBRIÕES SOMÁTICOS NAS CÉLULAS DA PERIFERIA DO CALO NODULAR (SETAS). F= FLOEMA; X= XILEMA; CP= CALO PRIMÁRIO.



Aos 210 dias, pró-embriões puderam ser observados (FIGURA 7A). Embriões somáticos com a protoderme definida foram observados e alguns apresentavam-se fundidos (FIGURA 7B). Também foram observados embriões com compostos fenólicos presentes em algumas células protodérmicas e embriões em que a protoderme não era contínua. Aos 250 dias, embriões desconectados do tecido original foram observados (FIGURA 7C). Os poucos embriões convertidos apresentaram a epiderme do primórdio foliar mal desenvolvida, com poucos estômatos e um parênquima clorofiliano frouxo (FIGURA 7D). Os feixes vasculares apresentavam células parenquimáticas, tanto do xilema quanto do floema, com compostos fenólicos.

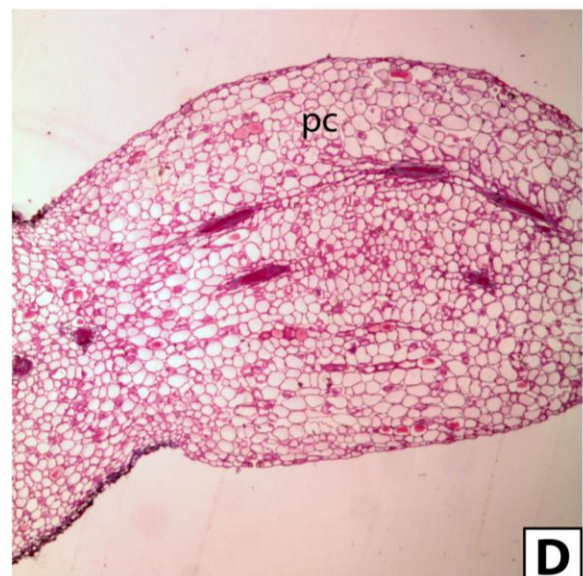
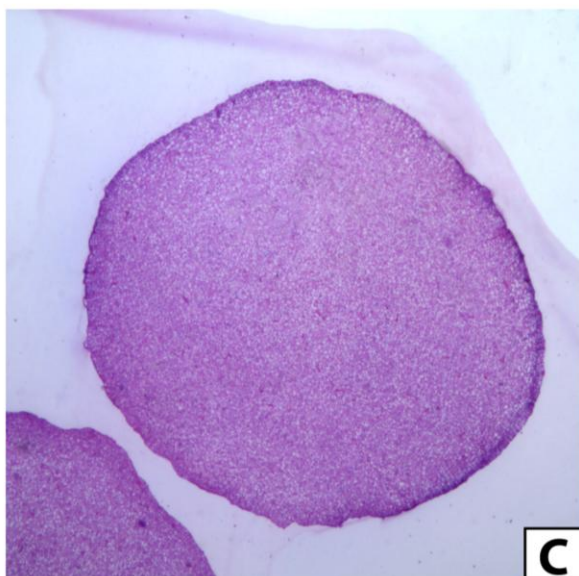
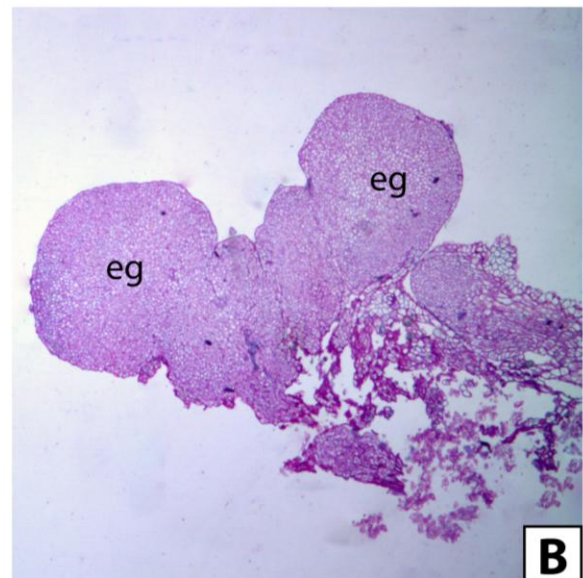
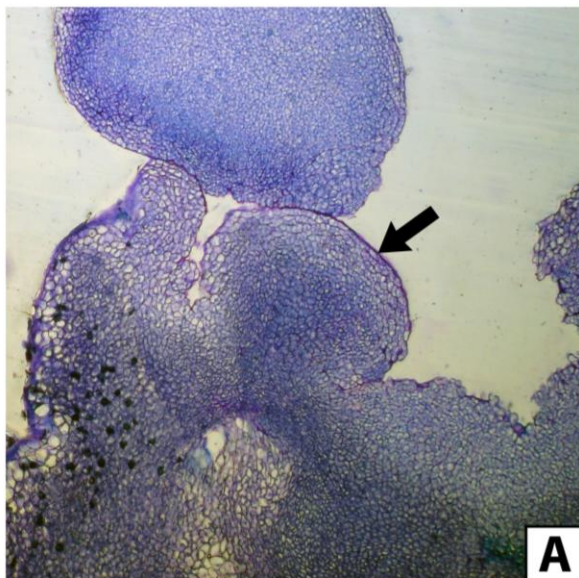


FIGURA 7 – A: FORMAÇÃO DE UM PRÓ-EMBRIÃO (pe) NO CALO NODULAR DE *A. ACULEATA*, AOS 210 DIAS DE CULTIVO IN VITRO. B: EMBRIÕES GLOBULARES (eg) COM PROTODERME DEFINIDA AOS 240 DIAS, FUSIONADOS C: EMBRIÃO GLOBULAR AOS 250 DIAS. D: CORTE LONGITUDINAL DE PLÂNTULA CONVERTIDA, MOSTRANDO A EPIDERME MAL-FORMADA (SETA) E O PARÊNQUIMA CLOROFILIANO (pc) DESORGANIZADO, COM MUITOS ESPAÇOS INTERCELULARES.

5 DISCUSSÃO

A técnica do TCL foi promissora para *A. aculeata* utilizando a parte foliar como explante. Essa técnica foi desenvolvida por Tran Than Van (1973) e foi aplicada eficientemente em várias espécies, como *Panax ginseng* (AHN *et al.*, 1996), *Digitaria sanguinalis* (BUI *et al.*, 1997) e *Oryza sativa* (NHUT *et al.*, 2000). Em um teste preliminar, verificou-se que a indução de calos em explantes foliares de *A. aculeata* com cerca de 5 mm de espessura foi muito baixa (dados não apresentados), enquanto a indução com tTCLs foi eficiente. Gill *et al.* (1992) mostraram que tTCLs de hipocótilos de gerânio híbrido (*Pelargonium x hortorum*) desenvolveram embriões somáticos rapidamente e em maior número do que quando os hipocótilos inteiros foram usados como explantes.

O uso dos TCLs como explantes apresenta a vantagem de que as células tem maior contato com os nutrientes e reguladores vegetais presentes no meio de cultura do que os explantes inteiros (AHN *et al.*, 1996). A técnica proporciona um sistema simples e eficiente de micropropagação, utilizando uma quantidade pequena de material vegetal e de meio de cultura, facilitando estudos de embriogênese somática e organogênese (SILVA, 2003). Além de *A. aculeata*, a técnica do TCL foi utilizada com sucesso em outras palmeiras, como *Bactris gasipaes* (STEINMACHER *et al.*, 2007b) e *Elaeis guineensis* (SCHERWINSKI-PEREIRA *et al.*, 2010), iniciando as culturas com tTCLs foliares de plântulas obtidas de germinação *in vitro*.

A maior taxa de indução de calos primários em *A. aculeata* foi observada nos explantes basais, correspondentes à região do meristema apical. Nessas regiões, os tecidos encontravam-se em divisão e diferenciação celular. Explantes foliares respondem de acordo com a sua ontogênese e idade fisiológica e em monocotiledôneas as células competentes para a calogênese estão localizadas nas folhas jovens (JULLIEN e TRAN THANH VAN, 1994). Wernicke e Milkovits (1984) mostraram que as regiões foliares mais jovens de trigo responderam melhor na regeneração de plantas do que as mais velhas. Também para diferentes variedades de trigo, Mahalakshmi *et al.* (2003) observaram que as regiões basais de folhas

jovens respondiam melhor na regeneração. Em pupunha (*Bactris gasipaes*), a maior taxa de indução de calos primários foi nos explantes próximos à região do meristema apical, independente da concentração de picloram utilizada, sendo a taxa mais alta encontrada na posição 0, correspondente ao meristema apical (STEINMACHER *et al.*, 2007b). Além disso, em tTCLs foliares de dendezeiro, a formação de calos embriogênicos e de embriões somáticos foi maior nessas regiões (SCHERWINSKI-PEREIRA *et al.*, 2010).

A indução e iniciação de culturas embriogênicas de *A. aculeata* ocorreu em meio de cultura suplementado com altas concentrações de auxina associada ao carvão ativado e isso tem sido comum na indução de embriogênese somática em espécies de palmeiras (ALANG e KRISHNAPILLAY, 1987; FERNANDO *et al.*, 2004; PÉREZ-NUÑEZ *et al.*, 2006; SAÉNZ *et al.*, 2006; STEINMACHER *et al.*, 2007a,b; OTHMANI *et al.*, 2009; PERERA *et al.* 2009; AL-KHAYRI, 2010).

Dentre as auxinas sintéticas, o picloram foi eficiente na indução de embriões somáticos de *A. aculeata* e também para outras palmeiras, como pupunha (STEINMACHER *et al.*, 2007a,b), dendezeiro (SCHERWINSKI-PEREIRA *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2012), açai (SCHERWINSKI-PEREIRA *et al.* 2012) e *Areca catechu* (KARUN *et al.*, 2004). Em um teste preliminar (dados não apresentados), a taxa de indução de calos em tTCLs foliares de *A. aculeata* cultivados na presença de 2,4-D foi quase nula. Tabai (1992) também mostrou que em *A. aculeata* o picloram foi melhor que o 2,4-D na indução de calos primários a partir de embriões zigóticos. No presente trabalho, o picloram foi necessário para a indução de calos em explantes foliares em *A. aculeata*. No trabalho de Moura *et al.* (2009), a indução de calos embriogênicos e a formação de embriões somáticos só ocorreu quando o picloram foi utilizado nos meios de cultura para o mesmo tipo de explante.

A passagem dos calos primários de *A. aculeata* do meio de indução diretamente para um meio sem picloram e sem carvão ativado causou a oxidação lenta dos mesmos e não houve formação de embriões somáticos. A remoção da auxina do meio antes do tempo pode inibir a formação de embriões somáticos. Somleva *et al.* (2000) observou em *Dactylis glomerata* L. que a passagem dos calos para um meio sem auxina inibiu a formação de embriões somáticos. Mesmo as células sendo competentes, elas precisariam de um maior tempo de exposição à auxina para

completar a transição para o estado embriogênico. O carvão ativado possui a capacidade de adsorver vários tipos de moléculas, como, por exemplo, compostos fenólicos secretados pelos tecidos, o que tem resolvido o problema da necrose tecidual em palmeiras. Entretanto, adsorve também componentes importantes nas respostas morfogênicas, como vitaminas e reguladores vegetais (EBERT e TAYLOR, 1990; EBERT *et al.*, 1993; SAÉNZ *et al.*, 2005). Essa capacidade de adsorção pode variar dependendo do tipo de carvão ativado utilizado, resultando em variações na concentração de auxina ativa no meio, podendo afetar a reprodutibilidade dos protocolos (FERNANDO *et al.*, 2004; SAÉNZ *et al.*, 2005).

A escolha do melhor meio de cultura é muito importante para desenvolver um protocolo eficiente de cultura de qualquer espécie vegetal (ABOSHAMA, 2011). É necessário investigar e escolher um meio de cultura que atenda aos requerimentos nutricionais da espécie estudada para proporcionar um crescimento *in vitro* ideal (KAI *et al.*, 2008). Alguns trabalhos mostraram que diferentes formulações salinas podem modificar a resposta *in vitro* da espécie, inclusive inibindo a embriogênese somática (ROUT *et al.*, 1995).

Em *A. aculeata*, um maior número de calos foi induzido no Y3 em comparação aos induzidos no MS e somente no meio Y3 apareceram calos embriogênicos e embriões somáticos. O meio de cultura Y3 foi desenvolvido para indução e crescimento de calos em *Cocos nucifera* por Eeuwens (1976) e mostrou-se superior aos meios MS, de White (1943) e de Heller (1953). Eeuwens (1976) mostrou que a maior quantidade de nitrato, iodo e potássio, além da diminuição da concentração de amônia, favoreceram o crescimento de calos.

A subcultura dos calos primários para o meio com concentração de picloram reduzida e com adição de BAP e 2-iP estimulou o crescimento e a diferenciação dos calos. Já no meio de conversão, o uso de BAP ou 2-iP não apresentou diferenças nas respostas ao tipo de citocinina, tanto de calogênese quanto de formação de embriões somáticos, mas houve maior formação de embriões somáticos na menor concentração de ambas as citocininas, combinadas com o ANA. As citocininas têm sido usadas na indução de massas embriogênicas e de embriões somáticos, sozinhas ou combinadas com baixas concentrações de auxina (RAO e GANAPATHI,

1993). Elas influenciam a divisão celular e a morfogênese *in vitro*, regulando a divisão e diferenciação de tecidos (KRIKORIAN, 1995; FEHÉR *et al.*, 2003).

Em *A. aculeata*, o nitrato de prata aplicado no meio de cultura na concentração de 1 μM diminuiu a formação de calos primários e inibiu a formação de calos embriogênicos e embriões somáticos. O mesmo foi observado por Hatanaka *et al.* (1995) em explantes foliares de *Coffea canephora*, onde a adição de nitrato de prata nas concentrações de 5, 10, 20 e 50 μM no meio de cultura inibiu a embriogênese somática. Do mesmo modo, em *Rubus ssp.*, a adição de 58,8 μM de nitrato de prata diminuiu a indução de calos em explantes foliares (TSAO e REED, 2002). O nitrato de prata atua como inibidor da ação do etileno e afeta a embriogênese, aumentando ou diminuindo a resposta *in vitro* dos explantes, dependendo da espécie (KONG *et al.*, 2012; AL-KHAYRI e AL-BAHRANY, 2004). Sendo assim, o efeito do nitrato de prata sobre a embriogênese deve ser avaliado em cada espécie.

A formação de calos embriogênicos ocorreu quando a concentração de picloram foi reduzida no meio de cultura. Após transferência para o meio de maturação, houve formação de embriões somáticos. Entretanto, após a transferência para o meio de conversão, os embriões oxidaram. A baixa taxa de conversão é um problema recorrente nos protocolos de embriogênese somática. Em muitos, mesmo com uma alta produção de embriões somáticos, a falta ou baixa frequência de conversão em plantas é observada (GAJ, 2004). Baixa taxa de conversão de embriões somáticos pode estar associada a anormalidades morfológicas ou à imaturidade do embrião (AMMIRATO *et al.*, 1987; SUHASINI *et al.*, 1996).

O estudo histológico dos eventos envolvidos no início da calogênese dos explantes é importante, pois a origem do calo pode afetar seu estado fisiológico e sua capacidade regenerativa (OKA *et al.*, 1995). A análise histológica da calogênese de *A. aculeata* mostrou que as alterações celulares nos TCLs iniciaram aos dois dias de cultivo *in vitro* e ocorreram nas células localizadas entre os vasos do xilema e do floema. Em explantes foliares de *Phoenix dactylifera* foram observadas alterações celulares no parênquima fascicular após dois dias de cultivo *in vitro*, tanto na presença de ANA (GUEYE *et al.*, 2009b) quanto na presença de

2,4-D (GUEYE *et al.*, 2009a). Também em embriões zigóticos de *Carica papaya*, as primeiras divisões celulares ocorreram em células meristemáticas localizadas próximas ao procâmbio (FERNANDO *et al.*, 2001). Em TCLs foliares de *Bactris gasipaes* cultivados na presença de picloram, Steinmacher *et al.* (2007b) observaram as primeiras divisões celulares, próximas aos feixes vasculares, após 30 dias. Segundo Almeida *et al.* (2012), as células pré procambiais, que darão origem aos feixes vasculares, são o nicho de formação de células precursoras tanto de embriões somáticos quanto de brotações em *Bactris gasipaes*. Outros autores relataram que as células pró cambiais são multipotentes e dão origem às linhagens de células embriogênicas, como em *Medicago trunculata* (WANG *et al.*, 2011), em cenoura (SCHMIDT, 1997) e originam embriões somáticos diretamente em *Capsicum chinense* Jacq. (SANTANA-BUZZY *et al.*, 2009).

O calo primário de *A. aculeata* apresentou duas regiões distintas após 30 dias: o centro meristemático, com células compactas em intensa divisão e a parte periférica, de aparência friável, com células vacuoladas. Esse padrão foi observado também em *Carica papaya* (FERNANDO, *et al.*, 2001) aos 15 dias de cultivo *in vitro*. Já Gueye *et al.* (2009b), definiram três zonas concêntricas nos calos primários de tamareira: a central, com células meristemáticas; uma região cortical, com células maiores, vacuoladas e a região periférica, com células um pouco menores, bem coradas, apresentando divisões celulares. Em *A. aculeata*, a partir do calo primário, outro calo se desenvolveu, apresentando uma zona meristemática externa, não mais central. Desse calo surgiram os pró-embriões, a partir da divisão de células da periferia. Isso também foi observado em amendoim (LOISEAU, 1998) e batata (SHARMA e MILLAN, 2005). Já em *B. gasipaes*, os pró-embriões surgiram do calo primário, que também apresentou uma zona meristemática periférica (STEINMACHER *et al.*, 2007b).

Os pró-embriões de *A. aculeata* desenvolveram-se e formaram embriões globulares, já com uma protoderme definida. Alguns apresentaram compostos fenólicos nas células da protoderme, como foi encontrado por Bandeira (2008) para a mesma espécie. A presença desses compostos pode ter impedido a diferenciação e desenvolvimento dos embriões, justificando o baixo número de embriões que progrediram e foram convertidos em plantas.

Alguns embriões somáticos de *A. aculeata* progrediram, mas houve falhas na conversão de alguns, como ausência do primórdio foliar, não emissão da radícula ou a ocorrência de ambos. Os estádios iniciais da embriogênese são processos críticos, quando são estabelecidos a polaridade, a formação da protoderme e dos demais meristemas, sendo que a sobrevivência e crescimento das plântulas regeneradas dependem desses fatores (BOZHKOV *et al.*, 2002).

Alterações na formação e morfologia dos embriões somáticos, como falta de histodiferenciação (FILLIPI *et al.*, 2001), falha estrutural ou funcional do meristema apical caulinar (NICKLE e YEUNG, 1993; WETZSTEIN e BAKER, 1993) e desintegração do meristema caulinar (YEUNG *et al.*, 1996) explicam a dificuldade de regeneração das plântulas. A desorganização tecidual da epiderme e do parênquima e a presença de compostos fenólicos depositados em células dos feixes vasculares dos embriões convertidos de *A. aculeata* pode ter sido a causa da morte dos mesmos durante o crescimento das plântulas.

6 CONCLUSÕES

A técnica do TCL é promissora para indução de calos e embriões somáticos em *A. aculeata*. Os tTCLs foliares mais basais respondem melhor à calogênese e o picloram é eficiente na indução de calos, principalmente nas concentrações de 150 e 300 μM . Os calos precisam de exposição a uma menor concentração de auxina, associada a uma citocinina, para formação dos embriões somáticos. A remoção completa de picloram no segundo meio inibe a formação de embriões somáticos. As citocininas 2-iP e BAP induzem maior quantidade de embriões somáticos na concentração de 12,5 μM . Os sais do meio de cultura Y3 são mais eficientes na calogênese e na formação de embriões somáticos do que os sais do MS e o nitrato de prata 1 μM diminui a formação de calos, causando necrose dos TCLs e inibindo a formação de embriões somáticos. A partir disso, um protocolo pode ser definido (FIGURA 8).

Os calos primários se originam de células do parênquima perivascular, que começam a se modificar após dois dias de cultivo *in vitro*, quando aparecem as primeiras células com características meristemáticas. Os embriões somáticos começam a se formar na periferia dos calos nodulares. A presença de compostos fenólicos nas células protodérmicas de alguns embriões e a falta dos meristemas pode explicar a baixa taxa de conversão dos embriões somáticos.

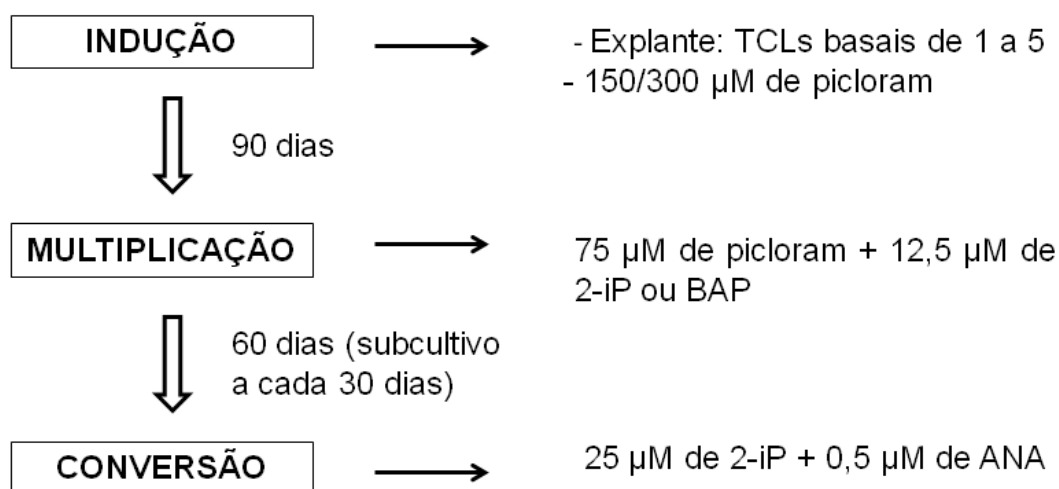


FIGURA 8 – PROTOCOLO DE EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM *ACROCOMIA ACULEATA* ATRAVÉS DA TÉCNICA DO TCL.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O protocolo de embriogênese somática em *A. aculeata* por meio da técnica do TCL deve ser aprimorado para aumentar a produção de embriões somáticos de maior qualidade, que podem ser eficientemente convertidos em plantas. Alterações no tempo de exposição e da concentração dos reguladores, no tempo de indução e tratamentos de maturação devem ser testados. Além disso, estudos histológicos, histoquímicos e bioquímicos devem ser conduzidos para compreender todas as etapas da embriogênese, ajudando na melhoria do protocolo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOSHAMA, H.M.S. Direct somatic embryogenesis of Pepper (*Capsicum annum* L.). **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 7, n. 6, p. 755-762, 2011.

AHMED, R.; GUPTA, S. D.; DE, D. N. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf derived callus of winged bean [*Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC.]. **Plant Cell Reports**, v. 15, p. 531-535, 1996.

AHN, I. O.; LE, B. V.; GENDY, C.; TRAN THANH VAN, K. Direct somatic embryogenesis through thin cell layer culture in *Panax ginseng*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 45, p. 237-243, 1996.

ALANG, Z. C.; KRISHNAPILLAY, B. Somatic embryogenesis from young leaf tissues of sago palm *Metroxylon sagu* **Plant Tissue Culture Letters**, v. 4, n. 1, p. 32-34, 1987.

AL-KHAYRI, J. M; AL-BAHRANY, A. M. Genotype-dependent *in vitro* response of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars to silver nitrate. **Scientia horticultrae**, n.99, p.153-162, 2004.

AL-KHAYRI, J. M. Date Palm *Phoenix dactylifera* L. In: Jain, S. M.; Gupta, P., K. (eds.). **Protocol for embryogenesis in woody plants**, p. 309-319, 2005.

AL-KHAYRI, J. M. Somatic embryogenesis of date palm *Phoenix dactylifera* L. improved by coconut water. **Biotechnology**, vol. 9, n. 4, p.477-484, 2010.

ALMEIDA, M.; KERBAUY, G. B. Micropropagation of *Bactris gasipaes* H.B.K. (Palmae) through flower bud. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 8, p. 215-217, 1996.

ALMEIDA, M.; GRANER, E. M.; ALMEIDA, C. V.; BRONDANI, G. E.; ABREU-TARAZI, M F. Pre-procambial cells are niches for pluripotent and totipotent stem-like cells for organogenesis and somatic embryogenesis in the peach palm: a histological study. **Plant Cell Reports**, v. 31, p. 1495-1515, 2012.

AMMIRATO, P.V. Organization events during somatic embryogenesis. In: GREEN, C.E.; SOMERS, D.A., HACKETT, W. P.; BIESBOER, D. D. (Eds.) **Plant Tissue and Cell Culture, Plant Biology**, v. 3, p. 57-81, 1987.

ANGELO, P. C.; LOPES, R.; MORAES, L. A. C.; CUNHA, R. N. V. da. Embryogenic calli induced in interspecific (*Elaeis guineensis* X *E. oleifera*) hybrid zygotic embryos. **Crop breeding and applied biotechnology**, n. 9, p. 274-277, 2009.

ARIAS, O. Propagación vegetativa por cultivo de tejidos del pejobaye (*Bactris gasipaes* H. B. K.). **Revista de la Asociación Bananera Nacional**, Costa Rica, v. 9, p. 24-27, 1985.

ARTECA, R.N. **Plant Growth substances – Principles and applications**. Chapman & Hall, 322 p., 1996.

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

BELÉN-CAMACHO, D. R.; LÓPEZ, I.; GARCÍA, D.; GONZALÉZ, M.; MORENO-ALVAREZ, M. J.; MEDINA, C. Evaluación físico-química de la semilla y del aceite de corozo (*A. aculeata* Jacq.). **Grasas y Aceites**, Venezuela, v. 56, n. 4, p 311-316, 2005.

BHARGAVA, S.C.; SAXENA, S.N.; SHARMA, R. *In vitro* multiplication of *Phoenix dactylifera* L. **Journal Plant Biochemistry & Biotechnology**, v. 12, p. 43-47, 2003.

BHASKARAN, S.; SMITH, R. H. Somatic embryogenesis from shoot tip and immature inflorescence of *Phoenix dactylifera* cv. Barhee. **Plant Cell Reports**, v. 12, p. 22-25, 1992.

BHERING, L. **Macaúba: Matéria - prima nativa com potencial para a produção de biodiesel**. Disponível em: <<http://www.diadecampo.com.br/zpublisher/materias/Materia.asp?id=21272&secao=Artigos%20Especiais>>. Acesso em 06 janeiro 2011.

BOLANDI, A. R.; BRANCHARD, M. ALIBERT, G.; GENZBITEL, L.; BERVILLE, A.; SARRAFI, A. Combining-ability analysis of somatic embryogenesis from epidermal layers in the sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 100, p.621–624, 2000.

BOUGET, F. -Y.; BERGER, F.; BROWNLEE, C. Position dependent control of cell fate in the *Fucus* embryo: role of intercellular communication. **Development**, v. 125, p. 1999-2008, 1998.

BOZHKOVA, P. V.; FILINOVA, L. H.; VON ARNOLD, S. A key developmental switch during norway spruce somatic embryogenesis is induced by withdrawal of growth regulators and is associated with cell death and extracellular acidification. **Biotechnology and bioengineering**, v. 77, n. 6, 2002.

BUI, V. L.; DO MY, N.T. GENDY, C.; VIDAL, J.; TRAN THANH VAN, K. Somatic embryogenesis on thin cell layers of a C₄ species, *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 49, p.201-208, 1997.

CALDAS, L.S., HARIDASAN, P., FERREIRA M.E. Meios Nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH. v.1, p.87-116, 1998.

CANGAHUALA-INOCENTE, G. C. **Caracterização morfofisiológica, bioquímica e proteômica da embriogênese zigótica e somática de goiabeira serrana (*Acca sellowiana* (O. Berg.) Burret)**. Tese (Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais) – Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

CANTRILL, L. C.; OVERALL, R. L.; GOODWIN, P. B. Changes in symplastic permeability during adventitious shoot regeneration in tobacco thin cell layers. **Planta**, v. 214, p. 206-214, 2001.

CARIMI, F.; PASQUALE, F. de; CRESCIMANNO, F. G. Somatic embryogenesis and plant regeneration from pistil thin cell layers of *Citrus*. **Plant Cell Reports**, v.18, p. 935–940, 1999.

CHAN, J. L.; SAENZ, L.; TALAVERA, C.; HORNUNG, R.; ROBERT, M.; OROPEZA, C. Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**. v. 17, p. 517-521, 1998.

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

DUDITS D; GYORGYEY J; BOGRE L; BAKO L. Molecular biology of somatic embryogenesis. In: THORPE TA (Ed.). **In Vitro Embryogenesis in Plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. p. 267-280, 1995.

EBERT, A.; TAYLOR, H.F.; BLAKE, J. Changes of 6-benzylaminopurine and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentrations in plant tissue culture media in the presence of activated charcoal. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v. 33, p.157-162, 1993.

EEUWENS, C.J. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera* L.) and culture *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, v. 36. p. 23-28, 1976.

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**, v. 4, p. 244-246, 2005.

ELHITI, M.; STASOLLA, C. The use of zygotic embryos as explants for in vitro propagation: an overview. In: THORPE and YEUNG, E. C. (eds.) **Plant Embryo Culture: Methods and Protocols**. Methods in Molecular Biology, v. 710, p. 229-253, 2011.

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

FERNANDO, J. A.; MELO, M.; SOARES, M. K. M.; APEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Anatomy of somatic embryogenesis in *Carica papaya* L. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 44, n. 3, p. 247-255, 2001.

FERNANDO, S. C.; GAMAGE, C. K. A. Abscisic acid induced somatic embryogenesis in immature embryo explants of coconut (*Cocos nucifera* L.). **Plant Science**, v. 151, p. 193-198, 2000.

FERNANDO, S. C.; WEERAKOON, L. K.; GUNATHILAKE, T. R. Micropropagation of coconut through plumule culture. **Cocos**, vol. 16, p.1-10, 2004.

FILIPPI, S. B.; APEZZATO-DA-GLÓRIA, B. RODRIGUEZ, A. P. M. Variações morfológicas de embriões somáticos obtidos a partir de inflorescências de bananeira. **Scientia Agricola**, vol. 58, p. 711-716, 2001.

FKI, L.; MASMOUDI, R.; DRIRA, N.; RIVAL, A. An optimized protocol for plant regeneration from embryogenic suspension cultures of date palm, *Phoenix dactylifera* L., cv. Deglet Nour. **Plant Cell Reports**, v. 21, p. 517–524, 2003.

FORTES, I. C. P.; BAUGH, P. J. Study of analytical on-line pyrolysis of oils from Macauba fruit (*Acrocomia sclerocarpa* M.) via GC/MS. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 10, p. 469-477, 1999.

GAJ, M. D. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Growth Regulators**, v. 43, p. 27-47, 2004.

GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v. 50, p. 151-158, 1968.

GASPAR, T.; KEVERS, C.; PENEL, C.; GREPPIN, H. REID, D. M.; THORPE, T. A. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, n.32, p. 272-289, 1996.

GENDY, C.; SANÉ, M.; LE, B. V.; VIDAL, J.; TRAN THANH VAN, K. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. **Plant Cell Reports**, v. 15, p. 900-904, 1996.

GEORGE, F. E. **Plant propagation by tissue culture**. Exegetics Limited: England, ed. 2, v.2, 1996.

GILL, R.; GERRATH, J.; SAXENA, P. K. High-frequency direct embryogenesis in thin layers culture of hybrid seed geranium (*Pelargonium*). **Canadian Journal of Botany**, v. 71, p. 408-413, 1992.

GOMES, K. K. P.; OLIVEIRA, V. C. de; LEDO, A. S.; ANGELO, P. C. S.; COSTA, J. L. S. Indução de calo a partir de eixo embrionário de coqueiro (*Cocos nucifera* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, p. 124-126, 2004.

GONZÁLEZ-MARÍN, R. M.; MORENO-CASASOLA, P.; ORELLANA, R.; CASTILLO, A. Palm use and social values in rural community on the coastal plains of Veracruz, Mexico. **Environment, Development and Sustainability**. n. 14, p. 541-555, 2012.

GROLL, J.; MYCOCK, D. J.; GRAY, V. M.; LAMINSKI, S. Secondary somatic embryogenesis of cassava on picloram supplemented media. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 65, p. 201-210, 2001.

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**, v. 10, n.52, p. 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**, v. 111, p. 65-71, 1998.

GUERRA, P.M.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, A.T. Embriogênese somática e semente sintética. In: TORRES, A.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA - CNPH, p. 533-568, 1999.

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

GUEYE, B.; SANE, S. D.; AHMED, D.; MORCILLO, F.; BORGEL, A.; HILBERT, J. L.; VERDEIL, J.; BLERVACQ, A. S. Callogenesis and rhizogenesis in date palm leaf segments: are there similarities between the two auxin-induced pathways? **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 98, n. 47-58, 2009b.

HENDERSON, A.; GALEANO, G.; BERNAL, R. **Field Guide to the Palms of the Americas**. New Jersey. Princeton University. p.166-167, 1995.

JULLIEN, F.; TRAN THANH VAN, K. Micropropagation and embryoid formation from young leaves of *Bambusa glaucescens* 'Golden goddess'. **Plant Science**, v. 98, p. 199-207, 1994.

KAI, G.Y.; DAI, L.M.; MEI, X.Y.; ZHENG, J.G.; WANG, W.; LU, Y.; QIAN, Z.Y.; ZHON, G.Y. In vitro plant regeneration from leaf explants of *Ophiorrhiza japonica*. **Biologia Plantarum**, v. 52, n. 3, p. 557-560, 2008.

KARNOVSKY, M. J. A. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cellular Biology**, v. 27, p. 137-138, 1965.

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

KOEHLER, A. D. **Reprodução em *Brachiaria* spp.: SERK (Somatic embryogenesis receptor-like kinase) no desenvolvimento de antera, do ovário e na embriogênese.** Tese (Doutorado em Ciências – Biologia na Agricultura e no Ambiente). 110 p. USP, Piracicaba, 2010.

KONG, D.-M.; SHEN, H.-L.; LI, N. Influence of AgNO₃ on somatic embryo induction and development in Manchuria ash (*Fraxinus mandshurica* Rupr.) **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 120-125, 2012.

LAKSHMANAN, P.; GEIJSKES, R. J.; WANG, L.; ELLIOT, A.; GROF, C. P. L.; SMITH, G. R. Developmental and hormonal regulation of direct shoot organogenesis and somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum* spp. interspecific hybrids) leaf culture. **Plant Cell Reports**, v. 25, p. 1007–1015, 2006.

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

LEGUILLON, S. BRANCHARD, M. Plant regeneration from thin cell layers in *Spinacia oleracea*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 74, p. 257–265. 2003.

LISINGEN, L. V.; CERVI, A. C. *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd ex Mart., nova ocorrência para a flora do Estado do Paraná. **Acta Biológica Paranaense**, Curitiba, v. 38, p. 187-192, 2009.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings International Plant Propagators Society**, v. 30, p.421- 427, 1980.

LOISEAU, J.; MICHAUX-FERRIÈRE, N.; DEUNFF, Y. L. Histology of somatic embryogenesis in pea. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 36, n. 9, p. 683-687, 1998.

LORENZI, G. M. A. C.. **Acrococomia aculeata (Jacq.) Lodd. ex Mart. - Arecaceae: bases para o extrativismo sustentável.** 2006. Tese (Doutorado em Agronomia- Produção Vegetal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

MAHALAKSHMI, A.; KHURANA, J. P.; KHURANA, P. Rapid induction of somatic embryogenesis by 2,4-D in leaf base cultures of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Plant Biotechnology**, v. 20, n. 4, p. 267-273. 2003.

MARTINS, H. **Produção de combustíveis líquidos a partir de óleos vegetais.** Belo Horizonte, Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais, 1983. 2v. (STI- MIC / CETEC - Programa Energia). Relatório final.

MELO, P. G.; PORTELA, F. M.; SANTOS, D. Q. HERNANDEZ-TERRONES, M. G. Produção de biodiesel etílico e metílico a partir de macaúba. In: **IX Encontro Interno e XIII Seminário de Iniciação Científica.** Uberlândia, 2009.

MISSOURI BOTANICAL GARDEN: *Acrococomia aculeata*. Disponível em: <<http://www.tropicos.org/Name/2401428> > Acessado em 02/12/2010.

MONTERO-CORTÉZ, M.; SAÉNZ L.; CÓRDOVA, I.; QUIROZ, A.; J. L.; VERDEIL, J. –L.; OROPEZA, C. GA₃ stimulates the formation and germination of somatic embryos and the expression of a KNOTTED-like homeobox gene of *Cocos nucifera* (L.). **Plant Cell Reports**, v. 29, p. 1049-1059, 2010.

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

MOURA, E. F.; MOTOIKE, S. Y.; VENTRELLA, M. C.; JUNIOR, A. Q. de S.; CARVALHO, M. Somatic embryogenesis in macaw palm (*Acrococomia aculeata*) from zygotic embryos. **Scientia Horticulturae**, v.119, p. 447–454, 2009.

MOTTA, P.E.F., CURI, N. OLIVEIRA-FILHO, A.T., GOMES, J. B. V. Ocorrência da macaúba em Minas Gerais: Relação com atributos climáticos, pedológicos e vegetacionais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, p. 1023-1031, 2002.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.

NAMASIVAYAM, P. Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 86, p. 285-301, 2007.

NHUT, D. T.; ASWATH, C. R.; TEIXEIRA DA SILVA, J. A.; BUI, V. L.; THORPE, T.; TRAN THANH VAN, K. Tobacco thin cell layer morphogenesis. In: Nhut DT, Van Le B, Tran Thanh Van K, Thorpe T. (eds) **Thin Cell Layer Culture System: Regeneration and Transformation Applications**, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, p. 65-134, 2003.

NHUT, D. T.; LE, B. V.; TRAN THANH VAN, K. Somatic embryogenesis and direct shoot regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) using thin cell layer culture of apical meristems. **Journal of Plant Physiology**, v. 157, p. 559–565, 2000.

NICKLE, T. C.; YEUNG, E. C. Failure to establish a functional shoot meristem may be a cause of conversion failure in somatic embryos of *Daucus carota* (Apiaceae). **American Journal of Botany**, vol. 80, p. 1284-1291, 1993.

OTHMANI, A.; BAYOUDH, E. C.; DRIRA, E. N.; MARRAKCHI, M.; TRIFI, E.M. Somatic embryogenesis and plant regeneration in date palm *Phoenix dactylifera* L., cv. Boufeggous is significantly improved by fine chopping and partial desiccation of embryogenic callus. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v. 97, p. 71-79. 2009.

PERERA, P. I. P.; HOCHER, V.; VERDEIL, J. L.; DOULBEAU, S.; YAKANDAWALA, D. M. D.; WEERAKOON, L. K. Unfertilized ovary: a novel explant for coconut (*Cocos nucifera* L.) somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**, v. 26, p. 21-28, 2007.

PERERA, P. I. P.; VIDHANAARACHCHI, V. R. M.; GUNARHILAKE, T. R.; YAKANDAWALA, D. M. D.; HOCKER, V.; VERDEIL, J. L.; WEERAKOON, L. K. Effect of plant growth regulators on ovary culture of coconut (*Cocos nucifera* L.) **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v. 99, p. 73-81, 2009.

PÉREZ-NUÑEZ, M. T.; CHAN, J. L.; GONZÁLEZ, T.; SAÉNZ, L., VERDEIL, J. L.; OROPEZA, C. Improved somatic embryogenesis from *Cocos nucifera* (L.) plumule explants. **In Vitro Cellular Developmental. Biology-Plant**, v. 42, p. 37–43, 2006.

PINTO, A. L. D.; DUARTE, A. P. S.; SALUM, A.; PAIVA, C. L.; MIRANDA, T. L. S. Desenvolvimento de um novo óleo tipo mesa a partir da polpa de macaúba. **IV Congresso Brasileiro de Mamona e I Simpósio Internacional de Oleaginosas Energéticas**, João Pessoa, PB – 2010.

PTAK, A.; BACH, A. Somatic embryogenesis in tulip (*Tulipa gesneriana* L.) flower stem cultures. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 43, p. 35-39, 2007.

QUIROZ-FIGUEROA, F. R.; ROJAS-HERRERA, R.; GALAZ-AVALOS, R. M.; LOYOLA-VARGAS, V. M. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study all differentiation in plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 90, p. 1-8, 2006.

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**, v. 75, p. 41-47, 2003.

RAMOS, M. I. L.; RAMOS FILHO, M. M.; HIANE, P. A.; BRAGA NETO, J. A.; SIQUEIRA, E. M. A. Qualidade nutricional da polpa de bociúva *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, p. 90-94, 2008.

RAMOS, M. I. L.; SIQUEIRA, E. M. A.; ISOMURA, C. C.; BARBOSA, A. M. J.; ARRUDA, S. F. Bociuiva (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd) Improved Vitamin A Status in Rats. **Journal of Agricultural and Food Chemical**, v. 55, p. 3186-3190, 2007.

RIBEIRO, L. M.; GARCIA, Q S.; OLIVEIRA, D. M. T. Structural evaluations of zygotic embryos and seedlings of the macaw palm (*Acrocomia aculeata*, Arecaceae) during in vitro germination. **Trees**, v. 26, p. 851-863, 2012.

ROUT, G. R.; SAMANTARAY S.; DAS, P. Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus culture of *Acacia catechu* – a multipurpose leguminous tree. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 42, p. 293-285, 1995.

SAENZ, L.; AZPEITIA, A.; CHUC-ARMENDARIZ, B.; CHAN, J. L.; VERDEIL, J. L.; HOCHER, V.; OROPEZA, C. Morphological and histological changes during somatic embryogenesis from coconut plumule explants. **In Vitro Cellular Developmental Biology - Plant**. v. 42, p. 19-25, 2006.

SAENZ, L.; AZPEITIA, A.; OROPEZA, C.; JONES, L. H.; FUCHSOVA, K.; SPICHAL, L.; STRNAD, M. Endogenous cytokinins in *Cocos nucifera* L. in vitro cultures obtained from plumular explants **Plant Cell Reports**, v. 29, P. 1227-1234, 2010.

SALIS, S.M.; MATTOS, P.P. **Floração e frutificação de bocaiúva (*Acrocomia aculeata*) e do carandá (*Copernicia alba*)**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2009. 6 p. (Embrapa Pantanal. Comunicado Técnico, 78. Disponível em: <http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/download.php?arq_pdf=COT78>. Acesso em: 10 mar. 2010.

SAMOSIR, Y. M. S.; GODWIN, I. D.; ADKINS, S. W.; DREW, R. A. A report on the culture of embryos of dwarf coconut, *Cocos nucifera* L. var. *nana in vitro*. In: International Symposium of Biotechnology of tropical and subtropical species. Proceedings, **Acta Horticulturae**, v. 30. p. 467-474, 1998.

SANÉ, D.; ABERLENC-BERTOSSI, F.; GAMASSA-DIA, Y. K.; SAGNA, M.; TROUSLOT, F.; DUVAL, Y.; BORGEL, A. Histocytological Analysis of Callogenesis and Somatic Embryogenesis from Cell Suspensions of Date Palm (*Phoenix dactylifera*). **Annals of Botany**, v. 98, p. 301-308, 2006.

SANTANA-BUZZY, N.; LOPEZ-PUC, G.; BARREDO-POOL, F.; CANTO-FLICK, A. BALAM-UC, E.; AVILÉS-VIÑAS, S.; SOLÍS-MARROQUÍN, D.; LECONA-GUZMÁN, C.; BELLO-BELLO, J. J.; GÓMEZ-UC, E.; MIJANGOS-CORTÉS, J. O. Ontogenesis of the Somatic Embryogenesis of Habanero Pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) **HortScience**, vol. 44, n. 1, p. 113-118, 2009.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J.; GUEDES, R. S.; FERMINO, P. C.; DILVA, T. L.; COSTA, F. H. Somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm using the thin cell layer technique. **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, v. 46, p. 378-385, 2010.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; GUEDES, R. S.; SILVA, R. A.; FERMINO, P. C. P.; LUIS, Z. G.; FREITAS, E. O. Somatic embryogenesis and plant regeneration in açai palm (*Euterpe oleracea*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 109, p. 501-508, 2012.

SCHMIDT, E. D.; GUZZO, F.; TOONEN, M. A.; DEURIES, S. C. A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. **Development**, v. 124, p. 2049-2062, 1997.

SHARMA, S. K.; MILLAN, S. Somatic embryogenesis in *Solanum tuberosum* L.: a histological examination of key developmental stages. **Plant Cell Reports**, v. 23, p. 115-119, 2004.

SILVA, J. A. da. Thin Cell Layer technology in ornamental plant micropropagation and biotechnology. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, p. 683-691, 2003.

SILVA, J. A. da; NHUT, D. T. Cells: functional units of TCLs. In: Nhut, D.T., Van Le, B., Tran Thanh Van, K., Thorpe T. (eds) **Thin Cell Layer Culture System: Regeneration and Transformation Application**, Kluwer Academic, p. 65-134, 2009.

SILVA, J. C. **Endocarpos de babaçu e macaúba, comparados à madeira de *Eucalyptus grandis* para a produção de carvão vegetal**. Piracicaba, 1986. 124p. (Tese-Mestrado-ESALQ). 1986.

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**, v. 111, p. 59-67, 2012.

SILVA, V. dos S. **Regeneração in vitro de embriões de *Cocos nucifera* L.** Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo, 2007.

SLATER, A.; SCOTT, N.; FOWLER, M. **Plant biotechnology: the genetic manipulation of plants**. 346p. Oxford: Oxford University Press, 2003.

STEINMACHER, D. A. **Germinação, crio-preservação e embriogênese somática em pupunha**. 146 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais), Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

STEINMACHER, D. A.; CANGAHUALA-INOCENTE, G.C.; CLEMENT, C.R.; GUERRA, M.P. Somatic embryogenesis from peach palm zygotic embryos. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 43, p. 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**, p. 1- 11, 2007b.

STEINMACHER, D.; 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**, v. 108, p. 1463-1475, 2011.

SOMLEVA, M. N.; SCHMIDT, E. D. L.; DE VRIES, S.C. Embryogenic cells in *Dactylis glomerata* L. (Poaceae) explants identified by cell tracking and by SERK expression. **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 718, 726, 2000.

SUHASINI, K.; SAGARE, A. P., KRISHNAMURTHY, K. V. Study of aberrant morphologies and lack of conversion of somatic embryos of chickpea (*Cicer arietinum* L.). **In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 32, p.6-10, 1996.

TABAI, S. A. **Propagação da palmeira macaúba *Acrocomia aculeata* (Jack) Loddiges, através de métodos in vitro**. 121f. Dissertação (Mestrado) CEBTEC-ESALQ, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 1992.

TAHA, H. S.; BEKHEET, S. A.; EL-BAHR, M. K. Alternative approach for micropropagation of the date palm c.v. Zaghlool. **Arabian Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 1, P. 103-111, Jan., 2003.

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

TEIXEIRA, J. B.; SONDAHL, M. R.; KIRBY, E. G. Somatic embryogenesis from immature inflorescences of oil palm. **Plant Cell Reports**, v. 13, p. 247-250, 1994.

TEIXEIRA, J. B.; SONDAHL, M. R.; NAKAMURA, T.; KIRBY, E. G. Establishment of oil palm cell suspensions and plant regeneration. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 40, p. 405-411, 1995.

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

TISSERAT, B. Embryogenesis, organogenesis and plant regeneration. In: DIXON, R. A.(ed.) **Plant Cell Culture – a practical approach**. Oxford: IRL Press, p. 79-106, 1991.

TITON, M.; XAVIER, A.; OTONI, W. C.; MOTOIKE, S. Y. Efeito dos reguladores de crescimento Dicamba e picloram na embriogênese somática em *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**. v. 31, p. 417-426, 2007.

TRAN THANH VAN, K. M. Direct Flower Neof ormation from Superficial Tissue of Small Explants of *Nicotiana tabacum* L. **Planta**, v. 115, p. 87-92, 1973.

TRAN THANH VAN, K. M. Control of morphogenesis by inherent and exogenously applied factors in thin cell layers. **International Review of Cytology**, v. 32, p. 291-311, 1980.

TSAO, C. W. V.; REED, B. M. Gelling agent, silver nitrate and sequestrene iron influence adventitious shoot and callus formation from *Rubus* leaves. **In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant**, v. 38, p. 29-32, 2002.

VALVERDE, R.; ARIAS, O.; THORPE, T. A. Picloram-induced somatic embryogenesis in pejibaye palm (*Bactris gasipaes* HBK). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 10, p. 149–156, 1987.

VERDEIL, J. –L.; HUET, C.; GROSDÉMANGE, F.; BUFFARD-MOREL, J. Plant regeneration from cultured immature inflorescences of coconut (*Cocos nucifera* L.): evidence for somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**, v. 13, p. 218-221, 1994.

VIEIRA, M. C.P. **Avaliação de uma política pública: o caso do biodiesel do Ceará**. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) – Universidade Federal do Ceará, 2009.

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

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

WANG, X.; NOLAN, K. E.; IRWANTO, R. R.; SHEAHAN, M. B.; ROSE, R. J. Ontogeny of embryogenic callus in *Medicago truncatula*: the fate of the pluripotent and totipotent stem cells. *Annals of Botany*, v. 107, p. 599-609, 2011.

WERNICKE, W.; MILKOVITS, L. Developmental gradients in wheat leaves – Response of leaf segments in different genotypes cultured *in vitro*. **Journal of Plant Physiology**. v. 115, n. 1, p. 49-58. 1984.

WETZSTEIN, H. Y.; BAKER, C. M. The relationship between somatic embryo morphology and conversion in peanut (*Arachis hypogaea* L.) **Plant Science**, v. 9, n. 81-89, 1993.

YEUNG, E.C. Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. In: BAJAJ, Y.P.S. ***In vitro* embryogenesis in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic, 16:205-248, 1995.

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

APÊNDICES

APÊNDICE 1 RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA FATORIAL PICLORAM X ORIGEM DO EXPLANTE NO EFEITO DA ORIGEM DO CORTE E DE TRÊS CONCENTRAÇÕES DE PICLORAM NA INDUÇÃO DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS *

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Picloram	3	24,8786	8,29289	134,1217 **
Posição	7	6,17400	0,88200	14,2627 **
Int. PicXPos	21	2,89225	0,13773	2,2275 **
Tratamentos	31	33,94492	1,09500	17,7095 **
Resíduo	128	7,91438	0,06183	
Total	159	41,8593		

CV (%): 37,14

* Experimento repetido duas vezes (estatística em cima da média).

** significativo ao nível de 1% de probabilidade.

APÊNDICE 2 RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO FATOR CALO FRIÁVEL NO EFEITO DA ORIGEM DO CORTE E DE TRÊS CONCENTRAÇÕES DE PICLORAM NA INDUÇÃO DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	3	19,87885	6,62628	1,3066 ns
Resíduo	36	182,56889	5,07136	
Total	39	202,44774		

CV (%): 33,42

APÊNDICE 3 RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO FATOR CALO NODULAR NO EFEITO DA ORIGEM DO CORTE E DE TRÊS CONCENTRAÇÕES DE PICLORAM NA INDUÇÃO DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	3	3,94238	1,311413	0,4695 ns
Resíduo	36	100,76123	2,79892	
Total	39	104,52251		

CV (%): 54,26

APÊNDICE 4 RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO FATOR CALO COMPACTO NO EFEITO DA ORIGEM DO CORTE E DE TRÊS CONCENTRAÇÕES DE PICLORAM NA INDUÇÃO DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	3	10,64641	3,54880	1,2461 ns
Resíduo	36	102,16891	2,84785	
Total	39	113,16891		

CV (%): 23,96

APÊNDICE 5 RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA FATORIAL MEIO DE CULTURA X PICLORAM NO EFEITO DO MEIO DE CULTURA E DUAS CONCENTRAÇÕES DE PICLORAM NA INDUÇÃO DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Meio de cultura	1	0,72743	0,72743	5,5986 *
Picloram	1	0,78357	0,78357	6,0308 *
Int. MeioXPic	1	0,00036	0,00036	0,0028 ns
Tratamentos	3	1,51136	0,503379	3,8774*
Resíduo	36	4,67744	0,12993	
Total	39	6,18880		

CV (%): 33,71

* significativo ao nível de 5% de probabilidade.

ns não significativo.

APÊNDICE 6 RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA FATORIAL DA VARIÁVEL CALO FRIÁVEL NO EFEITO DO MEIO DE CULTURA E DUAS CONCENTRAÇÕES DE PICLORAM NA INDUÇÃO DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Meio	1	0,47397	0,47397	3,1954 ns
Picloram	1	0,80247	0,80247	5,4100 *
Int. MeioXPic	1	0,16054	0,16054	1,0823 ns
Tratamentos	3	1,43698	0,503379	3,2293 ns
Resíduo	16	1,43698	0,12993	
Total	19	2,37327		

CV (%): 61,39

* significativo ao nível de 5% de probabilidade.

ns não significativo.

APÊNDICE 7 RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA FATORIAL DA VARIÁVEL CALO COMPACTO NO EFEITO DO MEIO DE CULTURA E DUAS CONCENTRAÇÕES DE PICLORAM NA INDUÇÃO DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Meio	1	0,00892	0,00892	0,0886 ns
Picloram	1	0,09109	0,09109	0,9049 ns
Int. MeioXPic	1	0,04119	0,04119	0,4092 ns
Tratamentos	3	0,14119	0,04707	0,4676 ns
Resíduo	16	1,6105	0,10066	
Total	19	1,7517		

CV (%): 138,73

ns não significativo.

APÊNDICE 8 RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA FATORIAL DA VARIÁVEL CALO NODULAR NO EFEITO DO MEIO DE CULTURA E DUAS CONCENTRAÇÕES DE PICLORAM NA INDUÇÃO DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Meio	1	0,67995	0,67995	34,3614 **
Picloram	1	0,16801	0,16801	8,4905 *
Int. MeioXPic	1	0,16801	0,16801	8,4905 *
Tratamentos	3	1,01597	0,33866	17,1141 **
Resíduo	16	0,31661	0,01979	
Total	19	1,33258		

CV (%): 76,29

* significativo ao nível de 5% de probabilidade.

** significativo ao nível de 1% de probabilidade.

APÊNDICE 9 RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA FATORIAL PICLORAM X NITRATO DE PRATA NO EFEITO DO NITRATO DE PRATA NA INDUÇÃO DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS.

Fonte de Variação	G.L.	SQ	QM	F
Picloram	1	0,32883	0,32883	4,1703 *
Nitrato de prata	1	0,57476	0,57476	7,2892 *
Int Pic x Nit	1	0,98973	0,98973	12,5518 **
Tratamentos	3	1,89332	0,63111	8,0038 **
Resíduo	36	2,83864	0,07885	
Total	39	4,73196		

CV (%): 43,14

* significativo ao nível de 5% de probabilidade.

** significativo ao nível de 1% de probabilidade.