

FABIANA SCHMIDT BANDEIRA

**CULTIVO *IN VITRO* E EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE EMBRIÕES  
ZIGÓTICOS DE MACAÚBA (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Loddiges)**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2008

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

B214c  
2008

Bandeira, Fabiana Schmidt, 1978-

Cultivo *in vitro* e embriogênese somática de embriões zigóticos de macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Loddiges) / Fabiana Schmidt Bandeira. – Viçosa, MG, 2008.

xiii, 92f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Aloisio Xavier.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Reflorestamento. 2. Macaúba - Propagação *in vitro*.  
3. Plantas oleaginosas. 4. *Acrocomia aculeata*. 5. Recursos energéticos - Pesquisa. 6. Plantas - Propagação *in vitro*.  
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDO adapt. CDD 634.92

FABIANA SCHMIDT BANDEIRA

**CULTIVO *IN VITRO* E EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE EMBRIÕES  
ZIGÓTICOS DE MACAÚBA (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Loddiges)**

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

APROVADA EM: 25 de fevereiro de 2008.

---

Prof. Wagner Campos Otoni  
(Co-orientador)

---

Pesq. João Batista Teixeira  
(Co-orientador)

---

Prof. José Maria Moreira Dias

---

Prof. Ismael Eleotério Pires

---

Prof. Aloisio Xavier  
(Orientador)

## AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte de toda sabedoria, pelo dom da vida e por todas as graças concedidas.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-graduação em Ciência Florestal pela oportunidade de realização deste treinamento.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, FAPEMIG, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu noivo Diogo, pelo amor, paciência, dedicação, apoio, por compreender todos os momentos de ausência e estresse e por nunca me deixar desistir de meus objetivos.

Aos meus familiares, em especial à minha mãe pelo amor e apoio incondicional em todos os momentos.

Aos meus queridos sogros Dr. Sérgio e Bete por todo amor, incentivo, apoio, amizade e pelo “colo” nos momentos de desânimo.

À amiga, mais que especial, “Lili” por toda ajuda, sugestões, conselhos, amizade durante todos esses anos e, principalmente, pelo empenho na obtenção de todas as condições necessárias, além do material vegetal, para a realização deste trabalho.

Às grandes amigas Elisa, Maure, Andréia Koheler, Ana Paula e Miranda, que presentes fisicamente ou não, nunca mediram esforços para ajudar; pelos desabafos nos intermináveis “chás” e almoços, cumplicidade, conselhos, troca de experiências e companheirismo nesta jornada.

À amiga Jaqueline pela generosidade, prestatividade e pelos agradáveis momentos durante nossas pausas para o “cafezinho” no laboratório.

À amiga Rosângela, a querida “Rô” pelas palavras amigas e apoio nos momentos mais difíceis.

Às amigas Ana Cláudia e Lourdes pela amizade, conselhos, sugestões e ajuda na anatomia.

Ao Thiago, meu estagiário e bolsista de iniciação científica, pelo profissionalismo, competência, dedicação e amizade durante a realização deste trabalho e também pela documentação fotográfica do material vegetal.

À Bárbara pela ajuda no laboratório de Anatomia Vegetal na montagem das lâminas.

Ao Leandro por toda a generosidade e ajuda sempre que precisei durante o processamento dos frutos.

Aos colegas do LCTII pela agradável convivência.

Aos meus Co-orientadores Prof. Wagner Otoni e Pesq. João Batista Teixeira pelas idéias, sugestões, críticas, e pela disponibilidade em ajudar em todas as situações.

Aos membros da banca examinadora pelas críticas e sugestões.

Ao meu orientador Aloisio Xavier, pela confiança em mim depositada e pelos ensinamentos que proporcionaram meu crescimento pessoal e profissional.

Aos funcionários do Departamento de Engenharia Florestal, especialmente à Ritinha pela competência, boa vontade em resolver todos os problemas do dia-a-dia e pela amizade durante os anos de pós-graduação.

Aos funcionários da Central de Ensino e Desenvolvimento Agrário de Florestal, CEDAF, pela oportunidade de realização das coletas dos frutos.

Ao Prof. Acelino Alfenas por disponibilizar a estufa incubadora utilizada durante a realização dos experimentos.

Ao Sr. “Zé” (tecnologia de alimentos) e Sr. Eugênio (Bioagro), por toda a boa vontade e presteza em colaborar durante o processamento dos frutos coletados.

A todos os motoristas da Universidade Federal de Viçosa que me acompanharam durante as viagens para Florestal, pela boa vontade em ajudar a coletar os frutos no campo.

A todos aqueles que, de alguma forma, deram sua contribuição para a realização deste trabalho e concretização deste sonho, mas que, por uma “negação do consciente”, não tenham sido aqui citados.

Muito obrigada!

## BIOGRAFIA

FABIANA SCHMIDT BANDEIRA, filha de José Carlos Soares Bandeira e Sandra Maria Cardoso Schmidt, nasceu no dia 02 de maio de 1978, na cidade de Brasília, Distrito Federal.

Em março de 2001, graduou-se em Engenharia Florestal pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais.

Em fevereiro de 2004 obteve o título de “*Magister Scientiae*” em Ciência Florestal, na Área de Concentração em Silvicultura, na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG.

Em abril de 2004, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, em nível de Doutorado, na Área de Concentração em Silvicultura, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese em fevereiro de 2008.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	8
<b>EFEITO DO REGIME DE INCUBAÇÃO E DO CARVÃO ATIVADO NA GERMINAÇÃO <i>in vitro</i> DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS MADUROS DE MACAÚBA (<i>Acrocomia aculeata</i>).....</b>	<b>11</b>
RESUMO.....	11
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
2.1. Material vegetal.....	13
2.2. Meios de cultura e condições de cultivo.....	14
2.3. Condução e avaliações experimentais.....	15
2.4. Aclimatização das plântulas.....	16
3. RESULTADOS.....	16
4. DISCUSSÃO.....	22
5. CONCLUSÕES.....	24
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25
<b>EFEITO DO MEIO NUTRITIVO E DO CARVÃO ATIVADO NA GERMINAÇÃO <i>in vitro</i> DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS MADUROS E IMATUROS DE MACAÚBA (<i>Acrocomia aculeata</i>).....</b>	<b>27</b>
RESUMO.....	27
1. INTRODUÇÃO.....	28
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
2.1. Material vegetal.....	30
2.2. Meios de cultura e condições de cultivo.....	31
2.2.1. Influência da composição do meio nutritivo e da concentração salina na germinação <i>in vitro</i> de embriões zigóticos maduros.....	31
2.2.2. Efeito da concentração salina do meio Y <sub>3</sub> e do carvão ativado na germinação <i>in vitro</i> de embriões zigóticos imaturos.....	32
2.3. Condução e avaliações experimentais.....	33
2.3.1. Influência da composição do meio nutritivo e da concentração salina na germinação <i>in vitro</i> de embriões zigóticos maduros.....	33
2.3.2. Efeito da concentração salina do meio Y <sub>3</sub> e do carvão ativado na germinação <i>in vitro</i> de embriões zigóticos imaturos.....	34
3. RESULTADOS.....	36
3.1. Influência da composição do meio nutritivo e da concentração salina na germinação <i>in vitro</i> de embriões zigóticos maduros.....	36
3.2. Efeito da concentração salina do meio Y <sub>3</sub> e do carvão ativado na germinação <i>in vitro</i> de embriões zigóticos imaturos.....	39
4. DISCUSSÃO.....	44
5. CONCLUSÕES.....	47
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

<b>INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO DOS FRUTOS E DA SACAROSE NA GERMINAÇÃO <i>in vitro</i> DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS MADUROS E IMATUROS DE MACAÚBA (<i>Acrocomia aculeata</i>)</b> .....	<b>51</b>
RESUMO.....	51
1. INTRODUÇÃO.....	52
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	54
2.1. Material vegetal.....	54
2.2. Meios de cultura e condições de cultivo.....	55
2.2.1. Influência de temperaturas de armazenamento dos frutos e de concentrações de sacarose na germinação <i>in vitro</i> de embriões zigóticos maduros.....	55
2.2.2. Influência do tempo de armazenamento dos frutos à 35 °C na germinação <i>in vitro</i> de embriões zigóticos imaturos.....	56
2.3. Condução e avaliações experimentais.....	57
2.3.1. Influência de temperaturas de armazenamento dos frutos e de concentrações de sacarose na germinação <i>in vitro</i> de embriões zigóticos maduros.....	57
2.3.2. Influência do tempo de armazenamento dos frutos à 35 °C na germinação <i>in vitro</i> de embriões zigóticos imaturos.....	58
3. RESULTADOS.....	59
3.1. Influência de temperaturas de armazenamento dos frutos e de concentrações de sacarose na germinação <i>in vitro</i> de embriões zigóticos maduros.....	59
3.2. Influência do tempo de armazenamento dos frutos à 35 °C na germinação <i>in vitro</i> de embriões zigóticos imaturos.....	64
4. DISCUSSÃO.....	67
5. CONCLUSÕES.....	71
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
<b>EFEITO DO PICLORAM NA INDUÇÃO DE CALOS EMBRIOGÊNICOS A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS MADUROS DE MACAÚBA (<i>Acrocomia aculeata</i>)</b> .....	<b>75</b>
RESUMO.....	75
1. INTRODUÇÃO.....	76
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	77
2.1. Material vegetal.....	78
2.2. Meios de cultura e condições de cultivo.....	78
2.3. Condução e avaliações experimentais.....	79
2.4. Histologia.....	80
3. RESULTADOS.....	80
3.1. Indução de embriogênese somática.....	80
3.2. Histologia.....	83
4. DISCUSSÃO.....	85
4.1. Indução de embriogênese somática.....	85
4.2. Histologia.....	87
5. CONCLUSÕES.....	88

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88
3. CONCLUSÕES GERAIS.....	91

## RESUMO

BANDEIRA, Fabiana Schmidt, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2008. **Cultivo *in vitro* e embriogênese somática de embriões zigóticos de macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq). Loddiges).** Orientador: Aloisio Xavier. Co-Orientadores: Wagner Campos Otoni e João Batista Teixeira.

O presente trabalho teve por objetivos a proposição de protocolos para a cultura de embriões e indução de embriogênese somática da macaúba, utilizando-se como fonte de explantes embriões zigóticos maduros e imaturos. Na cultura de embriões *in vitro* estudou-se: a) o efeito do regime de incubação e carvão ativado na germinação de embriões maduros; b) o efeito da composição do meio, concentração de sais, e do carvão ativado na germinação de embriões zigóticos maduros e imaturos; c) o efeito de temperaturas de armazenamento dos frutos e da sacarose na germinação *in vitro* de embriões zigóticos maduros e imaturos. Quanto à indução de embriogênese somática, avaliou-se o efeito da auxina picloram na indução de calos embriogênicos, a partir de embriões zigóticos maduros. Nos experimentos de germinação *in vitro* de embriões zigóticos, avaliaram-se os percentuais de intumescimento, oxidação, germinação, explantes sem reação, conversão de plântulas viáveis, plantas com raízes secundárias, comprimento da parte aérea e da raiz primária e o número médio de folhas por plântula. Na indução de embriogênese somática, foram avaliados os percentuais de calejamento dos explantes, o tipo de calo formado (primário ou embriogênico), o percentual de calos nodulares e a oxidação. O cultivo dos embriões sob fotoperíodo resultou em elevado índice de oxidação dos explantes, no entanto foi favorável ao crescimento e desenvolvimento das plântulas se comparados ao regime de escuro inicial. A suplementação do meio com carvão ativado mostrou-se imprescindível ao pleno desenvolvimento das plântulas, principalmente por estimular o desenvolvimento de um sistema radicular eficiente, visto que na ausência deste componente no meio, não foi observada a conversão de plântulas viáveis, que por sua vez apresentaram crescimento lento e desbalanceado. Em relação à composição do meio, em geral o meio de MS promoveu resultados ligeiramente superiores ao meio Y<sub>3</sub>, em termos de desenvolvimento das plântulas, na

ausência de carvão ativado. Contudo, independente da composição salina utilizada, a ausência de carvão no meio resultou no crescimento desbalanceado das plântulas, que nessa condição, não apresentaram formação de raízes primárias e secundárias. Por outro lado, a incorporação de carvão ativado aos meios, promoveu a conversão de plântulas viáveis, com raízes bem formadas, e em condições de serem aclimatizadas. Plântulas oriundas da cultura de embriões imaturos tenderam a se desenvolver melhor em meio contendo maiores concentrações de sais (75 e 100 % da força total) do meio Y<sub>3</sub>. Além disso, notou-se que as raízes primárias tiveram maior alongamento e desenvolvimento de raízes secundárias, à medida que a concentração de carvão ativado no meio foi aumentada. Quanto ao armazenamento dos frutos, a temperatura ambiente incorreu em maior percentual de germinação dos embriões. A menor concentração de sacarose foi o pior tratamento, pois além de influenciar negativamente a germinação dos embriões, especialmente para os frutos mantidos em baixa temperatura, resultou na formação de plântulas anormais, com sintomas de hiperidricidade. Nas concentrações mais elevadas de sacarose, não foi observada diferença no aspecto das plântulas, que mostraram-se muito vigorosas, independente da temperatura em que os frutos foram estocados. A temperatura de 35 °C estimulou a germinação dos embriões imaturos e a conversão de plântulas viáveis, e, independente do tempo em que os frutos permaneceram nessa condição a qualidade fisiológica e viabilidade dos explantes foi mantida. Além disso, proporcionou maior eficiência durante o processamento dos frutos e extração dos embriões. A frequência de calos embriogênicos foi maior em meio contendo 2,4 mg L<sup>-1</sup> de picloram, que também mostrou-se mais efetiva na formação de estruturas nodulares. Seções histológicas de calos nodulares revelaram a formação de pró-embriões e embriões somáticos na fase globular, contudo essas estruturas não progrediram para fases mais avançadas quando transferidas para meio de maturação, e os calos tenderam a escurecer por completo após 30 dias nessa condição. Os resultados obtidos nesse trabalho permitiram concluir que é possível obter plântulas de macaúba a partir da cultura de embriões *in vitro* de forma relativamente rápida (12 semanas). No entanto, estudos complementares visando, principalmente, aprimorar a fase de aclimatização devem ser conduzidos, considerando o crescimento lento

apresentado, o que demonstra a dificuldade de enraizamento *in vitro* da espécie. Pesquisas mais aprofundadas nesse sentido contribuirão para aumentar a sobrevivência das plântulas nessa fase e com isso viabilizar a aplicação desta técnica na propagação da macaúba. Metodologias que visem a melhoria da fase de maturação e regeneração de embriões somáticos necessitam ser ajustadas, permitindo a clonagem em larga escala desta palmeira, via embriogênese somática, pelo seu potencial como oleaginosa na produção de biocombustíveis.

## ABSTRACT

BANDEIRA, Fabiana Schmidt, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February of 2008. ***In vitro* culture and somatic embryogenesis of zygotic embryos of macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq). Loddiges)**. Adviser: Aloisio Xavier. Co-advisers: Wagner Campos Otoni and João Batista Teixeira.

The objectives of this work were to propose the proceeds regarding the culture of embryos and induction of somatic embryogenesis of the *Acrocomia aculeata* palm tree using as explants source the mature and immature zygotic embryos. In the *in vitro* embryo culture the following were studied: a) the effect of the incubation conditions and of the activated charcoal on the germination of the mature embryos; b) the effect of the medium composition, salt composition and of the activated charcoal on the germination of mature and immature zygotic embryos; and c) the effect of the storage temperature of the fruits and of the sucrose on the *in vitro* germination of mature and immature zygotic embryos. In relation to the induction of somatic embryogenesis, the effect of the auxin picloram in the induction of embryogenic calluses was evaluated on mature zygotic embryos. In the experiments on *in vitro* germination of zygotic embryos, the percentage of swelling, oxidation, germination, non reative explants, conversion to viable seedlings, plants with secondary roots, length of the aerial part and of the primary root and the average number of leaves per seedlings were evaluated. In the induction of somatic embryogenesis, the percentages of callus formation on the explants, the type of callus formed (primary or embryogenic), the percentage of nodular callus and the oxidation were evaluated. The culture of embryos under photoperiodic conditions resulted in a high index of oxidation of the explants, but this was favorable to the growth and development of the seedlings if compared to the starting darkness condition. The addition of activated charcoal to the medium showed to be essential to the complete development of the seedlings, mainly because it stimulates the development of an efficient root system, because in the absence of this component in the medium the conversion to the viable seedling was not observed, instead, the seedlings had a slow and unbalanced growth. In relation to the medium composition, in general, the MS medium promoted slightly better

results than the Y<sub>3</sub> medium, considering the seedling development in the absence of the activated charcoal. However, independent of the saline composition used, the absence of activated charcoal in the medium resulted in the unbalanced growth of the seedlings, which, in this condition, did not show the formation of primary or secondary roots. On the other hand, the addition of activated charcoal to the media promoted the conversion to viable seedlings, with well formed roots and in conditions to grow normally. The seedlings produced from immature embryos had the tendency to develop better in a medium with higher salt concentrations (75 to 100 % of the total power) of the Y<sub>3</sub> medium. Moreover, it was observed that the primary roots had a greater length and developed more secondary roots as the concentration of activated charcoal was increased in the medium. In relation to the storage of the fruits, the environmental temperature caused the greatest percentage of germination of the embryos. The lower concentration of sucrose was the worst treatment, because, besides influencing negatively the germination of the embryos, specially those from fruits kept in low temperature, it resulted in the formation of abnormal seedlings, with symptoms of hyperhydricity. In the higher sucrose concentrations no difference was observed in the aspects of the seedlings, that showed great vigour, independently of the storage temperature of the fruits. The temperature of 35 °C stimulated the germination of immature embryos and the formation of viable seedlings, and, independent of the period of time that the fruits were kept in this condition, the physiologic quality and the viability of the explants were maintained. In addition, it rendered greater efficiency during the processing of the fruits and the extraction of the embryos. The frequency of the embryogenic calluses was greater in the medium containing 2,4 mg L<sup>-1</sup> of picloram that also showed to be more effective in the formation of nodular structures. Hystologic sections of the nodular calluses showed the formation of pro-embryos and of somatic embryos in the globular phase, but the formation of these structures did not progress to more advanced phases when they were transferred to a maturation medium, and the calluses tended to darken completely after 30 days in this condition. The results obtained in this work allowed to conclude that it is possible to obtain seedlings of *Acrocomia aculeata* from the *in vitro* embryo culture in a relatively fast way (12 weeks). Nevertheless, complementary studies directed mainly to the curing of the

seedlings should be done, because of the slow growth rate shown, which demonstrates the *in vitro* rooting difficulty of the species. More specific research in this direction will contribute to increase the survival rate of the seedlings in this phase and thus viabilize the application of this propagation technique to this palm species. The methodologies to improve the maturation phase and the regeneration of somatic embryos need to be adjusted, to allow the cloning in great numbers via somatic embryogenesis, because of the potential as oleaginous plant to produce biofuels.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A ameaça de que o petróleo, principal matéria-prima utilizada na obtenção de combustíveis, deverá se esgotar em meio século, desencadeou buscas por novas fontes energéticas, preferencialmente as renováveis, expondo a fragilidade de nações inteiras em se apoiarem em um único produto gerador de energia. A primeira crise do petróleo ocorreu na década de 70, quando o preço do barril foi elevado em 400%, o que desencadeou grave crise energética mundial. A partir de então, investimentos em pesquisas de fontes alternativas de energia, menos poluentes, passaram a ser prioritários em nível mundial (Pacheco, 2004). Some-se a isso a crescente preocupação em reduzir a emissão de gases poluentes causadores do efeito estufa, especialmente o CO<sub>2</sub>, pressionando a substituição dos combustíveis fósseis pelos renováveis.

Frente a essa realidade, em 2002, o governo brasileiro instituiu o Programa Brasileiro de Biocombustíveis, numa tentativa de viabilizar a utilização do biodiesel, considerando que este combustível poderia contribuir, favoravelmente, para o equacionamento de questões como geração de emprego e renda, inclusão social, redução das emissões de gases poluentes, das disparidades regionais de desenvolvimento e da dependência de importações de petróleo, abrangendo aspectos de natureza social, estratégica, econômica e ambiental. (Miragaya, 2005). Este programa contempla a adição de quantidades crescentes de biodiesel ao diesel de petróleo, e a partir de 2008 será obrigatória a incorporação de 2 % de biodiesel ao diesel mineral, com projeções de 5 % desta mistura a partir de 2013 (Ribeiro, 2006). Estima-se, com essa medida, que o Brasil reduza em 33 %, de um total de 6 bilhões de litros, suas importações de diesel, gerando uma economia anual de US\$ 350 milhões, além de um grande número de empregos diretos e indiretos.

A expectativa é de que o interesse mundial em investir no plantio de espécies oleaginosas promissoras na produção de óleo vegetal seja cada vez mais estimulado pelas entidades governamentais, visto que o suprimento de biocombustíveis, para atender a essa demanda, ainda é insuficiente em muitos países.

O Brasil é detentor de enorme potencial para assumir a liderança na produção de biocombustíveis, tendo em vista que apresenta vantagens

comparativas como a disponibilidade de terras agricultáveis e recursos hídricos, que associados às excelentes condições edafo-climáticas, são propícias ao cultivo de oleaginosas. Pioneiro na produção de biocombustíveis, com a criação do Proálcool, considerado um dos maiores programas de uso da energia renovável do mundo, o Brasil possui capacidade científica e laboratorial, além de competência tecnológica para desenvolver e promover a utilização de novos combustíveis alternativos. O incentivo ao biodiesel irá estimular o desenvolvimento global do país, acelerar o mercado interno, economizar divisas e poderá ser responsável pela geração de muitos empreendimentos, incluindo pequenos agricultores, o que o torna um dos maiores instrumentos de inclusão social.

Recentemente, as plantas oleaginosas vêm merecendo destaque, pela sua grande oportunidade de participação na matriz energética de muitos países. Em experiências já comprovadas na Europa, o biodiesel está se impondo como um aditivo ecológico e renovável, sendo amplamente utilizado em misturas com o óleo diesel, este último comprovadamente com limitações estratégicas e ambientais (Lima, 2005).

Entre as plantas oleaginosas mais utilizadas, o dendezeiro (*Elaeis guineensis*) é a espécie com maior produtividade, podendo atingir 6 toneladas de óleo por hectare por ano. Contudo, diante das exigências edafo-climáticas, seu cultivo no território brasileiro prevalece em áreas restritas nos estados do Pará e Bahia. Além disso, o uso do biodiesel produzido a partir do óleo de dendê limita-se a regiões de clima quente, em função de suas características físico-químicas. O óleo solidifica a temperaturas amenas, inviabilizando seu uso na região sul do Brasil (Teixeira, 2005).

A macaúba (*Acrocomia aculeata*) é uma palmeira pertencente à família *Arecaceae*, nativa de florestas tropicais, e no Brasil é considerada a palmeira de maior dispersão, com ocorrência de populações naturais em praticamente todo o território brasileiro, ocorrendo amplamente em áreas de cerrado (Bondar, 1964; Silva, 1994).

A palmeira macaúba possui estipe que pode atingir de 10 a 15 m de altura e 20 a 30 cm de diâmetro. A região dos nós é coberta de espinhos escuros, pontiagudos com cerca de 10 cm de comprimento. Frequentemente, o estipe é coberto pelas bases dos pecíolos, que permanecem aderidas a este por muitos

anos. As folhas verdes, ordenadas em diferentes planos dando um aspecto plumoso à copa, são pinadas com comprimento variando de 4 a 5 m, apresentando aproximadamente 130 folíolos de cada lado e espinhos na região central (Lorenzi et al., 1996; Silva, 2005).

Entre as folhas destacam-se a espata de até 2 m comprimento, as inflorescências amarelas e os cachos de frutos de tom marrom-amarelado. A inflorescência é em espádice, com 50 a 80 cm de comprimento, pendente, protegida por espata de acúleos castanhos. As flores de coloração amarelo-claro são unissexuais e ambos os sexos aparecem numa mesma inflorescência. As flores femininas nascem na base da inflorescência e as masculinas no topo. Os frutos são esféricos ou ligeiramente achatados, em forma de drupa globosa com diâmetro variando de 2,5 a 5,0 cm. O pericarpo rompe-se facilmente quando maduro. O mesocarpo é fibroso, mucilaginoso, de sabor adocicado, rico em glicerídeos, de coloração amarelo ou esbranquiçado, comestível. O endocarpo é fortemente aderido à polpa (mesocarpo), com parede óssea enegrecida e a amêndoa oleaginosa, comestível e revestida de uma fina camada de tegumento. Cada fruto contém, geralmente, uma semente envolvida por endocarpo duro e escuro com aproximadamente 3 mm de espessura (Bondar, 1964; Henderson et al., 1995; Silva, 2005).

A frutificação ocorre durante todo o ano e os frutos amadurecem, principalmente, entre setembro e janeiro. Os principais polinizadores são coleópteros das famílias Curculionidae, Nitidulidae e Escarabaeidae. A inflorescência é visitada pelas abelhas do grupo *Trigonia*, que coletam o pólen das flores masculinas e polinizam as flores femininas (Henderson et al., 1995; Scariot, 1998).

Em plantações naturais, estima-se que a capacidade de produção de óleo da macaúba pode chegar a 4 toneladas por hectare por ano. Entretanto, o aproveitamento atual apresenta característica basicamente extrativista, sem qualquer planejamento, resultando em um baixo rendimento e em produtos de baixa qualidade, embora Silva (1994) tenha estimado um potencial produtivo, com base nas populações nativas, entre 20 e 30 mil toneladas de óleo por ano, apenas no estado de Minas Gerais. A instalação de lavouras comerciais convive com dificuldades na quebra de dormência da semente e no baixo

crescimento inicial, além do desconhecimento de suas exigências ecológicas (Motta et al., 2002).

As perspectivas de aumento no rendimento de óleo por unidade de área não podem ser desprezadas, tendo em vista que, até o presente momento, o volume de trabalhos estudando os aspectos silviculturais da espécie é bastante reduzido. Por outro lado, o dendezeiro, considerada a espécie oleaginosa com maior potencial na produção de óleo, depois de quase um século de domesticação e muitos anos de melhoramento genético, atingiu uma produção que oscila entre 3 e 5 toneladas de óleo por hectare (Silva, 1994).

Por se tratar de uma espécie com boa adaptação a regiões áridas e semi-áridas, o cultivo da macaúba poderia ser realizado em áreas marginais ou com certo grau de degradação ambiental, contribuindo para a redução dos impactos no meio ambiente, decorrentes dos sucessivos desmatamentos para o plantio de oleaginosas. Aliado a isso, proporcionaria a diversificação da agricultura familiar, e constituiria uma fonte de renda adicional para populações regionais, visto que pode ser consorciada com outras culturas agrícolas.

As amplas possibilidades de aproveitamento energético e industrial tornam a exploração racional da cultura bastante atrativa, principalmente por ser uma espécie perene e bem adaptada a condições climáticas mais adversas. Cada parte da planta possui uma importância destacada, justificando-se a necessidade de pesquisas para aumentar a sua produtividade, bem como melhorar a qualidade dos inúmeros produtos e sub-produtos.

Em relação ao fruto, todas as suas partes têm utilização e valor expressivo (Silva, 2005). A casca pode ser usada na produção de combustíveis ou como produtora de óleo, cujas características se assemelham ao óleo da polpa, e ainda na composição de fertilizantes e para mistura com outras tortas na fabricação de ração animal. O óleo extraído da polpa é empregado na fabricação de sabões, enquanto do endocarpo pode ser obtido um carvão de excelentes propriedades (Silva, 1986). O valor industrial da amêndoa reside em sua riqueza em óleo, que por suas características pode ser utilizado no consumo humano e também na indústria de cosméticos.

Embora o fruto seja o produto de maior importância econômica, cada parte da planta apresenta grande variedade de usos e empregos. As folhas são utilizadas na fabricação de ração animal, do tronco é extraído um palmito muito

utilizado na culinária regional e também como moirões de cerca no meio rural. As inflorescências são destinadas à confecção de artesanatos.

A propagação da macaúba, em condições naturais, ocorre exclusivamente pela via seminífera, as quais apresentam dormência de causa ainda desconhecida. O embrião pode levar até quatro anos para germinar, provocando sério e desvantajoso atraso na produção das mudas, que por sua vez são muito desuniformes (Tabai, 1992). Adicionalmente, os métodos convencionais de propagação vegetativa não são possíveis para a espécie devido ao fato de, naturalmente, não produzirem perfilhos. Segundo Teixeira (2005), o índice de germinação *in situ* é de apenas 3 % e de acordo com estudos conduzidos pela EPAMIG, onde se buscava a domesticação da espécie, esse índice foi aumentado para 60 %, a partir da cultura de embriões zigóticos *in vitro*.

A cultura de embriões zigóticos consiste no isolamento e cultivo asséptico de embriões em meio de cultura capaz de sustentar o seu crescimento e desenvolvimento. Esta técnica possibilita maior compreensão dos requerimentos nutricionais e fisiológicos imprescindíveis ao desenvolvimento embrionário, superar a dormência das sementes, em virtude da imaturidade do embrião ou da presença de substâncias inibidoras no endosperma, encurtar o ciclo de melhoramento, testar a viabilidade de sementes, recuperar híbridos raros de cruzamentos incompatíveis; além de fornecer como fonte de explantes, tecido de elevada resposta morfogênica (Andreoli, 1986; Ho, 1987; Bridgen, 1994; Hu e Ferreira, 1998). O cultivo de embriões para palmeiras é importante, principalmente quando se refere ao intercâmbio de germoplasma, programas de melhoramento genético, qualidade fitossanitária e conservação de material, pois evita a destruição das matrizes no campo (Silva, 2005).

Essa técnica apresenta grande potencial de aplicação na propagação de várias espécies de palmeiras, que em geral apresentam crescimento lento e dificuldades de germinação, e tem sido freqüentemente empregada em protocolos regenerativos, visando, principalmente, à redução do tempo de germinação da semente, maior uniformidade das plântulas, regularização na produção de mudas e conservação de germoplasma a médio e a longo prazos (Tabai, 1992; Ledo et al., 2001; Melo et al., 2001; Spera et al., 2001; Sarasan et

al., 2002; Silva, 2002; Molla et al., 2004; Steinmacher, 2005; Pereira et al., 2006; Tzec-Simá et al., 2006; Ledo et al., 2007; Pech-Aké et al., 2007).

Uma outra alternativa para a propagação clonal de matrizes selecionadas, seria o desenvolvimento de metodologias como a embriogênese somática, a qual permitiria a obtenção de grande número de plantas geneticamente superiores e de alta produção comercial.

A embriogênese somática é o processo pelo qual células haplóides ou diplóides regeneram plântulas completas, seguindo padrões de histodiferenciação similares aos embriões zigóticos (Williams e Maheswaran, 1986). Como técnica de propagação, a embriogênese somática apresenta-se, em princípio como ferramenta mais indicada na obtenção de mudas clonais, visto esta explorar o máximo da juvenildade, além da capacidade de produção de um grande número de embriões geneticamente idênticos. Segundo Guerra et al. (1999), a principal aplicação da embriogênese somática em um programa de melhoramento de plantas perenes está na possibilidade de fixação do ganho genético de plantas selecionadas.

A indução de embriogênese somática em macaúba utilizando embriões zigóticos como explantes, foi inicialmente descrita por Tabai (1992) que obteve a formação de estruturas globulares semelhantes a embriões que não progrediram para fases mais avançadas da embriogênese, em detrimento de problemas relacionados com a oxidação fenólica. Recentemente, Moura (2007) apresentou resultados mais conclusivos com a espécie, onde foi observada a formação de muitos pró-embriões e embriões somáticos na fase globular. Contudo, não foi obtido sucesso completo na regeneração das plantas, demonstrando a necessidade de maiores estudos envolvendo, especialmente, as fases de maturação e germinação dos embriões, para obtenção de plântulas de macaúba *in vitro*.

Apesar da existência de povoamentos naturais de macaúba em diversas regiões do território brasileiro, e da alta produtividade, a dormência da semente, dentre outros fatores, como a alta heterogeneidade, e principalmente, a escassez de informações quanto aos aspectos fisiológicos e bioquímicos determinam um avanço muito lento em sua propagação e melhoramento genético. Vislumbra-se que nos próximos anos esta espécie terá grande impacto na economia nacional, com perspectivas de expansão de sua área

cultivada, situação essa que certamente demandará protocolos de propagação *in vitro* disponíveis e eficientes. Diante do exposto, o presente trabalho teve por objetivos avaliar:

- o efeito do regime de incubação e do carvão ativado na germinação *in vitro* de embriões zigóticos maduros;
- a influência da temperatura de armazenamento dos frutos, e de concentrações de sacarose na germinação *in vitro* de embriões zigóticos maduros e imaturos;
- a influência da composição do meio nutritivo, da concentração salina e de concentrações de carvão ativado na germinação *in vitro* de embriões zigóticos maduros e imaturos; e
- o efeito do picloram na indução de calos embriogênicos a partir de embriões zigóticos maduros.

## 2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREOLI, C. Cultura de embrião. In: SIMPÓSIO DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 1., 1985, Brasília. **Anais...** Brasília: ABCTP/EMBRAPA, 1986, p. 25-28.

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

BRIDGEN, M. P. A review of plant embryo culture. **HortScience**, v. 29, n. 11, p. 1243-1245, 1994.

GUERRA, M. P., TORRES, A. C., TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C., CALDAS, L. S., BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1999. v.2, p.533-568.

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

HO, R. H. Embryo culture. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. (Eds.). **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987, v. 2, p. 137-167.

HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. Cultura de embriões. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1998, v. 1, p. 371-394.

LEDO, A. S.; GOMES, K. K. P.; BARBOZA, S. B. S. C. VIEIRA, G. S. S.; TUPINAMBÁ, E. A.; ARAGÃO, W. M. Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos e aclimação de plântulas de coqueiro-anão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 2, p. 147-154, 2007.

LEDO, A. S.; LAMEIRA, O. A.; BENBADIS, A. K.; MENEZES, I. C.; LEDO, C. A. S.; OLIVEIRA, M. S. P. Cultura *in vitro* de embriões zigóticos de açaizeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 3, p. 468-472, 2001.

LIMA, P. C. R. **Biodiesel: um novo combustível para o Brasil**. Consultoria Legislativa, 31 p. 2005.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M.; MEDEIROS-COSTA, J. T.; CERQUEIRA, L. S. C.; BEHR, N. V. **Palmeiras no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Plantarum, 1996. 303 p.

MELO, B.; PINTO, J. E. B. P.; LUZ, J. M. Q.; PEIXOTO, J. R.; JULIATTI, F. C. Diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e desenvolvimento das plântulas na cultura *in vitro* de embriões da guarirubeira (*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n. 6, p. 1301-1306, 2001.

MIRAGAYA, J. C. G. Biodiesel: tendências no mundo e no Brasil. **Informe Agropecuário**, v. 26, n. 229, p. 7-13, 2005.

MOLLA, M. M. H.; BHUIYAN, M.; KHANAM, D. M.; BATUGAL, P. *In vitro* coconut (*Cocos nucifera* L.) embryo culture in Bangladesh. **Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 98-101, 2004.

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, n. 7, p. 1023-1031, 2002.

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

PACHECO, F. Biodiesel: será o combustível do futuro? **Conjuntura e Planejamento**, v. 122, p. 26-31, 2004.

PECH-AKÉ, A.; MAUST, B.; OROZCO-SEGOVIA, A.; OROPEZA, C. The effect of gibberellic acid on the *in vitro* germination of coconut zygotic embryos and their conversion into plantlets. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 43, p. 247-253, 2007.

PEREIRA, J. E. S.; MACIEL, T. M. S.; COSTA, F. H. S.; PEREIRA, M. A. A. Germinação *in vitro* de embriões zigóticos de murmuru (*Astrocaryum ulei*). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 2, p. 251-256, 2006.

RIBEIRO, S. K. Biocombustíveis: aposta no biodiesel. **Scientific American**, v. 53, p. 60-65, 2006.

SARASAN, V.; RAMSAY, M. M.; ROBERTS, A. V. *In vitro* germination and induction of direct somatic embryogenesis in "Bottle Palm" (*Hyophorbe lagenicaulis* L. Bailey H. E. Moore), a critically endangered mauritian palm. **Plant Cell Reports**, v. 20, p. 1107-1111, 2002.

SCARIOT, A. Seed dispersal and predation of the palm *Acrocomia aculeata*. **Principes**, Brasília, v.42, n.1, p.5-8, 1998.

SILVA, J. C. Endocarpos de babaçu e de macaúba comparados à madeira de *Eucalyptus grandis* para a produção de carvão vegetal. **IPEF**, v. 34, p. 31-34, 1986.

SILVA, J. C. **Macaúba: fonte de matéria-prima para os setores alimentício, energético e industrial.** Viçosa: CEDAF/ DEF/ UFV, 1994, 41p. Material não publicado.

SILVA, J. C. **Macaúba: fonte de matéria-prima para os setores alimentício, energético e industrial.** Viçosa: DEF/ UFV, 2005, 59 p. Material não publicado.

SILVA, V. S. **Regeneração *in vitro* de embriões de *Cocos nucifera* L.** 2002, 87p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas), Piracicaba: ESALQ.

SPERA, M. R. N.; CUNHA, R.; TEIXEIRA, J. B. Quebra de dormência, viabilidade e conservação de sementes de buriti (*Mauritia flexuosa*). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 12, p. 1567-1572, 2001.

STEINMACHER, D. A. **Germinação *in vitro*, criopreservação e embriogênese somática em pupunha.** 2005, 125p. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais), Florianópolis: UFSC.

TABAI, S. A. **Propagação da palmeira macaúba *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Loddiges. através de métodos *in vitro*.** 1992, 121p. Dissertação (Mestrado em Ciências), Piracicaba: ESALQ.

TEIXEIRA, L. C. Potencialidades de oleaginosas para produção de biodiesel. **Informe Agropecuário**, v. 26, n. 229, p. 18-27, 2005.

TZEC-SIMÁ, M. A.; ORELLANA, R.; ROBERT, M. L. *In vitro* rescue of isolated embryos of *Bactris major* Jacq. and *Desmoncus orthacanthos* Mart., potentially useful native palms from the Yucatan peninsula (Mexico). **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 42, p. 54-58, 2006.

WILLIAMS, E. S.; MAHESWARAN, B. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany**, v. 57, p. 443-462, 1986.

## **Efeito do regime de incubação e do carvão ativado na germinação *in vitro* de embriões zigóticos maduros de macaúba (*Acrocomia aculeata*)**

### **RESUMO**

Os objetivos do presente trabalho foram determinar o regime de incubação inicial mais adequado à germinação *in vitro* e o efeito do carvão ativado na cultura de embriões zigóticos de macaúba. Foram utilizados como fonte de explantes embriões zigóticos extraídos de frutos maduros, os quais foram inoculados em meio básico composto pelos sais MS, acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, vitaminas de MS, e 6,5 g L<sup>-1</sup> de ágar Merck® como agente gelificante. Os explantes foram acondicionados em dois regimes de incubação na sala de crescimento (escuro durante 30 dias iniciais e fotoperíodo constante de 16 horas de luz e 8 horas de escuro). O carvão ativado foi adicionado aos meios nas concentrações de 0; 1; 2; e 3 g L<sup>-1</sup>. Após 90 dias em cultura, avaliaram-se os percentuais de intumescimento, oxidação, germinação, frequência de explantes sem respostas morfológicas, o percentual total de plântulas viáveis, o percentual de plântulas que apresentaram emissão de raízes secundárias, o comprimento da parte aérea (plúmula) e da raiz primária e o número médio de folhas por plântula. O regime de fotoperíodo proporcionou os maiores índices de oxidação dos explantes, contudo mostrou-se mais adequado ao desenvolvimento e conversão de plântulas viáveis, comparativamente ao regime de escuro inicial. A presença de carvão ativado foi determinante para o crescimento balanceado das plântulas, onde promoveu resultados positivos na emissão e alongamento de raízes primárias e secundárias, permitindo maiores chances de sucesso na fase de aclimatização.

## 1. INTRODUÇÃO

A macaúba é uma palmeira tropical, com ocorrência em todo o território brasileiro, predominantemente no estado de Minas Gerais. Apresenta grande potencial na produção de óleo biocombustível, o qual é extraído dos frutos, que por sua vez constituem o produto de maior valor econômico nesta espécie.

Embora já seja reconhecido o seu potencial econômico no mercado energético brasileiro, as populações existentes consistem de povoamentos nativos, explorados de forma extrativista e, portanto não racional. Adicionalmente, a macaúba apresenta grande dificuldade de germinação em condições naturais o que atrasa a entrada da planta na fase produtiva.

A cultura de embriões zigóticos pode contornar esses problemas, reduzindo o tempo de germinação das sementes e possibilitando o resgate de embriões oriundos de cruzamentos interespecíficos, quando apresentam alguma incompatibilidade, a superação da dormência, a produção de plantas assépticas e a elucidação de aspectos inerentes à nutrição do embrião no óvulo (Hu e Ferreira, 1998; Ledo et al., 2001).

Para muitas palmeiras, a oxidação dos tecidos é considerada uma grande limitação à expressão da morfogênese *in vitro* (Tisserat, 1979; Siqueira e Inoue, 1991; Tabai, 1992; Melo et al., 2001; Sarasan et al., 2002; Silva, 2002) e a adição de carvão ativado aos meios de cultura parece ser um consenso no controle da oxidação dos tecidos cultivados destas espécies. Dentre os efeitos benéficos do carvão ativado está a remoção de substâncias inibidoras do meio, produzidas durante a autoclavagem, ou liberadas pelos próprios tecidos. O carvão ativado é capaz de adsorver pigmentos tóxicos, especialmente os fenóis, causadores da oxidação e, dessa maneira, estimular o desenvolvimento das culturas *in vitro* (Pan e Staden, 1998). Fridborg et al. (1978) observaram a diferenciação de culturas de *Daucus* e *Allium* em meio acrescido de carvão ativado, onde o meio sem carvão continha compostos fenólicos, entre outros metabólitos, os quais eram responsáveis pela inibição da morfogênese. Além disso, a exclusão da luz pela presença do carvão ativado pode exercer um efeito benéfico, proporcionando um ambiente escuro no frasco de cultivo (Pan e Staden, 1998), tendo em vista que a luz aumenta a atividade de enzimas relacionadas à oxidação fenólica (Davies, 1972).

Com base na literatura revisada, poucos são os estudos referentes aos fatores que interferem na cultura de embriões da macaúba. A compreensão dos requerimentos básicos como luz ou escuro no início da cultura e a necessidade do carvão ativado no meio nutritivo podem contribuir para a redução do tempo de germinação, além de aumentar e uniformizar a obtenção de plântulas viáveis, com maiores chances de sobrevivência na fase de aclimatização. Os objetivos do presente estudo consistiram em determinar o regime de incubação inicial mais adequado e o efeito do carvão ativado durante o processo de germinação *in vitro* de embriões zigóticos maduros e crescimento das plântulas.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos II do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária - BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

### **2.1. Material vegetal**

Foram utilizados como fonte de explantes frutos maduros, coletados de plantas adultas de populações naturais existentes no campus da Central de Ensino e Desenvolvimento Agrário de Florestal – CEDAF, no município de Florestal, Minas Gerais, nos meses de janeiro a dezembro.

Previamente à extração dos embriões, foi removido o pericarpo dos frutos, e, em seguida, foram colocados para secar à temperatura ambiente por aproximadamente 30 dias antes do isolamento dos embriões. Os frutos foram quebrados com auxílio de um torno manual para a remoção do endocarpo e liberação da amêndoa, que contém em seu interior o embrião zigótico. As amêndoas foram previamente desinfestadas em hipoclorito de sódio comercial a 5% (Super Globo, Brasil) por 20 minutos, enxaguadas 3 vezes em água deionizada e autoclavada, e mantidas à temperatura ambiente por 24 horas para secagem, previamente à extração dos embriões.

Os embriões foram isolados com auxílio de bisturis e, em condições assépticas, foram desinfestados em hipoclorito de sódio comercial (Super

Globo, Brasil) a 0,75 % acrescido de 3 gotas do surfactante Tween-20<sup>®</sup> para cada 100 mL dessa solução durante 15 minutos, e por 4 enxágües sucessivos em água desionizada e autoclavada.

## **2.2. Meios de cultura e condições de cultivo**

Com o objetivo de avaliar o potencial de germinação, embriões zigóticos maduros foram inoculados em meio básico composto pelos sais de MS (Murashige e Skoog, 1962), acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, vitaminas de MS, e 6,5 g L<sup>-1</sup> de ágar Merck<sup>®</sup> como agente gelificante.

Inicialmente, os embriões foram cultivados em placas de Petri estéreis de poliestireno de 60 x 15 mm (J. Prolab, Brasil). Os meios de cultura foram vertidos em câmara de fluxo laminar, em alíquotas de 12 a 15 mL. Nesta fase, foram incorporados aos meios 300 mg L<sup>-1</sup> do antibiótico Timentim<sup>®</sup>, previamente filtro-esterilizado, em condições assépticas, após a autoclavagem e resfriamento dos meios nutritivos até uma temperatura de aproximadamente 50 °C.

Após 30 dias de cultivo, os embriões foram transferidos para tubos de ensaio (150 x 25 mm) contendo 10 mL de meio de cultura de mesma composição, vedados com tampas de polietileno e selados com filme de PVC (Goodyear<sup>®</sup>, Brasil). O pH dos meios foi ajustado para 5,7 ± 0,1, seguido de autoclavagem (121 °C, 1,1 atm de pressão, 20 minutos).

As culturas foram mantidas em sala de crescimento, à temperatura de 27± 2 °C, em ausência de luz durante 30 dias, para o regime de incubação inicial no escuro, e em seguida foram acondicionadas sob fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, irradiância de 36 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> provida por duas lâmpadas fluorescentes (Luz do Dia Especial, 20 W, Osram<sup>®</sup>, Brasil). Em relação ao regime de fotoperíodo, as culturas foram mantidas nesta condição durante todo o período de cultivo.

### 2.3. Condução e avaliações experimentais

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 4 (2 regimes de incubação dos explantes x 4 concentrações de carvão ativado). Os tratamentos consistiram da combinação dos regimes de incubação dos explantes na sala de crescimento, à temperatura de  $27 \pm 2$  °C (ambiente escuro, durante 30 dias de cultivo inicial; e sob fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, irradiância de  $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  provida por duas lâmpadas fluorescentes Luz do Dia Especial, 20 W, Osram®) com 4 concentrações de carvão ativado (0; 1; 2 e 3 g L<sup>-1</sup>). Após 30 dias de cultivo, os explantes mantidos na ausência de luz foram transferidos para condições de fotoperíodo já descritas anteriormente. Foram utilizadas 4 repetições por tratamento e 3 embriões por repetição.

Inicialmente, cada placa de Petri foi considerada uma repetição e após a transferência dos embriões para tubos de ensaio, cada repetição foi constituída de 3 tubos de ensaio, contendo 1 embrião por tubo.

Foram realizadas avaliações periódicas a cada 30 dias, quanto aos percentuais de intumescimento dos explantes, germinação, oxidação e frequência de explantes sem respostas morfológicas até os 90 dias de cultivo, quando então as plântulas obtidas passaram para a fase de aclimatização.

Aos 90 dias, foram avaliados, além das características já descritas anteriormente, o percentual total de plântulas viáveis, o percentual de plântulas que apresentaram emissão de raízes secundárias, o comprimento da parte aérea (plúmula) e da raiz primária e o número médio de folhas por plântula. Para o comprimento da raiz, as plântulas foram avaliadas sem que fossem retiradas dos tubos de ensaio, em condições assépticas, e para tanto, foram agrupadas em classes de comprimento de raiz, caracterizadas da seguinte forma: classe 1 (raiz  $\leq 0,5$  cm, considerada apenas um primórdio radicular); classe 2 (raiz apresentando 0,5 – 1,0 cm de comprimento) e classe 3 (raiz  $>1,0$  cm).

Consideraram-se germinados todos os embriões que emitiram apenas a raiz primária, apenas a parte aérea (ou plúmula) ou parte aérea e raiz. O critério adotado para descrição de plântulas viáveis ou normais, além do desenvolvimento da plúmula e da raiz primária na mesma unidade, foi a

expansão foliar e, esporadicamente, o desenvolvimento de raízes secundárias. Como plântulas anormais foram consideradas aquelas cujo crescimento da plúmula e da raiz primária mostrou-se atrofiado, e quando observada ausência de expansão foliar.

#### **2.4. Aclimatização das plântulas**

Após 90 dias de cultivo, plântulas que apresentaram crescimento de parte aérea, raiz e expansão foliar, foram submetidas à aclimatização, realizada inicialmente em condições assépticas, em frascos de cultura contendo mistura do substrato comercial Plantmax Café<sup>®</sup> e fibra de coco (1:1, em volume), e vedados com filme de PVC (Goodyear<sup>®</sup>, Brasil). As plântulas foram mantidas em sala de crescimento, sob fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, irradiância de  $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  provida por duas lâmpadas fluorescentes (Luz do Dia Especial, 20 W, Osram<sup>®</sup>, Brasil), durante 8 semanas, quando foram transferidas para potes plásticos, contendo a mesma mistura do substrato, em casa de vegetação. Os potes foram cobertos por 3 semanas com outro pote idêntico, para evitar a desidratação excessiva das plantas. Nessa fase as plântulas foram irrigadas de acordo com a necessidade, aproximadamente a cada dois dias. Mensalmente foi realizada adubação das plântulas com solução nutritiva (N:P:K na proporção 15:15:20). Os potes foram abertos gradativamente e totalmente retirados após 3 semanas de permanência das plântulas em casa de vegetação.

### **3. RESULTADOS**

Nos primeiros dias de cultivo, observou-se acentuado intumescimento do embrião, sobretudo na região cotiledonar correspondente ao eixo embrionário, extremidade proximal do embrião (Figura 1B). Após duas a três semanas de cultivo, observaram-se os primeiros sinais de desenvolvimento da radícula e, mais tardiamente da plúmula.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 1, baixos percentuais de explantes apenas intumescidos foram observados após 90 dias da inoculação, sendo representados por 25 % em regime inicial de escuro e

ausência de carvão, e por 8 % nesta condição, porém em concentrações menores de carvão ativado. Sob regime de fotoperíodo, 8 % dos explantes apresentaram intumescimento, quando na ausência de carvão ativado no meio de cultura, enquanto na presença de carvão não foram observados embriões intumescidos.

**Tabela 1** – Efeito do regime de incubação dos explantes na sala de crescimento (escuro e fotoperíodo) e de concentrações de carvão ativado (0, 1, 2 e 3 g L<sup>-1</sup>) nas diferentes respostas morfo-fisiológicas de embriões zigóticos maduros de macaúba (*Acrocomia aculeata*), após 90 dias da inoculação *in vitro*

Regime de incubação	Carvão ativado (g L <sup>-1</sup> )	Respostas morfo-fisiológicas (%) <sup>1</sup>			
		Intumescimento	Oxidação	Sem reação	Germinação
Fotoperíodo	0	8±8	50±10	8±8	34
	1	0	33±0	17±10	50±10
	2	0	17±10	17±10	66±19
	3	0	8±8	8±8	84±17
Escuro	0	25±16	42±8	8±8	25±16
	1	8±8	0	0	92±8
	2	8±8	8±8	8±8	75±16
	3	0	25±8	8±8	67±14

<sup>1</sup> Valores expressos em média ± erro padrão.

De maneira geral, já nos primeiros 30 dias de cultivo, os percentuais de oxidação dos embriões mostraram-se elevados, alcançando valores máximos nos meios sem carvão ativado, em ambas as condições de incubação (50 % sob fotoperíodo e 42 % em regime de escuro). Quando mantidos sob fotoperíodo durante todo o período de cultivo, puderam ainda ser observados percentuais de oxidação maiores, se comparados aos obtidos na condição de escuro, especialmente nas concentrações mais baixas de carvão (Tabela 1, Figura 1C).

Embora com percentuais relativamente reduzidos, observou-se que parte dos explantes utilizados não apresentou respostas morfogênicas, ao final de 90 dias em cultura (Tabela 1, Figura 1A). Os maiores valores (17 %) foram encontrados no regime de fotoperíodo, quando combinado às menores

concentrações de carvão ativado (1 e 2 g L<sup>-1</sup>). Nos demais tratamentos foram obtidos 8 % de explantes sem reação, exceto para o regime de escuro em presença de 1 g L<sup>-1</sup> de carvão, onde não foi observada a ocorrência de explantes sem respostas.

A germinação dos embriões não foi influenciada de forma expressiva pelo regime inicial de incubação dos explantes. Os percentuais variaram de 34 a 84 % para o regime de fotoperíodo e de 25 a 92 % para o regime de escuro. Por outro lado, maiores percentagens de germinação foram observados em meios acrescidos de carvão ativado (Tabela 1).

Em relação aos regimes de incubação, quando os embriões permaneceram sob fotoperíodo durante todo o cultivo, houve uma tendência de aumento dos percentuais de germinação, à medida em que a concentração de carvão foi aumentada. O valor máximo alcançado neste regime (84 %) ocorreu na maior concentração de carvão (3 g L<sup>-1</sup>), entretanto o maior percentual de germinação (92 %) foi observado no regime de escuro, combinado à concentração mais baixa de carvão (1 g L<sup>-1</sup>). No regime de escuro, observou-se que, com o aumento da concentração de carvão, os percentuais de germinação tenderam a decrescer. Para as duas condições de incubação, os menores percentuais (25 e 33 %) foram observados na ausência de carvão ativado no meio.

O desenvolvimento das plântulas no meio desprovido de carvão ativado mostrou-se lento e desbalanceado, com formação de um sistema radicular deficiente, caracterizado pela formação de um primórdio de raiz primária, embora mais freqüentemente, tenha sido observada a ausência de emissão de raízes nestes tratamentos (Figura 1D). Por outro lado, a incorporação de carvão ativado ao meio, incrementou o desenvolvimento das plântulas, principalmente no que se refere à formação de raízes primárias funcionais, independente do regime de incubação em que foram mantidas (Figura 1 E-J).

Observou-se influência positiva da maior concentração de carvão na formação de raízes pertencentes à classe 3 (raízes maiores que 1 cm), com superioridade tanto em regime de fotoperíodo (58 % das plântulas), quanto no ambiente escuro (33 % das plântulas) (Tabela 2). A formação de raízes maiores que 1 cm tendeu a aumentar, de acordo com o aumento da concentração de carvão do meio, nos dois regimes de incubação avaliados.

**Tabela 2** – Efeito do regime de incubação dos explantes na sala de crescimento (escuro e fotoperíodo) e de concentrações de carvão ativado (0, 1, 2 e 3 g L<sup>-1</sup>) no crescimento da parte aérea, raiz primária e no número médio de folhas de plântulas obtidas da germinação *in vitro* de embriões zigóticos maduros de macaúba (*Acrocomia aculeata*), após 90 dias de cultivo

Regime de incubação	Carvão ativado (g L <sup>-1</sup> )	Crescimento das plântulas <i>in vitro</i>				
		Parte aérea (cm) <sup>1</sup>	Nº de Folhas <sup>1</sup>	Raiz primária (%) <sup>2</sup>		
				Classe 1	Classe 2	Classe 3
Fotoperíodo	0	0,64	0,33	8±8	0	0
	1	1,93	0,6	8±8	8±8	33±14
	2	3,9	0,83	0	8±8	50±10
	3	5,1	1,0	0	17±10	58±21
Escuro	0	1,04	0,33	8±8	0	0
	1	3,4	1,2	50±22	8±8	17±17
	2	3,1	0,92	8±8	17±10	25±16
	3	3,6	0,8	17±10	17±10	33±14

<sup>1</sup>Valores médios obtidos a partir de três plântulas por repetição. <sup>2</sup>As plântulas foram agrupadas em classes de comprimento de raiz primária (classe 1=plântulas com primórdio radicular ≤0,5 cm; classe 2=plântulas com raiz entre 0,5 e 1 cm; classe 3=plântulas com raiz >1 cm). Os valores foram expressos em média ± erro padrão.

Em contrapartida, os percentuais de plântulas apresentando primórdio de raiz (classe 1) foram menores nas concentrações mais elevadas de carvão, independente do regime de incubação adotado, sugerindo que a adição de carvão ao meio em concentrações mais altas seja necessária, tendo em vista o estímulo ao crescimento das raízes em plântulas de macaúba. Comportamento semelhante foi observado em relação ao percentual de plântulas com formação de raízes pertencentes à classe 2, nos dois regimes de incubação inicial, com tendência de aumento nos valores percentuais, de acordo com a concentração desta substância no meio.

O crescimento da parte aérea das plântulas não foi significativamente afetado pelos regimes de incubação e concentrações de carvão ativado no meio. Contudo, melhores resultados foram observados, quando incorporou-se ao meio concentrações mais altas de carvão (2 e 3 g L<sup>-1</sup>), assim como a ausência de carvão resultou em menor crescimento da parte aérea (Tabela 2).

Foi possível observar ligeiro incremento no número médio de folhas por plântula, em presença de carvão ativado no meio. No entanto não foi notada diferença significativa em relação a diferentes concentrações de carvão ativado.

Para o regime de fotoperíodo, a maior concentração de carvão (3 g L<sup>-1</sup>) proporcionou maior número de folhas, enquanto no escuro, melhores resultados foram obtidos, quando adicionou-se ao meio, apenas 1 g L<sup>-1</sup> desta substância (Tabela 2).

No que se refere à conversão de plântulas viáveis, a exposição dos explantes sob fotoperíodo, durante todo o cultivo, mostrou superioridade em relação ao regime de escuro. Observou-se tendência de aumento dos percentuais, à medida que a concentração de carvão ativado no meio foi aumentada, sendo que os maiores valores (58 e 67 %). foram obtidos nas maiores concentrações de carvão (2 e 3 g L<sup>-1</sup>, respectivamente). De maneira semelhante, para o regime de escuro melhores resultados foram obtidos nas concentrações mais elevadas de carvão (33 e 25 % de plântulas viáveis em 2 e 3 g L<sup>-1</sup> de carvão, respectivamente). Por outro lado, na ausência de carvão, não foi observada a conversão de plântulas normais, nos dois regimes de incubação avaliados (Tabela 3).

**Tabela 3** – Efeito do regime de incubação dos explantes na sala de crescimento (escuro e fotoperíodo) e de concentrações de carvão ativado (0, 1, 2 e 3 g L<sup>-1</sup>) na conversão de plântulas viáveis e percentual de plântulas com emissão de raízes secundárias, após 90 dias da inoculação de embriões zigóticos maduros de macaúba (*Acrocomia aculeata*)

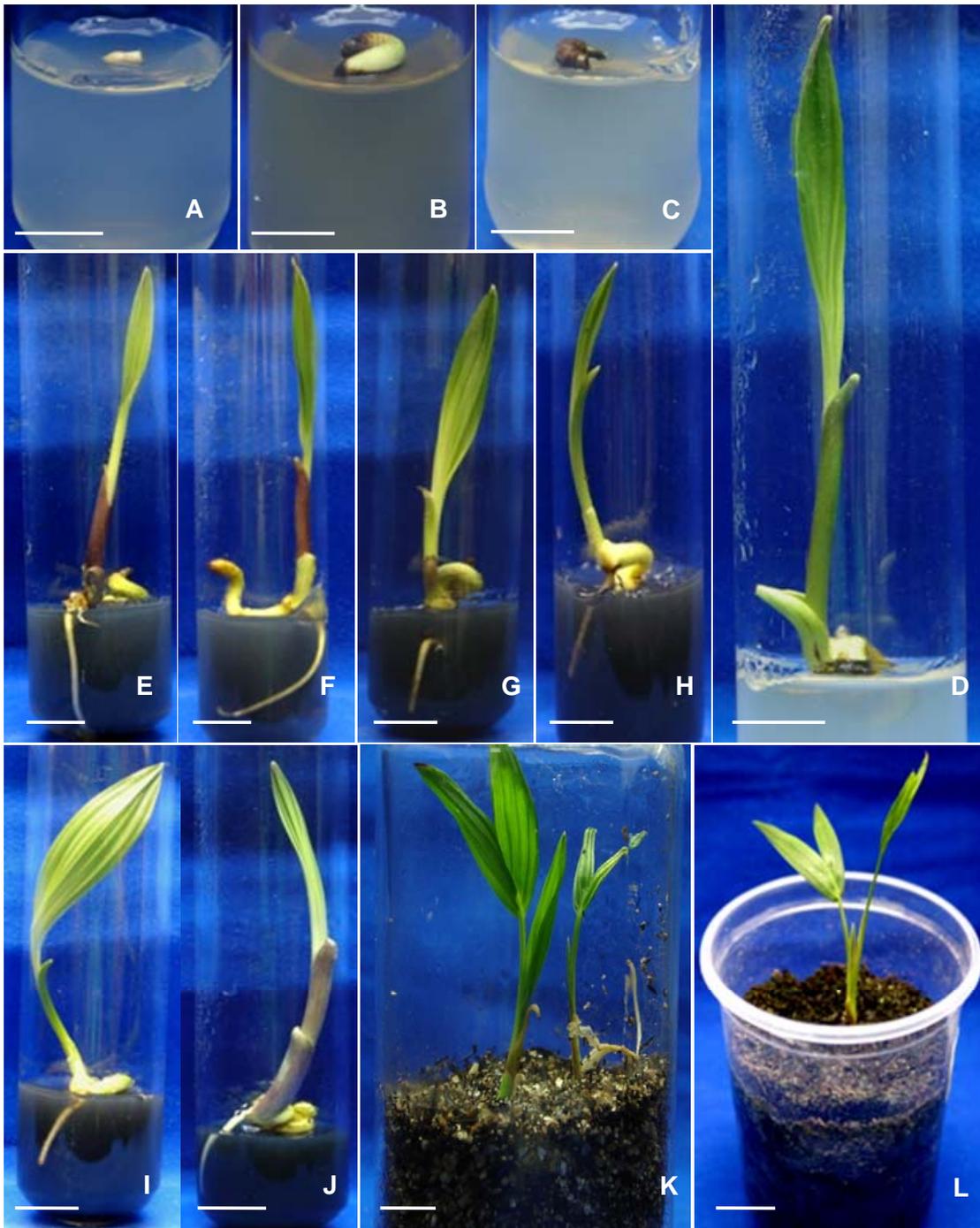
Regime de incubação	Carvão ativado (g L <sup>-1</sup> ) <sup>1)</sup>	Respostas morfo-fisiológicas (%) <sup>1)</sup>	
		Plântulas viáveis <sup>2)</sup>	Raízes secundárias <sup>2)</sup>
Fotoperíodo	0	0	0
	1	42±8	17±10
	2	58±16	25±8
	3	67±19	17±10
Escuro	0	0	0
	1	17±17	8±8
	2	33±14	8±8
	3	25±8	17±17

<sup>1)</sup>Valores médios obtidos a partir de três plântulas por repetição. <sup>2)</sup>Valores expressos em média ± erro padrão.

A formação de raízes secundárias foi observada apenas nos meios acrescidos de carvão ativado e maiores percentuais foram obtidos em 2 e 3 g

**Figura 1** – Efeito do regime de incubação dos explantes na sala de crescimento (escuro e fotoperíodo) e de concentrações de carvão ativado (0, 1, 2 e 3 g L<sup>-1</sup>) na germinação *in vitro* de embriões zigóticos maduros de macaúba (*Acrocomia aculeata*), após 90 dias de cultivo. **(A)** Explante sem resposta morfológica em meio desprovido de carvão ativado; **(B)** Explante intumescido, apresentando certo grau de escurecimento provocado pela oxidação do tecido, em meio desprovido de carvão ativado; **(C)** Explante totalmente oxidado em meio desprovido de carvão ativado; **(D)** Aspecto desbalanceado da plântula obtida em meio sem carvão, apresentando ausência de emissão de raiz primária; **(E-F)** Conversão de plântulas viáveis em meio acrescido de 1 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado; **(G-H)** Conversão de plântulas viáveis em meio acrescido de 2 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado; **(I-J)** Conversão de plântulas viáveis em meio acrescido de 3 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado. Nas figuras de **E** a **J**, à esquerda, plântulas mantidas sob fotoperíodo durante todo o cultivo, enquanto à direita plântulas mantidas em regime inicial de escuro. **(K)** Plântula em processo de aclimatização após 8 semanas da transferência para o substrato, em condições assépticas, na sala de crescimento. **(L)** Plântula aclimatizada após 4 semanas em casa de vegetação. (A-K, Barras = 10 mm e L, Barras = 20 mm).

L<sup>-1</sup> de carvão quando os explantes permaneceram sob fotoperíodo (25 %) e no escuro (17 %).



Nas condições experimentais adotadas, as plântulas viáveis obtidas após 90 dias de cultivo foram aclimatizadas com sucesso, e após a transferência para casa de vegetação, apresentaram crescimento vigoroso, emissão e expansão de novas folhas (Figura 1 K, L).

#### 4. DISCUSSÃO

No presente estudo, foram observados altos índices de oxidação dos embriões, em particular na ausência de carvão ativado no meio, e quando expostos à condição de fotoperíodo, durante todo o tempo de cultivo. Por outro lado, na presença de carvão, os percentuais mostraram-se bastante inferiores, especialmente quando os explantes permaneceram, inicialmente, em regime de escuro.

Resultados semelhantes foram obtidos por Melo et al. (2001) com embriões de guarirobeira, onde a permanência dos explantes em ambiente claro resultou em maior oxidação dos embriões, enquanto a adição de carvão ativado ao meio não foi eficaz no controle do escurecimento. Neste estudo, ficou evidenciada a importância dos antioxidantes no controle da oxidação do embrião desta palmeira, sendo o ácido ascórbico superior em relação ao tratamento com PVP e carvão ativado.

Embora inicialmente o cultivo dos embriões na presença de luz tenha resultado em maior oxidação dos explantes, posteriormente proporcionou maior conversão de plântulas viáveis, sugerindo um efeito positivo desta condição no crescimento e desenvolvimento das plantas após 90 dias em cultura. Em concordância com os resultados obtidos, Melo et al. (2001) observaram que a fase luminosa foi benéfica ao desenvolvimento das plântulas de *Syagrus oleracea*, promovendo maior número e tamanho médio das folhas em relação à condição de escuro. Contudo, o ambiente de luz acarretou em maior percentagem de explantes oxidados, enquanto o cultivo das plantas no escuro mostrou pouca eficiência em relação ao controle da oxidação para a cultura de embrião *in vitro* da guarirobeira.

O escurecimento e eventual morte dos tecidos é um problema freqüentemente encontrado durante os estádios iniciais de cultivo *in vitro* e ocorre devido à produção excessiva de polifenóis, possivelmente pela ativação de reações de defesa. Aos polifenóis, atribuem-se, propriedades inibidoras que devem ser evitadas ou eliminadas do ambiente de cultivo *in vitro*. Diversos métodos de prevenção ao surgimento dos fenóis têm sido propostos, sendo o mais amplamente utilizado, a transferência dos explantes para um novo meio (Pan e Staden, 1998).

A incorporação de carvão ativado ou de outras substâncias antioxidantes tais como PVP, ácido ascórbico ou ácido cítrico pode solucionar problemas relacionados ao escurecimento pela oxidação dos tecidos e tem sido freqüentemente relatada em vários protocolos de propagação *in vitro* em diferentes palmáceas (Tisserat, 1979; Reynolds, 1982).

Na germinação *in vitro* de embriões de *Hyophorbe lagenicaulis*, o escurecimento dos tecidos, acompanhado da redução no crescimento das plântulas também foi solucionado pela inclusão de carvão ativado ao meio nutritivo (Sarasan et al., 2002). Adicionalmente, em *Cocos nucifera*, a adição de carvão foi indispensável para todos os meios testados, mostrando-se eficiente na eliminação do escurecimento causado pela oxidação (Silva, 2002).

A formação de plântulas de macaúba com raízes primárias funcionais foi sensivelmente afetada pela presença de carvão ativado no meio, independente da concentração utilizada. Por outro lado, não foi observada a emissão de raízes no meio desprovido deste componente, para ambas as condições de incubação. Por propiciar um ambiente escuro e adsorver substâncias deletérias ou inibidoras ao crescimento dos tecidos *in vitro*, o carvão ativado pode estimular a formação de raízes (Pan e Staden, 1998). Segundo Grattapaglia e Machado (1998), o ambiente escuro proporcionado pelo carvão no meio de cultura, pode ser propício ao desenvolvimento das raízes por reduzir a incidência de luz na zona de crescimento ativo do sistema radicular.

Esses resultados corroboram aqueles encontrados por Fridborg e Eriksson (1975) os quais relatam a formação de raízes abundantes em culturas de *Allium cepa* quando cultivadas em meio contendo 1 % de carvão ativado, as quais normalmente não produzem raízes. Aliado a isso, à medida que a concentração de carvão foi aumentada, o crescimento organizado das culturas e o alongamento das raízes foi favorecido.

O crescimento desbalanceado das plântulas *in vitro* aliado à dificuldade de enraizamento observados em macaúba, também é relatado para outras palmeiras como *Cocos nucifera* (Santana e Teixeira, 2004; Ledo et al., 2007) e *Bactris gasipaes* (Steinmacher, 2005), sendo considerado um entrave na regeneração *in vitro* de embriões zigóticos destas espécies. Nesses trabalhos, a incorporação de carvão ativado ao meio nutritivo também influenciou positivamente, tanto a germinação dos embriões, quanto o crescimento

balanceado das plântulas, estimulando o crescimento das raízes primárias e secundárias.

Por outro lado, a adição de carvão ativado ao meio foi deletéria para a formação de partes aéreas e radiculares em orquídeas, estimulando o desenvolvimento de calos nestas culturas (Santos et al., 2005). Além disso, esta substância quando incorporada ao meio nutritivo, foi prejudicial à germinação das sementes e crescimento dos protocórmios (Ventura et al., 2005).

A obtenção de plântulas com formação de um sistema radicular funcional, capaz de sustentar a plântula durante a aclimatização, tem sido identificada como um sério problema, não apenas em macaúba, mas em outros trabalhos envolvendo a cultura de embriões em palmeiras (Ashburner et al., 1993; Santana e Teixeira, 2004; Ledo et al., 2007), reduzindo as chances de sobrevivência das plântulas nesta etapa (Ledo et al., 2007). Na cultura de embriões de macaúba, o carvão ativado adicionado ao meio mostrou-se preponderante para a formação de raízes primárias e secundárias, sendo o comprimento das raízes primárias favorecido, de acordo com a concentração utilizada. A ausência deste componente, além de não ter resultado em conversão das plântulas, foi responsável pelo alto nível de oxidação dos embriões, em ambas as condições iniciais de cultivo.

Em conformidade com os resultados obtidos no presente trabalho, após 12 semanas de cultivo *in vitro*, apenas as plântulas viáveis obtidas em meio acrescido de carvão ativado puderam ser aclimatizadas com sucesso, em casa de vegetação, expressando alto vigor e emissão de novas folhas.

## 5. CONCLUSÕES

O cultivo de embriões zigóticos maduros de macaúba na condição inicial de luminosidade resultou em altos índices de oxidação dos explantes, embora, posteriormente, este ambiente mostrou-se mais adequado para o desenvolvimento e conversão de plântulas viáveis.

A adição de carvão ativado ao meio de cultura foi indispensável para o crescimento balanceado das plântulas, principalmente na indução e

alongamento das raízes primárias e secundárias, contribuindo para a maior chance de sobrevivência das plântulas na fase de aclimatização *ex vitro*.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASHBURNER, G. R.; THOMPSON, W. K.; BURCH, J. M. Effect of  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid and sucrose levels on the development of cultured embryos of coconut. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 35, p. 157-163, 1993.

DAVIES, M. E. Polyphenol synthesis in cell suspension cultures of paul's scarlet rose. **Planta**, v. 104, p. 50-65, 1972.

FRIDBORG, G.; ERIKSSON, T. Effects of activated charcoal on growth and morphogenesis in cell cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 34, p. 306-308, 1975.

FRIDBORG, G.; PEDERSÉN, M.; LANDSTRÖM, L. E. The effect of activated charcoal on tissue cultures: adsorption of metabolites inhibiting morphogenesis. **Physiologia Plantarum**, v. 43, p. 104-106, 1978.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, 1998, v. 1, p. 183-260.

HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. Cultura de embriões. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, 1998, v. 1, p. 371-394.

LEDO, A. S.; LAMEIRA, O. A.; BENBADIS, A. K.; MENEZES, I. C.; LEDO, C. A. S.; OLIVEIRA, M. S. P. Cultura *in vitro* de embriões zigóticos de açaizeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 3, p. 468-472, 2001.

LEDO, A. S.; GOMES, K. K. P.; BARBOZA, S. B. S. C. VIEIRA, G. S. S.; TUPINAMBÁ, E. A.; ARAGÃO, W. M. Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos e aclimação de plântulas de coqueiro-anão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 2, p. 147-154, 2007.

MELO, B.; PINTO, J. E. B. P.; LUZ, J. M. Q.; PEIXOTO, J. R.; JULIATTI, F. C. Diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e desenvolvimento das plântulas na cultura *in vitro* de embriões da guarirrobeira (*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n. 6, p. 1301-1306, 2001.

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

PAN, M. J.; STADEN, J. V. The use of charcoal in *in vitro* culture – a review. **Plant Growth Regulation**, v. 26, p. 155-163, 1998.

REYNOLDS, J. F. Vegetative propagation of palm trees. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. (Eds.). **Tissue culture in forestry**. Netherlands: Martinus Nijhoff, 1982, p. 182-207.

SANTANA, M. C.; TEIXEIRA, S. L. Influência do ácido naftalenoacético no crescimento e enraizamento *in vitro* de plântulas de coqueiro (*Cocos nucifera* L.). **Biologia Geral e Experimental**, v. 5, n. 1, p. 30-33, 2004.

SANTOS, A. F.; DIAS, J. M. M.; LIMA, I. R. S.; VENTURA, G. M.; ALEXANDRE, R. S. Influência de diferentes concentrações de carvão ativado no crescimento *in vitro* de protocórmio de *Epidendrum ibaguense*. **Revista da Associação Brasileira de Horticultura**, v. 23, n. 2, p. 613, 2005.

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

SILVA, V. S. **Regeneração *in vitro* de embriões de *Cocos nucifera* L.** 2002, 87p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas), Piracicaba: ESALQ.

SIQUEIRA, E. R.; INOUE, M. T. Controle de oxidação na cultura de tecidos do coqueiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 26, n. 7, p. 949-953, 1991.

STEINMACHER, D. A. **Germinação *in vitro*, criopreservação e embriogênese somática em pupunha.** 2005, 125p. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais), Florianópolis: UFSC.

TABAI, S. A. **Propagação da palmeira macaúba *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Loddiges. através de métodos *in vitro*.** 1992, 121p. Dissertação (Mestrado em Ciências), Piracicaba: ESALQ.

TISSERAT, B. Propagation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) *in vitro*. **Journal of Experimental Botany**, v. 30, p. 1275-1283, 1979.

VENTURA, G. M.; SANTOS, A. F.; CARVALHO, V. S.; DIAS, J. M. M.; NOVAIS, R. F.; TEIXEIRA, S. L.; SILVA, M. G. Germinação de sementes e crescimento de protocórmios de orquídea em meio de cultura contendo diferentes concentrações de carvão ativado. **Revista da Associação Brasileira de Horticultura**, v. 23, n. 2, p. 615, 2005.

## **Influência do meio nutritivo e do carvão ativado na germinação *in vitro* de embriões zigóticos maduros e imaturos de macaúba (*Acrocomia aculeata*)**

### **RESUMO**

O presente estudo teve como objetivos avaliar a influência do meio nutritivo e do carvão ativado no potencial regenerativo da cultura de embriões zigóticos maduros e imaturos de macaúba (*Acrocomia aculeata*). Embriões maduros foram cultivados nas formulações salinas de MS (Murashige e Skoog, 1962) e de Y<sub>3</sub> (Eeuwens, 1976), nas concentrações de 25; 50; 75 e 100 % dos sais, desprovidos de carvão ativado, e em ambas as formulações com 100 % dos sais, acrescido de 1,5 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado. Embriões imaturos foram inoculados em meio de Y<sub>3</sub>, contendo 25; 50; 75 e 100 % da concentração salina, combinadas a 1; 2 e 3 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado. Após 30 e 90 dias de cultivo, avaliou-se o percentual de intumescimento, oxidação e germinação dos embriões, conversão em plântulas viáveis, o comprimento da parte aérea e da raiz primária e o número médio de folhas por plântula. Os resultados obtidos no experimento utilizando-se embriões maduros, como fonte de explantes, mostraram, em geral, o desenvolvimento mais vigoroso das plântulas cultivadas nos meios acrescidos de carvão ativado, enquanto nos meios sem carvão, melhores respostas foram observadas na formulação de MS, contendo 50 e 75 % dos sais. Contudo, as plântulas obtidas nos meios desprovidos de carvão apresentaram crescimento lento e desbalanceado entre a parte aérea e raiz, independente da formulação de sais utilizada. Em embriões imaturos, observou-se que a germinação e a conversão em plântulas viáveis foram pouco afetadas pela concentração de sais do meio, mostrando-se mais influenciados pelo carvão ativado. Elevados percentuais de germinação e conversão em plântulas completas, com desenvolvimento de raízes funcionais foram obtidos nas concentrações mais altas de carvão.

## 1.INTRODUÇÃO

Um dos aspectos mais críticos na cultura de embriões é a adequação de meios nutritivos capazes de suprir as necessidades nutricionais e fisiológicas dos embriões, de tal maneira que possam completar o ciclo de maturação. De forma geral, a composição do meio de cultura para a germinação *in vitro* de embriões zigóticos pode estar relacionada com o estágio de desenvolvimento destes explantes (Andreoli, 1986).

Segundo Andreoli (1986) e Hu e Ferreira (1998), o desenvolvimento de embriões maduros *in vitro* ocorre em meios nutritivos mais simples, compostos de sais minerais, vitaminas e açúcares, enquanto embriões imaturos requerem um meio de composição mais complexa, contendo além dos componentes acima mencionados, substâncias reguladoras de crescimento, compostos orgânicos e extratos naturais.

Dentre as inúmeras formulações salinas, a de MS (Murashige e Skoog, 1962) é a mais freqüentemente utilizada na grande maioria das espécies estudadas. Contudo, sua elevada concentração salina mostra a necessidade de se estudar modificações que permitam reduzir os níveis dos nutrientes, proporcionando dessa forma, maior adaptação de cultivos *in vitro* (Samartin, 1989). Como exemplo, a diluição dos sais para a metade de sua concentração estimulou o crescimento de embriões excisados de *E. guineensis* (Nwankwo e Krikorian, 1986).

A cultura de embriões é uma realidade na propagação de várias espécies, especialmente de algumas palmeiras, entre elas a macaúba que, por apresentar dificuldades de germinação encontra nas técnicas de propagação *in vitro* uma forma de viabilizar a germinação e a produção de mudas desta espécie.

O crescimento desbalanceado das plântulas oriundas da cultura de embriões *in vitro* tem sido relatado em diversos trabalhos com palmeiras (Melo, 2000; Al-Khayri, 2003; Santana et al., 2003; Santana e Teixeira, 2004; Steinmacher, 2005; Ledo et al., 2007). Santana et al. (2003) comentam que a irregularidade na emissão de radícula é freqüentemente observada na cultura *in vitro* de embriões de coqueiro. Em algumas plântulas, a emissão da radícula é o primeiro sinal da germinação e, neste caso, a raiz tem maior

desenvolvimento em relação à parte aérea ou a raiz primária cresce em extensão sem ramificar, o que também não é funcional, pois a área de absorção é reduzida. Desta forma, a não formação de um sistema radicular vigoroso, capaz de sustentar a plântula durante a fase de aclimatização tem sido considerado o principal obstáculo na germinação *in vitro* de muitas palmeiras (Ashburner et al., 1993; Ledo et al., 2007), o que permitiria maior sobrevivência das plântulas durante a aclimatização e em condições de campo (Ledo et al., 2007).

Diluições das formulações básicas do meio de cultura, em geral, têm possibilitado melhor enraizamento das culturas. Embora existam variações conforme a espécie, diluições da ordem de 25, 50 e 75 % da concentração salina do meio MS são freqüentes nessa fase (Assis e Teixeira, 1998; Grattapaglia e Machado, 1998).

Por outro lado, a incorporação de carvão ativado ao meio nutritivo tem proporcionado resultados positivos, em termos de emissão de raiz primária fasciculada e funcional e, conseqüentemente, na conversão de plântulas viáveis de diversas palmeiras (Silva, 2002; Sarasan et al., 2002; Santana e Teixeira, 2004; Steinmacher, 2005; Ledo et al., 2007). Fisicamente, o carvão simula a condição de ambiente escuro, no qual as raízes normalmente se desenvolvem melhor. Por outro lado, o carvão ativado tem como propriedade adsorver parte dos elementos que compõem o meio de cultura, com o que permite a diluição desse meio; e adsorve, também, compostos tóxicos inibidores do enraizamento (Grattapaglia e Machado, 1998) e compostos fenólicos que promovem a oxidação e eventual morte dos explantes durante os processos morfogênicos *in vitro* (Pan e Staden, 1998).

As informações a respeito da formulação de meios de cultura que contemplem as necessidades específicas das palmeiras, bem como as comparações entre as diversas composições de meios, a concentração adequada dos sais e de carvão ativado e seus efeitos nestas espécies de palmáceas são ainda escassas. Desta maneira, o presente estudo teve como objetivos avaliar o potencial germinativo de embriões zigóticos maduros e imaturos de macaúba (*Acrocomia aculeata*), em formulações salinas MS e Y<sub>3</sub>, concentrações de sais e de carvão ativado no meio de cultura.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos II do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária - BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

### 2.1. Material vegetal

Foram utilizados como fonte de explantes frutos maduros e imaturos de macaúba (*Acrocomia aculeata*) coletados de plantas adultas de populações naturais existentes no campus da Central de Ensino e Desenvolvimento Agrário de Florestal – CEDAF, no município de Florestal, Minas Gerais, nos meses de janeiro a dezembro.

Em relação a utilização de frutos maduros, previamente à extração dos embriões, foi removido o pericarpo dos frutos e em seguida colocados para secar à temperatura ambiente, por aproximadamente 30 dias, antes do isolamento dos embriões.

Quanto aos frutos imaturos (7 meses após a polinização), após a colheita, estes foram acondicionados em câmara fria a 14 °C durante 15 dias e, em seguida, procedeu-se a remoção do pericarpo e o despoldamento manual, para a retirada do mesocarpo, com auxílio de facas. Posteriormente, foram armazenados em estufa incubadora BOD (Diurnal Growth Chamber, Forma Scientific, USA) à temperatura de  $27 \pm 2$  °C para secagem por 24 horas.

Os frutos foram quebrados com auxílio de um torno manual para a remoção do endocarpo e liberação da amêndoa, que contém em seu interior o embrião zigótico. As amêndoas, oriundas de frutos maduros, foram previamente desinfestadas em hipoclorito de sódio comercial a 5 % (Super Globo, Brasil) por 20 minutos, seguido de 3 enxágües sucessivos em água desionizada e autoclavada, e mantidas à temperatura ambiente, por 24 horas, para secagem. Posteriormente, procedeu-se à extração dos embriões. Em função da consistência semi-sólida das amêndoas de frutos imaturos, estas não passaram pela desinfestação prévia descrita para os frutos maduros.

Embriões maduros e imaturos foram isolados com auxílio de bisturis, e em condições assépticas, desinfestados em hipoclorito de sódio comercial (Super

Globo, Brasil) a 1 e 0,5 %, respectivamente, acrescido de 3 gotas do surfactante Tween-20<sup>®</sup> para cada 100 mL dessa solução durante 15 minutos, seguidos de 4 enxágües sucessivos em água desionizada e autoclavada.

## **2.2. Meios de cultura e condições de cultivo**

### **2.2.1. Influência da composição do meio nutritivo e da concentração salina na germinação *in vitro* de embriões zigóticos maduros**

Avaliou-se o efeito das formulações salinas de MS (Murashige e Skoog, 1962), por ser a mais utilizada nos protocolos de cultura *in vitro*, e Y<sub>3</sub> (Eeuwens, 1976), por ser a composição utilizada com êxito nos trabalhos conduzidos com *Cocos nucifera*, nas concentrações de 25; 50; 75 e 100 % da força total dos sais, na germinação *in vitro* de embriões zigóticos maduros (Tabela 1). Além destas combinações, foram realizados dois tratamentos adicionais, que consistiram das formulações MS e Y<sub>3</sub> na concentração total dos sais, acrescido de 1,5 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado.

Os explantes foram inoculados em meio basal com as formulações de MS e de Y<sub>3</sub> em combinação com as concentrações de sais descritas acima, suplementados com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, vitaminas de MS, e 6,5 g L<sup>-1</sup> de ágar Merck<sup>®</sup> como agente gelificante.

Utilizaram-se para o cultivo inicial placas de Petri estéreis de poliestireno de 60 x 15 mm (J. Prolab, Brasil). Os meios de cultura foram vertidos em câmara de fluxo laminar, em alíquotas de 12 a 15 mL. Nesta fase, foram incorporados aos meios 300 mg L<sup>-1</sup> do antibiótico Timentim<sup>®</sup>, previamente filtro-esterilizado, em condições assépticas, após a autoclavagem e resfriamento dos meios nutritivos até uma temperatura de aproximadamente 50 °C. O pH dos meios foi ajustado para 5,7 ± 0,1, seguido de autoclavagem (121 °C, 1,1 atm de pressão, 20 minutos).

Após 30 dias de cultivo, os embriões foram transferidos para frascos de cultivo (120 x 55 mm) contendo 40 mL do mesmo meio básico, e vedados com filme de PVC (Goodyear<sup>®</sup>, Brasil).

**Tabela 1** - Composição química das diferentes formulações salinas utilizadas na germinação *in vitro* de embriões zigóticos maduros de macaúba (*Acrocomia aculeata*)

Composto	Formulações salinas	
	MS <sup>1</sup>	Y <sub>3</sub> <sup>2</sup>
Macronutrientes (mg. L <sup>-1</sup> )		
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	-
NH <sub>4</sub> Cl	-	535
KCl	-	1492
KNO <sub>3</sub>	1900	2020
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	370	247
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	440	294
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	-
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	-	312
Micronutrientes (mg. L <sup>-1</sup> )		
KI	0,83	8,3
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,20	3,10
MnSO <sub>4</sub> . 4H <sub>2</sub> O	15,6	10,0
ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	8,6	7,20
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0,25	0,24
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0,025	0,25
CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0,025	0,24
NiCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	-	0,024
Fontes de Ferro (mg. L <sup>-1</sup> )		
Na <sub>2</sub> EDTA	37,3	37,3
FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	27,8	13,9

<sup>1</sup> Formulação salina de Murashige e Skoog (1962). <sup>2</sup> Formulação salina de Eeuwens (1976).

As culturas foram mantidas em estufa incubadora BOD (Diurnal Growth Chamber, Forma Scientific, USA), à temperatura de 27 ± 2 °C e ausência de luz, durante 30 dias, e em seguida foram acondicionadas em sala de crescimento com temperatura de 27 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, irradiância de 36 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> provida por duas lâmpadas fluorescentes (Luz do Dia Especial, 20 W, Osram®, Brasil).

### 2.2.2. Efeito da concentração salina do meio Y<sub>3</sub> e do carvão ativado na germinação *in vitro* de embriões zigóticos imaturos

Os tratamentos consistiram da combinação de 4 concentrações de sais Y<sub>3</sub> (25; 50; 75 e 100 % da força total) com 3 concentrações de carvão ativado (1; 2 e 3 g L<sup>-1</sup>). Com o objetivo de avaliar o potencial de germinação, embriões zigóticos imaturos (7 meses após a polinização), após a desinfestação sob condições assépticas, foram inoculados em meio básico Y<sub>3</sub>, acrescido de 25 g

L<sup>-1</sup> de sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 40 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de adenina, vitaminas de MS e 6,5 g L<sup>-1</sup> de ágar Merck<sup>®</sup> como agente gelificante.

Inicialmente, os embriões foram cultivados em placas de Petri estéreis de poliestireno de 60 x 15 mm (J. Prolab, Brasil). Os meios de cultura foram vertidos em câmara de fluxo laminar, em alíquotas de 12 a 15 mL. Nesta fase, foram incorporados aos meios 300 mg L<sup>-1</sup> do antibiótico Timentim<sup>®</sup>, previamente filtro-esterilizado, em condições assépticas, após a autoclavagem e resfriamento dos meios nutritivos até uma temperatura de aproximadamente 50 °C.

Após 30 dias de cultivo, os embriões foram transferidos para tubos de ensaio (150 x 25 mm) com 10 mL dos meios respectivos. Os tubos foram vedados com tampas de polietileno e selados com filme de PVC (Goodyear<sup>®</sup>, Brasil). O pH dos meios foi ajustado para 5,7 ± 0,1, seguido de autoclavagem (121 °C, 1,1 atm de pressão, 20 minutos).

As culturas foram mantidas em estufa incubadora BOD (Diurnal Growth Chamber, Forma Scientific, USA), à temperatura de 27 ± 2 °C e ausência de luz durante 30 dias, e, em seguida, foram acondicionadas em sala de crescimento com temperatura de 27 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, irradiância de 36 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, provida por duas lâmpadas fluorescentes (Luz do Dia Especial, 20 W, Osram<sup>®</sup>, Brasil).

## **2.3. Condução e avaliações experimentais**

### **2.3.1. Influência da composição do meio nutritivo e da concentração salina na germinação *in vitro* de embriões zigóticos maduros**

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, utilizando-se 5 repetições por tratamento e 5 embriões por repetição.

Após 30 dias nesta condição, os embriões que germinaram foram transferidos das placas de Petri para frascos de cultivo.

Ao final de 30 dias da inoculação, foram avaliados os percentuais de intumescimento, germinação, oxidação, explantes sem reação e de contaminação.

Consideraram-se germinados todos os embriões que emitiram apenas a raiz primária, apenas a parte aérea (ou plúmula) ou parte aérea e raiz. O critério adotado para descrição de plântulas viáveis ou normais, além do desenvolvimento da plúmula e da raiz primária na mesma estrutura, foi a expansão foliar e, esporadicamente, o desenvolvimento de raízes secundárias. Como plântulas anormais foram consideradas aquelas cujo crescimento da plúmula e da raiz primária mostrou-se atrofiado, e quando observada ausência de expansão foliar.

Após 90 dias de cultivo, plântulas viáveis foram submetidas à fase de aclimatização, realizada, inicialmente, em condições assépticas, em frascos de cultura contendo mistura do substrato comercial Plantmax Café<sup>®</sup> e fibra de coco (1:1, em volume), e vedados com filme de PVC (Goodyear<sup>®</sup>, Brasil). As plântulas foram mantidas em sala de crescimento, sob fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, irradiância de  $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , provida por duas lâmpadas fluorescentes (Luz do Dia Especial, 20 W, Osram<sup>®</sup>, Brasil), durante 8 semanas, quando foram transferidas para potes plásticos, contendo a mesma mistura do substrato, e mantidas em casa de vegetação. Os potes foram cobertos com outro pote idêntico, para evitar a desidratação excessiva das plantas. Nessa fase, as plântulas foram irrigadas de acordo com a necessidade, aproximadamente a cada dois dias. Mensalmente, foi realizada adubação das plântulas com solução nutritiva Ouro Verde<sup>®</sup> (N:P:K na proporção 15:15:20). Os potes foram abertos gradativamente e totalmente retirados após 3 semanas de permanência das plântulas em casa de vegetação.

### **2.3.2. Efeito da concentração salina do meio Y<sub>3</sub> e do carvão ativado na germinação *in vitro* de embriões zigóticos imaturos**

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4 x 3 (4 concentrações de sais e 3 concentrações de carvão ativado). Foram utilizadas 4 repetições por tratamento e 2 embriões por repetição.

Inicialmente cada placa de Petri foi considerada uma repetição e após a transferência dos embriões para tubos de ensaio, cada repetição foi constituída de 2 tubos de ensaio, contendo 1 embrião por tubo.

Foram realizadas avaliações a cada 30 dias, quanto aos percentuais de intumescimento dos explantes; germinação; oxidação e frequência de explantes sem reação, até os 90 dias de cultivo, quando, então, as plântulas obtidas passaram para a fase de aclimatização.

Após 90 dias, foram avaliados, além das características já descritas anteriormente, o percentual total de plântulas viáveis, o percentual de plântulas que apresentaram emissão de raízes secundárias, o comprimento da parte aérea (plúmula) e da raiz primária e o número médio de folhas por plântula. Para o comprimento da raiz, as plântulas foram avaliadas sem que fossem retiradas dos tubos de ensaio, em condições assépticas, e para tanto, foram agrupadas em classes de comprimento da raiz, caracterizadas da seguinte forma: classe 1 (raiz  $\leq 0,5$  cm, considerada apenas um primórdio radicular); classe 2 (raiz apresentando 0,5 – 1,0 cm de comprimento) e classe 3 (raiz  $> 1,0$  cm).

Consideraram-se germinados todos os embriões que emitiram apenas a raiz primária, apenas a parte aérea (ou plúmula) ou parte aérea e raiz. O critério adotado para descrição de plântulas viáveis ou normais, além do desenvolvimento da plúmula e da raiz primária na mesma estrutura, foi a expansão foliar e, esporadicamente, o desenvolvimento de raízes secundárias. Como plântulas anormais foram consideradas aquelas cujo crescimento da plúmula e da raiz primária mostrou-se atrofiado, e quando observada ausência de expansão foliar.

Após 90 dias de cultivo, plântulas viáveis foram submetidas à fase de aclimatização *ex vitro*, sendo transferidas para potes plásticos contendo mistura do substrato comercial Plantmax Café<sup>®</sup> e fibra de coco (1:1, em volume) e mantidas em casa de vegetação. Os potes foram cobertos com sacolas de polietileno, para evitar a desidratação excessiva das plantas. Nessa fase as plântulas foram irrigadas de acordo com a necessidade, aproximadamente a cada dois dias. Mensalmente foi realizada adubação das plântulas com solução nutritiva Ouro Verde<sup>®</sup> (N:P:K na proporção 15:15:20). Após 3 semanas de permanência das plantas em casa de vegetação, as

sacolas plásticas foram cortadas em suas extremidades e completamente removidas após 5 semanas.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Influência da composição do meio nutritivo e da concentração salina na germinação *in vitro* de embriões zigóticos maduros

Uma semana após a inoculação dos explantes, observou-se o intumescimento dos embriões, considerado o início do processo de germinação, e, posteriormente, a protrusão da radícula e da plúmula. Após 30 dias, observou-se variação entre os diferentes tratamentos (8 a 28 %), e em relação às formulações salinas, houve tendência semelhante de comportamento, com maiores percentuais de germinação nas concentrações mais elevadas de sais (75 e 100 %). Na formulação Y<sub>3</sub> suplementada com 1,5 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado, foi notado percentual ligeiramente superior (28 %) em relação aos demais tratamentos (Tabela 2).

Conforme apresentado na Tabela 2, baixos percentuais de oxidação foram observados (0 a 20 %) em todos os tratamentos. Contudo, quanto aos embriões sem reação, de maneira geral os percentuais foram elevados nas duas formulações salinas (20 a 44 %), possivelmente em função do estágio fisiológico dos explantes utilizados.

Em geral, os percentuais de germinação, aos 30 dias de cultivo, foram considerados baixos, não ultrapassando 56 % (Tabela 2). Os resultados apresentados indicam, de maneira geral, sutil superioridade dos percentuais de germinação para os meios destituídos de carvão ativado, independente da formulação salina, especialmente nas concentrações de 25 a 75 % dos sais do meio. Contudo é importante destacar o crescimento desbalanceado das plântulas nestes tratamentos, onde a relação parte aérea: raiz primária foi de praticamente 2:1 (dados não apresentados). A adição de carvão ativado aos meios de MS e Y<sub>3</sub> estimulou, consideravelmente, o crescimento e desenvolvimento de raízes primárias e secundárias, bem como a conversão de plântulas viáveis ou normais, apresentando, além destas características, alongamento e expansão das folhas (Figuras 1E e 2E).

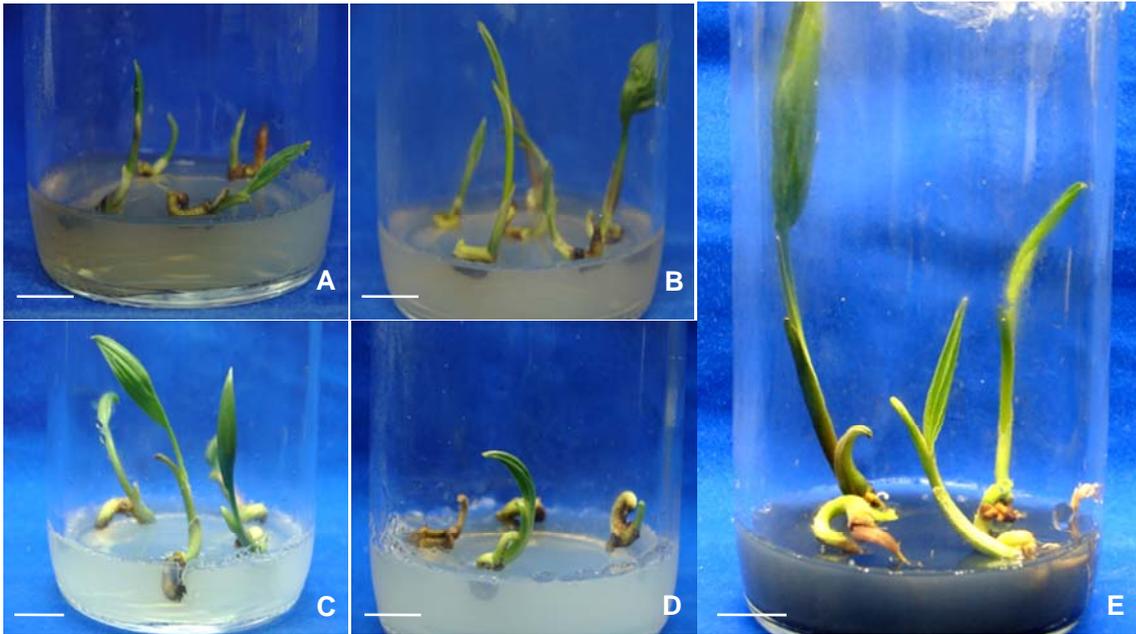
**Tabela 2** – Efeito das formulações salinas de MS (Murashige e Skoog, 1962) e Y<sub>3</sub> (Eeuwens, 1976), concentrações dos sais (25 %; 50 %; 75 %; 100 % e 100 % + 1,5 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado) nas diferentes respostas morfo-fisiológicas de embriões zigóticos maduros de macaúba (*Acrocomia aculeata*), após 30 dias da inoculação *in vitro*

Formulação salina	Concentração dos sais (%)	Respostas morfo-fisiológicas (%) <sup>1</sup>			
		Intumescimento	Oxidação	Sem reação	Germinação
MS	25	12±8	12±8	28±5	48±8
	50	8±8	20±13	20±6	52±12
	75	20±11	0	24±10	56±12
	100	20±6	16±12	44±12	20±6
	100 + carvão	20±6	8±8	28±5	40±11 (*)
Y <sub>3</sub>	25	12±8	16±7	24±7	48±10
	50	8±8	12±5	32±5	48±14
	75	16±7	4±4	32±14	48±12
	100	16±7	16±10	28±10	40±6
	100 + carvão	28±12	0	28±8	44±10

<sup>1</sup> Valores expressos em média ± erro padrão. (\*) No tratamento correspondente ao meio de MS na força total dos sais (100 %), na presença de carvão ativado, 4 ± 4 % dos explantes contaminaram ao final de 30 dias, sendo descartados do experimento.

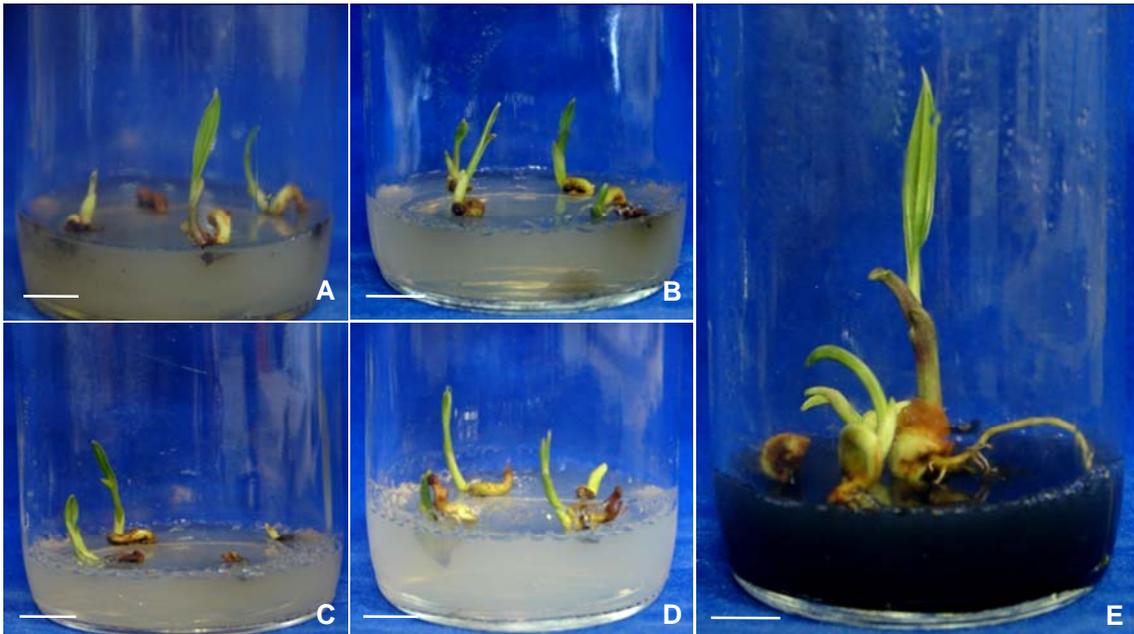
Plântulas oriundas dos tratamentos sem carvão ativado, em ambas as formulações de sais utilizadas, mostraram crescimento lento e atrofiado, e, em sua maioria, não houve emissão de raízes primárias, e quando presentes, estas não se desenvolviam e foram consideradas primórdios de raiz (raízes ≤0,5 cm) (Figuras 1 A, B, C e D e 2 A, B, C e D). De forma geral, nos tratamentos sem carvão ativado, embora tenha sido observada a conversão de plântulas com parte aérea alongada e com folhas expandidas, estas não enraizaram satisfatoriamente.

O efeito da concentração de sais do meio na conversão das plântulas, mostrou-se mais pronunciado para a formulação salina Y<sub>3</sub>, onde o crescimento lento e atrofiado foi observado em todas as concentrações de sais na ausência de carvão, especialmente na menor concentração (Figuras 1A e 2A). Em geral, as plântulas apresentaram pouco alongamento da parte aérea, quando comparado ao meio MS. Adicionalmente, em muitas plântulas não foi observada a expansão das folhas (Figura 2 A, B, C e D).



**Figura 1** - Efeito da formulação salina de MS (Murashige e Skoog, 1962) e concentração de sais em 25 % **(A)**; 50 % **(B)**; 75 % **(C)**; 100 % **(D)**; 100 % + 1,5 g L<sup>-1</sup> carvão ativado **(E)** na conversão de plântulas germinadas *in vitro*, a partir de embriões zigóticos maduros de macaúba (*Acrocomia aculeata*), após 90 dias de cultivo. (Barras = 10 mm).

Por outro lado, nos tratamentos onde utilizou-se o meio de MS, foi observado que as plântulas obtidas em meios com concentrações de 50 e 75 % dos sais, sem carvão, apresentaram crescimento mais vigoroso da parte aérea, quando comparados aos respectivos tratamentos com o meio Y<sub>3</sub>, nos quais mostraram maior alongamento e expansão das folhas. No entanto, ressalta-se que, em ambas as formulações salinas, na ausência de carvão ativado, não foi observado o enraizamento das plântulas *in vitro*, resultando em plântulas com crescimento desbalanceado. Houve a emissão apenas de primórdios de raiz, os quais posteriormente, não se desenvolveram em raízes primárias funcionais (Figuras 1 A, B, C e D e 2 A, B, C e D).



**Figura 2** - Efeito da formulação salina  $Y_3$  (Eeuwens, 1976) e concentração de sais, em 25 % (A); 50 % (B); 75 % (C); 100 % (D); 100% + 1,5 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado (E) na conversão de plântulas germinadas *in vitro*, a partir de embriões zigóticos maduros de macaúba (*Acrocomia aculeata*), após 90 dias de cultivo. (Barras = 10 mm).

### 3.2. Efeito da concentração salina do meio $Y_3$ e do carvão ativado na germinação *in vitro* de embriões zigóticos imaturos

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 3, pode-se observar, após 90 dias de inoculação, ausência de embriões apenas intumescidos, exceto por 13 % em meio com 50 % dos sais acrescido de 2 g L<sup>-1</sup> de carvão. Em geral, os percentuais de oxidação dos embriões foram reduzidos (13 %), mostrando que este fator não foi limitante no presente estudo. Além disso, a oxidação dos explantes ocorreu apenas nas menores concentrações de carvão ativado (1 e 2 g L<sup>-1</sup>).

Foi observado alto índice de germinação dos explantes em todos os tratamentos, indicando elevado potencial morfogênico de embriões zigóticos imaturos (Tabela 3). Além disso, observou-se que esses explantes reagem mais rapidamente em termos de intumescimento, expansão da lâmina cotiledonar e início da emissão da radícula e da plúmula, eventos que culminam no início do processo germinativo. De forma geral, a germinação de embriões imaturos iniciou após uma semana da inoculação, enquanto em

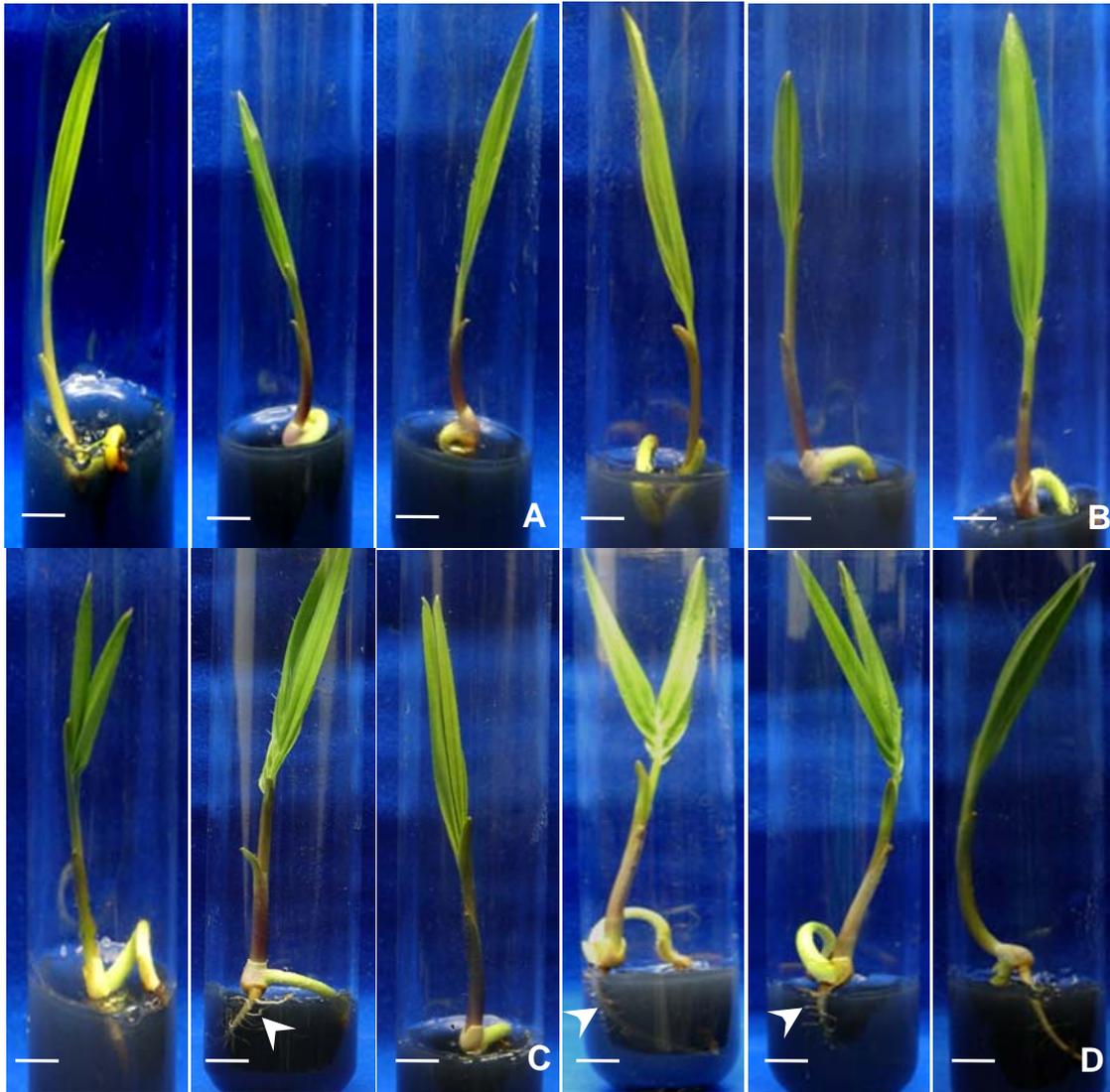
embriões maduros esse processo levou entre 15 e 30 dias, podendo em alguns casos simplesmente não ocorrer, conforme observado no experimento utilizando-se embriões maduros, em função da possível perda de viabilidade destes explantes (dados apresentados anteriormente).

**Tabela 3** – Efeito da concentração de sais  $Y_3$  (Eeuwens, 1976) (25 %; 50 %; 75 %; 100 %) e concentrações de carvão ativado (1; 2 e 3 g L<sup>-1</sup>) nas diferentes respostas morfo-fisiológicas de embriões zigóticos imaturos de macaúba (*Acrocomia aculeata*), após 90 dias da inoculação *in vitro*

Concentração de sais de $Y_3$ (%)	Carvão ativado (g L <sup>-1</sup> )	Respostas morfo-fisiológicas (%) <sup>1</sup>			
		Intumescimento	Oxidação	Sem reação	Germinação
25	1	0	0	0	100
	2	0	0	0	100
	3	0	0	0	100
50	1	0	0	0	100
	2	13±13	13±13	0	74±14
	3	0	0	0	100
75	1	0	13±13	0	87±13
	2	0	13±13	0	87±13
	3	0	0	0	100
100	1	0	13±13	0	87±13
	2	0	0	0	100
	3	0	0	0	100

<sup>1</sup>Valores expressos em média ± erro padrão.

Os percentuais de germinação mostraram-se elevados, variando entre 74 e 100 % nos diferentes tratamentos utilizados (Tabela 3). Em geral, notou-se que o aumento da concentração de sais e de carvão ativado no meio proporcionou melhores respostas em termos de vigor e desenvolvimento das plântulas obtidas. Plântulas oriundas dos tratamentos com maiores concentrações de sais e carvão ativado mostraram maior alongamento das folhas, crescimento e desenvolvimento de raízes primárias e secundárias, culminando na obtenção de plântulas viáveis e aptas à aclimatização (Tabela 3, Figura 3 C, D).



**Figura 3-** Efeito das concentrações salinas  $Y_3$  (Eeuwens, 1976) (25 %; 50 %; 75 %; 100 %) e do carvão ativado (1; 2; 3  $g L^{-1}$ ) na germinação *in vitro* de embriões zigóticos imaturos de macaúba (*Acrocomia aculeata*), após 90 dias da inoculação. **(A)** Plântulas obtidas em meio com 25 % dos sais  $Y_3$ ; **(B)** Plântulas obtidas em meio com 50 % dos sais  $Y_3$ ; **(C)** Plântulas obtidas em meio com 75 % dos sais  $Y_3$ ; **(D)** Plântulas obtidas em meio com 100 % dos sais  $Y_3$ . Em A, B, C e D, da esquerda para a direita: meio acrescido com 1; 2; e 3  $g L^{-1}$  de carvão ativado, respectivamente. As setas indicam detalhe do desenvolvimento acentuado das raízes primárias e secundárias. (Barras = 7,5 mm).

As maiores concentrações de carvão ativado favoreceram, de forma acentuada, o crescimento radicular, onde foi possível lograr, em geral, maiores percentuais de plântulas apresentando raízes primárias pertencentes às classes 2 e 3 (Tabela 4). Em relação à formação de primórdio de raiz, puderam

ser observados, em meio com concentrações de 25 e 100 % dos sais, maiores percentuais de plântulas (38 e 50 %) com essa característica na menor concentração de carvão (1 g L<sup>-1</sup>), enquanto em 50 e 75 % da concentração salina maiores valores (38 e 25 %) foram encontrados na maior concentração desta substância (3 g L<sup>-1</sup>).

**Tabela 4** – Efeito das concentrações salinas Y<sub>3</sub> (Eeuwens, 1976), (25 %; 50 %; 75 %; 100 %) e do carvão ativado (1; 2; 3 g L<sup>-1</sup>) no crescimento da parte aérea, raiz primária e no número médio de folhas de plântulas obtidas da germinação *in vitro* de embriões zigóticos imaturos de macaúba (*Acrocomia aculeata*), após 90 dias de cultivo

Concentração de sais Y <sub>3</sub> (%)	Carvão ativado (g L <sup>-1</sup> )	Crescimento das plântulas <i>in vitro</i>				
		Parte aérea (cm) <sup>1</sup>	Nº Folhas <sup>1</sup>	Raiz primária (%) <sup>2</sup>		
				Classe 1	Classe 2	Classe 3
25	1	2,5	0,5	38±13	63±13	0
	2	1,8	0,5	25±14	63±13	13±13
	3	3,4	0,6	0	63±24	38±24
50	1	4,0	0,8	25±14	50±20	13±13
	2	2,3	0,4	25±14	38±24	13±13
	3	3,3	0,8	38±24	25±14	38±13
75	1	4,8	0,7	13±13	63±24	0
	2	3,6	0,5	13±13	38±24	25±25
	3	4,8	0,9	25±25	25±14	50±20
100	1	5,6	0,9	50±20	0	25±14
	2	5,8	0,8	25±14	38±13	38±13
	3	5,1	0,7	0	50±20	50±20

<sup>1</sup>Valores médios obtidos a partir de duas plântulas por repetição. <sup>2</sup>As plântulas foram agrupadas em classes de comprimento de raiz primária (classe 1=plântulas com primórdio radicular ≤0,5 cm; classe 2=plântulas com raiz entre 0,5 e 1 cm; classe 3=plântulas com raiz >1 cm).<sup>2</sup> Valores expressos em média ± erro padrão.

Em relação ao comprimento da parte aérea, não foram observadas diferenças significativas entre as concentrações de sais e de carvão utilizadas. Porém, notou-se ligeira tendência de aumento do comprimento da parte aérea das plântulas com o aumento da concentração salina do meio, independente das concentrações de carvão utilizadas.

De acordo com a Tabela 4, o mesmo comportamento foi observado em relação ao número médio de folhas, onde as maiores concentrações de sais,

em geral, incrementaram o número de folhas emitidas. Entretanto não houve diferenças significativas entre as concentrações de sais e de carvão avaliadas.

O percentual de plântulas apresentando emissão de raízes secundárias foi em geral elevado, destacando-se que o maior valor (88%) foi observado na menor concentração de sais na adição de 3 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado ao meio. Em meio contendo 50, 75 e 100 % da concentração salina, foi verificado comportamento semelhante, com maiores percentuais (63 %) em meio acrescido da concentração mais alta de carvão ativado (Tabela 5 e Figura 3).

**Tabela 5** – Efeito das concentrações salinas Y<sub>3</sub> (Eeuwens, 1976), (25 %; 50 %; 75 %; 100 %) e do carvão ativado (1; 2; e 3 g L<sup>-1</sup>) na conversão de plântulas viáveis e percentual de plântulas com emissão de raízes secundárias, após 90 dias da inoculação de embriões zigóticos imaturos de macaúba (*Acrocomia aculeata*)

Concentração de sais Y <sub>3</sub> (%)	Carvão ativado (g L <sup>-1</sup> )	Respostas morfo-fisiológicas (%) <sup>1</sup>	
		Plântulas viáveis	Raízes secundárias
25	1	25±14	25±14
	2	38±24	50±20
	3	38±13	88±13
50	1	38±24	50±20
	2	25±14	25±14
	3	50±20	63±24
75	1	50±29	38±13
	2	38±13	50±29
	3	63±24	63±24
100	1	25±14	13±13
	2	50±0	63±24
	3	75±14	63±13

<sup>1</sup>Valores percentuais expressos em média ± erro padrão.

Ao final de 90 dias, observou-se percentuais variáveis de conversão em plântulas viáveis, os quais tenderam a aumentar, à medida que a concentração de sais e carvão do meio foi aumentada (Tabela 5). A utilização dos sais em sua capacidade total, acrescido da maior concentração de carvão ativado promoveu o maior percentual, onde puderam ser observados 75 % de plântulas viáveis. Para as demais concentrações de sais do meio, maiores percentuais

de plântulas viáveis também foram obtidos, quando da presença de concentrações mais altas de carvão ativado.

#### 4. DISCUSSÃO

Durante a realização do experimento, utilizando-se embriões maduros, foi possível observar que, após o período de 30 dias de cultivo, os percentuais de explantes sem reação morfogênica, mostraram-se relativamente elevados em todos os tratamentos. A ausência de respostas encontrada pode ser atribuída ao grau de maturação dos frutos utilizados, devendo-se levar em consideração as condições fisiológicas dos explantes neste período, os quais já haviam completado o ciclo de maturação e com isso podem ter entrado em dormência ou ter perdido a capacidade germinativa e até mesmo a viabilidade. Além disso, possíveis danos ou injúrias físicas causadas nos explantes durante a extração e isolamento podem ter contribuído para a ausência de respostas morfogênicas. Embriões danificados, principalmente na região proximal, correspondente ao eixo embrionário, não apresentaram respostas, quando inoculados nos meios e tenderam a oxidar após período de 30 dias em cultura. Por outro lado, embriões imaturos apresentaram elevados percentuais de germinação e conversão de plântulas viáveis, com formação de parte aérea e raiz na mesma unidade, mostrando crescimento balanceado entre essas estruturas, expansão foliar e desenvolvimento de raízes secundárias.

Os resultados obtidos sugerem que a seleção de explantes com máximo potencial morfogênico, em condições fisiológicas satisfatórias e, portanto, mais responsivos, conforme demonstrado pelos elevados percentuais de germinação de embriões imaturos, é fundamental para a obtenção de plântulas viáveis com desenvolvimento normal, tanto da plúmula, quanto da raiz primária, com maiores chances de sobrevivência durante a fase de aclimatização. Em estudo desenvolvido por Tabai (1992), a utilização de embriões oriundos de frutos maduros e imaturos, como explantes, evidenciou que os fatores que causam dormência em macaúba surgem, possivelmente, durante a maturação do fruto, tendo em vista os elevados índices de germinação obtidos em embriões imaturos. Na cultura de embriões de *Astrocaryum ulei*, Pereira et al. (2006) descreveram que embriões imaturos germinaram mais eficientemente,

se comparados a embriões maduros, sugerindo possível influência do estágio fisiológico dos frutos sobre a taxa de germinação desta palmeira.

No presente estudo, foi constatado em ambas as formulações salinas que a germinação e conversão dos embriões zigóticos maduros foram sensivelmente afetadas pela redução da concentração de sais, quando na ausência de carvão ativado no meio. Este efeito mostrou-se mais expressivo para os tratamentos do meio Y<sub>3</sub> em relação ao MS. As plântulas obtidas no meio Y<sub>3</sub> apresentaram crescimento lento e atrofiado, resultando em plântulas com crescimento desbalanceado, nas quais não foi observado enraizamento satisfatório, após 90 dias de cultivo. Esses resultados apontam para um maior requerimento nutricional de embriões zigóticos da macaúba, e concordam com os obtidos por Melo (2000) na germinação *in vitro* de guarirubeira. Adicionalmente, a incorporação de carvão ativado ao meio foi preponderante, resultando principalmente na conversão em plântulas normais, com desenvolvimento de sistema radicular fasciculado e vigoroso.

Um dos aspectos de maior importância da cultura de embriões reside na determinação correta do meio nutritivo, que estimule o seu desenvolvimento, devendo ser adaptado para cada espécie (Andreoli, 1986; George, 1993). Segundo Monier (1995), a composição do meio nutritivo, para a germinação *in vitro* de embriões zigóticos pode estar relacionada com o estágio de desenvolvimento no qual estes se encontram. Tabai (1992) estabeleceu uma metodologia para a cultura de embriões de macaúba, tendo verificado que alta concentração de nitrogênio causou redução no peso da matéria fresca e seca, quando comparada com o meio de cultura contendo concentrações de nitrogênio menores (50 e 25 % da formulação completa de MS). Foi observado que a ausência de nitrato afetou a germinação dos embriões, e que a presença conjunta de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup> em concentrações correspondentes a 50 e 25 % do meio MS são favoráveis para a germinação e desenvolvimento das plântulas.

Diluições das formulações básicas, em geral têm possibilitado melhor enraizamento das culturas. Altas concentrações de sais tendem a inibir todas as fases do enraizamento, em particular o crescimento das raízes, e, embora existam variações conforme a espécie, diluições da ordem de 25, 50 e 75 % da concentração salina do meio MS são freqüentes nessa fase (Grattapaglia e Machado, 1998). Entretanto, no presente estudo, o desenvolvimento de

sistema radicular fasciculado mostrou ser mais influenciado pela adição de carvão ativado ao meio nutritivo, que pela concentração salina, sendo este efeito dependente da concentração de carvão utilizada. De maneira geral, maiores concentrações de carvão estimularam o crescimento e alongamento das raízes primárias e desenvolvimento de raízes secundárias nas plântulas obtidas.

Em *Acrocomia aculeata*, a conversão de plântulas viáveis mostrou-se de fundamental importância na obtenção de plantas aptas à fase de aclimatização. Particularmente para essa palmeira, resultados preliminares nesta etapa, indicaram que o crescimento balanceado das plântulas, acompanhado da formação de um sistema radicular fasciculado, vigoroso e com crescimento ativo é essencial uma vez que plântulas apresentando primórdio de raiz ou mesmo sem raiz, quando transferidas para substrato não sobrevivem, sugerindo que nem sempre as raízes formadas *in vitro* apresentam características funcionais. Esses resultados concordam com os obtidos por Santana e Teixeira (2004) e Ledo et al. (2007) que por sua vez relatam a dificuldade de enraizamento das plântulas de coqueiro *in vitro*, considerada um entrave que pode comprometer a cultura de embriões zigóticos do coqueiro e a sobrevivência das plântulas na fase de aclimatização, haja vista que podem desenvolver um deficiente sistema radicular ou mesmo nenhuma raiz.

Os meios suplementados com carvão ativado proporcionaram efeitos positivos na conversão de plântulas viáveis ou normais, sendo benéficos principalmente na formação e desenvolvimento das raízes primárias, resultando em plantas vigorosas, coloração verde intensa e crescimento balanceado. A ausência deste componente no meio de cultura, resultou em plântulas sem raízes ou com a emissão apenas de primórdios, os quais não se desenvolveram num período de 90 dias de cultivo (Figuras 1 e 2). Esses resultados corroboram os obtidos por Paranjothy (1984) e Steinmacher (2005), onde embriões zigóticos de *E. guineensis* e *Bactris gasipaes*, respectivamente, desenvolveram-se rapidamente em plântulas, quando cultivados em meio de cultura contendo carvão ativado, sem, no entanto permitir o desenvolvimento de raízes, que foi geralmente ausente em meios destituídos de carvão. Em *Acca sellowiana*, a adição de 1,5 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado ao meio de cultura,

resultou em maior conversão de embriões somáticos em plântulas (Cangahuala-Inocente et al., 2007).

A adição de carvão ativado, principalmente na fase de recultivo, proporcionou incrementos na produção de matéria fresca e na formação de plântulas completas de orquídeas em diferentes meios de cultivo como MS, GB5, Peter's (10-30-20; 2 g L<sup>-1</sup>) e Knudson C modificado (Santos et al., 2005).

O carvão ativado tem sido freqüentemente utilizado na morfogênese *in vitro* de embriões de várias espécies de palmeiras. Segundo Pan e Staden (1998), entre as propriedades do carvão ativado estão a de proporcionar um ambiente de escuro ao meio nutritivo; adsorver substâncias deletérias e ou inibitórias ao desenvolvimento das culturas *in vitro*, as quais são produzidas pelo próprio meio ou pelos explantes, além de adsorver reguladores de crescimento, entre outros compostos orgânicos presentes no meio.

Além disso, o carvão ativado é apontado como um eficiente antioxidante, reduzindo o escurecimento provocado pela síntese de substâncias fenólicas, consideradas inibitórias dos processos de morfogênese *in vitro* (Pan e Staden, 1998). O carvão ativado pode ser benéfico para o enraizamento, haja vista que, fisicamente, este componente simula a condição de escuro no qual as raízes normalmente se desenvolvem melhor. Do ponto de vista químico, o carvão ativado tem efeito diluidor, retendo parte de todos os elementos que compõem o meio nutritivo e adsorvendo compostos tóxicos inibidores do enraizamento (Grattapaglia e Machado, 1998).

## 5. CONCLUSÕES

O meio de MS, reduzido a 50 e 75 % da concentração salina, desprovido de carvão ativado, promoveu melhores resultados em relação ao meio Y<sub>3</sub> no desenvolvimento de parte aérea de plântulas obtidas a partir da germinação *in vitro* de embriões zigóticos maduros de macaúba. No entanto, somente no meio contendo a força total dos sais e na presença de carvão ativado, as plântulas mostraram crescimento balanceado entre parte aérea e sistema radicular, com emissão de raízes primárias e secundárias.

A germinação e conversão de plântulas viáveis de embriões imaturos foi alta, não sendo influenciada pela concentração de sais e de carvão ativado no

meio Y<sub>3</sub>. Plântulas mais vigorosas e com crescimento balanceado puderam ser obtidas nas maiores concentrações de carvão utilizadas, independente da concentração de sais do meio Y<sub>3</sub>. A presença de carvão ativado nos meios mostrou-se imprescindível para a obtenção de plântulas viáveis, com crescimento ativo de raízes primárias, e com maiores chances de sobrevivência na fase de aclimatização.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-KHAYRI, J. M. *In vitro* germination of somatic embryos in date palm: effect of auxin concentration and strength of MS salts. **Current Science**, v. 84, n. 5, p. 680-683, 2003.

ANDREOLI, C. Cultura de embrião. In: SIMPÓSIO DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 1., 1985, Brasília. **Anais...** Brasília: ABCTP/EMBRAPA, 1986, p. 25-28.

ASHBURNER, G. R.; THOMPSON, W. K.; BURCH, J. M. Effect of  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid and sucrose levels on the development of cultured embryos of coconut. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 35, p. 157-163, 1993.

ASSIS, T. F.; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, 1998, v. 1, p. 261-296.

CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; DAL VESCO, L. L.; STEINMACHER, D.; TORRES, A. C.; GUERRA, M. P. Improvements in somatic embryogenesis protocol in Feijoa (*Acca sellowiana* (Berg) Burret): induction, conversion and synthetic seeds. **Scientia Horticulturae**, v. 111, p. 228–234, 2007.

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

GEORGE, E. F. **Plant Propagation by Tissue Culture**, 2<sup>nd</sup> Ed., Edington: Ed. Exegetic Limited, 1993. 574p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, 1998, v. 1, p. 183-260.

HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. Cultura de embriões. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, 1998, v. 1, p. 371-394.

LEDO, A. S.; GOMES, K. K. P.; BARBOZA, S. B. S. C. VIEIRA, G. S. S.; TUPINAMBÁ, E. A.; ARAGÃO, W. M. Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos e aclimação de plântulas de coqueiro-anão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 2, p. 147-154, 2007.

MELO, B. **Cultivo de embrião *in vitro* da guarirobeira (*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.)**. 2000, 117p. Tese (Doutorado em Fitotecnia), Lavras, Minas Gerais: UFLA.

MONIER, M. Culture of zygotic embryos. In: THORPE, T. A. (Ed.). ***In vitro* embryogenesis in plants**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 117-153.

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

NWANKWO, B. A.; KRIKORIAN, A. D. Morphogenetic potential of embryo and seedling-derived callus of *Elaeis guineensis* Jacq. var. *pisifera* Becc. **Annals of Botany**, v. 51, p. 65-76, 1986.

PAN, M. J.; STADEN, J. V. The use of charcoal in *in vitro* culture – a review. **Plant Growth Regulation**, v. 26, p. 155-163, 1998.

PARANJOTHY, K. Oil Palm. In: AMMIRATO, P. V.; EVANS, D. A.; SHARP, W.; YAMADA, Y. **Handbook of plant cell culture**. New York: Macmillan Publishing Company, v. 3, 1984, p. 591-605.

PEREIRA, J. E. S.; MACIEL, T. M. S.; COSTA, F. H. S.; PEREIRA, M. A. A. Germinação *in vitro* de embriões zigóticos de mururu (*Astrocaryum ulei*). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 2, p. 251-256, 2006.

SANTANA, M. C.; TEIXEIRA, S. L.; GOMES, J. E. Efeito da temperatura sobre a germinação *in vitro* de embriões zigóticos de *Cocos nucifera* L. (Arecaceae). **Biologia Geral e Experimental**, v. 3, n. 2, p. 41-46, 2003.

SANTANA, M. C.; TEIXEIRA, S. L. Influência do ácido naftalenoacético no crescimento e enraizamento *in vitro* de plântulas de coqueiro (*Cocos nucifera* L.). **Biologia Geral e Experimental**, v. 5, n. 1, p. 30-33, 2004.

SANTOS, A. F.; VENTURA, G. M.; DIAS, J. M. M.; NOVAIS, R. F.; CECON, P. R.; FRANCHINI, E. A.; LOCATTELI, M. V. Cultivo de *Cattleya walkeriana* em distintos meios de cultivo. **Revista da Associação Brasileira de Horticultura**, v. 23, n. 2, p. 613, 2005.

SAMARTIN, A. A comparative study of effects of nutrient media and cultural conditions on shoot multiplication of *in vitro* cultures of *Camellia japonica* explants. **Journal of Horticultural Science**, v. 64, n. 1, p. 73-79, 1989.

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

SILVA, V. S. **Regeneração *in vitro* de embriões de *Cocos nucifera* L.** 2002, 87p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas), Piracicaba: ESALQ.

STEINMACHER, D. A. **Germinação *in vitro*, criopreservação e embriogênese somática em pupunha.** 2005, 125p. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais), Florianópolis: UFSC.

TABAI, S. A. **Propagação da palmeira macaúba *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Loddiges. através de métodos *in vitro*.** 1992, 121p. Dissertação (Mestrado em Ciências), Piracicaba: ESALQ.

**Influência da temperatura de armazenamento dos frutos e da sacarose na germinação *in vitro* de embriões zigóticos maduros e imaturos de macaúba (*Acrocomia aculeata*)**

**RESUMO**

O presente trabalho teve como objetivos avaliar a influência de temperaturas de armazenamento dos frutos e de concentrações de sacarose na germinação *in vitro* de embriões zigóticos maduros e imaturos de *Acrocomia aculeata*. Os embriões foram inoculados em meio básico de MS, suplementado de 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, vitaminas MS, 2 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado e 6,5 g L<sup>-1</sup> de ágar Merck®, como agente gelificante. No experimento utilizando embriões maduros, variou-se as concentrações de sacarose, presentes no meio em 5; 10; 15; 20; 25 e 30 g L<sup>-1</sup>, em combinação com duas temperaturas de armazenamento dos frutos, por 30 dias, (temperatura ambiente a 27 ± 2 °C, e câmara fria a 12 a 15 °C). No experimento com embriões imaturos, adotou-se a concentração de sacarose de 20 g L<sup>-1</sup>. Os frutos imaturos foram expostos à temperatura de 35 °C por 0, 3, 6, 9 e 12 dias antes da extração dos embriões. Observaram-se melhores índices de germinação nos embriões isolados de frutos mantidos à temperatura ambiente (27 ± 2 °C) e em meio contendo 20 a 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose. Mesmo a germinação tendo sido relativamente elevada nos meios com menores concentrações de sacarose, as plântulas obtidas tenderam à hiperidricidade, principalmente nas concentrações de 5 a 15 g L<sup>-1</sup>. Em relação aos frutos imaturos, a exposição dos frutos à 35 °C não influenciou a germinação dos embriões e o desenvolvimento das plântulas, as quais mostraram-se muito uniformes e vigorosas. Foram obtidos em todos os tratamentos, 100 % de embriões germinados. Durante o período de exposição dos frutos sob temperatura elevada, não houve comprometimento fisiológico dos explantes, favorecendo o processamento dos mesmos, tornando as operações de extração e isolamento dos embriões menos morosa e com maior eficiência.

## 1. INTRODUÇÃO

A macaúba (*Acrocomia aculeata*) é uma palmeira tropical, pertencente à família *Arecaceae*, com ampla distribuição geográfica, ocorrendo na forma de extensos povoamentos naturais por, praticamente, todo território brasileiro. É uma espécie que habita áreas abertas, com alta incidência solar, bem adaptada a solos arenosos e com baixo índice hídrico (Lorenzi, 2006).

A palmeira macaúba apresenta grande potencial para produção de óleo com vasta aplicação nos setores industriais e energéticos, e possui vantagens sobre outras oleaginosas, principalmente em relação à sua maior rentabilidade agrícola e produção total de óleo (Motta et al., 2002). Quanto ao surgimento de empreendimentos industriais mais ousados, estes apontam para uma necessária substituição da atividade extrativa (dos povoamentos naturais) por cultivos racionais, possibilidade que ganha impulso com a busca de alternativas em face da crise energética atual (Silva, 1994).

A macaúba tem sido apontada como a palmeira oleaginosa mais importante comercialmente no contexto brasileiro, dada a possibilidade de seus frutos fornecerem 20 a 30 % de óleo, 5 % de farinha comestível, 35 % de tortas forrageiras e 35 % de combustível de alto poder calórico. Frente a necessidade atual de fontes alternativas de energia, a macaúba é considerada uma das espécies nativas com alta potencialidade de fornecimento de óleo para a produção de biodiesel (Silva, 1994; Nae, 2005).

A propagação ocorre exclusivamente pela via seminífera, que em condições naturais pode levar de um a dois anos para germinar (Lorenzi, 2006). Para Broschat (1994), a germinação de sementes de muitas espécies de palmeiras é, em geral, lenta, irregular e em baixa percentagem, além de perderem a viabilidade rapidamente, quando desidratadas. Esse comportamento caracteriza a natureza recalcitrante das sementes dessas espécies, necessitando de métodos especiais de armazenamento para assegurar a conservação das sementes e impedir que ocorra a perda de viabilidade dos embriões.

Para solucionar os problemas decorrentes das dificuldades de germinação *in situ* e da desuniformidade das plântulas formadas, a propagação *in vitro*, pela cultura de embriões, tornou-se uma ferramenta de grande valia na

produção de mudas dessas espécies. A propagação *in vitro* permite, dentre outras aplicações, a produção de plantas livres de patógenos e acelerar os programas de melhoramento, que em palmeiras são demorados e complexos, em virtude do longo ciclo, hábito de crescimento e ausência de métodos convencionais de propagação vegetativa, já que a produção de perfilhos está restrita a algumas espécies apenas (Ledo et al., 2001).

A cultura de embriões zigóticos é uma técnica de propagação *in vitro*, freqüentemente empregada na propagação de muitas palmeiras, e resultados promissores representados, principalmente, pelo aumento das taxas de germinação, uniformidade das plantas e conversão de plântulas viáveis têm sido relatados para espécies como *Cocos nucifera* (Ashburner et al., 1993; Silva, 2002; Molla et al., 2004; Pech-Aké et al., 2007; Ledo et al., 2007), *Bactris gasipaes* (Steinmacher, 2005; Tzec-Simá et al., 2006), *Euterpe oleracea* (Ledo et al., 2001), *Syagrus oleracea* (Melo et al., 2001), *Mauritia flexuosa* (Spera et al., 2001), *Astrocaryum ulei* (Pereira et al., 2006) e *Hyophorbe lagenicaulis* (Sarasan et al., 2002). Os resultados obtidos, a partir da cultura de embriões em diversas palmeiras, apontam para o potencial desta técnica em viabilizar a produção de mudas nestas espécies em que, naturalmente as dificuldades de germinação têm constituído um entrave ao estabelecimento de plantios de alta produtividade.

Ao contrário do observado para algumas espécies comerciais de palmeiras, por exemplo, *Cocos nucifera* (Silva, 2002; Santana et al., 2003; Ledo et al., 2007) e *Phoenix dactylifera* (Iossi et al., 2003) muito pouco se conhece a respeito das condições adequadas de temperatura e de requerimento energético da macaúba no ambiente *in vitro*, com vistas a obtenção de plântulas vigorosas e com maiores possibilidades de sobrevivência na fase de aclimatização.

Considerando o potencial produtivo e a importância que a macaúba pode desempenhar futuramente, na diversificação da matriz energética e no suprimento de óleo vegetal para produção de biodiesel, estudos desses fatores são fundamentais ao melhor entendimento do processo de germinação. Uma maior eficiência na germinação é essencial para atender a um programa de melhoramento genético e domesticação da espécie. A carência de informações

a esse respeito torna o estabelecimento de plantios comerciais de macaúba inviáveis, justificando a necessidade de maiores estudos.

O presente trabalho teve por objetivos avaliar diferentes temperaturas de armazenamento de frutos e o efeito de concentrações de sacarose na germinação *in vitro* de embriões zigóticos maduros e imaturos de macaúba (*Acrocomia aculeata*).

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos II do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária - BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

### **2.1. Material vegetal**

Foram utilizados como fonte de explantes frutos maduros e imaturos, colhidos de plantas adultas de populações naturais existentes no campus da Central de Ensino e Desenvolvimento Agrário de Florestal – CEDAF, nos municípios de Florestal e Rio Paranaíba, Minas Gerais, nos meses de janeiro a dezembro.

Em relação a utilização de frutos maduros, previamente à extração dos embriões, foi removido o pericarpo dos frutos e em seguida colocados para secar à temperatura ambiente ( $27 \pm 2$  °C), por aproximadamente 30 dias, antes do isolamento dos embriões.

Quanto aos frutos imaturos (coletados 7 meses após a polinização), após a colheita, estes foram armazenados à temperatura ambiente ( $27 \pm 2$  °C) por uma semana antes de serem processados. Em seguida, procedeu-se a remoção do pericarpo e o despulpamento manual para a retirada do mesocarpo, com auxílio de facas.

Os frutos foram quebrados com auxílio de um torno manual para a remoção do endocarpo e liberação da amêndoa, que contém em seu interior o embrião zigótico. As amêndoas, oriundas de frutos maduros, foram previamente desinfestadas em hipoclorito de sódio comercial a 5 % (Super Globo, Brasil) por 20 minutos, seguido de 3 enxágües sucessivos em água

desionizada e autoclavada, e mantidas à temperatura ambiente, por 24 horas, para secagem. Posteriormente, procedeu-se à extração dos embriões. Em função da consistência semi-sólida das amêndoas de frutos imaturos, estas não passaram pela desinfestação prévia descrita para os frutos maduros.

Embriões maduros e imaturos foram isolados com auxílio de bisturis e, em condições assépticas, desinfestados em hipoclorito de sódio comercial (Super Globo, Brasil) a 1 e 0,5 %, respectivamente, acrescido de 3 gotas do surfactante Tween-20<sup>®</sup> para cada 100 mL dessa solução durante 15 minutos, seguidos de 4 enxágües sucessivos em água desionizada e autoclavada.

## **2.2. Meios de cultura e condições de cultivo**

### **2.2.1. Influência de temperaturas de armazenamento dos frutos e de concentrações de sacarose na germinação *in vitro* de embriões zigóticos maduros**

Embriões zigóticos maduros foram inoculados em meio basal MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, vitaminas de MS, 2 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado e 6,5 g L<sup>-1</sup> de ágar Merck<sup>®</sup> como agente gelificante.

Os tratamentos consistiram da combinação de 2 condições de armazenamento dos frutos (temperatura ambiente a 27 ± 2 °C e câmara fria a 12 a 15 °C, no ambiente escuro durante 30 dias) com diferentes concentrações de sacarose do meio nutritivo (5, 10, 15, 20, 25 e 30 g L<sup>-1</sup>).

Inicialmente, os embriões foram cultivados em placas de Petri estéreis de poliestireno de 60 x 15 mm (J. Prolab, Brasil). Os meios de cultura foram vertidos em câmara de fluxo laminar, em alíquotas de 12 a 15 mL. Nesta fase, foram incorporados aos meios 300 mg L<sup>-1</sup> do antibiótico Timentim<sup>®</sup>, previamente filtro-esterilizado, em condições assépticas, após a autoclavagem e resfriamento dos meios nutritivos até uma temperatura de aproximadamente 50 °C.

Após 30 dias de cultivo, os embriões foram transferidos para tubos de ensaio (150 x 25 mm) contendo 10 mL de meio de cultura de mesma composição, vedados com tampas de polietileno e selados com filme de PVC

(Goodyear<sup>®</sup>, Brasil). O pH dos meios foi ajustado para  $5,7 \pm 0,1$ , seguido de autoclavagem ( $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 1,1 atm de pressão, 20 minutos).

As culturas foram mantidas em estufa incubadora BOD (Diurnal Growth Chamber, Forma Scientific, USA), à temperatura de  $27 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , na ausência de luz, durante 30 dias e, a seguir, transferidas para sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro com irradiância de  $36\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$  provida por duas lâmpadas fluorescentes (Luz do Dia Especial, 20 W, Osram<sup>®</sup>, Brasil).

### **2.2.2. Influência do tempo de armazenamento dos frutos à $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ na germinação *in vitro* de embriões zigóticos imaturos**

Embriões zigóticos imaturos, com aproximadamente 7 meses de idade, foram cultivados em meio básico de MS, acrescido de vitaminas de MS,  $100\text{ mg L}^{-1}$  de mio-inositol,  $20\text{ g L}^{-1}$  de sacarose,  $2\text{ g L}^{-1}$  de carvão ativado e  $6,5\text{ g L}^{-1}$  de ágar Merck<sup>®</sup> como agente gelificante.

Previamente à realização do experimento, os frutos foram armazenados em estufa incubadora BOD (Diurnal Growth Chamber, Forma Scientific, USA), à temperatura de  $35 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , na ausência de luz, durante diferentes períodos de permanência, (0, 3, 6, 9, 12 dias). Em seguida foram retirados, descascados e despolidos, sendo mantidos em estufa incubadora BOD a  $27 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , por 24 horas, para secagem. Após esse período, os frutos foram quebrados, com auxílio de um torno, e os embriões isolados e desinfestados assepticamente, conforme descrito anteriormente. No primeiro tratamento, após a colheita, os frutos permaneceram por uma semana à temperatura ambiente, ou seja, 0 dia a  $35 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  e, em seguida, foram utilizados.

Inicialmente, os embriões foram cultivados em placas de Petri estéreis de poliestireno de 60 x 15 mm (J. Prolab, Brasil). Os meios de cultura foram vertidos em câmara de fluxo laminar, em alíquotas de 12 a 15 mL. Nesta fase, foram incorporados aos meios  $300\text{ mg L}^{-1}$  do antibiótico Timentim<sup>®</sup>, previamente filtro-esterilizado, em condições assépticas, após a autoclavagem e resfriamento dos meios nutritivos até uma temperatura de aproximadamente  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Após 30 dias de cultivo, os embriões foram transferidos para tubos de ensaio (150 x 25 mm) contendo 10 mL de meio de cultura de mesma composição, vedados com tampas de polietileno e selados com filme de PVC (Goodyear<sup>®</sup>, Brasil). O pH dos meios foi ajustado para  $5,7 \pm 0,1$ , seguido de autoclavagem (121 °C, 1,1 atm de pressão, 20 minutos).

As culturas foram mantidas em estufa incubadora BOD (Diurnal Growth Chamber, Forma Scientific, USA), à temperatura de  $27 \pm 2$  °C, na ausência de luz, durante 30 dias e, a seguir, transferidas para sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro com irradiância de  $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  provida por duas lâmpadas fluorescentes (Luz do Dia Especial, 20 W, Osram<sup>®</sup>, Brasil).

### **2.3. Condução e avaliações experimentais**

#### **2.3.1. Influência de temperaturas de armazenamento dos frutos e de concentrações de sacarose na germinação *in vitro* de embriões zigóticos maduros**

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 6. Os tratamentos consistiram da combinação de 2 condições de armazenamento dos frutos após a colheita (frutos armazenados à sombra, em temperatura ambiente ( $27 \pm 2$  °C) e em câmara fria a 12 a 15 °C durante 30 dias) com diferentes concentrações de sacarose no meio nutritivo (5, 10, 15, 20, 25 e 30 g L<sup>-1</sup>). Foram utilizadas 5 repetições por tratamento com 5 explantes por repetição.

Aos 30 e aos 90 dias, foram realizadas avaliações, quanto ao percentual de explantes germinados; intumescidos; oxidação; explantes sem reação e plantas hiperídricas. Após 90 dias, avaliou-se também o percentual de plantas viáveis ou normais e de plantas que emitiram raízes secundárias ou apenas primórdio de raiz (raízes  $\leq 0,5$  cm).

Aos 30 dias da inoculação, após a transferência dos embriões mantidos em placas de Petri para tubos de ensaio, o experimento passou a ter 4 repetições, constituídas por 3 tubos de ensaio, contendo 1 plântula por tubo.

Consideraram-se germinados todos os embriões que emitiram apenas a raiz primária, apenas a parte aérea (ou plúmula) ou parte aérea e raiz. O critério adotado para descrição de plântulas viáveis ou normais, além do desenvolvimento da plúmula e da raiz primária na mesma estrutura, foi a expansão foliar e, esporadicamente, o desenvolvimento de raízes secundárias. Como plântulas anormais foram consideradas aquelas com aspecto hiperídrico e cujo crescimento da plúmula e da raiz primária mostrou-se atrofiado, e ausência de expansão foliar.

### **2.3.2. Influência do tempo de armazenamento dos frutos à 35 °C na germinação *in vitro* de embriões zigóticos imaturos**

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, com 5 tratamentos constituídos de períodos de armazenamento dos frutos (0, 3, 6, 9 e 12 dias) à temperatura de  $35 \pm 2$  °C. Foram utilizadas 4 repetições, com 10 embriões por repetição.

Inicialmente, cada placa de Petri foi considerada uma repetição e, após a transferência dos embriões para tubos de ensaio, cada repetição foi constituída por 10 tubos de ensaio contendo 1 embrião por tubo.

Foram realizadas avaliações a cada 30 dias, quanto aos percentuais de intumescimento dos explantes; germinação; oxidação e frequência de explantes sem respostas morfológicas até os 90 dias de cultivo, quando, então, as plântulas obtidas passaram para a fase de aclimatização.

Após 90 dias, foram avaliados, além das características já descritas anteriormente, o percentual total de plântulas viáveis, o percentual de plântulas que apresentaram emissão de raízes secundárias, o comprimento da parte aérea (plúmula) e da raiz primária e o número médio de folhas por plântula. Para o comprimento da raiz, as plântulas foram avaliadas sem que fossem retiradas dos tubos de ensaio, em condições assépticas, e para tanto, foram agrupadas em classes de comprimento da raiz, caracterizadas da seguinte forma: classe 1 (raiz  $\leq 0,5$  cm, considerada apenas um primórdio radicular); classe 2 (raiz apresentando 0,5 – 1,0 cm de comprimento) e classe 3 (raiz  $> 1,0$  cm).

Consideraram-se germinados todos os embriões que emitiram apenas a raiz primária, apenas a parte aérea (ou plúmula) ou parte aérea e raiz. O critério adotado para descrição de plântulas viáveis ou normais, além do desenvolvimento da plúmula e da raiz primária na mesma estrutura, foi a expansão foliar e, esporadicamente, o desenvolvimento de raízes secundárias. Como plântulas anormais foram consideradas aquelas cujo crescimento da plúmula e da raiz primária mostrou-se atrofiado, e quando observada ausência de expansão foliar.

Após 90 dias de cultivo, plântulas viáveis, que apresentaram crescimento e desenvolvimento de parte aérea e raiz na mesma unidade, e com expansão foliar, foram submetidas à fase de aclimatização *ex vitro*, sendo transferidas para potes plásticos contendo mistura do substrato comercial Plantmax Café® e fibra de coco (1:1, em volume) e mantidas em casa de vegetação. Os potes foram cobertos com sacolas de polietileno, para evitar a desidratação excessiva das plantas. Nessa fase, as plântulas foram irrigadas de acordo com a necessidade, aproximadamente a cada dois dias. Mensalmente, foi realizada adubação das plântulas com solução nutritiva Ouro Verde® (N:P:K na proporção 15:15:20). Após 3 semanas de permanência em casa de vegetação, as sacolas plásticas foram cortadas em suas extremidades e completamente removidas após 5 semanas.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Influência de temperaturas de armazenamento dos frutos e de concentrações de sacarose na germinação *in vitro* de embriões zigóticos maduros

De maneira geral, após 7 dias de inoculação, observou-se o intumescimento dos embriões, considerado uma resposta inicial do processo germinativo, e o desenvolvimento da lâmina cotiledonar. Após 30 dias, foi possível observar o crescimento e desenvolvimento da plúmula e da raiz primária. Aos 90 dias de cultivo, plântulas completas foram obtidas (Figura 1).

Após 30 dias, poucos embriões apresentaram apenas intumescimento, ressaltando-se que os percentuais tenderam a diminuir com o aumento das

concentrações de sacarose (Tabela 1). Para os frutos armazenados em baixa temperatura, obteve-se 48 % de intumescimento em 5 g L<sup>-1</sup> de sacarose, enquanto em 10, 15 e 20 g L<sup>-1</sup> foram observados apenas 20, 16 e 12 % de intumescimento, respectivamente. Comportamento semelhante foi constatado à temperatura ambiente, onde os percentuais foram ligeiramente inferiores e observados apenas em 5, 10 e 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose (4, 8 e 4 % de intumescimento, respectivamente).

**Tabela 1** – Efeito das temperaturas de armazenamento dos frutos (temperatura ambiente a 27 ± 2 °C e câmara fria, a 12 a 15 °C) e de concentrações de sacarose (5, 10, 15, 20, 25 e 30 g L<sup>-1</sup>) nas diferentes respostas morfo-fisiológicas de embriões zigóticos maduros de macaúba (*Acrocomia aculeata*), após 30 dias da inoculação *in vitro*

Armazenamento dos frutos	Sacarose (g L <sup>-1</sup> )	Respostas morfo-fisiológicas (%) <sup>1</sup>			
		Intumescimento	Oxidação	Sem reação	Germinação
Temperatura ambiente	5	4±4	0	0	96±4
	10	8±8	0	0	92±8
	15	0	0	0	100
	20	4±4	0	0	96±4
	25	0	0	4±4	96±4
	30	0	0	4±4	96±4
Câmara fria	5	48±5	0	12±5	40±9
	10	20±6	0	4±4	76±10
	15	16±10	0	8±8	76±10
	20	12±8	0	0	88±8
	25	0	0	8±5	72±19 (*)
	30	0	4±4	8±5	88±5

<sup>1</sup> Valores expressos em média ± erro padrão. (\*) No tratamento em que os frutos foram armazenados em câmara fria, em meio contendo 25 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 20 ± 20% dos explantes contaminaram ao final de 30 dias, sendo descartados do experimento.

Quanto à oxidação dos explantes, um reduzido percentual (4 %) foi observado somente na concentração de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, quando os embriões procediam de frutos mantidos em câmara fria.

De maneira geral, baixos percentuais de embriões zigóticos não mostraram reação após 30 dias cultivo, variando entre 4 a 12 % apenas, entre os diferentes tratamentos.

Em relação à percentagem de germinação, após 30 dias de cultivo *in vitro*, observou-se variação entre os tratamentos, porém, de forma geral, foram considerados elevados (40 a 100 %). Para a condição de armazenamento dos frutos após a colheita, a temperatura ambiente, independentemente da concentração de sacarose no meio apresentou melhores resultados, se comparados àqueles obtidos com os frutos estocados em câmara fria, sob temperatura de 12 a 15 °C, (Tabela 1).

Maiores percentagens de germinação foram obtidas nos tratamentos onde os frutos permaneceram à temperatura ambiente, em todas as concentrações de sacarose utilizadas, com valores variando de 92 % a 100 %. Por outro lado, para os frutos mantidos em câmara fria, foram observados percentuais relativamente inferiores aos obtidos à temperatura ambiente, com valores máximos de germinação (88 %) nas concentrações de 20 e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, respectivamente. Nesta condição, o menor percentual (40 %) foi observado na combinação com 5 g L<sup>-1</sup> de sacarose, com tendência de aumento gradativo em função do aumento da concentração de sacarose no meio, exceto para a concentração de 25 g L<sup>-1</sup> desse carboidrato, onde foi obtido 72 % de germinação (Tabela 1).

Apesar dos elevados índices de germinação obtidos, independente dos tratamentos, é importante salientar o efeito da sacarose sobre a conversão e o desenvolvimento de plântulas anormais. Após 90 dias de cultivo, observou-se elevados percentuais de plantas anormais, com aspecto de hiperidricidade, que mesmo apresentando desenvolvimento da plúmula e raiz primária na mesma estrutura embrionária, demonstraram tais distúrbios fisiológicos. Nas concentrações mais baixas de sacarose (5; 10; e 15 g L<sup>-1</sup>), esse efeito foi mais pronunciado, sendo nulo nas demais concentrações para os frutos sob temperatura ambiente, e reduzindo-se gradativamente, de acordo com o aumento da concentração do carboidrato, quando os frutos permaneceram sob baixa temperatura, em câmara fria (Tabela 2 e Figura 1 A, B e C). Por outro lado, nas concentrações mais elevadas de sacarose, observou-se ocorrência de plantas hiperídricas somente em 20 e 25 g L<sup>-1</sup> para frutos armazenados em câmara fria, porém com valores inferiores às demais concentrações. Em geral, nas maiores concentrações de sacarose (20, 25; e 30 g L<sup>-1</sup>) não se observou diferenças no desenvolvimento, onde as plântulas oriundas destes tratamentos

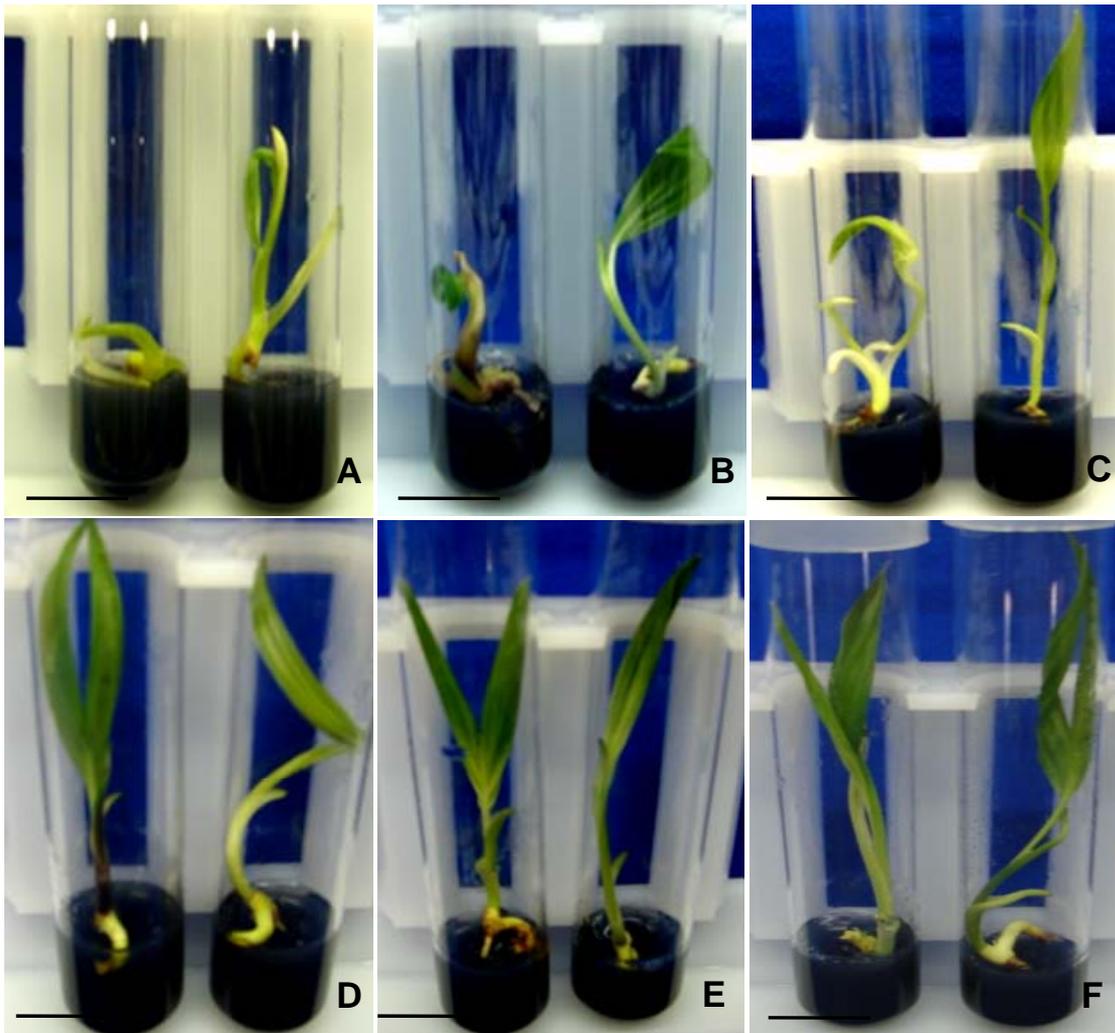
demonstraram-se vigorosas e aptas à fase de aclimatização, independente da condição de armazenamento dos frutos (Figura 1 D, E e F).

**Tabela 2** - Efeito das temperaturas de armazenamento dos frutos (temperatura ambiente a  $27 \pm 2$  °C e câmara fria, a 12 a 15 °C) e de concentrações de sacarose (5, 10, 15, 20, 25 e 30 g L<sup>-1</sup>) na conversão de plântulas com emissão de raízes secundárias, apenas primórdio de raiz, plântulas hiperídricas e de plântulas viáveis de macaúba (*Acrocomia aculeata*), após 90 dias da inoculação

Armazenamento dos frutos	Sacarose (g L <sup>-1</sup> )	Respostas morfo-fisiológicas (%) <sup>1</sup>			
		Raízes secundárias	Plântulas hiperídricas	Plântulas com primórdio	Plântulas viáveis
Temperatura ambiente	5	0	42±8	75±16	0
	10	0	67±24	67±14	0
	15	0	42±8	33±14	33±14
	20	25±8	0	25±8	42±16
	25	25±16	0	17±10	8±8
	30	50±22	0	0	25±8
Câmara fria	5	0	83±10	8±8	0
	10	0	25±8	42±16	8±8
	15	0	17±10	58±16	17±10
	20	8±8	8±8	17±10	33±14
	25	33±14	17±10	0	58±8
	30	50±17	0	0	58±8

<sup>1</sup>Valores médios obtidos a partir de três plântulas por repetição, expressos em média ± erro padrão.

Em relação a percentagem de plântulas viáveis ou normais, para os frutos mantidos em câmara fria, houve tendência de aumento proporcional ao aumento das concentrações de sacarose no meio (Tabela 2). Contudo, em baixas concentrações (10 e 15 g L<sup>-1</sup>) foram obtidos apenas 8 e 17 % de plântulas viáveis, enquanto na menor concentração (5 g L<sup>-1</sup>) não se constatou a formação de plântula normal. Quanto aos frutos armazenados à temperatura ambiente, observou-se melhores resultados em meio contendo 15, 20 e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose (33, 42 e 25 %, respectivamente). Comportamento semelhante foi observado nas menores concentrações do carboidrato, sendo nula a conversão de plântulas viáveis nestes tratamentos.



**Figura 1** – Efeito das temperaturas de armazenamento dos frutos (temperatura ambiente a  $27 \pm 2$  °C e câmara fria, a 12 a 15 °C) e de concentrações de sacarose (5, 10, 15, 20, 25, 30 g L<sup>-1</sup>) na germinação *in vitro* de embriões zigóticos maduros de macaúba (*Acrocomia aculeata*). Plântulas obtidas após 90 dias da inoculação. **A)** 5 g L<sup>-1</sup> de sacarose; **B)** 10 g L<sup>-1</sup> de sacarose; **C)** 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose; **D)** 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose; **E)** 25 g L<sup>-1</sup> de sacarose; **F)** 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose. Em A, B, C, D e F, à esquerda, plântulas obtidas de frutos armazenados à temperatura ambiente e à direita de frutos armazenados em câmara fria, a 12 a 15 °C. (Barras = 20 mm).

A conversão de plântulas com emissão de raízes secundárias foi observada somente nas concentrações mais elevadas de sacarose, sendo obtidos maiores percentuais (50 %), quando da adição de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose ao meio nutritivo, em ambas as temperaturas de armazenamento dos frutos (Tabela 2).

Na conversão das plântulas, altos percentuais de emissão de primórdio radicular foram obtidos após 90 dias de cultivo *in vitro*, não sendo observado crescimento aparente e posterior desenvolvimento de raiz primária, refletindo num crescimento desbalanceado das plântulas. Maiores percentuais de plântulas com emissão de primórdio foram obtidos nas concentrações mais baixas de sacarose, em ambas as temperaturas de armazenamento dos frutos (Tabela 2).

### **3.2. Influência do tempo de armazenamento dos frutos à 35 °C na germinação *in vitro* de embriões zigóticos imaturos**

Os primeiros sinais de germinação dos embriões de macaúba foram constatados a partir da primeira semana de cultivo, onde observou-se acentuado intumescimento dos embriões, sobretudo na região correspondente ao eixo embrionário. Passados 30 dias, ocorreu a emissão da radícula e da plúmula.

O armazenamento dos frutos à temperatura de 35 °C, por diferentes períodos, não influenciou as características avaliadas, embora em relação ao processamento dos frutos, as operações tornaram-se facilitadas à medida que permaneceram por mais tempo nessa condição. Apesar do alto potencial morfogênico observado em embriões imaturos, a casca (pericarpo) dos frutos, nesse estágio de desenvolvimento, não se desprende facilmente, e o despulpamento, realizado manualmente, faz das práticas executadas durante o processamento pouco operacionais e com baixo rendimento. Por outro lado, o maior período de armazenamento dos frutos a alta temperatura (12 dias) proporcionou certo escurecimento nas amêndoas, especialmente ao redor da cavidade de inserção do embrião. É provável que a exposição dos frutos a essa condição, por tempo superior a 12 dias, possa ocasionar deterioração dos frutos, seguida da perda de viabilidade e do potencial morfogênico dos embriões. Vale ressaltar que, independente dessa observação, os embriões não chegaram a apresentar comprometimento fisiológico, fato constatado pelo índice de germinação obtido nesse tratamento (100 % dos embriões germinaram) (Tabela 3).

**Tabela 3** - Efeito do tempo de armazenamento dos frutos à temperatura de  $35 \pm 2$  °C (0, 3, 6, 9 e 12 dias) na germinação *in vitro* de embriões zigóticos imaturos de macaúba (*Acrocomia aculeata*), conversão de plântulas viáveis, e percentual de plântulas com emissão de raízes secundárias, após 90 dias de cultivo

Frutos armazenados à 35 °C (dias)	Respostas morfo-fisiológicas (%) <sup>1</sup>		
	Germinação	Plântulas viáveis	Raízes secundárias
0	100	75±10,4	20±9,1
3	100	82,5±2,5	22,5±4,8
6	100	70±9,1	10±4,1
9	100	82,5±2,5	12,5±4,8
12	100	82,5±6,3	25±6,5

<sup>1</sup>Valores médios obtidos a partir de dez plântulas por repetição, expressos em média ± erro padrão.

Tão logo se separa os cachos imaturos da planta matriz no campo, se inicia uma natural desidratação dos embriões da macaúba. Isso significa dizer que a operacionalização das atividades relativas ao processamento dos frutos, após a colheita, deve se dar no mais curto período de tempo possível, para, desse modo, beneficiar as etapas posteriores de extração e isolamento dos embriões, garantindo a qualidade fisiológica dos explantes. Acrescente-se a isso, que para serem quebrados no torno, sem provocar danos ao embrião, os frutos devem ser despoldados, viabilizando essa operação. A maior qualidade fisiológica dos embriões reflete em maior viabilidade e capacidade de germinação, conseqüentemente. Embriões danificados durante a quebra do fruto e extração dos explantes, em geral, não germinam e tendem a oxidar por completo (dados não apresentados).

Nos frutos que permaneceram por mais tempo à 35 °C (6, 9 e 12 dias), foi observado que a retirada do pericarpo e mesocarpo foi bem mais rápida e pouco morosa, visto que sofreram maior desidratação. Contudo, os embriões extraídos estavam em perfeitas condições, sem apresentar sinais de desidratação.

A germinação dos embriões foi bastante uniforme, e ao final de 90 dias de cultivo, em todos os tratamentos, observou-se 100 % de germinação. A conversão de plântulas viáveis foi elevada e variou entre 70 e 82,5 % entre os diferentes tempos de permanência dos frutos à alta temperatura. Em relação à formação de raízes secundárias, o menor percentual (10 %) foi observado,

quando os frutos permaneceram por 6 dias à 35 °C e o maior (25 %), em 12 dias nessa condição (Tabela 3). As plântulas obtidas apresentaram-se muito vigorosas, não sendo possível observar diferenças, quanto ao seu desenvolvimento (Figura 2).

O crescimento da parte aérea variou de 8,0 a 9,6 cm, não sendo observada diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 4).

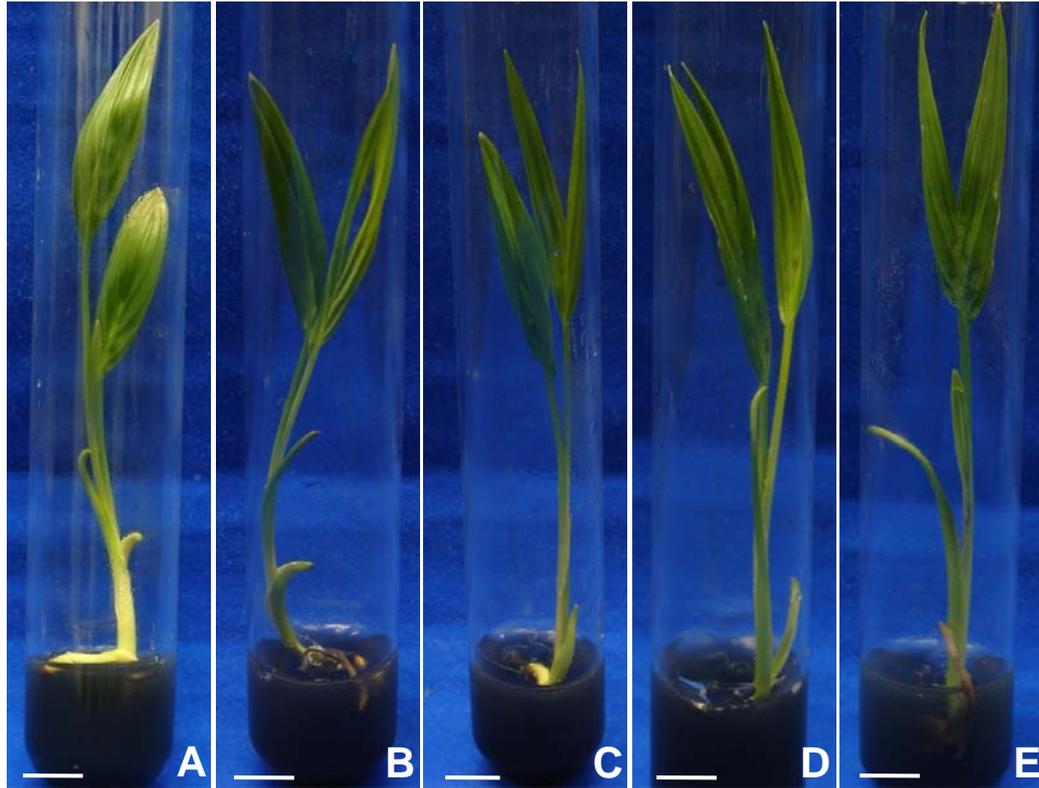
**Tabela 4** - Efeito do tempo de armazenamento dos frutos à temperatura de 35 ± 2 °C (0, 3, 6, 9 e 12 dias) no crescimento da parte aérea, raiz primária e no número médio de folhas de plântulas obtidas da germinação *in vitro* de embriões zigóticos imaturos de macaúba (*Acrocomia aculeata*), após 90 dias de cultivo

Frutos armazenados à 35 °C (dias)	Crescimento das plântulas <i>in vitro</i>				
	Parte aérea (cm) <sup>1</sup>	Nº de folhas <sup>1</sup>	Raiz primária (%) <sup>2</sup>		
			Classe 1	Classe 2	Classe 3
0	9,6	1,5	22,5±8,5	47,5±7,5	30±4,1
3	8,9	1,5	5±5	75±15,5	20±10,8
6	9,2	1,5	22,5±4,8	72,5±8,5	5±5
9	8,3	1,7	12,5±2,5	67,5±10,3	20±9,1
12	8,0	1,5	12,5±6,3	55±5	32,5±7,5

<sup>1</sup>Valores médios obtidos a partir de dez plântulas por repetição. <sup>2</sup>As plântulas foram agrupadas em classes de comprimento de raiz primária (classe 1=plântulas com primórdio radicular ≤0,5 cm; classe 2=plântulas com raiz entre 0,5 e 1 cm; classe 3=plântulas com raiz >1 cm). Valores percentuais expressos em média ± erro padrão.

Comportamento semelhante também foi observado para o número médio de folhas por plântula, em que obteve-se valores entre 1,5 a 1,7 entre os tratamentos.

Houve maior predominância de raízes na classe 2 de comprimento (47,5 a 75 %), mostrando que o armazenamento dos frutos à temperatura de 35 °C não prejudicou o crescimento das raízes primárias. Mesmo no tratamento de 12 dias, observou-se que 55 % das plântulas apresentaram raízes entre 0,5 e 1 cm de comprimento. As classes 1 e 3 apresentaram menores percentuais, porém, de forma geral, observou-se valores ligeiramente superiores na classe 3 em relação à 1, esta última representando a presença de apenas primórdio de raiz.



**Figura 2** - Efeito do tempo de armazenamento dos frutos à temperatura de  $35 \pm 2$  °C, na germinação *in vitro* de embriões zigóticos imaturos de macaúba (*Acrocomia aculeata*), após 90 dias de cultivo. **(A)** Plântulas obtidas de frutos expostos à 35 °C por 0 dia; **(B)** 3 dias; **(C)** 6 dias; **(D)** 9 dias; **(E)** 12 dias. (Barras = 10 mm).

#### 4. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no experimento com embriões maduros de macaúba, variando-se a concentração de sacarose do meio nutritivo, apontam para um requerimento energético condizente com os relatados para o cultivo de embriões maduros de espécies como *Vigna unguiculata* e *V. vexillata* (Pellegrinesch et al., 1997) e *Olea europaeae* (García et al., 2002), considerando o grau de maturação e a condição fisiológica destes explantes. Maiores concentrações de sacarose no meio (20 a 30 g L<sup>-1</sup>) resultaram num melhor desenvolvimento das plântulas, após 90 dias em cultura, independente da condição em que os frutos foram armazenados.

Níveis crescentes de sacarose no meio não influenciaram a germinação dos embriões, com exceção dos frutos mantidos em câmara fria. À temperatura ambiente, puderam ser observados altos percentuais de germinação, mesmo

em concentrações mais baixas de sacarose, no entanto, muitas plântulas obtidas mostraram-se hiperídricas, ao final de 90 dias de cultivo (Figura 1 A, B, C). Segundo Hu e Ferreira (1998), embriões excisados no estágio maduro ou próximos a este são considerados praticamente autotróficos, podendo germinar e crescer em meios inorgânicos. Segundo esses autores, em geral, dependendo da espécie, não há necessidade de suplementação com uma fonte de energia. Porém, quanto mais jovem for o embrião, mais complexa será a exigência nutricional que permita o seu desenvolvimento.

Em baixa temperatura, os percentuais de germinação dos embriões nas menores concentrações de sacarose foram relativamente inferiores, se comparados aos observados à temperatura ambiente. É possível que esta condição de armazenamento, associada à menor disponibilidade de carboidrato, tenha causado dormência ou até mesmo perda de viabilidade dos embriões, o que é confirmado pelos menores percentuais de germinação, especialmente na concentração mais baixa de sacarose. Acrescente-se a isso que, de forma similar à observada para os frutos sob temperatura ambiente, as plântulas obtidas nas menores concentrações de sacarose também tenderam à hiperidricidade.

Os resultados observados no presente trabalho, quanto a conversão de plântulas hiperídricas, em meios contendo menores concentrações de sacarose, sugerem que a germinação *in vitro* de embriões maduros pode até ocorrer em meios de cultura com baixa concentração de carboidratos, conforme é descrito para *Olea europae* (García et al., 2002) e *Astrocaryum ulei* (Pereira et al., 2006), entretanto, de forma similar à observada nestas espécies, não é suficiente para sustentar o desenvolvimento normal das plântulas. Normalmente, a sacarose está presente no meio de cultura em concentrações que variam de 2 a 4 % (Ferreira et al. (2002). Variações nas concentrações deste carboidrato no meio de cultivo afetam as condições osmóticas e o metabolismo da planta *in vitro*, influenciando o crescimento e o metabolismo das culturas (Pereira et al., 2006).

A hiperidricidade das plântulas obtidas em meios com menores concentrações de sacarose (5; 10 e 15 g L<sup>-1</sup>) pode ser atribuída ao aumento do potencial osmótico dos meios nesta condição, pela menor concentração de solutos, o que fisiologicamente, pode ter induzido nas plântulas uma rápida

absorção de sais do meio, culminando em tal distúrbio. O potencial osmótico do meio está relacionado à concentração de solutos, especialmente macronutrientes e carboidratos (George, 1993). A concentração osmótica do meio de cultura exerce influência na taxa de divisão celular e, conseqüentemente, no sucesso da morfogênese em células e tecidos cultivados. Segundo este autor, maiores concentrações de sacarose são necessárias em meios de cultura mais diluídos em relação à formulação salina, considerando a grande contribuição que os carboidratos desempenham na composição do potencial osmótico do meio.

Na conversão das plântulas obtidas a partir da germinação de embriões maduros de macaúba foram observados altos percentuais de plantas com emissão de primórdios de raiz, os quais não se desenvolveram posteriormente. O enraizamento insatisfatório das plântulas *in vitro* tem como principal conseqüência baixos índices de sobrevivência das mesmas, quando transferidas para substrato, durante a fase de aclimatização, e tem constituído sério entrave à cultura de embriões zigóticos desta espécie. A dificuldade de enraizamento das plântulas também tem sido apontada como uma limitação à germinação *in vitro* de embriões zigóticos de palmeiras como *Cocos nucifera* (Santana e Teixeira, 2004; Ledo et al., 2007) e *Syagrus oleraceae* (Melo et al., 2001).

O armazenamento dos frutos maduros de macaúba em condição de baixa temperatura, em câmara fria, acarretou em menores taxas de germinação dos embriões. Araújo et al. (1994) também observaram um efeito prejudicial do armazenamento de sementes de *Euterpe oleracea* em câmara fria a 3 a 4 °C, causando drástica redução no poder germinativo. Estas sementes tiveram um comportamento próprio de sementes recalcitrantes, não tolerando o dessecamento e/ou armazenamento em baixa temperatura, além de possuírem curta longevidade.

Sementes de *Euterpe edulis* mantiveram alto poder germinativo, quando conservadas por até oito meses, à 15 °C. O processo de deterioração das sementes foi mais acentuado na temperatura de 5 °C, atribuído ao efeito deletério provocado por baixas temperaturas em sementes recalcitrantes (Andrade et al., 1996). Segundo estes autores, sementes de muitas espécies tropicais podem sofrer danos letais, quando armazenadas em baixas

temperaturas (5, 10 e 15°C), principalmente alteração na permeabilidade das membranas plasmáticas. Para Andrade e Pereira (1997), a principal consequência da deterioração de sementes parece ser a redução dos valores de germinação, salientando, também, que esse processo freqüentemente é acompanhado do aumento na proporção de plântulas anormais, em geral de tamanho reduzido e crescimento desigual entre as partes; e pela redução na velocidade de germinação e emergência das plântulas.

Sementes de *Mauritia flexuosa* suportaram o armazenamento sob baixa temperatura (20 °C) por um período de quatro meses e meio, onde mantiveram a viabilidade e o potencial morfogênico dos embriões cultivados *in vitro* (Spera et al., 2001).

Segundo Negreiros et al. (2004), na maioria das espécies de palmeiras, a viabilidade durante o armazenamento, e a tolerância à desidratação diferem entre as espécies. Sementes de palmeiras são, de forma geral, consideradas recalcitrantes, sendo pouco tolerantes à dessecação e muito sensíveis a baixas temperaturas, constituindo sério obstáculo para a conservação de germoplasma dessas espécies, pela dificuldade de armazenamento (Villela e Peres, 2004). Segundo esses autores, a longevidade da semente é marcadamente influenciada pelas condições de armazenamento, sobretudo pelo teor de água e pela temperatura.

A cultura de embriões imaturos, extraídos de frutos submetidos à temperatura de 35 °C, por diferentes períodos, não afetou o poder germinativo dos embriões e o desenvolvimento das plântulas obtidas, as quais, após 90 dias de cultivo, mostraram-se muito uniformes e vigorosas. Broschat (1994) também observou que sementes de muitas espécies de palmeiras germinaram melhor na faixa de 30 a 35 °C. No entanto, Lorenzi et al. (1996) consideram que para a germinação de várias espécies de palmeiras, são favoráveis as temperaturas entre 24 e 28 °C.

Resultados semelhantes foram obtidos por Carpenter (1988), ao observar melhor taxa de germinação de sementes das palmeiras *Acoelorrhapha wrightii*, *Coccothrinax argentata*, *Sabal etonia* e *Thrinax morrisii* à temperatura de 35 °C. Temperaturas de 5 a 10 °C acima ou abaixo de 35 °C freqüentemente causaram atraso e redução na germinação e a tornaram irregular e desuniforme.

Santana et al. (2003) avaliaram o efeito de diferentes temperaturas na germinação *in vitro* de *Cocos nucifera*. Esses autores observaram maior percentual de germinação e baixo número de embriões deformados sob 34 °C, o que sugere haver um ótimo de temperatura, no qual o embrião é capaz de completar o seu amadurecimento.

Para macaúba, a exposição dos frutos imaturos à temperatura de 35 °C, além de proporcionar uma germinação mais rápida e uniforme, teve maior reflexo no processamento dos frutos, onde todas as operações de retirada do pericarpo e despulpamento tornaram-se menos morosas, permitindo maior eficiência durante a extração e isolamento dos embriões, e sem causar danos físicos e fisiológicos aos explantes.

## 5. CONCLUSÕES

O cultivo de embriões maduros de macaúba, oriundos de frutos mantidos à temperatura ambiente e em meio nutritivo contendo sacarose, nas concentrações de 20 a 30 g L<sup>-1</sup>, proporcionou maior percentagem de germinação e conversão de plântulas viáveis ou normais, passíveis de serem aclimatadas.

A exposição de frutos imaturos à temperatura de 35 °C foi favorável à germinação e ao desenvolvimento das plântulas. Esse tratamento beneficiou sobretudo, as operações de processamento dos frutos, garantindo maior rapidez na realização das atividades de extração e isolamento dos embriões, além de assegurar a qualidade fisiológica dos explantes.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, A. C. S.; MALAVASI, M. M.; COSTA, F. A. Conservação de palmito (*Euterpe edulis* mart.): efeito da temperatura de armazenamento e do grau de umidade das sementes. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 18, n. 2, p. 149-155, 1996.

ANDRADE, A. C. S.; PEREIRA, T. S. Comportamento de armazenamento de sementes de palmito (*Euterpe edulis* mart.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 32, n. 10, p. 987-991, 1997.

ARAÚJO, E. F.; SILVA, R. F.; ARAÚJO, R. F. Avaliação da qualidade de sementes de açaí armazenadas em diferentes embalagens e ambientes. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 16, n. 1, p. 76-79, 1994.

ASHBURNER, G. R.; THOMPSON, W. K.; BURCH, J. M. Effect of  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid and sucrose levels on the development of cultured embryos of coconut. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 35, p. 157-163, 1993.

BROSCHAT, T. K. Palm seed propagation. **Acta Horticulturae**, v. 360, p. 141-147, 1994.

CARPENTER, W. J. Temperature affects seed germination of four Florida palm species. **HortScience**, v. 23, n. 2, p. 336-337, 1988.

FERREIRA, M. G. R.; CÁRDENAS, F. E. N.; CARVALHO, C. H. S.; CARNEIRO, A. A.; DAMIÃO-FILHO, C. F. Resposta de eixos embrionários de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.) à concentração de sais, doses de sacarose e renovação do meio de cultivo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 1, p. 246-248, 2002.

GARCÍA, J. L.; TRONCOSO, J.; SARMIENTO, R.; TRONCOSO, A. Influence of carbon source and concentration on the in vitro development of olive zygotic embryos and explants raised from them. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 69, p. 95-100, 2002.

GEORGE, E. F. **Plant Propagation by Tissue Culture**, 2<sup>nd</sup> Ed., Edington: Ed. Exegetic Limited, 1993. 574p.

HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. Cultura de embriões. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, 1998, v. 1, p. 371-394.

IOSSI, E.; SADER, R.; PIVETTA, K. F. L.; BARBOSA, J. C. Efeitos de substratos e temperaturas na germinação de sementes de tamareira-anã (*Phoenix roebelenii* O'Brien). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 25, n. 2, p. 63-69, 2003.

LEDO, A. S.; GOMES, K. K. P.; BARBOZA, S. B. S. C. VIEIRA, G. S. S.; TUPINAMBÁ, E. A.; ARAGÃO, W. M. Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos e aclimação de plântulas de coqueiro-anão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 2, p. 147-154, 2007.

LEDO, A. S.; LAMEIRA, O. A.; BENBADIS, A. K.; MENEZES, I. C.; LEDO, C. A. S.; OLIVEIRA, M. S. P. Cultura *in vitro* de embriões zigóticos de açaizeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 3, p. 468-472, 2001.

LORENZI, G. M. A. C. **Acrocomia aculeata (Jacq.) Lodd ex Mart – Arecaceae: bases para o extrativismo sustentável**. 2006, 156 p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal), Curitiba: UFPR.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M.; MEDEIROS-COSTA, J. T.; CERQUEIRA, L. S. C.; BEHR, N. V. **Palmeiras no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Plantarum, 1996. 303 p.

MELO, B.; PINTO, J. E. B. P.; LUZ, J. M. Q.; PEIXOTO, J. R.; JULIATTI, F. C. Diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e desenvolvimento das plântulas na cultura *in vitro* de embriões da guarirobeira (*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n. 6, p. 1301-1306, 2001.

MOLLA, M. M. H.; BHUIYAN, M.; KHANAM, D. M.; BATUGAL, P. *In vitro* coconut (*Cocos nucifera* L.) embryo culture in Bangladesh. **Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 98-101, 2004.

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, n. 7, p. 1023-1031, 2002.

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

NAE, NÚCLEO DE ASSUNTOS ESTRATÉGICOS DA PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA. **Cadernos NAE: Biocombustíveis**, Brasília: Núcleo de Assuntos estratégicos da Presidência da República, n. 2, 2005, 232 p.

NEGREIROS, G. F.; PEREZ, S. C. J. G. A. Resposta fisiológica de sementes de palmeiras ao envelhecimento acelerado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 4, p. 391-396, 2004.

PECH-AKÉ, A.; MAUST, B.; OROZCO-SEGOVIA, A.; OROPEZA, C. The effect of gibberellic acid on the *in vitro* germination of coconut zygotic embryos and their conversion into plantlets. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 43, p. 247-253, 2007.

PELLEGRINESCHI, A.; FATOKUN, C. A.; THOTTAPPILLY, G.; ADEPOJU, A. A. Cowpea embryo rescue: influence of culture media composition on plant recovery from isolated immature embryos. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 133-138, 1997.

PEREIRA, J. E. S.; MACIEL, T. M. S.; COSTA, F. H. S.; PEREIRA, M. A. A. Germinação *in vitro* de embriões zigóticos de murmuru (*Astrocaryum ulei*). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 2, p. 251-256, 2006.

SANTANA, M. C.; TEIXEIRA, S. L.; GOMES, J. E. Efeito da temperatura sobre a germinação *in vitro* de embriões zigóticos de *Cocos nucifera* L. (Arecaceae). **Biologia Geral e Experimental**, v. 3, n. 2, p. 41-46, 2003.

SANTANA, M. C.; TEIXEIRA, S. L. Influência do ácido naftalenoacético no crescimento e enraizamento *in vitro* de plântulas de coqueiro (*Cocos nucifera* L.). **Biologia Geral e Experimental**, v. 5, n. 1, p. 30-33, 2004.

SARASAN, V.; RAMSAY, M. M.; ROBERTS, A. V. *In vitro* germination and induction of direct somatic embryogenesis in "Bottle Palm" (*Hyophorbe lagenicaulis* L. Bailey H. E. Moore), a critically endangered mauritian palm. **Plant Cell Reports**, v. 20, p. 1107-1111, 2002.

SILVA, J. C. **Macaúba: fonte de matéria-prima para os setores alimentício, energético e industrial**. Viçosa: CEDAF/ DEF/ UFV, 1994, 41p. Material não publicado.

SILVA, V. S. **Regeneração *in vitro* de embriões de *Cocos nucifera* L.** 2002, 87 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas), Piracicaba: ESALQ.

SPERA, M. R. N.; CUNHA, R.; TEIXEIRA, J. B. Quebra de dormência, viabilidade e conservação de sementes de buriti (*Mauritia flexuosa*). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 12, p. 1567-1572, 2001.

STEINMACHER, D. A. **Germinação *in vitro*, criopreservação e embriogênese somática em pupunha**. 2005, 125p. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais), Florianópolis: UFSC.

TZEC-SIMÁ, M. A.; ORELLANA, R.; ROBERT, M. L. *In vitro* rescue of isolated embryos of *Bactris major* Jacq. and *Desmoncus orthacanthos* Mart., potentially useful native palms from the Yucatan peninsula (Mexico). **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 42, p. 54-58, 2006.

VILLELA, F. A.; PERES, W. B. Coleta, beneficiamento e armazenamento. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Orgs.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004, p. 265-281.

**Efeito do picloram na indução de embriogênese somática em embriões zigóticos maduros de macaúba (*Acrocomia aculeata*)**

**RESUMO**

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da auxina picloram na indução de embriogênese somática em explantes de embriões zigóticos de *Acrocomia aculeata*. Embriões zigóticos maduros foram cultivados em meio basal composto pelos sais de MS, suplementado com 60 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 400 mg L<sup>-1</sup> de glutamina, vitaminas de MS, e 2,9 g L<sup>-1</sup> de fitagel como agente gelificante. Aos 75 dias da inoculação, avaliou-se a intensidade de calejamento, a percentagem de formação de calos primários e embriogênicos, a presença de estruturas nodulares nos calos obtidos e a oxidação fenólica. O picloram foi adicionado ao meio nas concentrações de 0; 1,2; 2,4; 3,6 e 4,8 mg L<sup>-1</sup>. Melhores resultados foram obtidos na concentração de 2,4 mg L<sup>-1</sup> do regulador, promovendo maior percentual de calos com características embriogênicas. A análise histológica evidenciou a formação de pró-embriões e embriões globulares apresentando ausência de conexão vascular com o tecido de origem, os quais surgiram de zonas meristemáticas formadas a partir de estruturas nodulares.

## 1. INTRODUÇÃO

*Acrocomia aculeata* é uma palmeira endêmica da região central do Brasil, e sua ocorrência estende-se por praticamente todo o território brasileiro, com maior concentração de populações nativas no estado de Minas Gerais.

O fruto é o produto economicamente mais representativo desta palmeira. O óleo extraído, tanto da polpa como da amêndoa, apresenta excelentes propriedades, e, mais recentemente, tem constituído uma fonte atrativa de energia, baseada na produção de biocombustíveis, que, do ponto de vista ambiental, são renováveis e menos poluentes.

As grandes reservas naturais desta palmácea revelam-se muito promissoras pelo alto rendimento em óleo por unidade de área, quando comparada a outras oleaginosas já domesticadas, pelo fornecimento de uma ampla variedade de matérias-primas, atendendo a diversos segmentos industriais e por se desenvolverem em áreas não competitivas com a agricultura (Silva, 2005). Estratégias que visem a domesticação da espécie devem ser desenvolvidas, em razão da alta variabilidade genética entre e dentro das populações nativas, principalmente no que se refere a precocidade de floração e frutificação, o que permitiria o estabelecimento de culturas racionais e bem orientadas da macaúba (Tabai, 1992). A implantação de lavouras comerciais desta planta esbarra em dificuldades na quebra de dormência de suas sementes e no baixo crescimento inicial, além do desconhecimento a respeito de suas exigências ecológicas (Motta et al., 2002).

Em condições naturais, a macaúba apresenta limitações, quanto à germinação, em virtude da dormência da semente. Alternativamente, os métodos convencionais de propagação vegetativa não são possíveis, pois esta palmeira não perfilha, tornando inviável a produção de mudas (Silva, 2005).

As técnicas de propagação *in vitro* podem contribuir, proporcionando avanços consideráveis na propagação clonal em grande escala. Dentre essas, a embriogênese somática consiste na formação de embriões sem a ocorrência de fertilização, ou seja, através de estímulos especiais, células somáticas são induzidas a formarem embriões e posterior conversão em plantas, passando por estádios semelhantes aos observados na embriogênese zigótica (Guerra et al., 1999).

Protocolos regenerativos baseados na embriogênese somática tem sido relatados com sucesso para algumas espécies de palmeiras, utilizando-se como fonte de explantes, principalmente, embriões zigóticos (Guerra e Handro, 1988; Tabai, 1992; Teixeira et al., 1993; Huong et al., 1999; Ledo et al., 2002; Rajesh et al., 2003; Moura, 2007; Steinmacher, 2007); tecidos foliares juvenis (Chan et al., 1998; Sarasan et al., 2002; Fernando et al., 2003; Pérez-Núñez et al., 2006) e inflorescências (Branton e Blake, 1983; Bhaskaran e Smith, 1992; Teixeira et al., 1994; Verdeil et al., 1994; Guerra e Handro, 1998; Karun et al., 2004). Para a macaúba, a primeira tentativa de indução de embriogênese somática foi realizada por Tabai (1992), estudo no qual é relatada a formação de estruturas pró-embriogênicas, utilizando-se embriões zigóticos como fonte de explantes. No entanto, o trabalho conduzido por Moura (2007) apresentou resultados mais promissores da aplicação da embriogênese somática para esta palmeira, no qual é descrito um protocolo para a obtenção de muitos pró-embriões e embriões somáticos. Apesar disso, é comentada a dificuldade de maturação e germinação, dos embriões, comprometendo a produção de mudas clonais desta espécie em larga escala.

Considerando o potencial energético e industrial já constatado para a macaúba, aliado à carência de estudos, quanto a sua propagação, o desenvolvimento de pesquisas buscando a adequação de um protocolo reproduzível de embriogênese somática, otimizaria a propagação clonal e poderia alavancar a produção de mudas, contribuindo decisivamente para a implantação de plantios comerciais desta palmeira. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da auxina picloram na indução de embriogênese somática em embriões zigóticos de macaúba.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos II do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária - BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

## **2.1. Material vegetal**

Foram utilizados como fonte de explantes frutos maduros, colhidos de plantas adultas de populações naturais existentes no campus da Central de Ensino e Desenvolvimento Agrário de Florestal – CEDAF, no município de Florestal, Minas Gerais, nos meses de janeiro a dezembro.

Previamente à extração dos embriões, foi removido o pericarpo dos frutos e, em seguida, foram colocados para secar à temperatura ambiente por aproximadamente 30 dias, antes do isolamento dos embriões. Os frutos foram quebrados com auxílio de torno manual para a remoção do endocarpo e liberação da amêndoa, a qual contém em seu interior o embrião zigótico. As amêndoas foram previamente desinfestadas em hipoclorito de sódio comercial a 5 % (Super Globo, Brasil) por 20 minutos, enxaguadas 3 vezes em água desionizada e autoclavada, e mantidas à temperatura ambiente por 24 horas para secagem.

Os embriões foram isolados com auxílio de bisturis e, em condições assépticas, foram desinfestados em hipoclorito de sódio comercial (Super Globo, Brasil) a 1 %, acrescido de 3 gotas do surfactante Tween-20<sup>®</sup> para cada 100 mL dessa solução, durante 15 minutos e por 4 enxágües sucessivos em água desionizada e autoclavada.

## **2.2. Meios de cultura e condições de cultivo**

Embriões zigóticos maduros foram inoculados em meio basal composto pelos sais de MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com 60 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 400 mg L<sup>-1</sup> de glutamina, vitaminas de MS, e 2,9 g L<sup>-1</sup> de fitagel (Sigma<sup>®</sup>) como agente gelificante, em diferentes concentrações de picloram (0; 1,2; 2,4; 3,6 e 4,8 mg L<sup>-1</sup>).

Os embriões foram cultivados em placas de Petri estéreis de poliestireno de 60 x 15 mm (J. Prolab, Brasil). Os meios de cultura foram vertidos em câmara de fluxo laminar, em alíquotas de 12 a 15 mL. Nesta fase, foram incorporados aos meios 300 mg L<sup>-1</sup> do antibiótico Timentim<sup>®</sup>, previamente filtro-esterilizado, em condições assépticas, após a autoclavagem e resfriamento dos meios nutritivos até uma temperatura de aproximadamente 50 °C. O pH dos

meios foi ajustado para  $5,7 \pm 0,1$ , seguido de autoclavagem ( $121^\circ \text{C}$ , 1,1 atm de pressão, 20 minutos).

As culturas foram mantidas em estufa incubadora BOD (Diurnal Growth Chamber, Forma Scientific, USA), à temperatura de  $27 \pm 2^\circ \text{C}$ , na ausência de luz durante todo o período de cultivo. Os calos foram transferidos mensalmente, para meio de mesma composição, e mantidos sob as mesmas condições de cultivo, até o surgimento de calos com características embriogênicas.

Os calos considerados embriogênicos e que não demonstraram sinais de oxidação, foram transferidos para meio básico  $Y_3$  (Eeuwens, 1976) acrescido de  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-D;  $11,2 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP e  $2,5 \text{ g L}^{-1}$  de carvão ativado e mantidos sob as mesmas condições de cultivo descritas anteriormente.

### **2.3. Condução e avaliações experimentais**

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, onde avaliou-se o efeito do picloram (0; 1,2; 2,4; 3,6 e  $4,8 \text{ mg L}^{-1}$ ) na indução de calos embriogênicos em explantes de embriões zigóticos. Foram utilizadas 5 repetições por tratamento, e 4 explantes para cada repetição.

O desenvolvimento dos calos foi acompanhado, periodicamente, e o cocultivo realizado a cada 30 dias para meio de mesma composição, até a formação de calos embriogênicos. Ao final de 75 dias, avaliou-se a intensidade de calejamento, o tipo de calo formado, quanto a sua textura (calos primários ou embriogênicos), a presença de estruturas nodulares nos calos obtidos e a oxidação fenólica. As avaliações de intensidade de calejamento foram feitas por comparação, sendo discriminadas como baixa, média e alta. Em relação à textura dos calos obtidos, foram classificados como primários os calos com textura semi-compacta a compacta (células firmemente ligadas) ou semi-friável (regiões do calo com células frouxamente ligadas) e embriogênicos aqueles com aspecto friável, porém apresentando maior área composta de células frouxamente ligadas.

Quanto à intensidade de oxidação, foi considerada baixa para calos amarelo escuro tendendo a marrom claro, intensidade média para calos com

maior parte da área escurecida, com coloração marrom mais escura e alta para calos totalmente escurecidos.

## **2.4. Histologia**

Com o objetivo de confirmar o padrão celular dos calos formados após 60 dias da inoculação, regiões do calo apresentando estruturas nodulares foram isoladas, fixadas em FAA (formol: ácido acético: álcool etílico 50 %) durante 48 horas, sob vácuo. Em seguida, essas amostras foram colocadas em álcool etílico 70 % v/v, onde permaneceram estocadas, e novamente submetidas a vácuo, por 24 horas.

As amostras foram desidratadas em série etílica e incluídas em metacrilato (Historesin, Leica), conforme recomendações do fabricante. Seções longitudinais de 8 µm de espessura foram obtidas em micrótomo rotativo de avanço automático (RM 2155-Leica), coradas em Azul de Toluidina durante 10 minutos com pH 4,0 (O`brian e Mccully, 1981), sendo as lâminas montadas em resina sintética (Permount®).

A documentação fotográfica das lâminas foi realizada, utilizando-se o microscópio Olympus AX70, conectado a um sistema de fotomicrografia Olympus U-Photo do Laboratório de Anatomia Vegetal, do Departamento de Biologia Vegetal da UFV.

## **3. RESULTADOS**

### **3.1. Indução de embriogênese somática**

Periodicamente, o desenvolvimento dos calos foi acompanhado e, após 30 dias de cultivo, observou-se que praticamente todos os explantes haviam iniciado o calejamento, com exceção do tratamento sem a adição de picloram no meio de cultura, que por sua vez promoveu a germinação de 100 % dos embriões. Em geral, após 75 dias de cultivo, os percentuais de calejamento foram elevados e a maior predominância dos calos obtidos apresentaram-se nas intensidades média ou alta (Figura 1A).

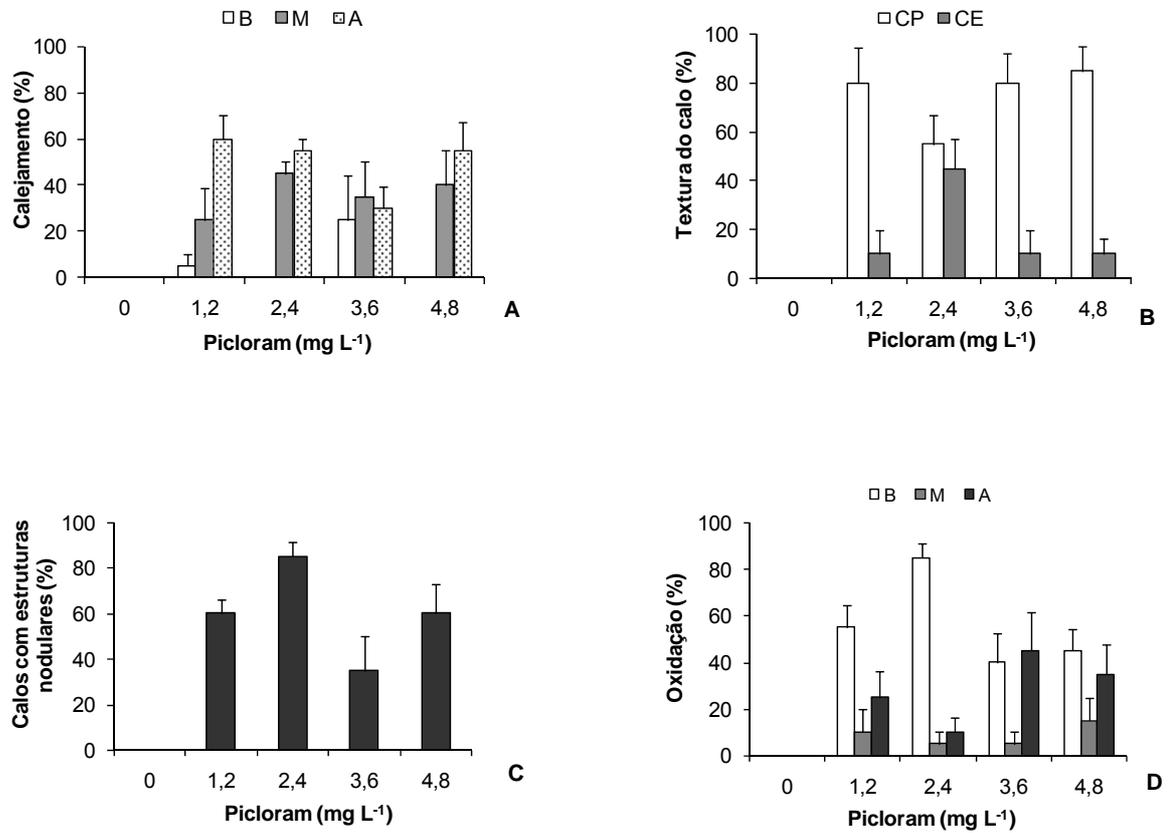
O início do calejamento deu-se, principalmente, na região proximal do embrião, correspondente ao eixo embrionário, com a ruptura dos tecidos nessa região (Figuras 2A, B). Os calos apresentavam coloração amarelo escuro e em todos os tratamentos com picloram, observou-se maior percentagem de calos primários em relação aos calos com características embriogênicas (Figuras 1B, 2C). A frequência de calos embriogênicos foi baixa (10 %) em meio suplementado com 1,2; 3,6 e 4,8 mg L<sup>-1</sup> de picloram. Contudo, a concentração de 2,4 mg L<sup>-1</sup> deste regulador mostrou-se a melhor, obtendo-se o maior percentual de calos embriogênicos (45 % dos calos formados). Foi possível observar que com o aumento da concentração de picloram os calos tendiam a apresentar textura compacta, com menor frequência de estruturas nodulares, sendo esse efeito acentuado nas concentrações mais altas.

Independentemente da textura dos calos formados, muitas estruturas nodulares foram observadas (Figura 2B), destacando-se que em 2,4 mg L<sup>-1</sup> de picloram essa resposta foi máxima, com 85 % de calos com presença de nódulos (Figura 1C). Esses nódulos muitas vezes evoluíram para estruturas mais definidas, chegando a se assemelhar a estruturas globulares, que eventualmente se desprendiam do tecido de origem (Figura 2D). Alguns dos embriões formavam estruturas similares a feixes, que frequentemente se rompiam após 75 dias, liberando muitas estruturas globulares.

A oxidação não restringiu o potencial morfogênico dos explantes, e embora tenham sido observados altos percentuais, houve predominância de explantes oxidados na intensidade baixa. Apenas nas maiores concentrações de picloram, a oxidação tendeu a aumentar na intensidade alta (Figura 1D).

O índice de contaminação obtido no presente estudo foi de 2 %, indicando que a metodologia para o isolamento e desinfestação dos embriões mostrou-se eficiente, e dessa forma, os explantes puderam ser estabelecidos *in vitro* com sucesso.

Não houve progressão dos calos friáveis após a transferência para meio Y<sub>3</sub> contendo 2,4-D (0,2 mg L<sup>-1</sup>), BAP (11,2 mg L<sup>-1</sup>) e carvão ativado, resultando na formação de regiões de aparência esponjosa, coloração esbranquiçada, com posterior perda da competência embriogênica (Figura 2E). Após 30 dias, os calos se tornaram completamente escurecidos em decorrência da oxidação fenólica.

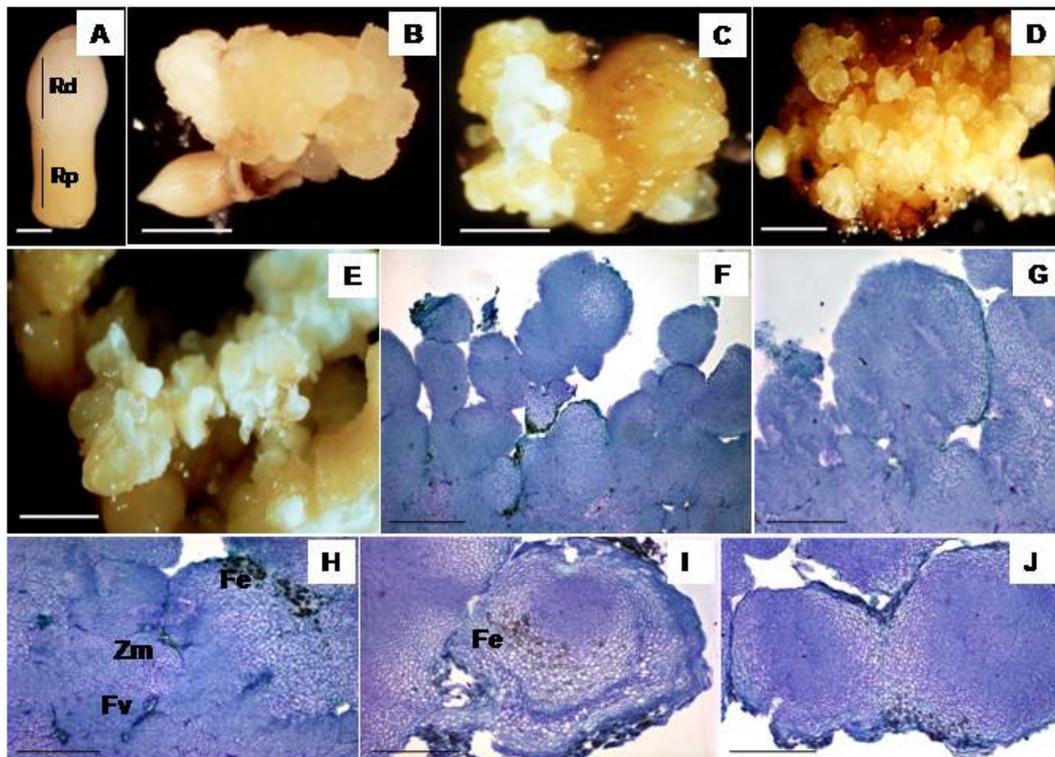


**Figura 1** – Efeito de concentrações da auxina picloram (0; 1,2; 2,4; 3,6 e 4,8 mg L<sup>-1</sup>) na indução de embriogênese somática em explantes de embriões zigóticos maduros de *Acrocomia aculeata*, após 75 dias da inoculação. As barras indicam o erro padrão. **(A)** Percentagem de explantes calejados, onde B refere-se à intensidade baixa, M à média, e A à alta; **(B)** Percentagem de tipos de calos formados, em relação à textura (primários =CP e embriogênicos = CE); **(C)** Percentagem de calos apresentando formação de estruturas nodulares; **(D)** Intensidade de oxidação dos embriões, onde B refere-se à intensidade baixa, M à média, e A à alta.

### 3.2. Histologia

A análise histológica revelou o surgimento de muitos centros meristemáticos nas estruturas nodulares, obtidas de calos com características embriogênicas, após 60 dias da inoculação em meio de indução (Figuras 2F, H). Essas regiões se distinguem do restante do calo por apresentar intensa divisão celular, com formação de grupos de células com citoplasma denso e núcleos proeminentes, características típicas de células embriogênicas. Essas massas meristemáticas, presentes na porção mais periférica do calo, numa fase mais tardia evoluíram, tornando-se estruturas globulares semelhantes a embriões somáticos e tenderam a se isolar do tecido de origem (Figura 2G). Em alguns casos, a diferenciação de elementos traqueais foi evidenciada na região central dos embriões, com ausência de conexão com o tecido do calo (Figura 2I). Alguns destes embriões se desprenderam das zonas meristemáticas, no entanto, os cordões de procâmbio não foram detectados (Figura 2J).

Foi possível observar a deposição de substâncias fenólicas no interior de células protodérmicas circundando algumas estruturas globulares, inclusive na região mais interna constituída por células parenquimáticas, o que pode ter comprometido a diferenciação e progressão dos embriões globulares para estágios mais avançados da embriogênese (Figuras 2I, J).



**Figura 2** – Efeito do picloram na indução de embriogênese somática a partir de embriões zigóticos maduros de macaúba (*Acrocomia aculeata*). **(A)** Embrião zigótico de macaúba utilizado como fonte de explante (regiões proximal - Rp e distal - Rd) (Barra = 5 mm); **(B)** Calo primário obtido após 30 dias em meio de indução (Barra = 5 mm); **(C)** Calo primário com aspecto nodular e coloração amarelo escuro, após 60 dias da inoculação em meio de indução (Barra = 5 mm); **(D)** Calo embriogênico, após 60 dias de cultivo em meio de indução contendo  $2,4 \text{ mg L}^{-1}$  de picloram (Barra = 5 mm); **(E)** Aspecto do calo embriogênico, após 30 dias da transferência para meio de maturação (Barra = 2,5 mm). (F-J) Histologia de calos embriogênicos formados, após 60 dias em meio de indução com  $2,4 \text{ mg L}^{-1}$  de picloram. **(F)** Seção de um calo primário nodular (Barra = 300  $\mu\text{m}$ ); **(G)** Estrutura globular semelhante a um embrião somático com início de formação da protoderme (Barra = 150  $\mu\text{m}$ ); **(H)** Formação de zonas meristemáticas, evidenciando a fenolização de algumas células (Barra = 150  $\mu\text{m}$ ); **(I)** Embrião globular apresentando cordão de procâmbio (Barra = 200  $\mu\text{m}$ ); **(J)** Embrião globular em fragmentação (Barra = 200  $\mu\text{m}$ ). Fe: células com deposição de compostos fenólicos; Fv: Feixes vasculares em diferenciação; Zm: zona meristemática.

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1. Indução de embriogênese somática

No presente estudo, a utilização de picloram mostrou-se eficiente na indução de calos nodulares, e com características embriogênicas. Esta auxina também foi empregada com sucesso na indução de embriogênese em tecidos de *Bactris gasipaes* (Steinmacher et al., 2007); *Areca catechu* (Karun et al., 2004) e *Phoenix canariensis* (Huong et al., 1999).

O primeiro relato da indução de calos embriogênicos em macaúba foi descrito por Tabai (1992), o qual obteve resultados positivos com o uso do picloram, enquanto com o 2,4-D os calos se formaram apenas em concentrações maiores que 50 mg L<sup>-1</sup>, contudo não expressaram potencial embriogênico. O picloram estimulou a formação de agregados globulares e um melhor desenvolvimento dos calos nas concentrações de 50 e 100 mg L<sup>-1</sup>, em meio suplementado com 3 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado. Morfologicamente, as estruturas globulares e alongadas apresentaram características típicas de estruturas embriogênicas. Entretanto, quando isoladas não progrediram devido principalmente a fatores relacionados com a oxidação fenólica, ou apresentaram escassos casos de emissão de apêndice similar a raízes nas estruturas alongadas. A utilização do picloram mostrou-se efetiva na indução de calos embriogênicos, apontando um grande potencial de seu uso na regeneração de embriões somáticos nesta palmeira, desde que consiga otimizar as condições de cultivo e manutenção dos calos.

Mais recentemente, o trabalho conduzido por Moura (2007) representou avanços nessa cultura, pela descrição de um protocolo de embriogênese somática de macaúba, iniciado a partir de embriões zigóticos. Massas embriogênicas foram obtidas após a inoculação dos embriões em meio Y<sub>3</sub> contendo picloram ou 2,4-D combinados ou não com TDZ, na ausência de luz. Após 60 dias de cultivo em meio de regeneração, com a mesma composição do meio de indução, porém na presença de carvão ativado, as massas embriogênicas regeneraram estruturas globulares semelhantes a embriões somáticos. Essas estruturas apresentavam células pequenas, de citoplasma denso, alta relação núcleo/citoplasma e núcleos com nucléolos evidentes. Aos

120 dias em meio suplementado com picloram e carvão ativado, foi possível observar a formação de embriões somáticos a partir de calos nodulares. Estes embriões possuíam protoderme característica, cordões de procâmbio, meristema apical e germinaram em meio de cultura Y<sub>3</sub>, na ausência de reguladores de crescimento.

No presente trabalho, embora tenha sido observada a expressão de competência embriogênica nos calos formados na presença de picloram, quando inoculados em meio para maturação dos calos, contendo baixa concentração de auxina e citocinina, e mantidos na ausência de luz, os calos se degeneraram e após 30 dias nessa condição haviam se tornado completamente escurecidos.

Tem sido postulada que a formação de embriões somáticos é favorecida pela redução da concentração de auxina no meio de cultura e inclusão de uma citocinina (Verdeil et al., 1994; Fernando e Gamage, 2000). Embriões somáticos de *Cocos nucifera* se desenvolveram e começaram a germinar quando inoculados em meio com redução da auxina e adição de citocinina (Chan et al., 1998).

Os resultados apresentados nesse trabalho estão de acordo com os obtidos por Moura (2007) que demonstrou a eficiência da auxina picloram em induzir a competência embriogênica e a formação de muitos pró-embriões e de alguns embriões na fase globular. Contudo, pelas análises morfológicas, poucos chegaram às fases mais avançadas de desenvolvimento. Esse autor sugere que mais estudos são necessários a fim de se melhorar o processo de maturação dos embriões globulares e germinação dos embriões somáticos, para obtenção de plântulas de macaúba *in vitro*.

Neste trabalho, o fato de os calos não terem mostrado evolução durante a fase de maturação e regeneração pode ser atribuída a alguns fatores, que incluem a procedência dos frutos a partir dos quais os embriões foram obtidos e à condição fisiológica dos explantes na época da excisão. Da mesma forma, ajustes nas condições de cultivo, bem como no meio de cultura utilizado na fase de maturação dos embriões devem ser realizados, visando a diferenciação das estruturas nodulares obtidas.

## 4.2. Histologia

A aquisição de competência embriogênica e indução de embriogênese somática em explantes de embriões zigóticos seguiu padrões de desenvolvimento similares aos descritos para outras palmeiras. A formação de zonas meristemáticas, a partir das quais diferenciaram-se agregados de estruturas nodulares, que, numa fase mais tardia deram origem a pró-embriões e embriões somáticos na fase globular.

Em *Cocos nucifera*, Saénz et al. (2006) também descreveram a formação de nódulos merismáticos constituídos de agregados de células meristemáticas, que posteriormente se desenvolveram em estruturas nodulares. A partir dessas estruturas, embriões somáticos eventualmente se formaram e foram considerados estruturas embriogênicas globulares.

A análise histológica de calos embriogênicos de pupunha, mostrou que a proliferação celular ocorreu a partir de células sub-epidermais adjacentes ao feixe vascular, culminando na formação de calos primários constituídos de uma zona meristemática da qual se originaram os embriões somáticos, sugerindo o padrão de origem multicelular. Estes embriões apresentavam protoderme delimitada e não possuíam conexão vascular com o tecido matriz (Steinmacher et al., 2007).

A presença de substâncias fenólicas foi evidente em algumas porções do calo, em particular circundando algumas estruturas globulares semelhantes a embriões. Possivelmente a presença de compostos fenólicos atuou impedindo a diferenciação das estruturas globulares obtidas. Tabai (1992) também atribuiu à oxidação fenólica as falhas ocorridas durante a maturação de estruturas embriogênicas de macaúba, as quais não mostraram evolução aparente.

Num estudo pioneiro em que descreve anatomicamente a embriogênese somática em macaúba, Moura (2007) relata que algumas das massas meristemáticas apresentaram muitas células fenolizadas na periferia e, possivelmente estas não teriam originado embriões somáticos. Por outro lado, massas meristemáticas sem indício de fenolização formaram embriões por via multicelular. Após a transferência dos calos para meio de regeneração, com a adição de carvão ativado e redução dos níveis exógenos de picloram, houve

aumento da diferenciação dos calos nodulares, formados a partir de massas meristemáticas, em estruturas globulares. Essas estruturas se desprendiam das massas meristemáticas formadas a partir das células procambiais e continuavam se multiplicando, algumas por fragmentação.

## 5. CONCLUSÕES

O picloram, na concentração de 2,4 mg L<sup>-1</sup>, mostrou-se efetivo na indução de calos embriogênicos obtidos de embriões zigóticos maduros de *Acrocomia aculeata*. Contudo, as estruturas nodulares formadas, semelhantes a embriões globulares não evoluíram, quando cocultivadas em meio de maturação, com baixa concentração de auxina e na presença de carvão ativado.

A histologia dos calos nodulares confirmou o padrão embriogênico das células, onde pró-embriões e embriões somáticos globulares formaram-se a partir de zonas meristemáticas na região periférica do calo. Soma-se a isso o fato dos embriões globulares não terem apresentado conexão vascular com o explante de origem.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

BRANTON, R. L.; BLAKE, J. Development of organized structures in callus derived from explants of *Cocos nucifera* L. **Annals of Botany**, v. 52, p. 673-678, 1983.

CHAN, J. L.; SAÉNZ, L.; TAVALERA, C.; HORNUNG, R. Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 515-521, 1998.

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

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.; VERDEIL, J. L.; HOCHER, V.; WEERAKOON, L. K.; HIRIMBUREGAMA, K. Histological analysis of plant regeneration from plumule explants of *Cocos nucifera*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 72, p. 281-284, 2003.

GUERRA, M. P.; HANDRO, W. Somatic embryogenesis and plant regeneration in embryo cultures of *Euterpe edulis* Mart. (palmae). **Plant Cell Reports**, v. 7, p. 550-552, 1988.

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, n. 1101, p. 65-71, 1998.

GUERRA, M. P., TORRES, A. C., TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C., CALDAS, L. S., BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, 1999. v.2, p.533-568.

HUONG, L. T. L.; BAIOTTO, M.; HUY, B. P.; MEZZETTI, B.; SANTILOCCH, R.; ROSATTI, P. Somatic embryogenesis in canary island date palm. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 56, p. 1-7, 1999.

KARUN, A.; SIRIL, E. A.; RADHA, E.; PARTHASARATHY, V. A. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from leaf and inflorescence explants of arecanut (*Areca catechu* L.). **Current Science**, v. 86, n. 12, p. 1623-1628, 2004; )

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

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, n. 7, p. 1023-1031, 2002.

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

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

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

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

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

SARASAN, V.; RAMSAY, M. M.; ROBERTS, A. V. In vitro germination and induction of direct somatic embryogenesis in bottle palm [*Hyophorbe lagenicaulis* (L. Bailey) H. E. Moore]. **Plant Cell Reports**, v. 20, p. 1107-1111, 2002.

SILVA, J. C. **Macaúba: fonte de material-prima para os setores alimentício, energético e industrial**. Viçosa, Minas Gerais, 2005, 59 p. Material não publicado.

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, 2007.

TABAI, S. A. **Propagação da palmeira macaúba *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Loddiges. através de métodos *in vitro***. 1992, 121p. Dissertação (Mestrado em Ciências), Piracicaba: ESALQ.

TEIXEIRA, J. B.; SÖNDHAL, M. R.; KIRBY, E. G. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of oil palm. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 34, p. 227-233, 1993.

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

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.

### 3. CONCLUSÕES GERAIS

Nas condições experimentais em que os trabalhos foram desenvolvidos, os resultados obtidos permitem as seguintes conclusões:

- O cultivo inicial de embriões maduros sob fotoperíodo, acarretou em maior oxidação dos embriões, no entanto esta condição favoreceu o desenvolvimento das plântulas, comparativamente ao ambiente escuro. A suplementação dos meios com carvão ativado foi imprescindível para a conversão de plântulas viáveis ou normais, principalmente, pelo seu efeito estimulador sobre o alongamento das raízes primárias e desenvolvimento de raízes secundárias.
- O armazenamento dos frutos à temperatura ambiente proporcionou maior índice de germinação dos embriões em relação à câmara fria. A adição de sacarose aos meios, em concentrações de 20 a 30 g L<sup>-1</sup> resultou em maior proporção de plântulas viáveis, passíveis de serem aclimatadas. Baixas concentrações desse carboidrato não afetaram a germinação, contudo as plântulas tenderam à hiperidricidade. A exposição dos frutos imaturos à temperatura de 35 °C não influenciou a germinação dos embriões e o desenvolvimento das plântulas. Os tratamentos não causaram danos fisiológicos aos embriões, que mantiveram alta capacidade morfogênica, e além disso tornaram as operações de processamento dos frutos menos morosas e com maior eficiência de extração e isolamento dos explantes.
- A utilização da formulação salina de MS, na ausência de carvão, mostrou-se ligeiramente superior em relação ao meio de Y<sub>3</sub> para a conversão das plântulas. Nos meios sem carvão, embriões maduros apresentaram maior desenvolvimento de parte aérea com 50 e 75 % dos sais. No entanto, a incorporação de carvão ativado aos meios, nas duas formulações estudadas, foi determinante para o desenvolvimento de plântulas viáveis, culminando num crescimento balanceado entre a parte aérea e a raiz, com efeito pronunciado sobre o crescimento de raízes funcionais. Em relação à cultura de embriões imaturos, o meio de Y<sub>3</sub> contendo 75 e 100 % da concentração salina resultou em plântulas mais vigorosas. A presença de carvão ativado foi altamente

benéfica ao crescimento das raízes, sendo esse efeito mais expressivo conforme a concentração deste componente foi aumentada.

- A indução de calos embriogênicos em explantes de embriões zigóticos maduros, foi maior em meio contendo 2,4 mg L<sup>-1</sup> de picloram. Muitas estruturas globulares se formaram a partir de nódulos meristemáticos presentes nos calos. Entretanto, essas estruturas não evoluíram e os calos perderam a competência embriogênica, quando transferidos para meio com redução da auxina exógena e na presença de carvão ativado, possivelmente em razão da formação de substâncias fenólicas nas células envolvendo essas estruturas, que podem ter impedido a progressão das estruturas globulares para fases mais avançadas da embriogênese.

O presente trabalho gerou informações relevantes para o desenvolvimento de um protocolo eficiente da cultura de embriões zigóticos de macaúba. Foi possível obter plântulas vigorosas, de crescimento uniforme e, principalmente, num curto espaço de tempo. Após 12 semanas de cultivo *in vitro*, plântulas completas puderam ser aclimatadas, reduzindo drasticamente o período de obtenção de mudas para a espécie. Considerando o valor econômico, estratégico e ambiental que a espécie representa e que o volume de estudos conduzidos nesse sentido ainda é incipiente, a produção de mudas pela cultura de embriões é uma alternativa interessante e de fundamental importância para atender a programas de domesticação e de melhoramento da macaúba. Entretanto, maiores estudos devem ser conduzidos em relação à fase de aclimatização das plântulas, que por apresentarem uma dificuldade natural de enraizamento, possuem menores chances de sobrevivência sob condições *ex vitro*. Essas informações adicionais poderiam contribuir para o aumento de sobrevivência das plantas, redução do tempo requerido para a aclimatização e com isso viabilizar a aplicação comercial da técnica. Em relação à propagação clonal via embriogênese somática, estudos mais aprofundados das condições de cultivo, relacionados à maturação e regeneração dos embriões são necessários e permitiriam o estabelecimento de um protocolo eficiente de embriogênese somática, com alta frequência e desenvolvimento sincronizado dos embriões.