

ELISA FERREIRA MOURA

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM MACAÚBA: INDUÇÃO,  
REGENERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2007

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

T

M929e  
2007

Moura, Elisa Ferreira, 1979-

Embriogênese somática em macaúba : indução, regeneração e caracterização anatômica / Elisa Ferreira Moura. – Viçosa : UFV, 2007.  
xv, 66f. : il. col.; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: Sérgio Yoshimitsu Motoike.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

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

CDD 22.ed. 571.8233

ELISA FERREIRA MOURA

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM MACAÚBA: INDUÇÃO,  
REGENERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA**

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

APROVADA: 12 de fevereiro de 2007

---

Prof.<sup>a</sup> Marília Contin Ventrella  
(Co-Orientadora)

---

Prof. Wagner Campos Otoni  
(Co-Orientador)

---

Prof. Luiz Antonio dos Santos Dias

---

Prof. Marcelo de Oliveira Santos

---

Prof. Sérgio Yoshimitsu Motoike  
(Orientador)

*Ofereço*

*A meu pai, Raimundo Moura  
A meu marido, Roberto  
E a minha irmã Helena*

*Dedico*

*A minha avó Semírames  
A minha mãe Edila  
E a minha tia Leonora  
Por terem me mostrado que se pode conciliar família e trabalho*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço,

A Deus, por ter me proporcionado tantas oportunidades e realizações.

Ao meu marido Roberto, pelo companheirismo, amor e bons momentos.

A meus pais, Edila e Moura e minha irmã Helena, pelo apoio e carinho sempre.

A Bené, por ter cuidado de mim.

Aos meus avós, tios e primos, por serem uma família tão querida.

Aos meus padrinhos Lúcia e Amadeu por estarem sempre por perto.

À família de meu marido Roberto, em especial à minha sogra Consuelo e meus cunhados, por todo apoio.

Ao casal de tios Sérgio e Ana Rita, pela torcida sempre.

À Universidade Federal de Viçosa, por ter me aceitado como aluna.

Ao curso de pós-graduação em Genética e Melhoramento pela oportunidade de realizar o curso.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador, Sérgio Motoike, por ter aceitado me orientar, pela confiança depositada durante a realização dos trabalhos e pela paciência.

À conselheira Marília Ventrella, pela dedicação, apoio e sugestões.

Aos professores e conselheiros Wagner Otoni e Cláudio Bruckner, pela disponibilidade em ajudar.

Aos professores Luiz Antonio dos Santos Dias e Marcelo de Oliveira Santos, por terem aceitado participar da banca de tese.

Ao professor José Maria Moreira Dias, pela disponibilidade.

Aos demais professores do curso de Genética e Melhoramento, pelas excelentes aulas que assisti.

Ao aluno de iniciação científica Aduino Quirino, pela grande assistência neste trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Cultura de Tecidos e Células Vegetais do Departamento de Fitotecnia da UFV, Márcio e Cenira, pela ajuda sempre que precisei.

Aos professores, alunos e funcionários do Laboratório de Anatomia Vegetal da UFV, especialmente a Vânia Valente e ao estudante de iniciação científica Diogo pela grande ajuda na análise histológica.

Às funcionárias Rita, Rose e Conceição da Secretaria de Genética pelos serviços prestados.

Aos alunos e amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos e Células Vegetais da UFV, em especial a Mychelle Carvalho, Candida Manfio, Patrícia Flores, Aurinete do Val, Crislene Silva, Aurora Sato, Patrícia Leão, Gizella Ventura, Rodrigo Alexandre e aos demais, pela troca de conhecimentos e convivência.

Aos alunos e amigos do curso de Genética e Melhoramento, em especial a Márcia Flores, Adésio Ferreira, Simone Rodrigues, Giselda Pereira, Juliano Ferreira, Wellington Clarindo, Márcia Regina, Robson Missio, Tatiana Rosado, Kécya Moita e Luiz Pessoni, por trocarmos experiências e pelos momentos de descontração.

Ao amigo Gilvan da Silva, pelo convívio desde a época do mestrado.

A todos aqueles que ajudaram a contribuir para o desenvolvimento deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

ELISA FERREIRA MOURA, filha de Raimundo da Costa Moura e Edila Arnaud Ferreira Moura, nasceu em 31 de dezembro de 1979, na cidade de Belém, estado do Pará.

Graduou-se em Bacharelado em Ciências Biológicas em agosto de 2001 pela Universidade Federal do Pará. Iniciou seu mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas em agosto de 2001, tendo concluído o curso em julho de 2003.

Em março de 2004, iniciou o doutorado em Genética e Melhoramento pela Universidade Federal de Viçosa e concluiu-o em fevereiro de 2007.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xi
<b>RESUMO</b> .....	xii
<b>ABSTRACT</b> .....	xiv
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	1
<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	3
1 – Aspectos Botânicos da Macaúba .....	3
2 – Utilizações da Macaúba .....	5
3 – Embriogênese Somática .....	7
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	8

### Capítulo 1

---

#### **EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM MACAÚBA A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS**

<b>1 – INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 – MATERIAL E MÉTODOS</b> ..	14
2.1 – Indução de embriogênese somática .....	14
2.2 – Regeneração dos embriões somáticos .....	15
2.3 – Multiplicação dos embriões somáticos (embriogênese secundária) .....	17
2.4 – Germinação dos embriões somáticos .....	17
2.5 – Análise histológica .....	18
<b>3 – RESULTADOS</b> .....	18
3.1 – Indução de embriogênese somática.....	18
3.2 – Regeneração dos embriões somáticos .....	20
3.3 – Multiplicação dos embriões somáticos (embriogênese secundária) .....	21
3.4 – Germinação dos embriões somáticos .....	21
<b>4 – DISCUSSÃO</b> .....	29
4.1 – Indução de embriogênese somática.....	29
4.2 – Regeneração dos embriões somáticos .....	30
4.3 – Multiplicação dos embriões somáticos (embriogênese secundária) .....	31
4.4 – Germinação dos embriões somáticos .....	32
<b>5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	36

### Capítulo 2

---

#### **CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA DA INDUÇÃO DE EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE MACAÚBA**

<b>1 – INTRODUÇÃO</b> .....	40
<b>2 – MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	41
2.1 – Indução da embriogênese somática .....	41
2.2 – Regeneração dos embriões somáticos .....	42
2.3 – Análise anatômica e histoquímica .....	42
<b>3 – RESULTADOS</b> .....	43



<b>4 – DISCUSSÃO .....</b>	<b>58</b>
<b>5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>62</b>
<b>CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>65</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>66</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Detalhes da palmeira macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Martius). A: Macaúba em seu habitat natural. B: Cachos com frutos de macaúba. C: Detalhe dos frutos. Extraído de Lorenzi et al. (2004)..... 5

### Capítulo 1

#### EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM MACAÚBA A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS

- Figura 1.** A: Amêndoa seccionada de macaúba; seta indica o embrião zigótico. B: Embrião zigótico; rp: região proximal, corresponde ao eixo embrionário; rd: região distal, corresponde à região cotiledonar, fica em contato com o endosperma. C: Calo não-embriogênico ou tipo I obtido, após 60 dias de cultivo em meio com 9 µM de picloram. D: Calo embriogênico ou tipo II obtido após 60 dias em meio com 9 µM de picloram, com aspecto nodular e cor amarela. E: Estruturas globulares semelhantes a embriões somáticos obtidos com 9 µM de picloram, após 70 dias de cultivo..... 22
- Figura 2.** Efeito de tipos de auxina (A) e de TDZ (B) na indução de calos embriogênicos em embriões zigóticos de macaúba. Para cada interação, as barras com as mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste Tukey com  $p=0,05$ ..... 23
- Figura 3.** Diferentes respostas dos embriões zigóticos aos reguladores utilizados na indução de calo embriogênico em macaúba. A: Calo induzido com 9 µM de 2,4-D e 1 µM de TDZ. B: Secção do calo induzido com 2,4-D e TDZ, com região meristemática na periferia do explante. C: Detalhe da região meristemática, com estruturas semelhantes a proembriões e início de formação de células meristemáticas D: Calo induzido com 9 µM de CPA. E: Secção de calo obtido com CPA, com intensa desestruturação das células, e estruturas globulares sem protoderme característica. As setas indicam descamação de células F: Detalhe de uma estrutura globular obtida com CPA. As setas brancas indicam descamação das camadas celulares e a seta preta indica presença de mucilagem, indicando degradação da parede. G: Calo induzido com 9 µM de picloram e 1 µM de TDZ, com estruturas globulares. H: Secção transversal de estruturas geradas com picloram e TDZ, evidenciando possíveis primórdios radiculares. I: Detalhe destes primórdios radiculares com células em disposição concêntrica e ausência de protoderme. A seta branca indica o desenvolvimento de elementos traqueais. ca: região de calo; eg: estruturas globulares; pe: proembrião; pr: primórdios radiculares; rm: região meristemática..... 24
- Figura 4.** Efeito de carvão ativado, TDZ e auxinas na porcentagem de calos de macaúba que formaram estruturas globulares durante a primeira fase de regeneração. Para cada interação, as barras com as mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste Tukey com  $p=0,05$ ..... 25
- Figura 5.** Efeito de tipos de auxina e de TDZ no número de estruturas globulares gerados em calos nodulares de macaúba. As barras com as mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste Tukey com  $p=0,05$ ..... 25
- Figura 6.** A: Embriões somáticos obtidos em tratamento contendo 9 µM de picloram após 180 dias do estabelecimento dos explantes. B: Embriões somáticos em desenvolvimento. C: Secção de embrião somático na fase globular apresentando protoderme, mas sem desenvolvimento de procâmbio. D: Detalhe da protoderme do embrião somático globular. E: Embrião somático na fase cotiledonar. As setas indicam formação de embriões somáticos secundários. F: Secção transversal de embrião somático na fase cotiledonar indicando cordões de procâmbio. G: Detalhe de cordão de procâmbio do embrião somático. H: Secção transversal de embrião somático cotiledonar. A seta indica a formação

de cavidade interna contendo folhas primordiais. I: Embriogênese secundária em embrião somático a partir de brotações. J: Seção de embriões somáticos em divisão. As setas indicam locais de invaginação da protoderme. K: Embrião somático germinado, indicando formação de radícula, e não desenvolvimento da parte aérea. cp: cordão de procâmbio; fp: folha primordial; es: embrião somático; pt: protoderme.....	28
<b>Figura 7.</b> Esquema das principais fases da embriogênese somática de macaúba. O período em dias está relacionado à indução da embriogênese.....	34
<b>Figura 8.</b> Regeneração de plântulas de macaúba. A: Germinação completa de embrião somático de macaúba. B: Regeneração de parte aérea a partir de massas embriogênicas de macaúba.....	35

## Capítulo 2

### CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA DA INDUÇÃO DE EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE MACAÚBA

<b>Figura 1.</b> Seções histológicas do embrião zigótico de macaúba. A: Seção longitudinal com a região proximal que possui uma cavidade contendo a plúmula. A região distal contém basicamente o cotilédone. Pode-se verificar as invaginações da protoderme na base da região distal e cordões de procâmbio ao longo do embrião. B: Seção transversal aproximadamente na linha da seta na região proximal, com a plúmula e os primórdios foliares formados, a fenda cotiledonar e os cordões de procâmbio ao redor da cavidade com a plúmula. C: Seção transversal aproximadamente na linha da seta na região distal, com os cordões de procâmbio distribuídos próximo às invaginações da protoderme. ci: cavidade interna; cp: cordões de procâmbio; fc: fenda cotiledonar; fp: folha primordial; pl: plúmula; pt: protoderme; rp: região proximal; rd: região distal.....	47
<b>Figura 2.</b> A-B: Seções transversais do explante de macaúba aos 10 dias de cultivo em meio para indução de embriogênese somática. A: Detalhe da protoderme e do meristema fundamental. Setas indicam células com núcleos e nucléolos evidentes. B: Detalhe do cordão de procâmbio, com células pouco diferenciadas. C-G: Seções do explante de macaúba aos 20 dias de cultivo em meio para indução de embriogênese somática. C: Seção transversal da região distal do explante com cordões de procâmbio mais diferenciados. Setas brancas indicam divisões das células abaixo da protoderme e as setas pretas indicam pró-embriões em início de desenvolvimento. D: Detalhe dos pró-embriões. Setas indicam a desintegração das paredes e acúmulo de mucilagem. E: Detalhe de um cordão de procâmbio, com início de diferenciação de elementos traqueais (seta). F: Seção transversal da região distal do explante, com acúmulo de grãos de amido (setas pretas) e divisões celulares abaixo da protoderme. A coloração esverdeada das paredes dos elementos traqueais indica lignificação. G: Detalhe da região distal com grãos de amido acumulados nas células abaixo da protoderme. cp: cordão de procâmbio; et: elementos traqueais; pt: protoderme.....	49
<b>Figura 3.</b> Seções do explante de macaúba aos 30 dias de cultivo em meio para indução de embriogênese somática. A: Seção transversal da região distal do explante, onde os cordões de procâmbio já apresentam elementos traqueais com paredes lignificadas e muitas divisões anticlinais e periclinais na protoderme (seta preta) e nas células subjacentes. As setas brancas indicam formação de pró-embriões. B: Detalhe dos pró-embriões. Setas indicam isolamento entre os pró-embriões pelo acúmulo de mucilagem. C: Detalhe dos elementos traqueais diferenciados a partir de células procambiais. D-E: Seção do explante, com acúmulo de grãos de amido em células com citoplasma menos denso, próximo à região de intensa divisão celular. ca: células com grãos de amido; et: elementos traqueais; pe: região com pró-embriões; pt: protoderme.....	50
<b>Figura 4.</b> Seções do explante de macaúba aos 40 dias de cultivo em meio para indução de	

embriogênese somática. A: Seção longitudinal do explante, com formação de massas meristemáticas a partir dos cordões de procâmbio. B: Detalhe das células das massas meristemáticas. Setas indicam células com dois nucléolos. C: Cordões de procâmbio com elementos traqueais diferenciados (lignificados) circundados por massas meristemáticas. Setas pretas indicam elementos traqueais e seta branca, o local de formação de pró-embriões. D: Detalhe dos pró-embriões. Seta indica formação de espaços intercelulares entre os pró-embriões. E: Detalhe dos cordões de procâmbio com elementos traqueais lignificados. As setas indicam divisões celulares. F: Acúmulo de grãos de amido em células com citoplasma pouco denso, próximas ao local de formação de pró-embriões (seta branca). G: Detalhe das células com grãos de amido. cm: células meristemáticas; cp: cordões de procâmbio; et: elementos traqueais; mm: massas meristemáticas; pt: protoderme..... 52

**Figura 5.** Seções do explante de macaúba aos 50 dias de cultivo em meio para indução de embriogênese somática. A: Formação das massas meristemáticas a partir de células do procâmbio. Seta mostra a protoderme do explante sendo eliminada. B: Detalhe dos elementos traqueais entremeados por estruturas globulares. C: Detalhe de células em divisão das massas meristemáticas do procâmbio. D: Formação de estruturas globulares sem protoderme definida. E: Formação de massas meristemáticas próximas às células com acúmulo de grãos de amido. Seta indica elementos traqueais. F: Detalhe das células com acúmulo de grãos de amido. G: Surgimento de estrutura embriogênica por brotação. H: Detalhe da estrutura embriogênica com protoderme definida e células com núcleos e nucléolos evidentes (seta). eg: estruturas globulares; et: elementos traqueais; mm: massa meristemática; ca: células com grãos de amido; pt: protoderme..... 54

**Figura 6.** Calo de macaúba aos 60 dias de cultivo em meio para indução de embriogênese somática. A: Calo nodular com estruturas globulares fusionadas (seta). B: Seção do calo nodular com cordões de procâmbio com elementos traqueais diferenciados e massas meristemáticas muito desenvolvidas. Setas indicam células fenolizadas, com coloração esverdeada. C: Células com grãos de amido e células com compostos fenólicos (setas) indicado pela coloração esverdeada. D: Formação de primórdios radiculares a partir de massas meristemáticas. Seta indica elementos traqueais. E: Estrutura globular semelhante a embrião somático formando-se a partir de massa meristemática. F: Detalhe da estrutura semelhante a embrião somático com protoderme definida (seta). G: Estruturas globulares formadas a partir de calos nodulares. H: Seção das estruturas globulares formadas a partir da massa meristemática, com ausência de organização embriogênica definida. eg: estruturas globulares; es: estrutura globular semelhante a embrião somático; et: elementos traqueais; pr: primórdios radiculares; pt: protoderme..... 56

**Figura 7.** Exemplos de embriões somáticos de origens uni e multicelular. A: Embrião somático de origem unicelular, que se destaca facilmente do calo de origem e não está fusionado aos demais embriões. B: Seção histológica de embrião somático unicelular, com protoderme caracterísrica e não fusionada ao explante de origem. C: Embrião somático de origem multicelular (seta), fusionado ao tecido de origem e a outros embriões somáticos. D: Estrutura embriogênica de origem multicelular, fusionado ao tecido de origem (seta) que dará origem a mais de um embrião somático..... 57

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1

---

#### EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM MACAÚBA A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS

<b>Tabela 1.</b> Combinação de reguladores de crescimento utilizados na indução de embriogênese somática em embriões zigóticos de macaúba.....	15
<b>Tabela 2.</b> Combinação de reguladores de crescimento e carvão ativado utilizados na primeira fase de regeneração de calos embriogênicos de macaúba...	17
<b>Tabela 3.</b> Porcentagem de regeneração de embriões somáticos a partir de massas embriogênicas com EGSEs de macaúba.....	26

## RESUMO

MOURA, Elisa Ferreira D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2007.

**Embriogênese somática em macaúba: indução, regeneração e caracterização anatômica** Orientador: Sérgio Yoshimitsu Motoike. Co-Orientadores: Marília Contin Ventrella, Wagner Campos Otoni e Cláudio Horst Bruckner.

Dentre as espécies oleaginosas que poderiam ser usadas na produção de biodiesel, a macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Martius) se destaca por ser uma palmeira altamente produtiva e adaptada a regiões semi-áridas. Entretanto, esta espécie apresenta problemas quanto à sua propagação e a embriogênese somática pode ser uma alternativa. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi contribuir para o desenvolvimento de protocolos de embriogênese somática nesta espécie. Massas embriogênicas de macaúba foram obtidas após a inoculação de embriões zigóticos maduros em meio de cultivo 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, mas contendo carvão ativado, as massas embriogênicas regeneraram estruturas globulares semelhantes a embriões somáticos (EGSE). Após 120 dias de cultivo em meio contendo picloram e carvão ativado, embriões somáticos se formaram a partir do calo nodular. 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. Contudo, muitos embriões não apresentaram desenvolvimento completo da parte aérea. Quando inoculados no meio original de indução, estes embriões somáticos geraram embriogênese secundária, originando novos embriões somáticos por brotação. O estudo anatômico do processo da indução da embriogênese somática em embriões zigóticos de macaúba evidenciou o surgimento de muitos pró-embriões de origem unicelular no meristema fundamental. Esses pró-embriões se originaram preferencialmente na região distal do embrião, que corresponde à região cotiledonar. Alguns pró-embriões de origem unicelular chegaram às fases mais avançadas, como a fase globular. Os pró-embriões começaram a se formar entre o 10º e o 20º dia, e aos 40 dias já chegavam à fase globular. Entre 30 e 40 dias, houve a formação de massas meristemáticas originadas do crescimento das células procambiais. Essas massas sofreram fragmentação e geraram as EGSEs, que se formaram a partir da massa embriogênica. Algumas das estruturas formadas a partir da massa meristemática

sofreram “epidermização”, levando à formação de embriões somáticos de origem multicelular.

## ABSTRACT

MOURA, Elisa Ferreira D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February of 2007.

**Somatic embryogenesis in macauba: induction, regeneration and anatomical characterization.** Adviser: Sérgio Yoshimitsu Motoike. Co-Advisers: Marília Contin Ventrella, Wagner Campos Otoni and Cláudio Horst Bruckner.

Among oleaginous plants that could be used to produce biodiesel, macauba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Martius) is known as a highly productive and semi-arid adapted palm. However, this species shows some problems regarding to its propagation and somatic embryogenesis can be an alternative. The aim was to contribute to the development of macauba somatic embryogenesis protocols. Macauba embryogenic masses have been obtained 60 days after mature zygotic embryos inoculation on Y<sub>3</sub> culture medium containing picloram or 2,4-D combined or not with TDZ, under light absence. 60 days after culture on regeneration medium, which has had the same induction medium composition plus activated charcoal, embryogenic masses have regenerated globular structures similar to somatic embryos (GSSE). 120 days after culture on medium containing picloram and activated charcoal, somatic embryos had regenerated from nodular callus. These embryos have showed a characteristic protoderm, procambial strands, shoot meristem, and have germinated on Y<sub>3</sub> medium without growth regulators. However, many embryos have not showed a complete shoot development. When inoculated on the original induction medium, somatic embryos have generated secondary embryogenesis, and have originated new somatic embryos by budding. Anatomical studies of somatic embryogenesis induction process on macauba zygotic embryos have proved the emergence of many unicellular originated proembryos in the fundamental meristem. These proembryos have originated mainly on the embryo distal region, which corresponds to the cotyledonary region. Some unicellular-origin proembryos have reached more advanced phases, such as globular phase. Proembryos have began to develop between the 10<sup>th</sup> and the 20<sup>th</sup> day, and by the 40<sup>th</sup> day, they have reached globular phase. Between 30 and 40 days, there has been the generation of meristematic masses generated from procambial cells growth. These masses have showed fragmentation and have generated GSSEs which have arose from



embryonic masses. Some of the structures formed from meristematic masses have passed through “epidermization” leading to multicellular-origin somatic embryos.

## INTRODUÇÃO GERAL

O lançamento do Programa Brasileiro de Biocombustíveis pelo governo nacional em 2002 tem como principal meta desenvolver a tecnologia de produção do biodiesel, visando diminuir a dependência do petróleo, reduzir a emissão de gases causadores do efeito estufa e gerar emprego e renda, principalmente pelo estímulo da agricultura familiar. Atualmente, a produção de biodiesel no Brasil ainda pode ser considerada incipiente, quando se leva em conta a demanda por este produto (Miragaya, 2005). A expectativa do governo brasileiro é chegar aos 3,34 bilhões de litros ao ano até 2010, e atualmente são produzidos 840 milhões de litros ao ano. Apesar destas expectativas, no momento muito ainda se discute a respeito de quais espécies oleaginosas devem ser utilizadas para a produção de biodiesel no Brasil.

A realidade é que o Brasil possui clima propício para o cultivo de uma grande variedade de plantas oleaginosas, nativas ou exóticas, que podem ser adaptadas ao processo. Entre essas espécies, a macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Martius) se destaca por ser uma palmeira altamente produtiva e nativa de regiões semi-áridas, podendo ser recomendada para os agricultores destas áreas. A espécie possui várias aplicações, principalmente no aproveitamento de seus frutos. A polpa é comestível e pode ser consumida *in natura* ou na fabricação de doces. A casca (endocarpo) pode ser aproveitada na fabricação de carvão vegetal (Silva et al., 1986). A amêndoa também pode ter uso alimentício, já que tem alto valor protéico (Hiane et al., 2006). Entretanto, é a propriedade oleaginosa dos frutos de macaúba que vem atraindo mais atenção. A macaúba tem a segunda maior produtividade entre as plantas oleaginosas, com produção de 1500 a 5000 kg de óleo/ha, só ficando atrás de outra palmeira, o dendê (*Elaeis guineensis*). Isso torna a macaúba uma espécie com grande potencial para a produção de biodiesel, já que além de sua grande produtividade, ela se mantém produtiva por mais de 100 anos, apesar de demorar quatro anos para começar a produzir (Teixeira, 2005).

Como mencionado, a produtividade da macaúba só é menor que a do dendê. Considerando que o dendê, ao contrário da macaúba, há muito vem sendo melhorado geneticamente, e a existência de vários cultivares comerciais de dendê já lançados, o potencial produtivo da macaúba se torna ainda maior, ao se comparar as duas espécies. Além disso, o dendê é adaptado a regiões quentes e úmidas e no Brasil é mais comumente cultivado nas regiões Amazônicas e no sul da Bahia. Já a macaúba

poderia ser uma alternativa para as regiões semi-áridas do país, que ocupam 974.752 km<sup>2</sup> de seu território, abrangendo regiões do Nordeste e do Sudeste brasileiros.

O uso da macaúba pode ser estendido para outras regiões do mundo, por sua capacidade de tolerância à seca. Previsões ambientais sinalizam para o aumento do aquecimento global, que atualmente já é sentido, culminando no prolongamento de períodos secos em várias partes do mundo.

A utilização do óleo de macaúba como fonte produtora de biodiesel depende da domesticação da espécie, a fim de se obter maior produção e maior homogeneização do produto. Atualmente, a exploração da macaúba é feita de forma extrativista, aproveitando a ocorrência de grandes populações, principalmente no Norte de Minas Gerais. Entretanto, essas populações são altamente heterogêneas e têm problema de sazonalidade (Motta et al., 2002). Uma das formas de se contribuir para a sua domesticação é gerar o desenvolvimento de tecnologias que visem à otimização da produção, como na propagação de mudas selecionadas a partir de matrizes superiores.

A principal forma de multiplicação das palmeiras é via sementes, e em raras exceções, por divisão de touceiras (Lorenzi et al., 2004). A macaúba não gera touceiras, e só pode ser propagada por sementes. Entretanto, além da propagação por sementes gerar plantios geneticamente desuniformes, há relatos de que a espécie tem difícil germinação (Kobernic, 1971; Pinheiro, 1986). A cultura de tecidos, por meio de técnicas de micropropagação, é uma das alternativas para se obter o processo de propagação clonal em larga escala. A técnica de cultivo de ápices caulinares em palmeiras não vem sendo muito utilizada, já que sua obtenção tem como consequência a inviabilidade da planta doadora. A embriogênese somática é uma técnica de cultura de tecidos que envolve a regeneração de plântulas por meio da obtenção de embriões a partir de tecidos somáticos. Protocolos de embriogênese somática já foram descritos para algumas espécies de palmeiras, utilizando como explantes embriões zigóticos (Teixeira et al., 1993; Huong et al., 1999; Ledo et al., 2002; Sarasan et al., 2002), folhas imaturas (Schwendiman et al., 1988; Guerra & Handro, 1998), inflorescências (Verdeil et al., 1994; Teixeira et al., 1994; Guerra & Handro, 1998) e ovário não fertilizado (Perera et al., 2007), entre outros. Esta técnica vem sendo bastante utilizada para palmeiras com interesse comercial, como *E. guineensis* (Duval et al., 1995) e *Phoenix dactylifera* (Fki et al., 2003). Há alguns anos que clones de dendê obtidos por embriogênese somática vêm sendo testados em

campo experimental, e muitos desses clones vêm produzindo com sucesso, sendo que anomalias devido ao cultivo *in vitro* são raras (Duval et al., 1995). Assim, testes para a obtenção de protocolos de embriogênese somática de macaúba devem ser realizados. Apesar de a embriogênese somática a partir de embriões zigóticos não gerar plantas com o mesmo genótipo materno, ela serve como um modelo para a obtenção do processo a partir de tecidos adultos.

O objetivo geral deste trabalho foi obter a embriogênese somática de macaúba a partir de embriões zigóticos e estudar o início da embriogênese de macaúba por meio de técnicas histológicas.

## REVISÃO DE LITERATURA

### 1 – Aspectos Botânicos da Macaúba

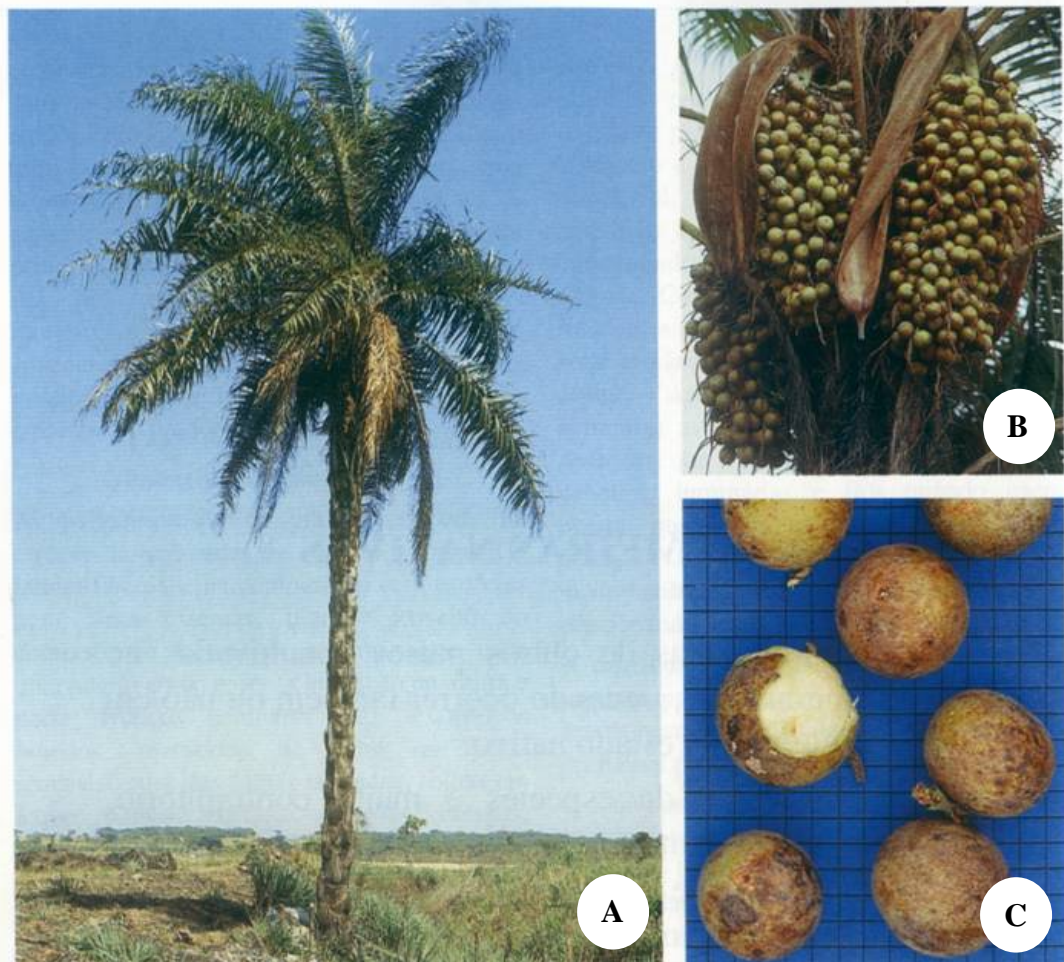
O gênero *Acrocomia* pertence à família Arecaceae, dentro da ordem Arecales, na divisão Liliopsida, pertencente à divisão Magnoliophyta do reino Plantae. *Acrocomia* contém duas espécies, *A. hassleri* e *A. aculeata*. Apesar de serem descritas várias espécies de *Acrocomia*, Henderson et al. (1995) comentam que muitas na verdade são sinônimas de *A. aculeata*, como *A. totai*, *A. mexicana*, *A. media*, *A. vinifera* e *A. sclerocarpa*, entre outras. Já Lorenzi et al. (2004) comentam a existência de três espécies brasileiras de *Acrocomia* e colocam *A. totai* como uma espécie distinta de *A. aculeata*. Por ser um gênero com ampla dispersão geográfica, podendo ocorrer variações morfológicas dentro das mesmas espécies, são necessários mais estudos para caracterizar o número real de espécies de *Acrocomia*.

A espécie *Acrocomia aculeata* se distribui desde a América Central até o sul da América do Sul. No Brasil, ocorre principalmente em Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. Seu principal habitat são áreas de vegetação aberta com alta incidência solar, e é reconhecida como espécie indicadora de solos férteis. A macaúba tem a característica de ser colonizadora de áreas devastadas, sendo muito freqüente em regiões de pastagens.

A planta pode atingir até 15 metros de altura. Seu tronco é do tipo estipe ereto, e apresenta muitos espinhos escuros em sua superfície, especialmente na região dos nós, o que é uma característica do gênero. O caule é coberto pelas bases persistentes das folhas (Figura 1A). As folhas são pinadas e têm de 4 a 5 metros de

comprimento, têm aspecto crispado e possuem espinhos na região central (Lorenzi et al., 2004). As inflorescências ocorrem entre as folhas, são em forma de espádice, apresentam de 80 a 130 cm de comprimento, são pendentes e cobertas por uma bráctea. Assim que a inflorescência alcança a maturidade, a bráctea torna-se túrgida, ficando perpendicular ao caule, e abre-se liberando a inflorescência. As ráquias são dióicas, com flores pistiladas na base e flores estaminadas na extremidade. As flores femininas se tornam maduras antes das flores masculinas, o que caracteriza o processo de protoginia. Apesar de a protoginia ocorrer como forma de evitar a autogamia, a espécie apresenta auto-compatibilidade, e em algumas inflorescências ocorre sobreposição de flores femininas e masculinas maduras (Scariot et al., 1991). Dessa forma, o sistema de reprodução da macaúba é considerado do tipo misto. Segundo Scariot et al. (1991), esta seria uma forma da espécie colonizar novos ambientes. A polinização cruzada é feita por coleópteros das famílias Curculionidae, Nitidulidae e Scarabaedae (Scariot et al., 1991), e a anemofilia também ocorre em menores taxas. A produção de frutos ocorre entre junho e março, tendo picos em outubro e novembro, e a taxa de pegamento dos frutos varia de 25,4 a 28,9% (Scariot & Lleras, 1995). Segundo os autores, a taxa de pegamento pode estar relacionada com a frequência da polinização por seus insetos polinizadores.

O fruto tem forma de drupa globosa, liso, de coloração marrom-amarelada quando maduro e possui polpa amarelada com amêndoa oleaginosa (Figuras 1B,C). O epicarpo rompe-se com facilidade quando maduro. O mesocarpo, que corresponde à polpa, é fibroso, mucilaginoso, de sabor adocicado, rico em glicerídeos e comestível. O endocarpo é fortemente aderido à polpa, com parede escura e, ao ser quebrado, pode liberar de uma a três amêndoas. As amêndoas são compostas por grande quantidade de endosperma, que é comestível e contém alto teor de óleos e proteínas. O embrião zigótico está aderido ao endosperma e tem forma de chave. A dispersão das sementes de macaúba é feita por animais que se alimentam de seus frutos. Esses animais são principalmente mamíferos silvestres, e em regiões de pastagem, animais domésticos também ajudam na dispersão (Scariot, 1998). Alguns animais simplesmente mastigam os frutos, sem ingeri-los, removendo naturalmente o epicarpo e o mesocarpo.



**Figura 1.** Detalhes da palmeira macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Martius). A: Macaúba em seu habitat natural. B: Cachos com frutos de macaúba. C: Detalhe dos frutos. Extraído de Lorenzi et al. (2004).

## 2 – Utilizações da Macaúba

O cultivo da macaúba por produtores traria como benefícios não só a comercialização de óleo para a produção de biodiesel, mas de outros subprodutos. Lorenzi (2006) identificou nove categorias de uso associadas a diferentes partes da macaúba entre populações da região pantaneira. Além da obtenção de óleo a partir dos frutos e sementes, destacam-se o uso de folhas para produção de ração animal e o aproveitamento da polpa dos frutos para fabricação caseira de licores e doces.

Os frutos de macaúba representam a principal fonte de renda relativa à comercialização da espécie. Dos frutos, podem ser aproveitados o endocarpo, a polpa e o endosperma da semente, com diferentes funções. O aproveitamento do óleo extraído dos frutos da macaúba atualmente vem sendo bastante visado, já que este

óleo pode ser aproveitado na produção de biodiesel. O óleo de macaúba pode ser extraído da polpa e da amêndoa, e existem diferenças quanto à composição e as utilidades dos dois tipos de óleo.

O óleo da polpa é alaranjado e contém altas concentrações de vitamina A, enquanto o óleo extraído das amêndoas é transparente. Hiane et al. (2005) verificaram diferenças na composição dos óleos da polpa e da amêndoa. Enquanto a polpa gera 16,5% de rentabilidade de óleo, a amêndoa gera 52,9%. A quantidade de ácidos graxos saturados do óleo da polpa é menor (25,52%) que a do óleo de amêndoa (46,69%). Com relação aos tipos de ácidos graxos, os dois tipos de óleo contêm ácido oléico como principal constituinte. Entretanto, o segundo ácido graxo mais abundante no óleo da amêndoa é o ácido láurico, enquanto o segundo mais abundante no óleo de polpa é o ácido palmítico. Os óleos láuricos, como são chamados aqueles que contêm grande taxa de ácido láurico em sua composição, são utilizados na indústria de cosméticos. O óleo da amêndoa de macaúba tem similaridade com o óleo de oliva, podendo substituí-lo (Pio-Corrêa, 1984). Por isso, atualmente os óleos da amêndoa e da polpa vem recebendo valores distintos no mercado, e isso garante uma valorização a mais ao cultivo da macaúba.

Um dos problemas da produção de biodiesel em usinas é a geração de subprodutos como a glicerina, farelo e tortas (Teixeira, 2005). Na produção a partir de frutos de mamona (*Ricinus comunis*), por exemplo, a torta, que poderia ser usada como ração animal, não pode ter esse destino, devido à presença de substâncias tóxicas, como a ricina. No caso da macaúba, as tortas obtidas da polpa e da amêndoa têm alto valor energético, podendo ser usadas como ração para animais domésticos. A torta de amêndoa também tem alta concentração de proteínas, podendo também ser utilizado na produção de alimentos para consumo humano.

Como mencionado, as amêndoas contêm alta porcentagem de proteínas. Hiane et al. (2006) identificaram 17,6% de proteínas na composição do endosperma de macaúba. As análises mostraram que, apesar de haver deficiência de alguns aminoácidos, como treonina e lisina, a amêndoa é rica em metionina, cisteína, valina e leucina. Outra vantagem do uso da amêndoa como fonte protéica é a ausência de proteases, que melhora a sua digestibilidade.

Além do uso do fruto na obtenção de óleo, ração e alimentos, o endocarpo pode ser utilizado na fabricação de carvão (Silva et al., 1986). O carvão do

endosperma de macaúba pode ser utilizado em operações metalúrgicas e siderúrgicas e pode ter uso gasogênico e doméstico.

Um dos problemas da macaúba é o seu longo período juvenil, já que a espécie pode demorar até 7 anos para produzir. No entanto, a macaúba pode ser cultivada em consórcio com outras oleaginosas com potencial para produção de biodiesel, como pinhão-manso e girassol (Teixeira, 2005), que garantiriam o sustento dos produtores até o amadurecimento das macaúbas.

### 3 - Embriogênese Somática

A embriogênese somática é definida como o processo de formação de uma estrutura bipolar que passa pelas fases características da embriogênese zigótica, levando à formação de plântulas. A embriogênese somática tem suas aplicações potencializadas quando há ocorrência de embriogênese somática secundária, que é a produção de novos embriões a partir de embriões somáticos pré-existentes. Os sistemas de calos embriogênicos são altamente regeneráveis, podem gerar grande número de propágulos e se manter por longos períodos. Há relatos de manutenção de calos embriogênicos por até 12 anos (McLean et al., 1999).

A manutenção de culturas embriogênicas tem inúmeras aplicações no cultivo de plantas (Raemarkers et al., 1995). Em culturas com ciclo de vida longo, a preservação de linhagens embriogênicas pode ser uma maneira eficiente de manter genótipos que ainda estão sob avaliação. Além disso, as culturas embriogênicas representam um sistema bastante eficiente para a aplicação de técnicas de biotecnologia, como transformação genética, indução e seleção de mutações e regeneração de plantas haplóides. A embriogênese somática também pode ser um meio eficiente para a produção de sementes sintéticas e como fonte de explantes para a criopreservação de espécies em extinção.

A propagação em larga escala de mudas por embriogênese somática já foi relatada para algumas espécies. Para plantas lenhosas, a embriogênese somática representa uma importante via de propagação, já que na organogênese muitas vezes a pouca produção de brotos por explante não compensa o seu uso comercial. Entre as gimnospermas, há exemplos de sistemas de embriogênese somática altamente regenerativos para *Picea abies* (von Arnold et al., 1995) e *Araucaria angustifolia* (Guerra et al., 1999). Além disso, em muitos casos, a embriogênese somática é a



única forma de propagação *in vitro*, como para palmeiras em geral e para *Theobroma cacao* (Maximova et al., 2002). A micropropagação tem maior importância, no caso de plantas alógamas, quando é induzida a partir de tecidos da planta adulta. Isso indica que há produção de propágulos com o mesmo genótipo dos cultivares comerciais. A obtenção de embriogênese somática a partir de tecidos adultos vem sendo utilizada com sucesso em *Coffea*, onde a indução de embriogênese somática é realizada a partir de tecidos foliares adultos (Etienne, 2005). Outra vantagem do uso de embriões somáticos para micropropagação em larga escala é a ausência de manipulação do material para separação dos brotos, enraizamento e aclimação, já que os embriões evoluem nos cultivos em suspensão celular ou biorreatores de forma isolada e são bipolares.

Já existem relatos de que a produção de mudas por embriogênese somática pode ser um processo viável. Etienne-Barry et al. (1999) realizaram a semeadura direta no solo de embriões somáticos de *Coffea arabica* derivados de produção em biorreator e verificaram taxa de conversão de plântulas *ex vitro* entre 50 e 70%. Os autores afirmam que uma das vantagens desta metodologia é a eliminação do processo de aclimação de plântulas germinadas *in vitro* em casas de vegetação. Já existem campos de experimentação para avaliar a viabilidade de plantas obtidas por embriogênese somática de *Elaeis guineensis* (Rival et al., 2001), planta que também possui protocolos de regeneração de embriões somáticos a partir de tecidos adultos. O uso de biorreatores na propagação de *E. guineensis* também já vem sendo testado (Gorret et al., 2004).

O entendimento de processos de indução, multiplicação e maturação dos embriões somáticos pode levar ao desenvolvimento de processos automatizados de embriogênese somática, diminuindo a mão-de-obra e barateando a sua utilização.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Duval Y, Engelmann F, Durand-Gasselín T Somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) In: Bajaj YPS (ed) **Biotechnology in Agriculture and Forestry 30: Somatic embryogenesis and synthetic seed I**, Springer-Verlag:Berlin, p. 335-352, 1995.

Etienne H Somatic embryogenesis protocol: coffee (*Coffea arabica* L. and *C. canephora* P.). In: Jain SM, Gupta K. **Protocol for somatic embryogenesis in Woody Plants**. Springer Netherlands, p. 167-179, 2005.

Etienne-Barry D, Bertrand B, Vasquez N, Etienne H Direct sowing of *Coffea arabica* somatic embryos mass-produced in a bioreactor and regeneration of plants. **Plant Cell Reports** 19: 111-117, 1999.

Fki L, Masmoudi R, Drira N, Rival A An optimized protocol for plant regeneration from embryogenic suspension cultures of date palm *Phoenix dactylifera* L., cv. Deglet Nour. **Plant Cell Reports** 21: 517-524, 2003.

Gallo-Meagher M, Green J Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of saw palmetto, an important landscape and medicinal plant. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 68: 253-256, 2002.

Gorret N, bin Rosli SK, Oppenheim SF, Willis LB, Lessard PA, Rha CK, Senskey AJ Bioreactor culture of oil palm (*Elaeis guineensis*) and effects of nitrogen source, inoculum size and conditioned medium on biomass production. **Journal of Biotechnology** 108: 253-263, 2004.

Guerra MP, Handro W Somatic embryogenesis and plant regeneration in different organs of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae): control and structural features. **Journal of Plant Research** 111: 65-71, 1998.

Guerra MP, Torres AC, Teixeira JB Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: Torres AC, Caldas LS, Buso JA **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas v.2**. Brasília: Embrapa-CBAB, p.533-568, 1999.

Henderson A, Galeano G, Bernal R **Field guide to the palms of the Americas**. New Jersey, Princeton University, 1995. p. 166-167.

Hiane PA, Ramos-Filho MMR, Ramos MIL, Macedo MLR Óleo da polpa e amêndoa de bociúva, *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. Caracterização e composição em ácidos graxos. **Brazilian Journal of Food Technology** 8: 256-259, 2005.

Hiane PA, Baldasso PA, Marangoni S, Macedo MLR. Chemical and nutritional evaluation of kernels of bociúva, *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** 26: 683-689, 2006.

Huong LT, Balocco M, Huy BP, Mezzette B, Santilocchi R, Rosatti P Somatic embryogenesis in Canary Island date palm. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 56: 1-7, 1999.

Koebornik J Germination of palm seed. **Principes** 15: 134-137, 1971.

Ledo AS, Lameira OA, Benbadis AK, Menezes IC, Oliveira MSP, Medeiros-Filho S Somatic embryogenesis from zygotic embryos of *Euterpe oleracea* Mart. **Revista Brasileira de Fruticultura** 24: 601-603, 2002.

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

Lorenzi H, Souza H, Costa JTM, Cerqueira LSC, Ferreira E **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2004. 432 p.

Maximova S, Alemanno, Young A, Ferriere N, Traore A, Gultinan M Efficiency, genotypic variability and cellular origin of primary and secondary somatic embryogenesis of *Theobroma cacao*. **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant** 38: 252-259, 2002.

McLean NL, Nelke M, Nowak J, Wright JM Meiotic chromosome pairing, isozyme analyses and ferritin expression in a red clover mutant capable of somatic embryogenesis. **Annals of Botany** 83: 315-323, 1999.

Miragaya JCG Biodiesel: tendências no mundo e no Brasil. **Informe Agropecuário** 26: 7-13, 2005.

Motta PE, Curi N, Oliveira-Filho AT, Gomes JBV Ocorrência de macaúba em Minas Gerais: relação com atributos climáticos, pedológicos e vegetacionais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 37: 1023-1031, 2002.

Perera PP, Hoche V, Verdeil JL, Doubeau S, Yakandawala DMD, Weerakoom LK Unfertilized ovary: a novel explant for coconut (*Cocos nucifera* L.) somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports** 26: 21-28, 2007.

Pinheiro CUB **Germinação de sementes de palmeiras**. Teresina, Embrapa-UEPAE, 1986. 102p.

Pio-Corrêa M **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas (6 volumes)**. Rio de Janeiro IBDF, 1984.

Raemarkers CJJM, Jacobsen E, Visser RGF Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. **Euphytica** 81: 93-107, 1995.

Rival A, Tregear J, Jaligot E, Morcillo F, Aberlenc F, Billotte N, Richaud F, Beule T, Bogel A, Duval Y Oil palm biotechnology: progress and prospects. **OCL-1 Corps. Grass. Lipids** 8: 295-306, 2001.

Sarasan V, Ramsay MM, Roberts AV 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** 20: 1107-1111, 2002.

Scariot A Seed dispersal and predation of the palm *Acrocomia aculeata*. **Principes** 42: 5-8, 1998.

Scariot AO, Lleras E, Hay JD Reproductive biology of the palm *Acrocomia aculeata* in Central Brazil. **Biotropica** 23: 12-22, 1991.

Scariot A, Lleras E Flowering and fruiting phenologies of the palm *Acrocomia aculeata*: patterns and consequences. **Biotropica** 27: 168-173, 1995.

Schwendiman J, Pannetier C, Michaux-Ferriere N Histology of somatic embryogenesis from leaf explants of the oil palm *Elaeis guineensis*. **Annals of Botany** 62: 43-52, 1988.

Silva JC, Barrichelo LEG, Brito JO Endocarpos de babaçu e macaúba comparados a madeira de *Eucalyptus grandis* para a produção de carvão vegetal. **IPEF** 34: 31-34, 1986.

Teixeira JB, Sandahl MR, Kirby EG Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of oil palm. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 34: 227-233, 1993.

Teixeira JB, Sandahl MR, Kirby EG Somatic embryogenesis from immature inflorescences of oil palm. **Plant Cell Reports** 13: 247-250, 1994.

Teixeira LC Potencialidades de oleaginosas para produção de biodiesel. **Informe Agropecuário** 26: 18-27, 2005.

Verdeil JL, Huet C, Grosdemange F, Buffard-Morel J Plant regeneration from cultured immature inflorescences of coconut (*Cocos nucifera* L.): evidence for somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports** 13: 218-221, 1994.

Von Arnold S, Clapham D, Egertsdotter U, Ekberg I, Mo H, Yibrah H Somatic embryogenesis in Norway spruce (*Picea abies*) In: Bajaj YPS (ed) **Biotechnology in Agriculture and Forestry 30: Somatic embryogenesis and synthetic seed I**, Springer-Verlag:Berlin, p. 415-430, 1995.

## CAPÍTULO 1

# EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM MACAÚBA A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS

## 1 - INTRODUÇÃO

Com a crescente demanda de energia pelos países e o incontestável esgotamento das reservas mundiais de petróleo, torna-se essencial a busca por novas fontes de energia que, de preferência, sejam renováveis. Aliado ao esgotamento das reservas mundiais, conflitos internacionais têm contribuído para o aumento do preço do barril de petróleo, e há estimativas de que seu valor chegue a US\$100,00 até o início da próxima década. Frente a esta realidade, o uso do biodiesel, derivado de óleos vegetais ou animais, vem sendo considerado uma boa alternativa como substituto dos derivados de petróleo. O biodiesel, que representa uma fonte de energia renovável e biodegradável, tem menor emissão de gases poluentes e causadores do efeito estufa e pode gerar muitos empregos na agricultura. A exportação de biocombustíveis, ou simplesmente de sua matéria prima, representaria fonte adicional de divisas para os países produtores.

Dentre as espécies oleaginosas que poderiam ser usadas na produção de biodiesel, a macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Martius) se destaca por ser uma palmeira produtiva e adaptada a regiões semi-áridas, podendo ser recomendada para os agricultores dessas áreas. A espécie tem ampla dispersão na América, ocorrendo desde o sul do México e Antilhas até o sul do Brasil, podendo também ser encontrada no Paraguai e na Argentina. A macaúba tem a segunda maior produtividade entre as plantas oleaginosas (Tickel, 2000), com produção de 1500 a 5000 kg de óleo/ha, só ficando atrás de outra palmeira, o dendê (*Elaeis guinnensis*). Considerando que o dendê, ao contrário da macaúba, já vem sendo melhorado geneticamente há décadas, com vários cultivares comerciais já lançados, o potencial produtivo da macaúba se torna ainda maior, ao se comparar as duas espécies. Concomitante a isso, o dendê é adaptado a regiões quentes e úmidas, enquanto a macaúba é adaptada a longos períodos de seca. Essa característica torna a macaúba uma boa opção para os países que têm grande ocorrência de regiões semi-áridas (Arkcoll, 1990), que inclui países dos continentes americano, africano e Oceania. Além disso, previsões ambientais sinalizam para o aumento do aquecimento global,

que já vem ocorrendo atualmente, culminando no prolongamento de períodos secos em várias partes do mundo. Assim, a busca por culturas mais adaptadas às condições de semi-aridez e aridez é fundamental.

A utilização do óleo de macaúba como fonte produtor de biodiesel depende da domesticação da espécie, com o objetivo de se obter maior produtividade e maior homogeneidade na produção. Nos países em que ocorre, a exploração da macaúba é feita de forma extrativista, aproveitando a ocorrência de grandes populações da espécie. Entretanto, populações nativas geralmente são altamente heterogêneas e tem problema de sazonalidade (Motta et al., 2002). Uma das formas de se contribuir para a domesticação da macaúba é com o desenvolvimento de tecnologias que visem otimizar sua produção, como na propagação de clones selecionados de matrizes superiores.

Além do potencial da macaúba como produtora de óleo para produção de biodiesel, seu endocarpo pode ser utilizado para a produção de carvão vegetal (Silva et al., 1986). O carvão gerado a partir de endocarpo de macaúba pode ter uso gasogênico, em operações metalúrgicas e siderúrgicas e para uso doméstico, com a vantagem de não ser um processo destrutivo. A produção de carvão seria um subproduto do cultivo da macaúba para geração de biodiesel, além de ser uma alternativa ao desmatamento de árvores nativas.

Contudo, devido à sua natureza morfoanatômica e fisiológica, não é possível obter a propagação vegetativa da macaúba por métodos convencionais (Lorenzi et al., 2004). A cultura de tecidos, por meio de técnicas de micropropagação, é uma das alternativas de se obter o processo de propagação clonal em larga escala. A técnica de cultivo de ápices caulinares em palmeiras não vem sendo muito utilizada, já que sua obtenção tem como consequência a inviabilidade da planta doadora. A embriogênese somática é uma técnica de cultura de tecidos que envolve a regeneração de plântulas por meio da obtenção de embriões a partir de tecidos somáticos. Protocolos de embriogênese somática já foram descritos para algumas espécies de palmeiras, utilizando como explantes embriões zigóticos (Teixeira et al., 1993, Huang et al., 1999, Ledo et al., 2002, Sarasan et al., 2002), folhas imaturas (Schwendiman et al., 1988; Guerra & Handro, 1998) e inflorescências (Verdeil et al., 1994; Teixeira et al., 1994; Guerra & Handro, 1998), entre outros. Esta técnica vem sendo bastante utilizada para palmeiras com interesse comercial, como *Elaeis guineensis* (Duval et al., 1995) e *Phoenix dactylifera* (Fki et al., 2003). Há alguns

anos que clones de dendê obtidos por embriogênese somática vêm sendo testados em campo experimental, e muitos desses clones vêm produzindo com sucesso, sendo que anomalias devido ao cultivo *in vitro* são raras (Duval et al., 1995). Dessa forma, tornam-se importantes testes para a obtenção de protocolos de embriogênese somática de macaúba.

Considerando que a embriogênese somática é uma importante forma de propagação de clones de palmáceas e de estudos nessa área com macaúba são incipientes, o objetivo deste trabalho foi estudar a embriogênese somática de macaúba a partir de embriões zigóticos.

## **2 – MATERIAL E MÉTODOS**

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos e Células Vegetais do setor de Fruticultura, Departamento de Fitotecnia e no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa em Minas Gerais, Brasil. Foram utilizados no trabalho embriões zigóticos obtidos de frutos maduros de macaúba, coletados de plantas adultas de populações naturais do Estado de Pernambuco, Brasil.

### **2.1 - Indução da embriogênese somática**

Após coleta, os frutos foram armazenados em ambiente ventilado e sombreado por aproximadamente 20 dias. Logo após esse período, os frutos foram processados, removendo-se manualmente o mesocarpo e o epicarpo. O endocarpo foi quebrado com auxílio de um torno mecânico para obtenção das amêndoas. As amêndoas foram previamente lavadas com água e sabão líquido, posteriormente lavadas com Detertec 50% e então desinfestadas da seguinte forma: 15 minutos em HgCl<sub>2</sub> a 0,01%, 30 minutos em NaOCl a 6% e mais 20 minutos em nova solução de NaOCl a 6%. Entre cada etapa, as amêndoas foram enxaguadas com água destilada autoclavada por três vezes. Em câmara de fluxo laminar, as amêndoas foram seccionadas (Figura 1A) e o embrião zigótico foi retirado com auxílio de pinças e bisturi de lâmina fixa. Os embriões foram inoculados em tubos de ensaio de dimensão 25 x 150 mm com tampa de polipropileno contendo 10 mL de meio básico (MB). O MB foi composto de sais de Y<sub>3</sub> (Euweens, 1978), 68,46 g.L<sup>-1</sup> de sacarose,

1g.L<sup>-1</sup> de caseína hidrolisada, 100 mg.L<sup>-1</sup> de mio-inositol, solidificado com 2,5 g.L<sup>-1</sup> de Gelrite<sup>®</sup> (Sigma, USA) e suplementado com diferentes combinações de reguladores de crescimento, visando a indução de calos embriogênicos. Ao todo, obtiveram-se oito tratamentos, detalhados na Tabela 1, gerando um fatorial 4x2 (tipos de auxinas x TDZ). Os tratamentos de indução foram denominados Ti. O experimento foi instalado na forma de delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições, com parcela de três tubos, com um embrião por tubo. Os tubos foram mantidos em sala de crescimento, no escuro, a 25±2°C por 60 dias. Após este período de incubação, determinou-se a porcentagem de explantes com formação de calos embriogênicos. Os dados foram submetidos à análise de variância. Foi realizada a análise de variância dos tratamentos com o tratamento controle e as diferenças entre as médias dos tratamentos Ti1 a Ti8 foram verificadas pelo teste de Tukey a 5%. Ao final desta fase, calos obtidos nos tratamentos Ti1, Ti2, Ti3 e Ti8 (Tabela 1) foram coletados para estudos histológicos.

**Tabela 1.** Combinação de reguladores de crescimento utilizados na indução de embriogênese somática em embriões zigóticos de macaúba.

<b>Tratamento</b>	<b>Reguladores de crescimento</b>
Ti0 (controle)	-
Ti1	9 µM de picloram + 1 µM de TDZ
Ti2	9 µM de picloram
Ti3	9 µM de 2,4-D + 1 µM de TDZ
Ti4	9 µM de 2,4-D
Ti5	9 µM de NOA + 1 µM de TDZ
Ti6	9 µM de NOA
Ti7	9 µM de CPA + 1 µM de TDZ
Ti8	9 µM de CPA

## 2.2 - Regeneração dos embriões somáticos

Na etapa de regeneração de embriões somáticos, estudou-se o efeito de três fatores, auxina, TDZ e carvão ativado, em um fatorial 2x2x2 (auxinas x TDZ x carvão ativado) instalado em delineamento inteiramente casualizado, sendo MB o



meio basal, gerando oito tratamentos (Tabela 2). Os tratamentos de regeneração foram denominados Tr. Cada tratamento foi composto de cinco repetições, com parcela de três tubos de ensaio de dimensão 25 x 150 mm, contendo uma massa embriogênica de aproximadamente 5,0 mm de diâmetro por tubo. Os calos utilizados nesta etapa apresentaram aspecto nodular e cor amarelada e foram obtidos na fase de indução. Após a inoculação, os tubos foram incubados no escuro em sala de cultivo e mantidos a  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Após 60 dias de incubação, avaliou-se a porcentagem de explantes que geraram estruturas globulares semelhantes a embriões somáticos (EGSE). Os dados foram submetidos à análise de variância, sendo as interações significativas desdobradas e as diferenças entre as médias verificadas pelo teste de Tukey a 5%. Ao final desta etapa, massas embriogênicas contendo EGSE de Tr3 (Tabela 2) foram coletadas para estudos histológicos.

Após a avaliação, os tratamentos sem carvão ativado (Tr2, Tr4, Tr6 e Tr8) foram eliminados do experimento e as massas embriogênicas dos tratamentos remanescentes (Tr1, Tr3, Tr5 e Tr7), repicadas para placas de Petri de poliestireno com 90 x 15 mm de dimensão vedadas com filme de PVC transparente. Nesta fase, o experimento foi instalado em esquema fatorial 2 x 2 (tipo de auxinas x TDZ) em delineamento inteiramente casualizado. Cada placa continha 30 mL de novo meio enriquecido com  $3 \text{ g.L}^{-1}$  de carvão ativado e com as suas respectivas concentrações de reguladores de crescimento (Tabela 2). As placas foram vedadas com filme de PVC transparente (Goodyear, Brasil). Nesta fase o experimento passou a ter quatro tratamentos e seis repetições, com parcela constituída por uma placa de Petri com quatro massas embriogênicas de, aproximadamente, 5,0 mm de diâmetro. Após a repicagem, as placas de Petri foram incubadas em sala de cultivo e mantidos em fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de  $30 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , obtido com lâmpadas fluorescentes de 40W e temperatura de  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , sendo o meio de cultura trocado a cada 60 dias. Aos 120 dias da repicagem, determinou-se o número de EGSE produzidos por tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias testadas pelo teste de Tukey a 5%. Uma nova avaliação realizou-se aos 180 dias, quando se determinou a porcentagem de massas embriogênicas que regeneraram embriões somáticos e o número de embriões somáticos formado em cada tratamento.

### 2.3 - Multiplicação dos embriões somáticos (embriogênese secundária)

Para obtenção da multiplicação dos embriões somáticos, estes foram resgatados do tratamento Tr3 e transferidos para placas de Petri de poliestireno com 90 x 15 mm de dimensão, contendo 30 mL de meio MB, suplementado com 9  $\mu\text{M}$  de picloram ou 20  $\mu\text{M}$  de picloram + 300  $\text{mg.L}^{-1}$  de carvão ativado. Após a inoculação, as placas de Petri foram mantidas no escuro a  $25\pm 2^\circ\text{C}$  por 60 dias, quando se avaliou a porcentagem de embriões somáticos com desenvolvimento de embriogênese secundária. Ao final desta etapa, alguns materiais foram selecionados para estudos histológicos.

**Tabela 2.** Combinação de reguladores de crescimento e carvão ativado utilizados na primeira fase de regeneração de calos embriogênicos de macaúba.

Tratamento	Auxina	Carvão ativado*	Citocinina
Tr1	9 $\mu\text{M}$ de picloram	3 $\text{g.L}^{-1}$	1 $\mu\text{M}$ de TDZ
Tr2	9 $\mu\text{M}$ de picloram	-	1 $\mu\text{M}$ de TDZ
Tr3	9 $\mu\text{M}$ de picloram	3 $\text{g.L}^{-1}$	-
Tr4	9 $\mu\text{M}$ de picloram	-	-
Tr5	9 $\mu\text{M}$ de 2,4-D	3 $\text{g.L}^{-1}$	1 $\mu\text{M}$ de TDZ
Tr6	9 $\mu\text{M}$ de 2,4-D	-	1 $\mu\text{M}$ de TDZ
Tr7	9 $\mu\text{M}$ de 2,4-D	3 $\text{g.L}^{-1}$	-
Tr8	9 $\mu\text{M}$ de 2,4-D	-	-

\*Ecibra, Brasil

### 2.4 - Germinação dos embriões somáticos

Os embriões somáticos em fase cotiledonar foram isolados de Tr3, na etapa final de regeneração e cultivados em meio MB, suplementado com 3,0  $\text{g.L}^{-1}$  de carvão ativado, em tubos de ensaio, contendo 10 mL de meio de cultura. Os tubos foram incubados em sala de cultivo e mantidos com fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 30  $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , obtido com lâmpadas fluorescentes de 40W e temperatura de  $25\pm 2^\circ\text{C}$ .

Todos os meios de cultura utilizados neste trabalho tiveram seu pH aferido para 5,7 e foram autoclavados a 121°C e 1,5 atm por 20 minutos. Para meios em placas de Petri, os meios de cultura foram autoclavados em frascos Erlenmeyer de 500 mL e vertidos nas placas em câmara de fluxo laminar.

## 2.5 - Análise histológica

Para a obtenção dos cortes anatômicos, o material foi fixado em FAA<sub>50</sub> (formol: ácido acético: álcool etílico<sub>50%</sub>, na proporção de 5: 5: 90) e estocado em etanol 70% (Johansen, 1940). As amostras foram incluídas em metacrilato (Historesin-Leica), de acordo com as recomendações do fabricante. O material emblocado foi seccionado transversal e longitudinalmente em micrótomo rotativo, com 6 µm de espessura. O material foi corado com azul de toluidina, para metacromasia (O'Brien et al., 1964) e submetido ao reagente de Lugol (Johansen, 1940) para a detecção de amido, e as lâminas montadas em resina sintética (Permount®). As imagens foram obtidas em fotomicroscópio (Olympus AX70) equipado com sistema U-photo.

## 3 - RESULTADOS

### 3.1 - Indução da embriogênese somática

No total, 135 embriões zigóticos foram estabelecidos *in vitro* sem ocorrência de perdas por oxidação ou contaminações biológicas, o que indica que o protocolo de desinfestação foi eficiente e não causou danos aos explantes.

Com 30 dias do estabelecimento dos explantes em meio de indução, os calos começaram a se formar, principalmente na região distal do embrião zigótico, que corresponde à região cotiledonar (Figura 1B). Aos 60 dias, todos os tratamentos, com exceção do tratamento controle, formaram calo. Houve diferença entre os efeitos do tratamento controle e dos tratamentos contendo reguladores de crescimento. Durante o período de 60 dias, os embriões zigóticos em meio com reguladores de crescimento intumesceram, triplicando de tamanho.

O tratamento contendo NOA, sem TDZ (Ti5), além de ter gerado calo, induziu a germinação de 36% dos embriões zigóticos. Com relação ao tipo de calo

formado, as diferenças entre os explantes submetidos a diferentes tratamentos foram evidentes. Houve a formação de dois tipos de calo: calo tipo I ou não embriogênico (Figura 1C) e calo tipo II, ou embriogênico (Figura 1D). O calo tipo I apresenta coloração branca e aparência esponjosa. Já o calo tipo II apresenta aspecto nodular e cor amarelada e possui estruturas globulares, que ocasionalmente se destacam do calo. Alguns dos embriões formam estruturas semelhantes a feixes, que frequentemente se rompem próximo aos 60 dias, ou após este período, liberando muitas EGSEs (Figura 1E).

Houve interação entre o TDZ e os tipos de auxina na obtenção de calo tipo II (Figuras 2A,B). Entre as auxinas testadas, o 2,4-D e o picloram foram os mais eficientes na indução de calo tipo II, tanto na presença quanto na ausência de TDZ (Figura 2A). Já o NOA e o CPA apresentaram, em geral, menores índices de indução de calo tipo II (Figura 2B). Com relação ao efeito do TDZ, só houve diferença na combinação com o 2,4-D, onde a presença de TDZ aumentou em 33,6% a indução do calo tipo II (Figura 2B).

Seções histológicas dos calos obtidos com 2,4-D + TDZ (Figura 3A) mostraram formação de áreas meristemáticas (Figura 3B). Estas áreas se distinguiram das demais regiões do explante por apresentarem células pequenas, com citoplasma denso e alta relação núcleo/citoplasma. Intercaladas a estas regiões meristemáticas, ocorreram muitos elementos traqueais diferenciados e alguns pró-embriões (Figura 3C).

As seções histológicas dos calos induzidos com o CPA (Figura 3D) apresentaram estruturas globulares sem protoderme característica (Figuras 3E,F). Este calo foi bastante instável, apresentando sinais de degradação dos tecidos com descamação de células. A coloração com azul de toluidina demonstrou a presença de mucilagem entre as células, o que indica a degradação de parede celular em calos obtidos com CPA (Figura 3F).

Apesar de ter sido verificada formação de calo semelhante a calo tipo II em tratamentos com picloram + TDZ, a análise histológica destes calos mostrou que muitas estruturas que se assemelham a embriões somáticos (Figura 3G), na verdade não possuem protoderme definida, têm massa de células com organização concêntrica e vários elementos traqueais desenvolvidos e provavelmente correspondem a primórdios radiculares (Figuras 3H,I).

### 3.2 - Regeneração dos embriões somáticos

Na fase de regeneração das massas embriogênicas em embriões somáticos, foram descartadas as massas obtidas com NOA e CPA, uma vez que o NOA foi ineficiente na obtenção de calo tipo II e as análises histológicas demonstraram que o CPA gerou calo com degradação celular (Figuras 3E, F). Nesta fase de regeneração, houve efeito positivo do carvão ativado e efeito negativo do TDZ na concentração de 1  $\mu\text{M}$ , na formação de EGSE nos calos (Figura 4). Em tratamentos com carvão ativado a porcentagem de explantes com formação de EGSE foi 40% superior aos tratamentos sem carvão ativado (Figura 4). Na ausência de carvão ativado, observou-se também maior escurecimento dos tecidos dos calos, principalmente da região em contato com o meio de cultura. Já na presença de TDZ, a porcentagem de explantes com formação de EGSE foi 36,7% inferior aos tratamentos sem TDZ (Figura 4). Os efeitos das auxinas utilizadas, 2,4-D e picloram, foram semelhantes (Figura 4).

Após 120 dias da repicagem das massas embriogênicas para novo meio de cultura, não houve interação entre o TDZ e as auxinas testadas, quanto ao número de EGSE formadas (Figura 5). Contudo, a presença de TDZ a 1  $\mu\text{M}$  foi deletéria para a formação de EGSE. Em meio com TDZ, o número de EGSE geradas foi em média 5,42 vezes menor que na ausência de TDZ (Figura 5). Em geral, calos tratados com o TDZ se tornaram mais compactos, perdendo a capacidade de regeneração de EGSE. Apesar de não ter havido diferenças estatísticas entre tratamentos com auxina, observou-se um maior número de EGSE em tratamentos com o picloram (Figura 5). Aos 180 dias de cultivo, somente as massas cultivadas em Tr3 regeneraram embriões somáticos (Tabela 3). Esses embriões apresentaram cor esbranquiçada e eram, na maioria, globulares (Figuras 6A, B). A análise histológica de embriões somáticos na fase globular demonstrou haver uma protoderme típica, mas sem sinais de formação de procâmbio (Figura 6C, D). Alguns embriões em fase torpedo apresentaram embriogênese secundária, por meio de brotações (Figura 6E). Embriões em fase cotiledonar apresentavam cordões de procâmbio bem distintos (Figura 6F,G) e uma cavidade interna contendo o meristema apical (Figura 6H), como ocorre no embrião zigótico de macaúba.

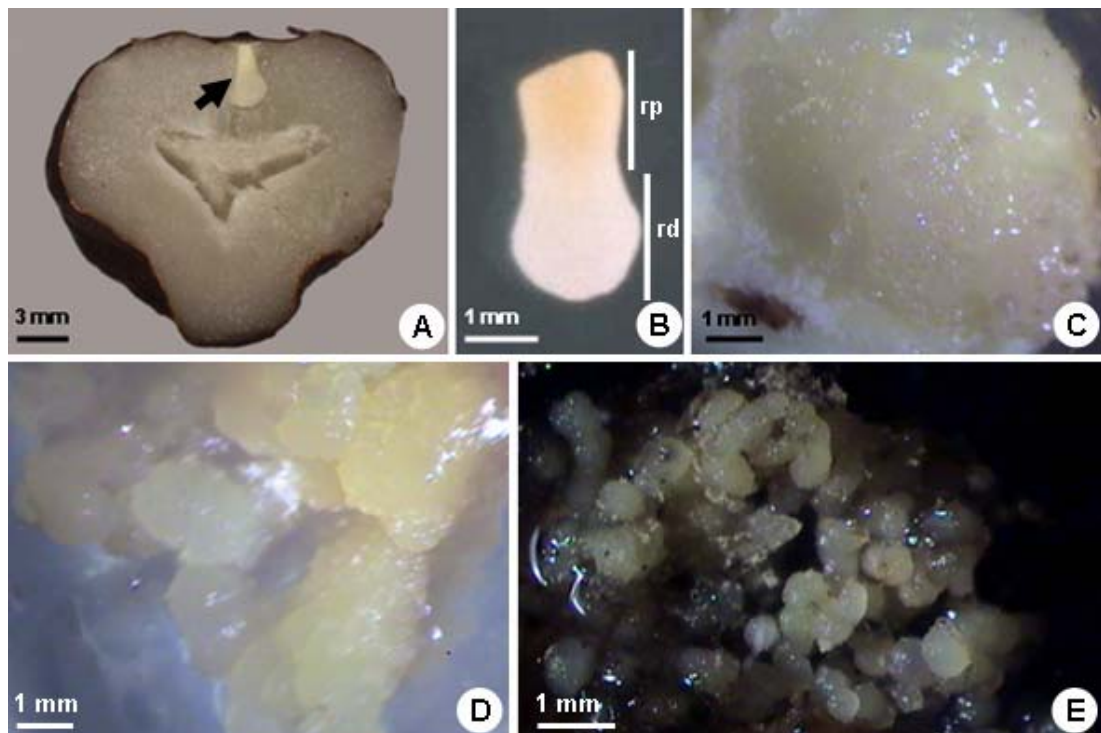
### 3.3 - Multiplicação dos embriões somáticos (embriogênese secundária)

A multiplicação de embriões somáticos ocorreu após 60 dias do resgate e transferência de embriões para meio MB + 9  $\mu\text{M}$  de picloram. Em meio contendo 20  $\mu\text{M}$  de picloram + 300  $\text{mg.L}^{-1}$  de carvão ativado, os embriões não se multiplicaram. A multiplicação ocorreu por meio da embriogênese secundária, sem a passagem por calo nodular (Figura 6I), em 100% dos embriões somáticos usados como explantes.

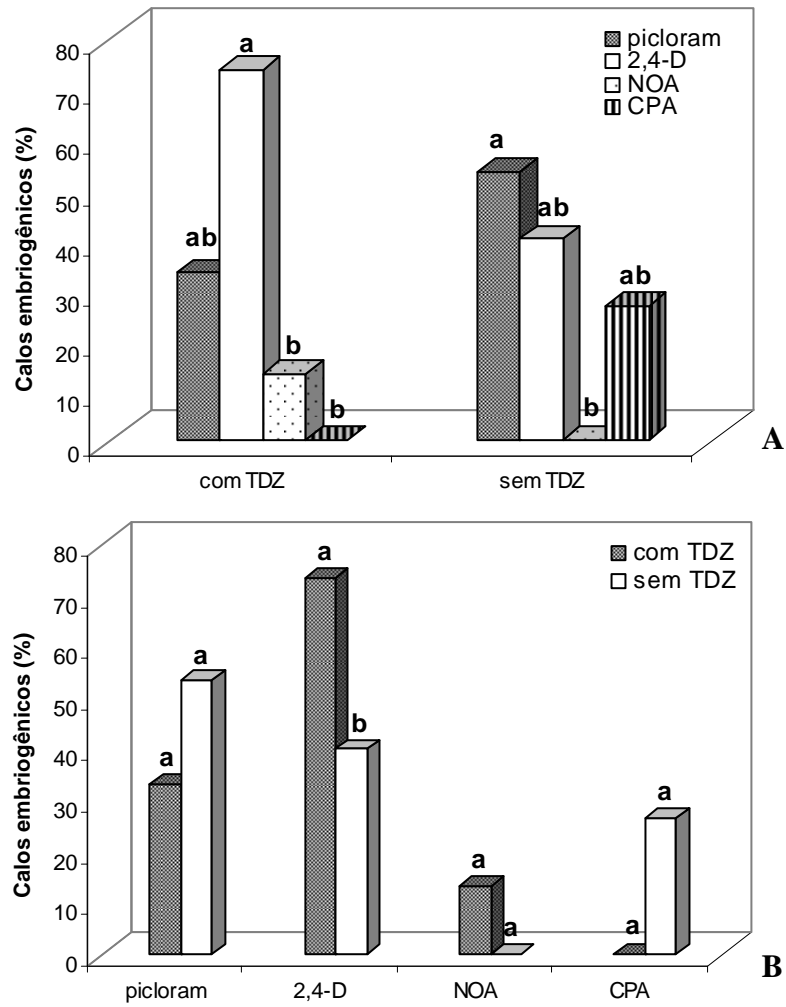
A análise histológica destes embriões somáticos confirmou a origem multicelular das brotações (Figura 6J). Houve uma discreta oxidação da parte do embrião em contato com o meio de cultura, porém esta oxidação não foi prejudicial ao processo da embriogênese secundária.

### 3.4 – Germinação dos embriões somáticos

A germinação dos embriões somáticos iniciou-se após 15 dias em meio de germinação, com a emissão da radícula. Com o passar do tempo a parte aérea do embrião iniciou o seu desenvolvimento, porém se estagnou, não completando a sua conversão em plântula (Figura 6K).

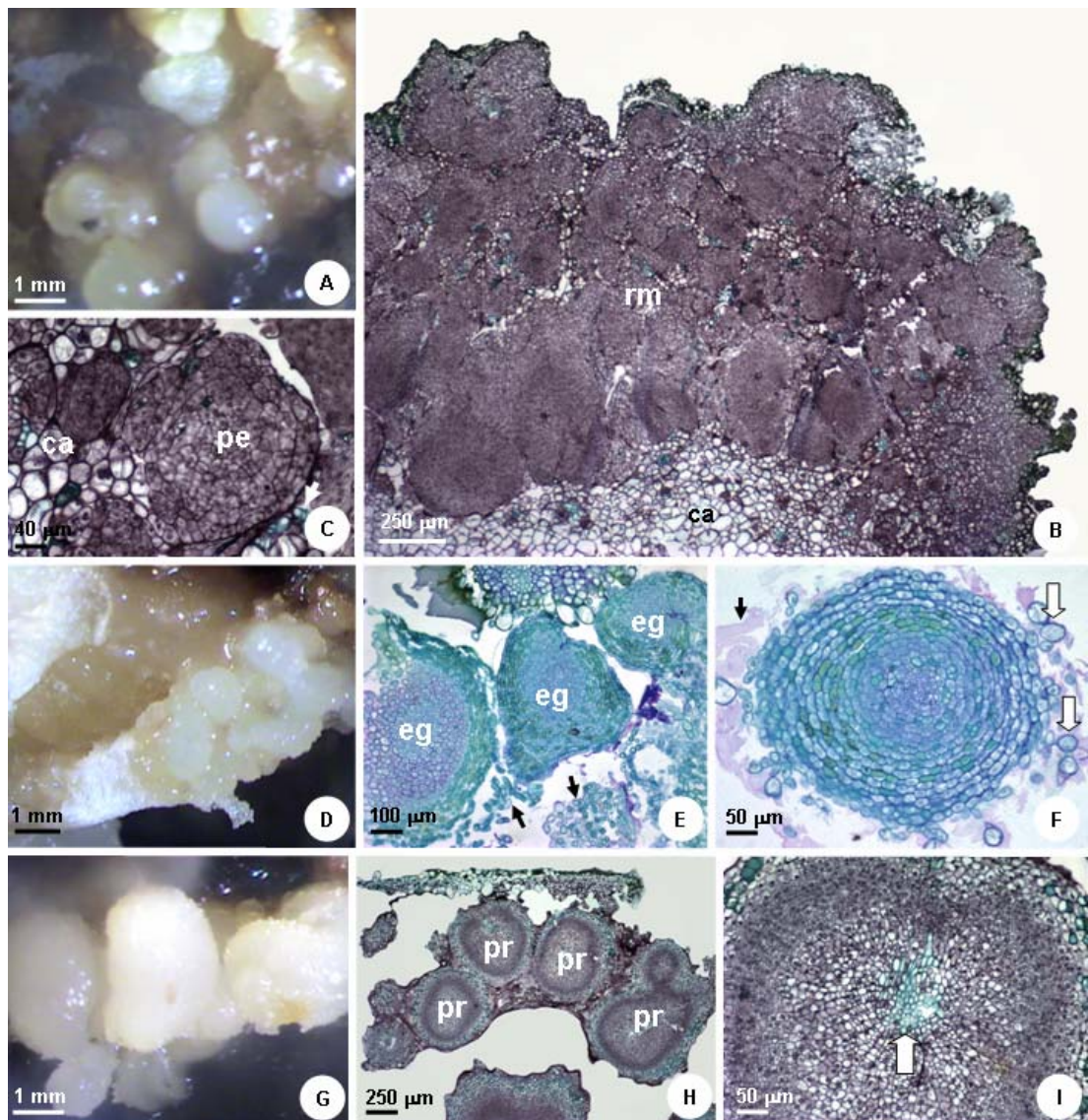


**Figura 1.** A: Amêndoa seccionada de macaúba; seta indica o embrião zigótico. B: Embrião zigótico; rp: região proximal, corresponde ao eixo embrionário; rd: região distal, corresponde à região cotiledonar, fica em contato com o endosperma. C: Calo não-embriogênico ou tipo I obtido, após 60 dias de cultivo em meio com 9  $\mu\text{M}$  de picloram. D: Calo embriogênico ou tipo II obtido após 60 dias em meio com 9  $\mu\text{M}$  de picloram, com aspecto nodular e cor amarela. E: Estruturas globulares semelhantes a embriões somáticos obtidos com 9  $\mu\text{M}$  de picloram, após 70 dias de cultivo.

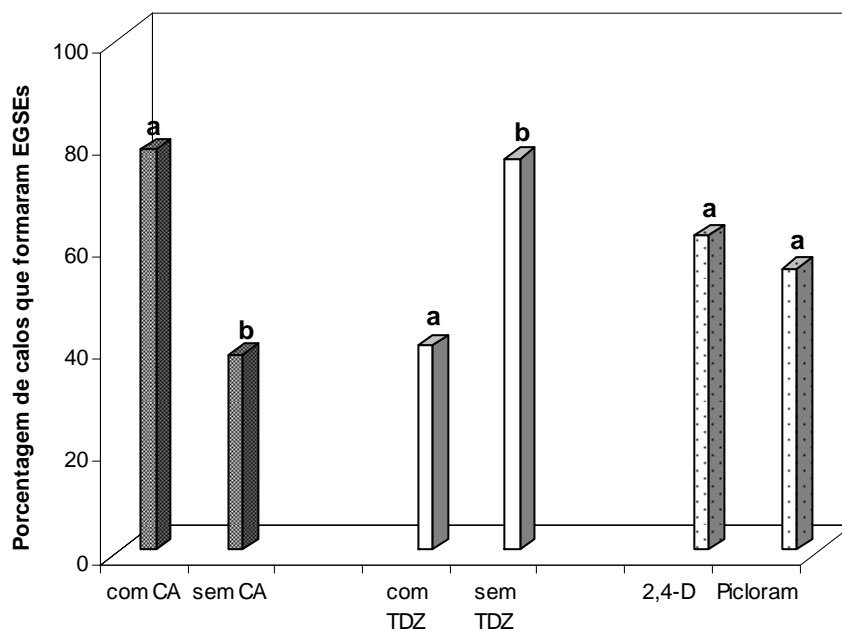


**Figura 2.** Efeito de tipos de auxina (A) e de TDZ (B) na indução de calos embriogênicos em embriões zigóticos de macaúba. Para cada interação, as barras com as mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste Tukey com  $p=0,05$ .

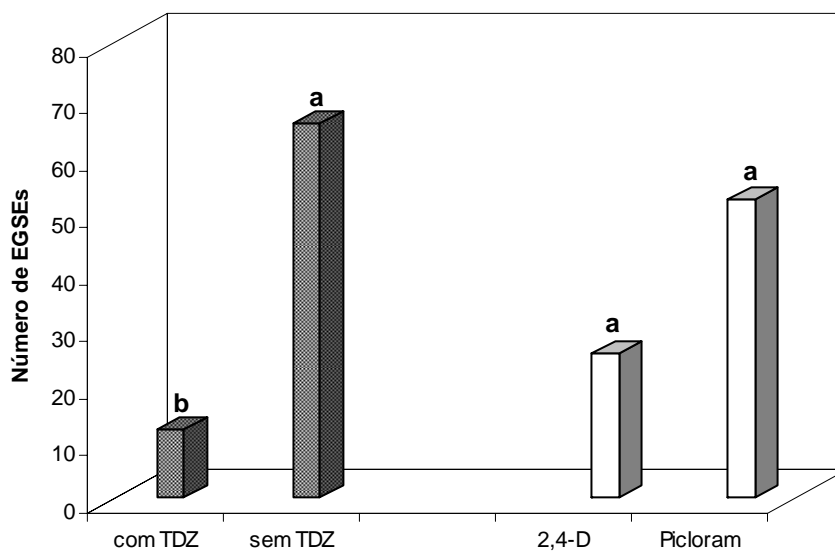




**Figura 3.** Diferentes respostas dos embriões zigóticos aos reguladores utilizados na indução de calo embriogênico em macaúba. A: Calo induzido com 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 1  $\mu\text{M}$  de TDZ. B: Secção do calo induzido com 2,4-D e TDZ, com região meristemática na periferia do explante. C: Detalhe da região meristemática, com estruturas semelhantes a proembriões e início de formação de células meristemáticas D: Calo induzido com 9  $\mu\text{M}$  de CPA. E: Secção de calo obtido com CPA, com intensa desestruturação das células, e estruturas globulares sem protoderme característica. As setas indicam descamação de células F: Detalhe de uma estrutura globular obtida com CPA. As setas brancas indicam descamação das camadas celulares e a seta preta indica presença de mucilagem, indicando degradação da parede. G: Calo induzido com 9  $\mu\text{M}$  de picloram e 1  $\mu\text{M}$  de TDZ, com estruturas globulares. H: Secção transversal de estruturas geradas com picloram e TDZ, evidenciando possíveis primórdios radiculares. I: Detalhe destes primórdios radiculares com células em disposição concêntrica e ausência de protoderme. A seta branca indica o desenvolvimento de elementos traqueais. ca: região de calo; eg: estruturas globulares; pe: proembrião; pr: primórdios radiculares; rm: região meristemática.



**Figura 4.** Efeito de carvão ativado, TDZ e auxinas na porcentagem de calos de macaúba que formaram estruturas globulares durante a primeira fase de regeneração. Para cada efeito, as barras com as mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste Tukey com  $p=0,05$ .



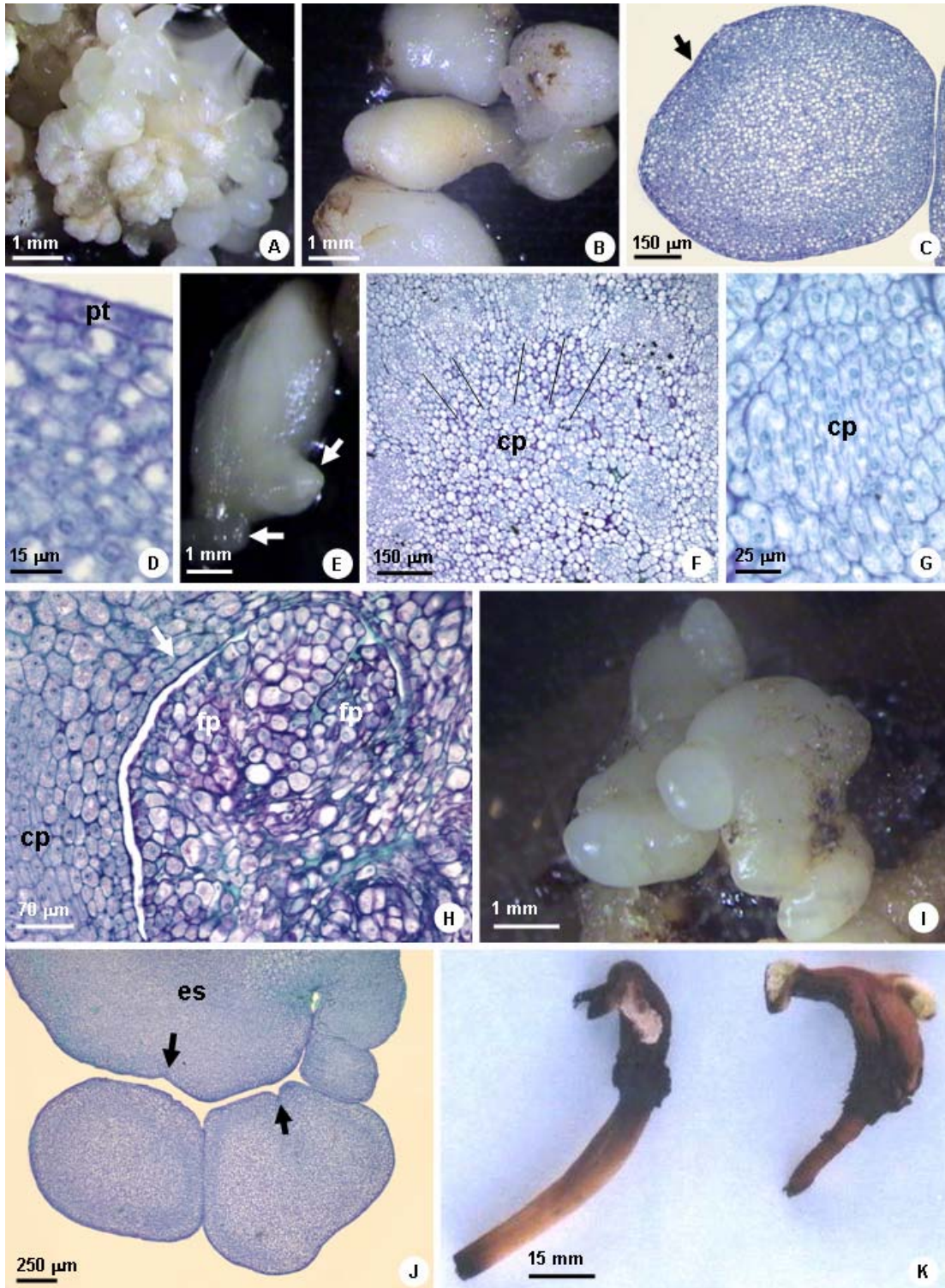
**Figura 5.** Efeito de tipos de auxina e de TDZ no número de estruturas globulares gerados em calos nodulares de macaúba. As barras com as mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste Tukey com  $p=0,05$ .

**Tabela 3.** Porcentagem de regeneração de embriões somáticos a partir de massas embriogênicas com EGSEs de macaúba.

<b>Tratamento</b>	<b>Massas embriogênicas que geraram embriões somáticos (%)</b>	<b>Número de embriões somáticos</b>
Tr1	0	0
Tr3	9	35
Tr5	0	0
Tr7	0	0

**Figura 6.** A: Embriões somáticos obtidos em tratamento contendo 9  $\mu\text{M}$  de picloram após 180 dias do estabelecimento dos explantes. B: Embriões somáticos em desenvolvimento. C: Seção de embrião somático na fase globular apresentando protoderme, mas sem desenvolvimento de procâmbio. D: Detalhe da protoderme do embrião somático globular. E: Embrião somático na fase cotiledonar. As setas indicam formação de embriões somáticos secundários. F: Seção transversal de embrião somático na fase cotiledonar indicando cordões de procâmbio. G: Detalhe de cordão de procâmbio do embrião somático. H: Seção transversal de embrião somático cotiledonar. A seta indica a formação de cavidade interna contendo folhas primordiais. I: Embriogênese secundária em embrião somático a partir de brotações. J: Seção de embriões somáticos em divisão. As setas indicam locais de invaginação da protoderme. K: Embrião somático germinado, indicando formação de radícula, e não desenvolvimento da parte aérea. cp: cordão de procâmbio; fp: folha primordial; es: embrião somático; pt: protoderme.





## 4 - DISCUSSÃO

### 4.1 - Indução da embriogênese somática

O presente trabalho apresenta a primeira descrição de embriogênese somática em macaúba (*Acrocomia aculeata*). Processos de embriogênese somática iniciados a partir de embriões zigóticos têm sido descritos para algumas palmeiras, como *Elaeis guineensis* (Teixeira et al., 1993; Kanchanapoom & Domyoas, 1999), *Phoenix canariensis* (Huong et al., 1999), *Euterpe oleracea* (Ledo et al., 2002) e *Hyophorbe lagenicaulis* (Sarasan et al., 2002). Para estas espécies, o 2,4-D tem sido a principal auxina utilizada na indução da embriogênese somática. No presente trabalho, tanto 2,4-D quanto picloram se mostraram eficientes na indução da embriogênese somática, originando calo tipo II (Figura 2). O picloram é uma auxina sintética derivada do ácido picolínico e tem sido empregada em algumas espécies para a indução da embriogênese somática (Dineshkumar et al., 1995; Groll et al., 2001; Akutsu & Sato, 2002; Perán-Quesada et al., 2004). Dentre as palmáceas, há relatos de uso do picloram com sucesso no processo de embriogênese somática em *Phoenix canariensis* e *Areca catechu* (Huong et al., 1999; Karun et al., 2004).

Os calos induzidos pelo picloram apresentaram muitas EGSE (Figura 1E), que se formaram a partir dos calos nodulares gerados no período de indução. A indução de calo nodular a partir da multiplicação de células perivasculares foi observada em *Elaeis guineensis* (Schwendiman et al., 1988), em *Cocos nucifera* (Buffard-Morel et al., 1992) e em *Euterpe edulis* (Guerra & Handro, 1998), mas utilizando explantes foliares. Geralmente, ao se utilizar como explantes embriões zigóticos, a embriogênese somática em palmeiras se origina de células da protoderme, ou de células subepidermais (Guerra & Handro, 1998; Kanchanapoom & Domyoas, 1999; Wang et al., 2006).

O CPA e o NOA foram testados como auxinas alternativas à indução de embriogênese somática, mas não surtiram efeito favorável. O fato de o NOA ter induzido o desenvolvimento e a germinação *in vitro* de uma parte dos embriões zigóticos de macaúba o torna um regulador com potencial para ser utilizado em fases de desenvolvimento e regeneração de embriões somáticos, ou mesmo na germinação *in vitro* da espécie. Não existem relatos de uso do CPA e do NOA na indução de embriogênese somática de palmeiras. Considerando outras espécies, o CPA foi

eficiente na indução de calos embriogênicos em *Pisum sativum* (Loiseau et al., 1995). Já o NOA foi utilizado na indução de embriogênese somática e no desenvolvimento de embriões somáticos de *Vitis sp.* (Reustle et al., 1995; Motoike et al., 2001).

Houve interação positiva entre o 2,4-D e o TDZ na indução da embriogênese somática em macaúba (Figura 2B). O TDZ é um derivado da feniluréia, geralmente utilizado como citocinina. Contudo, o TDZ tem sido associado à indução de embriogênese somática em diferentes espécies de plantas. Visser et al. (1992) foram os primeiros a observar a eficiência do TDZ na indução de embriogênese somática em experimentos com *Pelargonium x hortorum*. Nakano et al. (2004) verificaram que a combinação de TDZ com 2,4-D foi essencial na indução de embriogênese somática em *Tricyrtus spp.* Em palmáceas, apesar de o TDZ ter sido empregado na regeneração de embriões somáticos de *Serenoa repens* (Gallo-Meagher & Green, 2002) e na regeneração de brotos combinado com BAP em *Areca catechu* (Wang et al., 2003), não existem relatos de sua utilização na indução de embriogênese somática.

#### 4.2 – Regeneração dos embriões somáticos

Na fase de regeneração de embriões somáticos o efeito do TDZ a 1 µM foi negativo (Figuras 4,5), apesar de ter havido efeito positivo na indução da embriogênese somática em combinação com 2,4-D. Rajesh et al. (2003) também não obtiveram efeito positivo quando o TDZ foi utilizado na regeneração de embriões somáticos a partir de calos nodulares de *E. guineensis*.

O 2,4-D sozinho também gerou uma formação considerável de calo tipo II e de EGSE nas fases de regeneração (Figuras 4,5). Isso confirma a eficiência do 2,4-D na embriogênese somática de macaúba. Possivelmente, a regeneração dos calos tipo II e das EGSE geradas com o 2,4-D em embriões somáticos depende de fatores não testados no trabalho, como o uso de citocininas ou de ácido abscísico. Entretanto, o picloram se mostrou superior ao 2,4-D no presente trabalho, considerando a formação de embriões somáticos que chegaram a germinar. No geral, a obtenção de embriões somáticos em palmeiras está associado ao uso de citocininas ou ABA na fase de regeneração dos calos. Entretanto, no presente trabalho, a simples redução de auxinas no meio levou a formação de embriões somáticos em meio com picloram

(Tabela 3). Wang et al. (2006) também obtiveram a formação e conversão de embriões somáticos de *Areca catechu* em plântulas sem o uso de citocininas ou ABA.

A adição do carvão ativado auxiliou substancialmente na formação de EGSE a partir dos calos nodulares, induzidos com 2,4-D ou picloram (Figuras 4,5). O carvão ativado é conhecido como um filtro para muitos compostos adicionados ao meio, incluindo auxinas (Ebert & Taylor, 1990). Provavelmente, isso contribuiu para diminuir a concentração de auxina livre no meio, e assim as células embriogênicas e as EGSE puderam se desenvolver. Esse comportamento concorda com o que foi postulado por Komanine et al. (1992), de que o contato constante das células com doses elevadas de auxina mantém sua capacidade embriogênica, enquanto a retirada da auxina do meio induz as células a se diferenciarem. A adição de carvão ativado a meio líquido também aumentou a produção de embriões somáticos de *Phoenix dactylifera* (Fki et al., 2003). A manutenção das auxinas no meio de regeneração em conjunto com o carvão ativado pode também ter contribuído para a formação de embriões somáticos, já que, a retirada total de auxinas do meio pode levar a deformações nos embriões somáticos de palmeiras, como foi verificado em *Cocos nucifera* (Verdeil & Buffard-Morel, 1995).

Além de diminuir a disponibilidade da auxina, a adição do carvão ativado também diminuiu as taxas de oxidação dos tecidos de macaúba, o que provavelmente também contribuiu para a formação dos embriões somáticos. A adição de carvão ativado é muito comum na cultura de tecidos de palmáceas (Chan et al., 1998; Gallo-Meagher et al., 2002; Fki et al., 2003), principalmente por reduzir as taxas de oxidação. Segundo Pan & van Staden (1998), o carvão ativado adsorve os fenóis e inativa as enzimas polifenol oxidase e peroxidase, ajudando na diminuição da oxidação dos tecidos.

#### 4.3 - Multiplicação dos embriões somáticos (embriogênese secundária)

A embriogênese secundária foi obtida a partir dos embriões somáticos regenerados (Figura 1J). Os embriões somáticos se multiplicaram no mesmo meio de indução utilizado no início do processo e vêm se multiplicando até então. Entretanto, ao contrário da indução por meio de calos nodulares, quando se utilizou os embriões zigóticos, os embriões somáticos geraram novos embriões por meio de brotações,



com origem multicelular. Talvez isso esteja relacionado com o fato dos embriões somáticos estarem menos amadurecidos que os embriões zigóticos utilizados. Pode ter ocorrido o desvio de células ainda não diferenciadas e que expressaram novamente a totipotência. Pérez-Núñez et al. (2006) obtiveram altas taxas de multiplicação utilizando como explantes embriões somáticos recém-regenerados de calos embriogênicos de *Cocos nucifera*, na forma de brotações. A obtenção de embriões somáticos pela formação de massas meristemáticas com conseqüente invaginação da protoderme já foi descrita para *Quercus robur* (Zegzouti et al., 2001; Puigderrajols et al. 2001) e para *C. nucifera* (Fernando et al., 2003). Os autores confirmam que em todos os casos, houve a origem multicelular dos embriões somáticos.

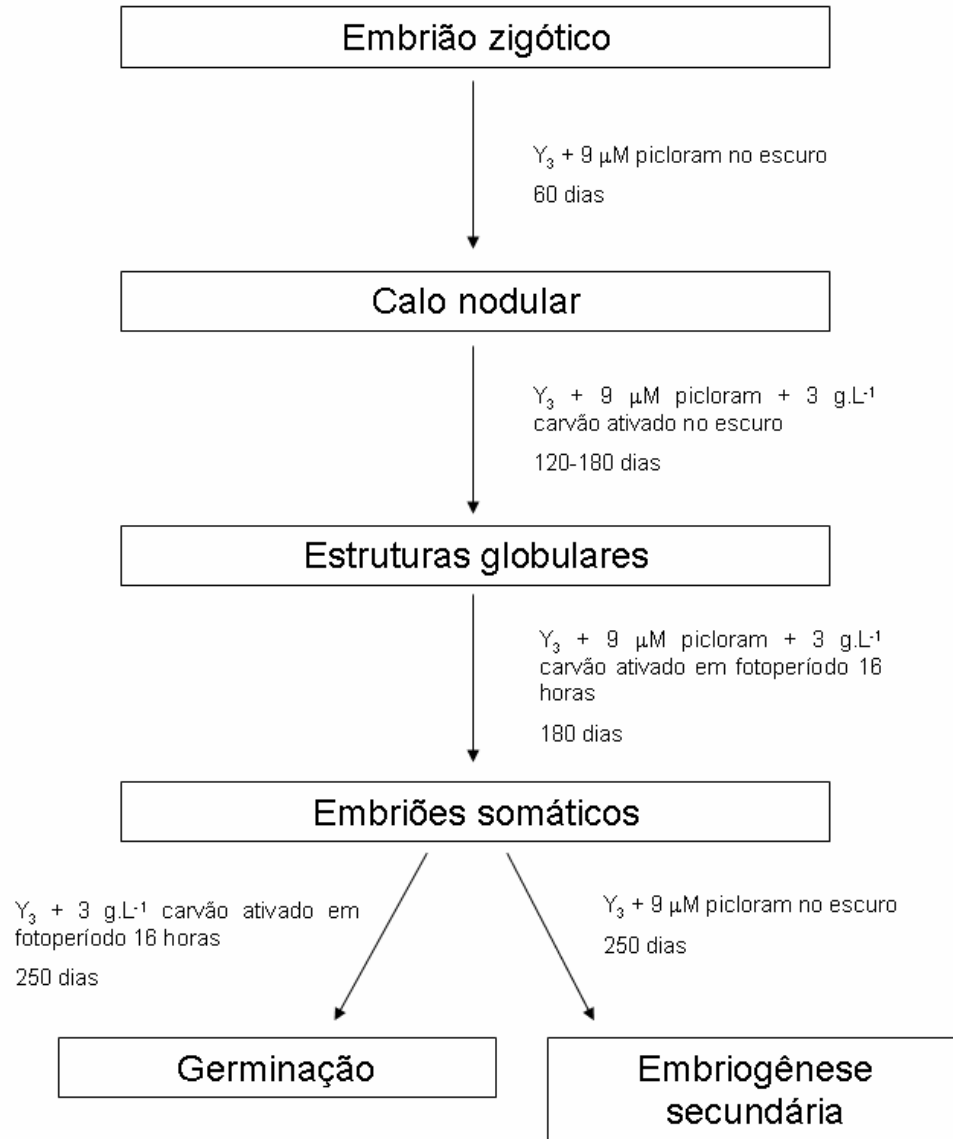
#### 4.4 – Germinação dos embriões somáticos

Apesar da ocorrência de germinação de alguns embriões somáticos, este evento foi raro e anormal, já que não houve diferenciação completa da parte aérea (Figura 6K). Os cortes histológicos demonstraram uma má formação da parte aérea, com ocorrência de mucilagem entre as células (Figura 6H). Provavelmente, isto ocorreu devido à ausência de uma etapa envolvendo o uso de citocininas durante as fases de regeneração. Aberlenc-Bertossi et al. (1999) evidenciaram a importância do BA na formação do ápice caulinar dos embriões somáticos de *Elaeis guineensis*. A não diferenciação da parte aérea nos embriões somáticos também foi observada por Gupta et al. (1984), que obtiveram embriões somáticos de *Cocos nucifera* utilizando somente auxinas durante o processo de embriogênese somática. Ao contrário, Gallo-Meagher & Green (2002) observaram que embriões somáticos de *Serenoa repens* induzidos somente com auxinas desenvolveram a parte aérea, mas não raízes, em meio sem reguladores de crescimento.

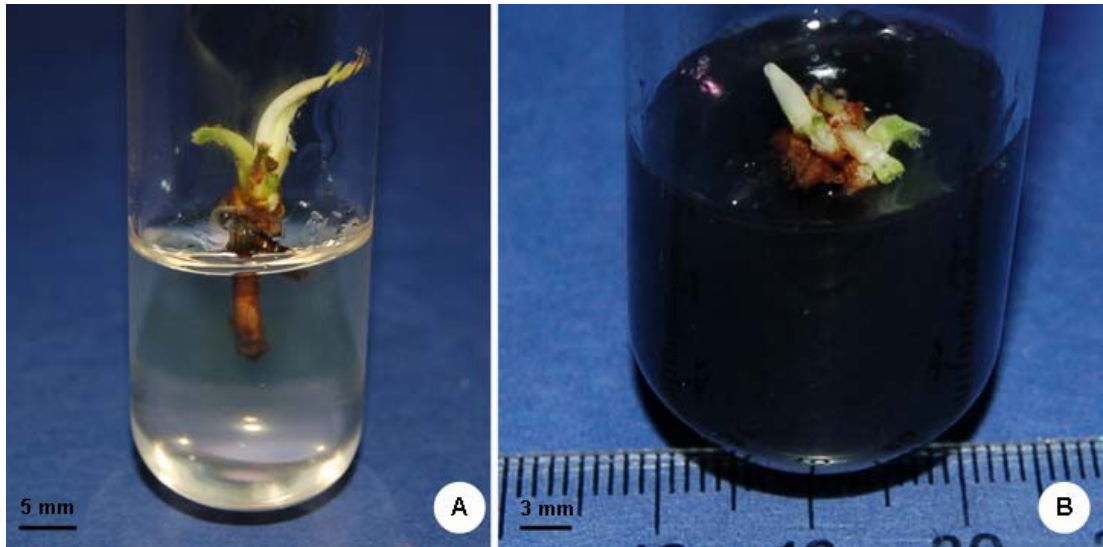
O trabalho descreveu um processo de embriogênese somática via obtenção de calos nodulares, que se demonstrou assincrônico, já que houve a formação simultânea de embriões somáticos em diferentes fases. O protocolo foi testado em embriões zigóticos provenientes da região do Norte de Minas Gerais, Brasil e também houve sucesso, indicando que o processo parece não ser genótipo-dependente (dados não mostrados). A Figura 7 mostra um resumo dos eventos mais significativos que ocorreram na embriogênese de macaúba. Os embriões zigóticos de

macaúba são importantes fontes de indução de embriogênese somática. Apesar de não ter sido obtido sucesso completo na regeneração das plantas, o trabalho contribui com importantes informações para o estabelecimento de um protocolo de multiplicação *in vitro* de macaúba via embriogênese somática. Entretanto, são necessários mais testes, especialmente nas fases de maturação e germinação dos embriões somáticos, para obtenção de plântulas de macaúba *in vitro*.

Atualmente, vem se tentando regenerar parte aérea e obter plântulas completas a partir de massas embriogênicas de macaúba, mas os resultados ainda são incipientes (Figura 8).



**Figura 7.** Esquema das principais fases da embriogênese somática de macaúba. O período em dias está relacionado à indução da embriogênese.



**Figura 8.** Regeneração de plântulas de macaúba. A: Germinação completa de embrião somático de macaúba. B: Regeneração de parte aérea a partir de massas embriogênicas de macaúba.

## 5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aberlenc-Bertossi F, Noirot M, Duval Y BA enhances the germination of oil palm somatic embryos derived from embryogenic suspension cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 56: 53-57, 1999.

Akutsu M, Sato H Induction of proembryos in liquid culture increases the efficiency of plant regeneration from *Alstromeria calli*. **Plant Science** 163: 475-479, 2002.

Arkcoll, D **New crops from Brazil**, In: Janick J, Simon EJ Advances in new crops p. 367-371 Timber press, Portland, OR, 1990.

Buffard-Morel J, Verdeil JL, Pannetier C Embryogenèse somatique du cocotier (*Cocos nucifera* L.) a partir d'explants foliaires: etudes histologiques. **Canadian Journal of Botany** 70: 735-741, 1992.

Chan JL, Saéñz L, Talavera C, Hornung R, Robert M, Oropeza C Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports** 17: 515-521, 1998.

Dineshkumar V, Kirti PB, Sachan JKS, Chopra VL. Picloram-induced somatic embryogenesis in chickpea (*Cicer arietinum* L.) **Plant Science** 109: 207-213, 1995.

Duval Y, Engelmann F, Durand-Gasselín T Somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) In: Bajaj YPS (ed) **Biotechnology in Agriculture and Forestry 30: Somatic embryogenesis and synthetic seed I**, Springer-Verlag:Berlin, p. 335-352, 1995.

Ebert A, Taylor HF Assessment of the changes of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentrations in plant tissue culture media in the presence of activated charcoal. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 20: 165-172, 1990.

Eeuwens CJ. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera*) and cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum** 36:23-28, 1978.

Fernando SC, Verdeil JL, Hocher V, Weerakoon LK, Hirimburegama K. Histological analysis of plant regeneration from plumule explants of *Cocos nucifera*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 72: 281-281, 2003.

Fki L, Masmoudi R, Drira N, Rival A An optimized protocol for plant regeneration from embryogenic suspension cultures of date palm, *Phoenix dactylifera* L., cv. Degls et Nour. **Plant Cell Reports** 21: 517-524, 2003.

Gallo-Meagher M, Green J Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of saw palmetto, an important landscape and medicinal plant. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 68: 253-256, 2002.

Groll J, Mycock DJ, Gray MV, Laminski S. Secondary somatic embryogenesis of cassava on picloram supplemented media. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 65: 201-210, 2001.

Guerra MP, Handro W Somatic embryogenesis and plant regeneration in different organs of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae): control and structural features. **Journal of Plant Research** 111: 65-71, 1998.

Gupta, PK, Kendurkar, SV, Kulkarni, VM, Shirgurkar, MV, Mascarenhas, AF Somatic embryogenesis and plants from zygotic embryos of coconut (*Cocos nucifera* L.) in vitro. **Plant Cell Reports** 3:222-225, 1984.

Huong LT, Balocco M, Huy BP, Mezzette B, Santilocchi R, Rosati P Somatic embryogenesis in Canary Island date palm. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 56: 1-7, 1999.

Johansen, DA **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book Co. Inc. 1940. 523p

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

Karun A, Siril E, Radha E, Parthasarathy VA Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from leaf and inflorescence explants of arecanut (*Areca catechu* L.) **Current Science** 86:1623-1628 2004.

Komanine A, Kawahara R, Matsumoto S, Sunabori S, Toya T, Fujiwara A, Tsukahara M, Smith J, Ito M, Fukuda H, Nomura K, Fujimura T Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures: physiology, biochemistry and molecular biology. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant** 28: 11-14, 1992.

Ledo AS, Lameira OA, Benbaid AK, Menezes IC, Oliveira MSP, Medeiros-Filho S Somatic embryogenesis from zygotic embryos of *Euterpe oleracea* Mart. **Revista Brasileira de Fruticultura** 24: 601-603, 2002.

Loiseau J, Marche C, Le Deunff Y Effects of auxins, cytokinins, carbohydrates and amino acids on somatic embryogenesis induction from shoot apices of pea. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 41: 267-275, 1995.

Lorenzi H, Souza H, Costa JTM, Cerqueira LSC, Ferreira E **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2004. 432 p.

Motoike SY, Skirvin RM, Norton MA, Otterbacher AG Somatic embryogenesis and long term maintenance of embryogenic lines from fox grapes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 66: 121-131, 2001.

Motta PE, Curi N, Oliveira-Filho AT, Gomes JBV Ocorrência da macaúba em Minas Gerais: relação com atributos climáticos, pedológicos e vegetacionais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 37: 1023-1031, 2002.

Nakano M, Mizunashi K, Tanaka S, Godo T, Nakata M, Saito H. Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of several species in the genus *Tricyrtis*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology -Plant** 40: 274-278, 2004.

O'Brien TP, Feder N, McCully ME Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma** 59: 368-373, 1964.

Pan MJ, van Staden J The use of charcoal in *in vitro* culture - a review. **Plant Growth Regulation** 26: 155-163, 1998.

Perán-Quesada R, Sánchez-Romero C, Barceló-Munóz A, Pliego-Alfaro F. Factors affecting maturation of avocado somatic embryos. **Scientia Horticulturae** 102: 61-73, 2004.

Perez-Núñez MT, Chan JL, Saenz L, Gonzalez T, Verdeil JL, Oropeza C. Improved somatic embryogenesis from *Cocos nucifera* (L.) plumule explants. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant** 42: 37-43, 2006.

Puigderrajols P, Mir G, Molinas M Ultrastructure of early secondary embryogenesis by multicellular and unicellular pathways in cork oak. **Annals of Botany** 87: 179-189, 2001.

Rajesh MK, Radha E, Karun A, Parthasarathy. Plant regeneration from embryo-derived callus of oil palm – the effect of exogenous polyamines. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 75: 41-47, 2003.

Reustle G, Harst M, Alleweldt G Plant regeneration of grapevine (*Vitis sp.*) protoplasts isolated from embryogenic tissue. **Plant Cell Reports** 15: 238-241, 1995.

Sarasan V, Ramsay MM, Roberts AV *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** 20:1107-1111 2002.

Schwendiman J, Pannetier C, Michaux-Ferriere N Histology of somatic embryogenesis from leaf explants of the oil palm *Elaeis guineensis*. **Annals of Botany** 62: 43-52, 1988.

Silva JC, Barrichelo LEG, Brito JO Endocarpos de babaçu e macaúba comparados a madeira de *Eucalyptus grandis* para a produção de carvão vegetal. **IPEF** 34: 31-34, 1986.

Teixeira JB, Sandahl MR, Kirby EG Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of oil palm. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 34: 227-233 1993.

Teixeira JB, Sandahl MR, Kirby EG Somatic embryogenesis from immature inflorescences of oil palm. **Plant Cell Reports** 13: 247-250 1994.

Tickel J **From the fryer to the fuel tank: the complete guide to using vegetable oil as an alternative fuel**. Tickel Energy Consulting, Tallahassee, FL, 162p. 3<sup>rd</sup>. ed. 2000.

Verdeil JL, Huet C, Grosdemange F, Buffard-Morel J Plant regeneration from cultured immature inflorescences of coconut (*Cocos nucifera* L.): evidence for somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports** 13: 218-221, 1994.

Verdeil JL, Buffard-Morel J. Somatic embryogenesis in coconut (*Cocos nucifera* L.) In: Bajaj YPS (ed) **Biotechnology in Agriculture and Forestry 30: Somatic embryogenesis and synthetic seed I**, Springer-Verlag:Berlin, p. 299-317, 1995.

Visser C, Qureshi JA, Gill R, Saxena PK. Morphoregulatory role of thidiazuron. **Plant Physiology** 99: 1704-1707 1992.

Wang HC, Chen JT, Wu SP, Lin MC, Chang WC. Plant regeneration through shoot formation from callus of *Areca catechu*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 75: 95-98, 2003.

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

Zegzouti R, Arnould MF, Favre JM. Histological investigation of the multiplication step in secondary embryogenesis of *Quercus robur* L. **Annals of Forest Sciences** 58: 681-190, 2001.



## CAPÍTULO 2

### CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA DA INDUÇÃO DE EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE MACAÚBA

#### 1 - INTRODUÇÃO

A macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Martius) é uma palmácea que tem grande potencial para a produção de biodiesel, graças a sua alta produtividade em óleo. Além disso, é uma espécie adaptada a regiões semi-áridas, podendo ser uma alternativa para produtores de oleaginosas dessas áreas (Arckoll, 1990). Atualmente, ainda há poucos estudos ligados ao desenvolvimento de tecnologias para o cultivo da macaúba e sua exploração ocorre de forma extrativista em populações nativas (Motta et al., 2002).

A embriogênese somática é o processo de regeneração de plântulas por meio da formação de estruturas bipolares, semelhantes a embriões zigóticos, a partir de células somáticas (Zimmerman, 1993). Este processo tem amplas aplicações na biotecnologia visando o melhoramento vegetal, como a propagação em massa de novas plantas, criopreservação, transformação genética e mutagênese (Litz & Gray, 1995; Raemarkers et al., 1995). Além disso, é uma ótima alternativa para a propagação de espécies que não possuem sistemas de propagação assexuada, como é o caso das palmeiras. Palmáceas com interesse comercial como *Elaeis guineensis* e *Phoenix dactylifera* já vêm sendo propagadas via embriogênese somática (Duval et al., 1995, Fki et al., 2003).

O estudo do desenvolvimento de células ou grupos de células por técnicas histológicas tem se mostrado útil para o entendimento da embriogênese em várias espécies vegetais. Em *Hevea brasiliensis*, o tempo adequado de subcultivos foi determinado por meio de análises histológicas (Michaux-Fèriere & Carron, 1989). Ao se utilizar embriões zigóticos de *Cocos nucifera* como fonte de embriogênese somática, verificou-se que o processo tem origem principalmente na plúmula (Chan et al., 1998), e o cultivo desta estrutura vem potencializando os protocolos de embriogênese dessa espécie (Pérez-Nuñez et al., 2006).

Em palmáceas, o acompanhamento de processos de embriogênese somática já foi relatado para algumas espécies (Schwendimann et al., 1988; Kanchanapoom &

Domyoas, 1999; Sané et al., 2006; Saézn et al., 2006), inclusive por estudos ultraestruturais (Verdeil et al., 2001). Os trabalhos têm demonstrado que a origem do embrião depende muito do explante utilizado e das condições do meio de cultivo. Para o dendê, por exemplo, a origem dos tecidos embriogênicos pode ser perivascular e multicelular quando se usam folhas jovens como explantes (Schwendimann et al., 1988) ou subepidermal e unicelular quando se usam embriões zigóticos (Kanchanapoom & Domyoas, 1999).

O processo de embriogênese somática em macaúba foi recentemente obtido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da UFV (vide capítulo 1). Porém, além de existirem dúvidas quanto ao tipo de origem dos embriões somáticos, ainda existem problemas quanto à regeneração dos embriões em plântulas. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi acompanhar por meio de técnicas histológicas a indução de embriogênese somática em embriões zigóticos de macaúba.

## **2 - MATERIAL E MÉTODOS**

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos e Células Vegetais do setor de Fruticultura, Departamento de Fitotecnia e no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa em Minas Gerais, Brasil. Foram utilizados no trabalho embriões zigóticos obtidos de frutos maduros de macaúba, coletados de plantas adultas de populações naturais do Estado de Pernambuco, Brasil.

### **2.1 - Indução da embriogênese somática**

Após coleta, os frutos foram armazenados em ambiente ventilado e sombreado por aproximadamente 20 dias. Logo após esse período, os frutos foram processados, removendo-se manualmente o epicarpo. O endocarpo foi quebrado com auxílio de um torno mecânico para obtenção das sementes. As sementes foram previamente lavadas com água e sabão líquido, posteriormente lavadas com Detertec 50% e então desinfestadas da seguinte forma: 15 minutos em HgCl<sub>2</sub> a 0,01%, 30 minutos em NaOCl a 6% e mais 20 minutos em nova solução de NaOCl a 6%. A cada etapa, as sementes foram lavadas com água destilada autoclavada por três vezes. Em câmara de fluxo, as sementes foram seccionadas e o embrião zigótico foi

retirado com auxílio de pinças e bisturi de lâmina fixa. Os embriões foram inoculados em tubos de ensaio de dimensão 25 x 150 mm com tampa de polipropileno contendo 10 mL de meio de indução composto de sais completos de Y<sub>3</sub> (Euweens, 1978), 68,46 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 1g.L<sup>-1</sup> de caseína hidrolisada, 100 mg.L<sup>-1</sup> de myo-inositol, solidificado com 2,5 g.L<sup>-1</sup> de Gelrite<sup>®</sup> (Sigma, USA) e 9 µM de picloram. Foram inoculados trinta embriões, sendo um por tubo.

## 2.2 - Regeneração dos embriões somáticos

Na etapa de regeneração de embriões somáticos, massas embriogênicas de aproximadamente 5,0 mm de diâmetro foram inoculadas em placas de Petri de poliestireno vedadas com filme de PVC transparente (Goodyear, Brasil) contendo 30 mL do mesmo meio de indução, porém, com adição de 3 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado (Ecibra, Brasil). Os calos utilizados nesta etapa tinham aspecto nodular e cor amarelada e foram obtidos na fase de indução. Após a inoculação, os tubos foram incubados no escuro em sala de cultivo e mantidos a 25±2°C.

Todos os meios de cultura utilizados neste trabalho tiveram seu pH aferido para 5,7 e foram autoclavados a 121°C e 1,5 atm por 20 minutos. Quando placas de Petri foram utilizadas, os meios de cultura foram autoclavados em frascos Erlenmeyer de 500 mL e vertidos nas placas em câmara de fluxo laminar.

## 2.3 - Análise anatômica e histoquímica

Para a análise anatômica, os explantes foram coletados aos 0, 4, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 dias após a indução de embriogênese somática e aos 10, 30 e 60 dias após a inoculação em meio de regeneração. Foram coletados três explantes a cada período. Os explantes foram fixados em FAA<sub>50</sub> (formol: ácido acético: álcool etílico<sub>50%</sub>, na proporção de 5: 5: 90) e estocado em etanol 70% (Johansen, 1940). As amostras foram incluídas em metacrilato (Historesin-Leica), de acordo com as recomendações do fabricante. O material emblocado foi seccionado transversal e longitudinalmente em micrótono rotativo, com 6 µm de espessura.

As seções obtidas foram coradas com azul de toluidina em pH ácido para detecção de metacromasia (O'Brien & McCully, 1981) e submetidas aos testes histoquímicos com Lugol (Johansen, 1940), para detecção de grãos de amido e XP

(Xylydine Ponceau), para detecção de proteína (O'Brien & McCully, 1981). As lâminas foram montadas em resina sintética (Permount<sup>®</sup>).

Foram feitos cortes de embrião zigótico aos 0 dias sem inclusão em metacrilato, e foram realizados os testes com Lugol para detecção de grãos amido, XP para detecção de proteína e Sudan Black B (Lison, 1960) e Sudan IV (Lison, 1960) para detecção de lipídeos totais.

As imagens foram obtidas em fotomicroscópio (Olympus AX70) equipado com sistema U-photo.

### **3 - RESULTADOS**

O embrião de *Acrocomia aculeata* tem a forma de chave, cerca de 4 mm de comprimento e é pequeno em relação ao volume total do endosperma presente na amêndoa. Nesse estágio, o embrião é constituído por um pólo radicular, um meristema apical e um único cotilédone (Figura 1A). O meristema apical está contido na região proximal do embrião e é envolto pelo cotilédone e contém de duas a três folhas primordiais (Figura 1B). A região distal do embrião é constituída totalmente pelo cotilédone e contém três tipos de células: do meristema fundamental, do procâmbio e da protoderme (Figura 1C). A região mais distal do embrião apresenta muitas invaginações da protoderme e cordões procambiais periféricos (Figura 1C). O embrião apresenta muitos grãos de proteína e de lipídeos como reservas, entretanto grãos de amido não são detectados.

Os embriões zigóticos começaram a responder ao tratamento de indução de embriogênese somática após a primeira semana de cultivo, quando os explantes começaram a intumescer. As principais modificações, aos 4 e 10 dias de indução de embriogênese somática, foram a ocorrência de algumas células com núcleos e nucléolos evidentes e outras com início de condensação da cromatina (Figuras 2A,B). Ocorreram algumas divisões das células da protoderme, das células abaixo da protoderme e das células do procâmbio. Novas camadas celulares surgiram, sendo provavelmente uma das causas do intumescimento percebido nos explantes. Aos 4 dias de cultivo, houve diminuição do conteúdo de proteína nas células, e aos 10 dias, a proteína não foi mais detectada nas células, sugerindo que as reservas protéicas foram totalmente consumidas até esta fase. Em alguns locais da protoderme houve acúmulo de compostos fenólicos no interior das células.

Aos 20 dias, ocorreram modificações bastante significativas no explante. Nesta fase, o embrião zigótico apresentou, na parte mais interna, regiões com células grandes e com citoplasma menos denso, enquanto as células da periferia permaneceram menores, com citoplasma mais denso e núcleos evidentes. Estas modificações foram mais evidentes na região distal do embrião, onde ocorreram muitas divisões celulares (Figura 2C). A periferia do explante concentrou maior ocorrência de divisões em vários planos, especialmente no meristema fundamental, logo abaixo da protoderme, caracterizando a formação de pró-embriões somáticos (Figura 2C). Nestes locais, ocorreram muitos agrupamentos de duas a oito células e alguns pró-embriões em fase mais avançada (Figura 2D). Ao redor destes agrupamentos, a parede celular apresentou um aparente espessamento e aspecto mucilaginoso, o que provavelmente causou o isolamento destes agrupamentos das células adjacentes (Figura 2D). O aparente espessamento das paredes pode ter ocorrido pelo início da desintegração da parede, acúmulo de pectinas e formação de mucilagem nessa região, conforme identificado pela coloração com azul de toluidina. Esse aparente espessamento não ocorreu entre as células maiores da parte mais interna do explante. O núcleo das células dos pró-embriões era evidente e apresentou de um a quatro nucléolos. As células do procâmbio sofreram muitas divisões celulares, e também diferenciação de elementos traqueais, que já apresentavam paredes espessadas de forma espiralada e certo grau de lignificação nessa fase, indicado pela coloração esverdeada de suas paredes com o azul de toluidina (Figura 2E). Houve acúmulo de grãos de amido nas células do meristema fundamental, logo abaixo da protoderme (Figuras 2F,G). Os grãos de amido ocorreram tanto nas células com citoplasma pouco denso quanto nas células da periferia, mas não nas células da protoderme (Figura 2G). Surgiram novas camadas de células a partir da protoderme e de células subjacentes. As células mais internas do embrião zigótico também sofreram divisões, mas em um único plano, provavelmente por isso, não levando à formação de pró-embriões.

Aos 30 dias, divisões celulares na região distal, próximas à plúmula, também ocorreram. Mesmo assim, a maior ocorrência de possíveis pró-embriões ocorreu na região distal, principalmente no meristema fundamental (Figuras 3A,B). Os pró-embriões nesta fase estavam mais desenvolvidos (Figura 3B). Os elementos traqueais se diferenciaram ainda mais, e estavam dispostos em vários planos no calo (Figura 3C). Os grãos de amido se acumularam principalmente nas células da parte interna

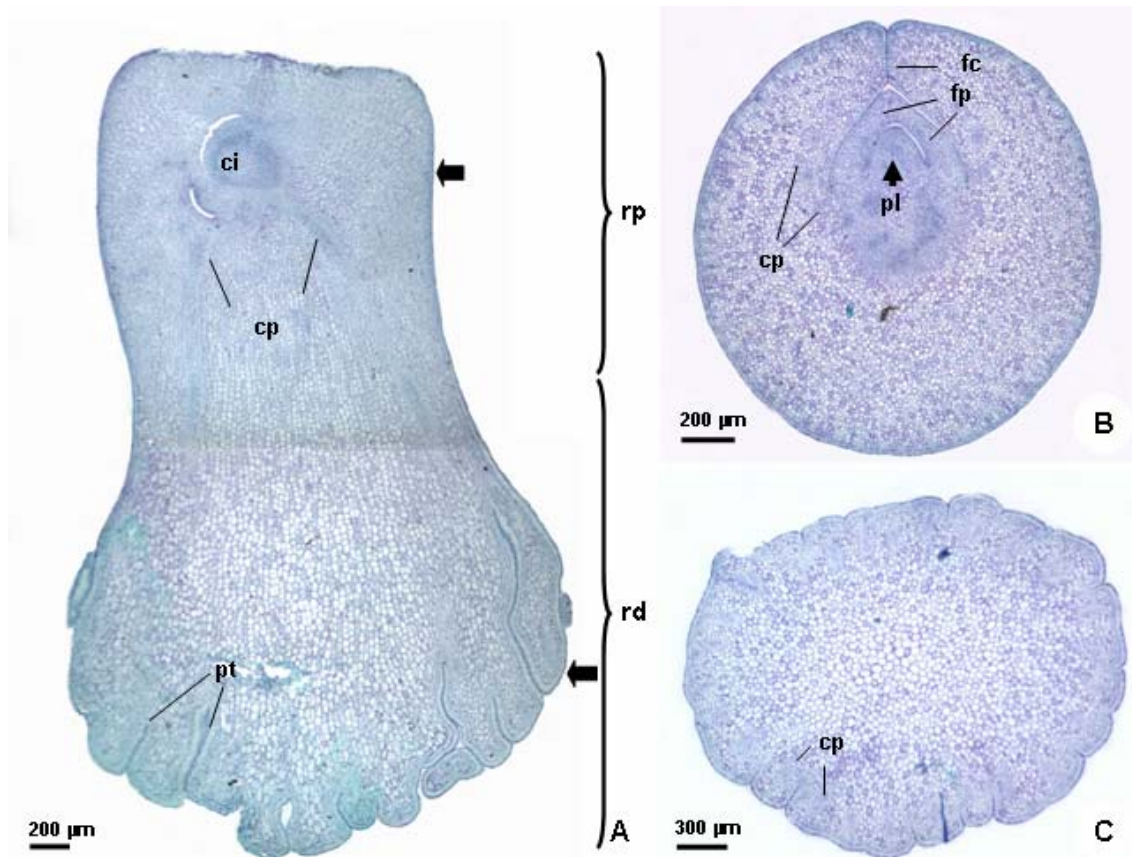
do explante, próximos a regiões de intensa divisão celular (Figura 3D) e nesta fase eram mais evidentes (Figura 3E). Em alguns setores, pôde ser verificado o início da formação de massas meristemáticas.

Essas massas meristemáticas se tornaram mais evidentes aos 40 dias de cultivo, onde se verificou que se diferenciavam a partir de células procambiais ou perivasculares pela proliferação de células do procâmbio (Figura 4A). As massas meristemáticas eram formadas por células pequenas, isodiamétricas, de citoplasma denso, com alta relação núcleo/citoplasma e núcleo evidente (Figura 4B). Essas células são bem distinguíveis das com citoplasma menos denso que as circundam e, em alguns locais, as células de citoplasma menos denso chegaram a se degradar. Seções transversais também mostram o desenvolvimento dos cordões de procâmbio e várias divisões celulares nas células próximas a essas estruturas (Figura 4C). Nas proximidades dos cordões de procâmbio em crescimento, ocorreram muitos pró-embriões, mas a maioria deles não passou de oito células, com alguns em fases mais avançadas (Figura 4D). Os cordões de procâmbio possuíam muitos elementos traqueais diferenciados e células associadas apresentando divisões periclinais (Figura 4E). Houve aumento do acúmulo de grãos de amido, especialmente nas células com citoplasma pouco denso do interior do explante (Figuras 4F,G).

Com 50 dias, o explante já havia formado calo, que possuía aspecto nodular. As seções histológicas demonstraram o aumento das células meristemáticas na região do procâmbio (Figura 5A). Em alguns locais, houve início de fragmentação das massas meristemáticas, levando à formação de estruturas globulares (Figura 5B). A ocorrência de elementos traqueais entre essas estruturas globulares confirma a sua origem procambial. Essas estruturas eram formadas por massas de células meristemáticas, mas sem a formação aparente de protoderme característica (Figura 5B). Em algumas regiões do procâmbio a atividade mitótica das massas meristemáticas era tão intensa que não havia formação aparente de parede celular entre as células (Figura 5C). Apesar de haver divisões em vários planos, a não individualização entre essas células no procâmbio provavelmente não levou a formação de pró-embriões de origem unicelular. Em locais próximos aos cordões de procâmbio, houve a formação de estruturas globulares (Figura 5D), que pela sua localização, provavelmente são os pró-embriões de origem unicelular vistos nas fases anteriores. A ocorrência de grãos de amido continuou restrita a células menos citoplasmáticas, próximas das massas meristemáticas (Figuras 5E,F). Estruturas

embriogênicas, com protoderme característica e células meristemáticas, surgiram nessa fase (Figura 5G,H). Essas estruturas possivelmente surgiram por brotação, já que estavam associadas ao tecido de origem.

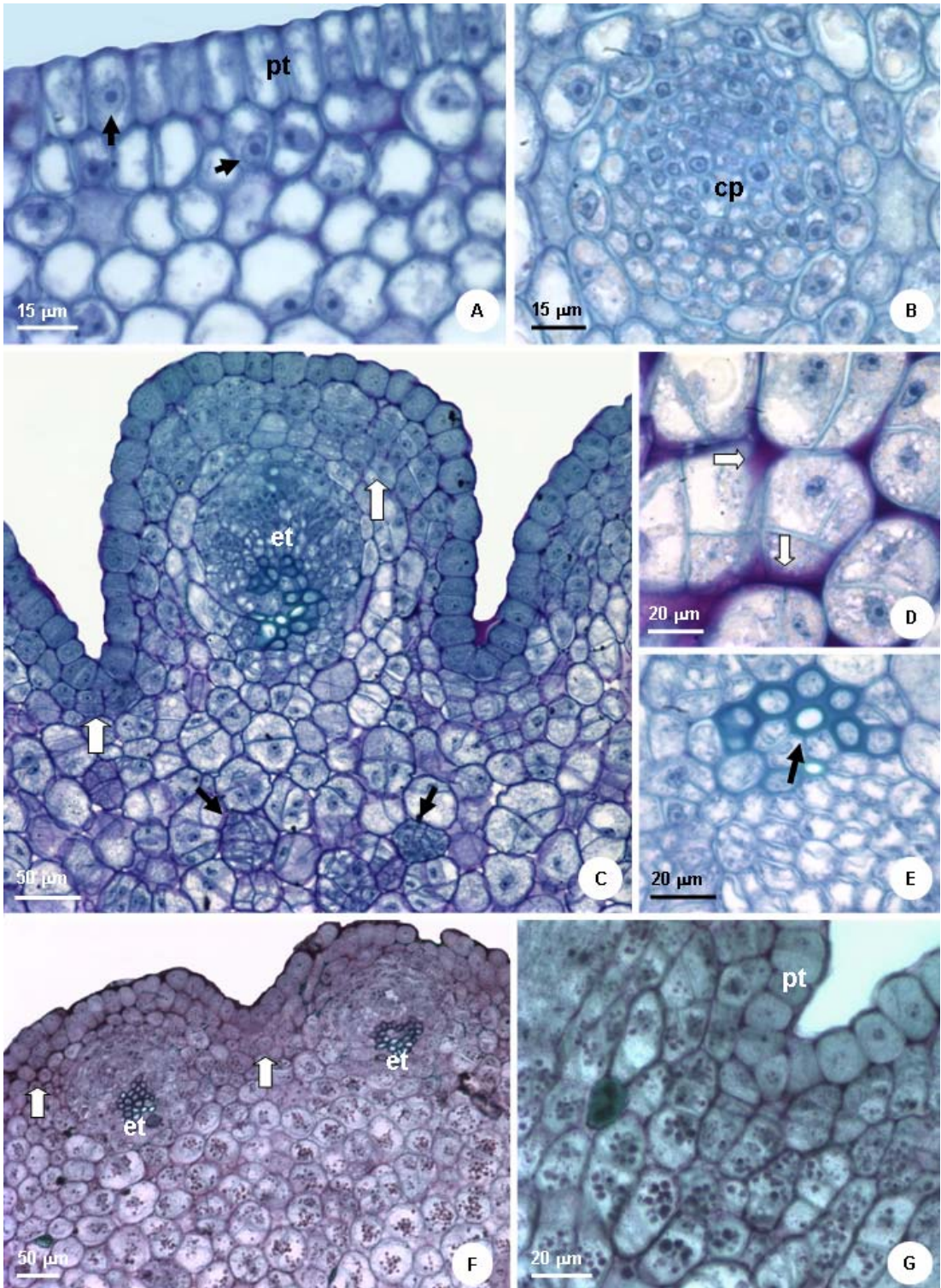
Aos 60 dias, alguns calos de macaúba formaram estruturas globulares que permaneceram fusionadas e conectadas ao explante e tinham aparência compacta (Figura 6A). A análise histológica demonstrou que essas estruturas correspondiam às massas meristemáticas provenientes dos cordões de procâmbio em crescimento (Figura 6B). Algumas destas massas meristemáticas apresentaram muitas células fenolizadas na periferia (Figura 6C) e possivelmente estas não teriam originado embriões somáticos. Intercaladas às células fenolizadas, haviam células com acúmulo de amido (Figura 6C). O amido acumulado nesta fase foi menor que aos 50 dias. As massas meristemáticas sem indício de fenolização levaram à formação de primórdios radiculares, caracterizados pela ausência de protoderme definida, forma alongada e presença de elementos vasculares (Figura 6D). Além disso, as massas meristemáticas formaram algumas brotações que evoluíram com a formação de protoderme (Figura 6E,F). Essas estruturas eram totalmente formadas por células meristemáticas pouco diferenciadas (Figura 6F). Em meio de regeneração, com a adição de carvão ativado e conseqüente redução dos níveis exógenos de picloram, houve aumento da diferenciação dos calos nodulares, formado a partir das massas meristemáticas, em estruturas globulares (Figura 6G). Essas estruturas tinham cor amarelada e forma globular, mas não tinham a superfície lisa como de um embrião somático. As estruturas globulares se fragmentavam a partir das massas meristemáticas formadas a partir das células procambiais ou a partir de divisões de células da região próxima aos cordões procambiais e não apresentavam características embriogênicas (Figura 6H). Eventualmente, embriões somáticos se formavam a partir dessas massas embriogênicas com estruturas globulares. Os embriões apresentavam aspecto de origem unicelular (Figura 7A), por se mostrarem independentes do tecido de origem. Esses embriões apresentavam protoderme definida e não ligada ao tecido de origem (Figura 7B). Além destes, embriões somáticos globulares de origem multicelular também se formaram. Esses embriões se apresentavam fusionados ao tecido de origem e, ocasionalmente, entre si (Figura 7C). Os embriões de origem multicelular apresentaram protoderme comum com o tecido de origem (Figura 7D).



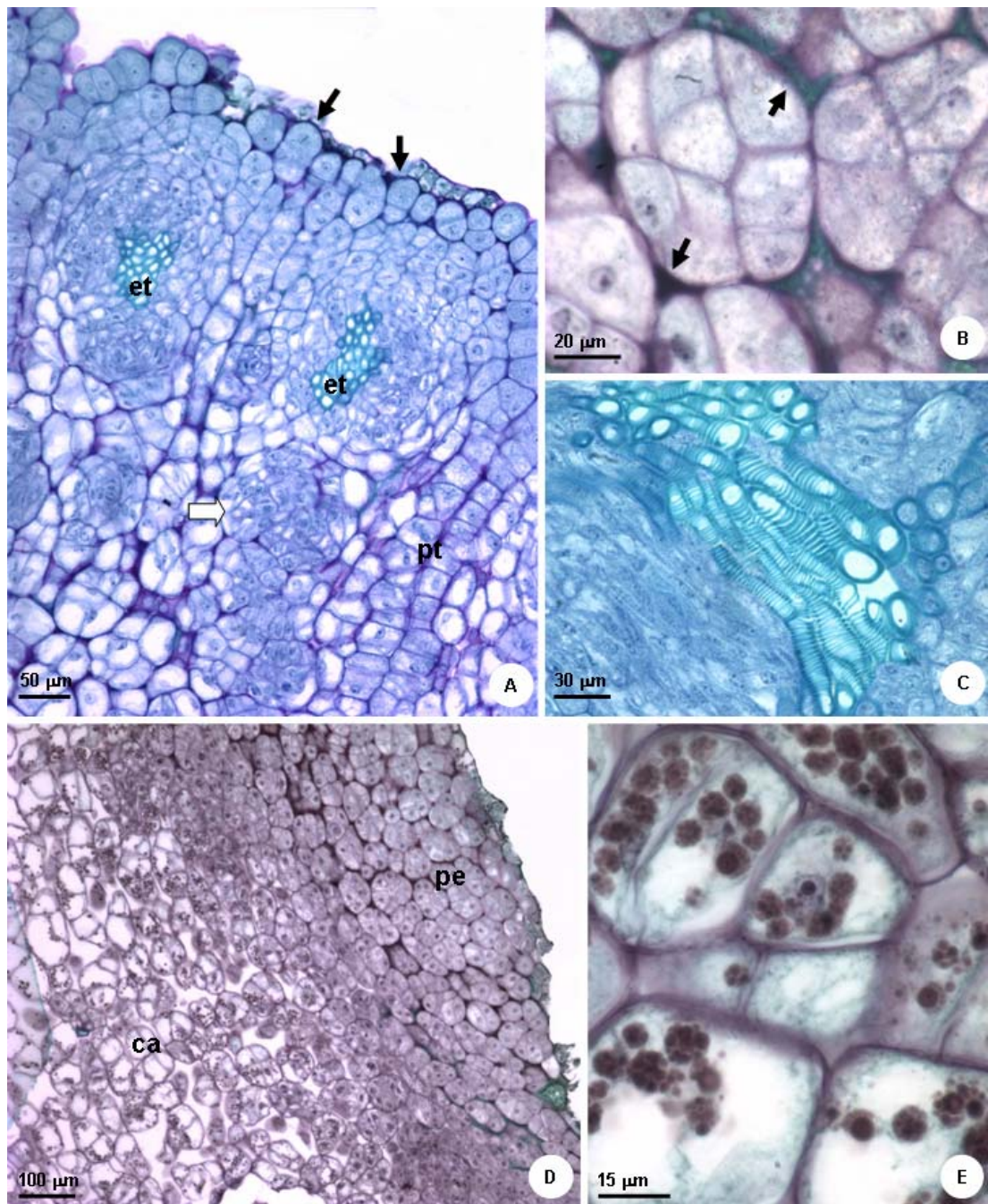
**Figura 1.** Seções histológicas do embrião zigótico de macaúba. A: Seção longitudinal com a região proximal que possui uma cavidade contendo a plúmula. A região distal contém basicamente o cotilédono. Pode-se verificar as invaginações da protoderme na base da região distal e cordões de procâmbio ao longo do embrião. B: Seção transversal aproximadamente na linha da seta na região proximal, com a plúmula e os primórdios foliares formados, a fenda cotiledonar e os cordões de procâmbio ao redor da cavidade com a plúmula. C: Seção transversal aproximadamente na linha da seta na região distal, com os cordões de procâmbio distribuídos próximo às invaginações da protoderme. ci: cavidade interna; cp: cordões de procâmbio; fc: fenda cotiledonar; fp: folha primordia; pl: plúmula; pt: protoderme; rp: região proximal; rd: região distal.



**Figura 2.** A-B: Seções transversais do explante de macaúba aos 10 dias de cultivo em meio para indução de embriogênese somática. A: Detalhe da protoderme e do meristema fundamental. Setas indicam células com núcleos e nucléolos evidentes. B: Detalhe do cordão de procâmbio, com células pouco diferenciadas. C-G: Seções do explante de macaúba aos 20 dias de cultivo em meio para indução de embriogênese somática. C: Seção transversal da região distal do explante com cordões de procâmbio mais diferenciados. Setas brancas indicam divisões das células abaixo da protoderme e as setas pretas indicam pró-embriões em início de desenvolvimento. D: Detalhe dos pró-embriões. Setas indicam a desintegração das paredes e acúmulo de mucilagem. E: Detalhe de um cordão de procâmbio, com início de diferenciação de elementos traqueais (seta). F: Seção transversal da região distal do explante, com acúmulo de grãos de amido (setas pretas) e divisões celulares abaixo da protoderme. A coloração esverdeada das paredes dos elementos traqueais indica lignificação. G: Detalhe da região distal com grãos de amido acumulados nas células abaixo da protoderme. cp: cordão de procâmbio; et: elementos traqueais; pt: protoderme.



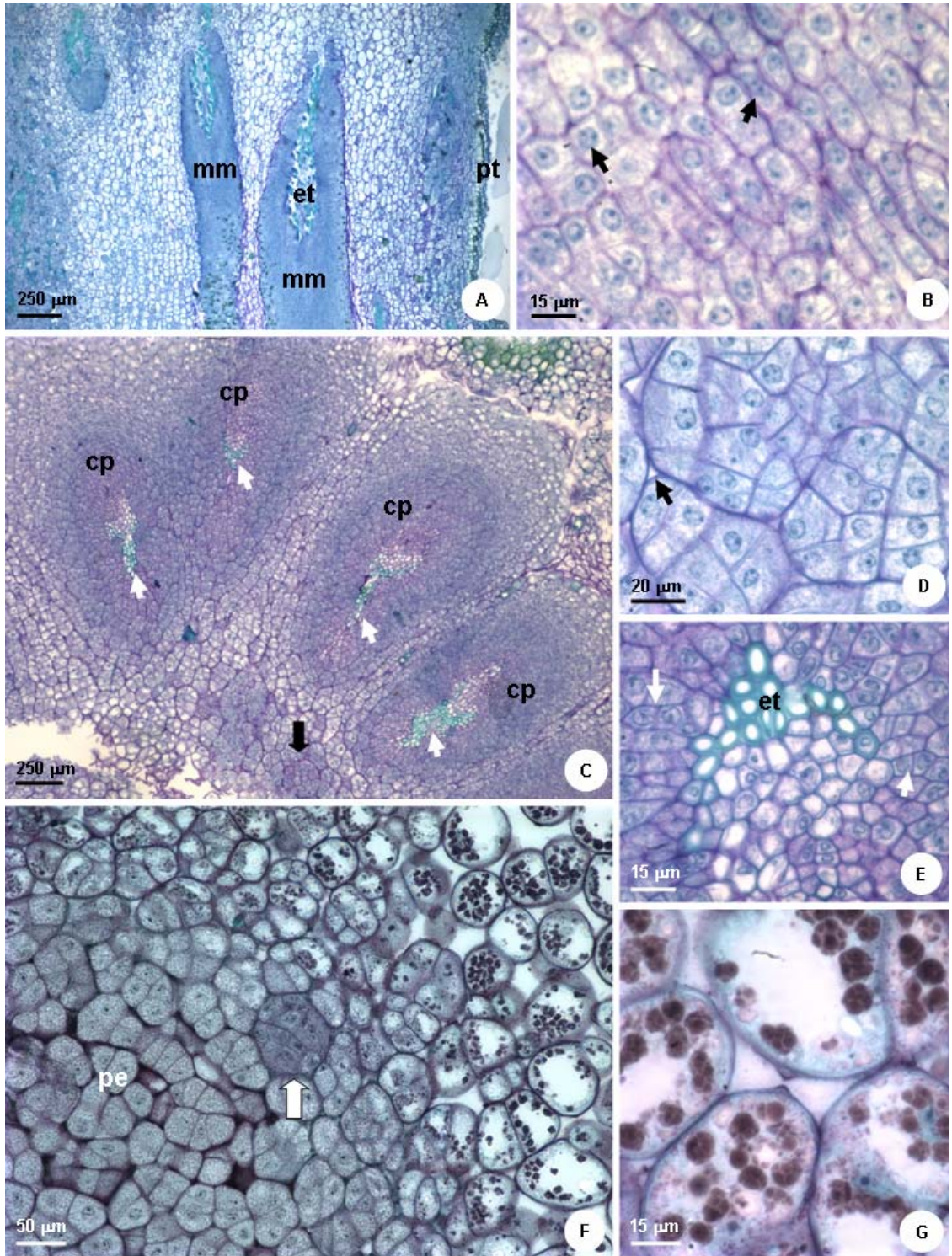




**Figura 3.** Seções do explante de macaúba aos 30 dias de cultivo em meio para indução de embriogênese somática. A: Seção transversal da região distal do explante, onde os cordões de procâmbio já apresentam elementos traqueais com paredes lignificadas e muitas divisões anticlinais e periclinais na protoderme (seta preta) e nas células subjacentes. As setas brancas indicam formação de pró-embriões. B: Detalhe dos pró-embriões. Setas indicam isolamento entre os pró-embriões pelo acúmulo de mucilagem. C: Detalhe dos elementos traqueais diferenciados a partir de células procambiais. D-E: Seção do explante, com acúmulo de grãos de amido em células com citoplasma menos denso, próximo à região de intensa divisão celular. ca: células com grãos de amido; et: elementos traqueais; pe: região com pró-embriões; pt: protoderme.

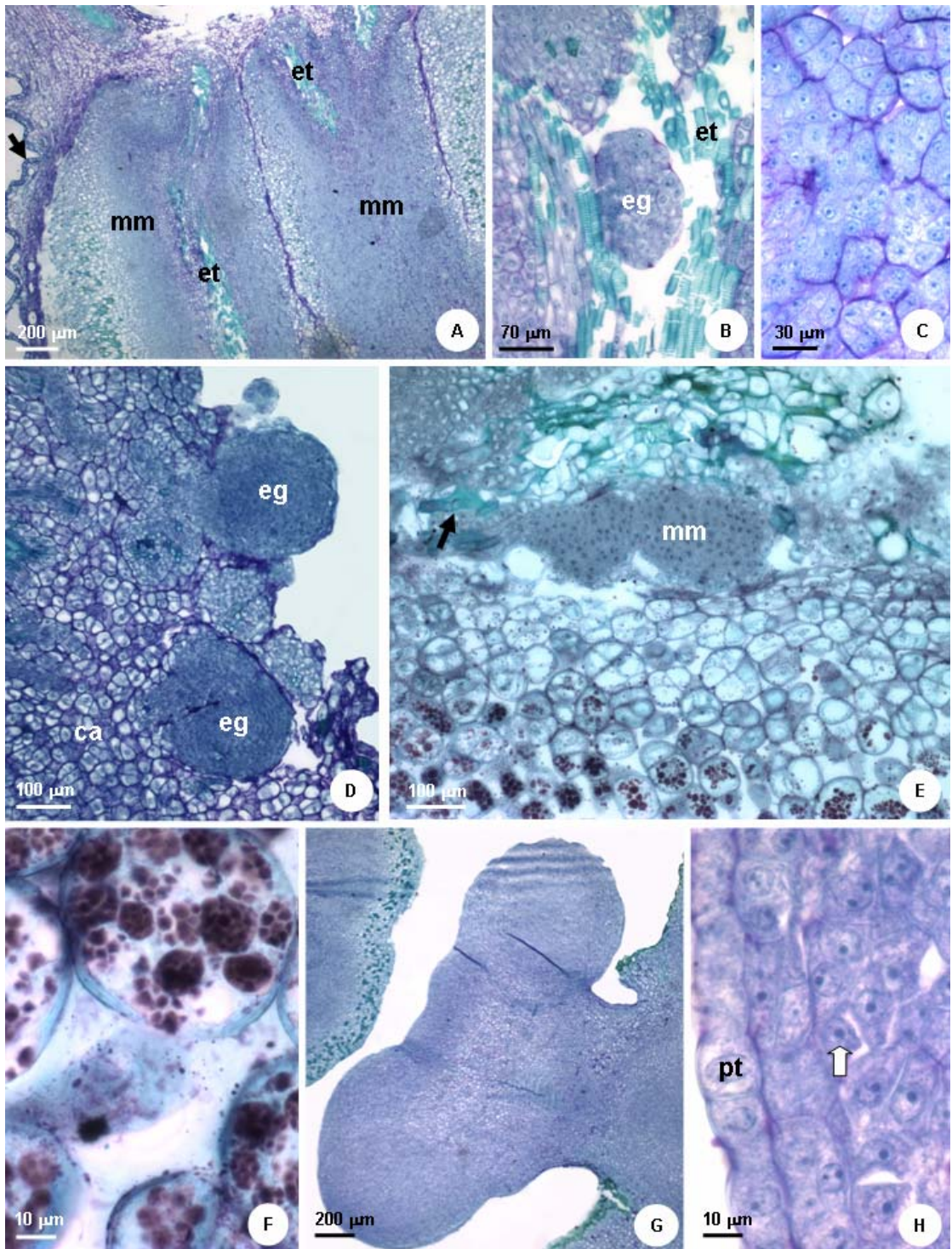
**Figura 4.** Seções do explante de macaúba aos 40 dias de cultivo em meio para indução de embriogênese somática. A: Seção longitudinal do explante, com formação de massas meristemáticas a partir dos cordões de procâmbio. B: Detalhe das células das massas meristemáticas. Setas indicam células com dois nucléolos. C: Cordões de procâmbio com elementos traqueais diferenciados (lignificados) circundados por massas meristemáticas. Setas pretas indicam elementos traqueais e seta branca, o local de formação de pró-embriões. D: Detalhe dos pró-embriões. Seta indica formação de espaços intercelulares entre os pró-embriões. E: Detalhe dos cordões de procâmbio com elementos traqueais lignificados. As setas indicam divisões celulares. F: Acúmulo de grãos de amido em células com citoplasma pouco denso, próximas ao local de formação de pró-embriões (seta branca). G: Detalhe das células com grãos de amido. cm: células meristemáticas; cp: cordões de procâmbio; et: elementos traqueais; mm: massas meristemáticas; pt: protoderme.





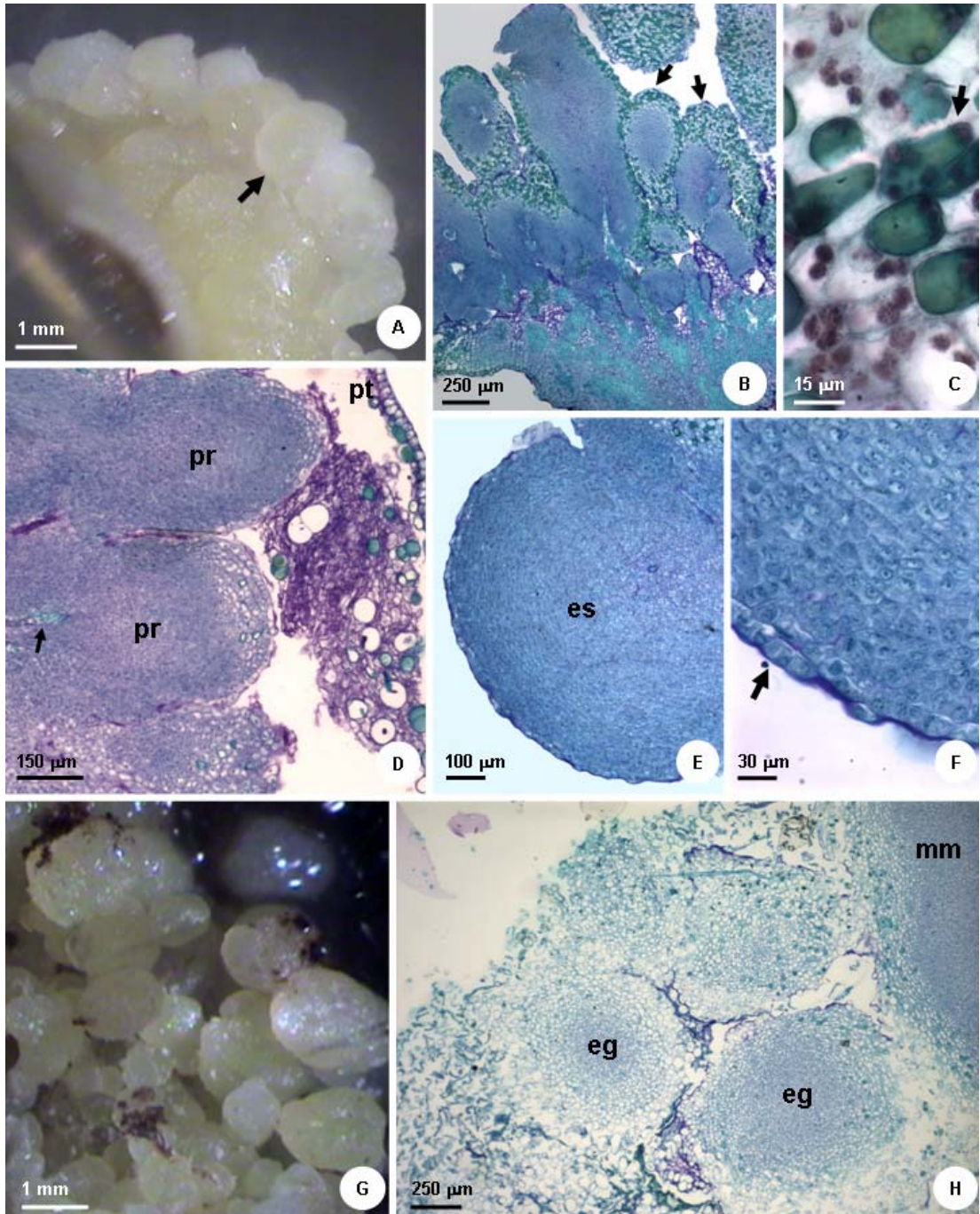
**Figura 5.** Seções do explante de macaúba aos 50 dias de cultivo em meio para indução de embriogênese somática. A: Formação das massas meristemáticas a partir de células do procâmbio. Seta mostra a protoderme do explante sendo eliminada. B: Detalhe dos elementos traqueais entremeados por estruturas globulares. C: Detalhe de células em divisão das massas meristemáticas do procâmbio. D: Formação de estruturas globulares sem protoderme definida. E: Formação de massas meristemáticas próximas às células com acúmulo de grãos de amido. Seta indica elementos traqueais. F: Detalhe das células com acúmulo de grãos de amido. G: Surgimento de estrutura embriogênica por brotação. H: Detalhe da estrutura embriogênica com protoderme definida e células com núcleos e nucléolos evidentes (seta). eg: estruturas globulares; et: elementos traqueais; mm: massa meristemática; ca: células com grãos de amido; pt: protoderme.

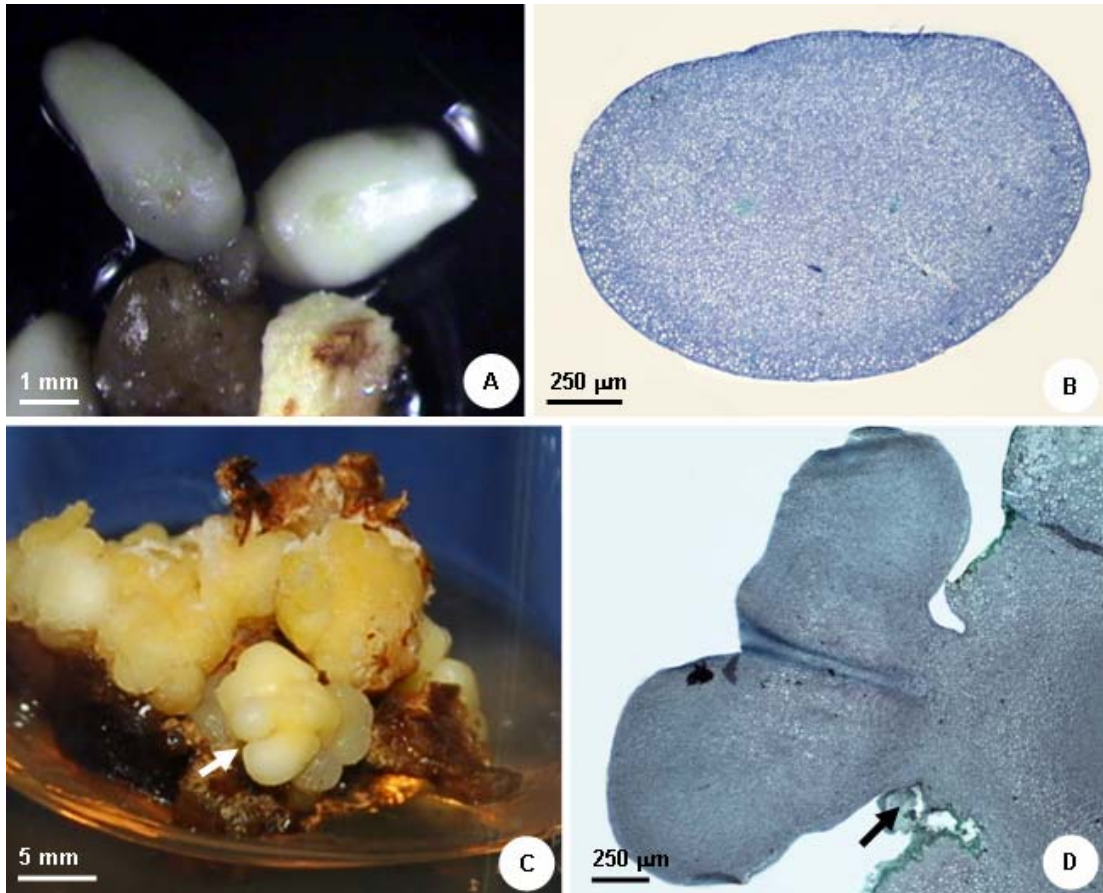




**Figura 6.** Calo de macaúba aos 60 dias de cultivo em meio para indução de embriogênese somática. A: Calo nodular com estruturas globulares fusionadas (seta). B: Seção do calo nodular com cordões de procâmbio com elementos traqueais diferenciados e massas meristemáticas muito desenvolvidas. Setas indicam células fenolizadas, com coloração esverdeada. C: Células com grãos de amido e células com compostos fenólicos (setas) indicado pela coloração esverdeada. D: Formação de primórdios radiculares a partir de massas meristemáticas. Setas indica elementos traqueais. E: Estrutura globular semelhante a embrião somático formando-se a partir de massa meristemática. F: Detalhe da estrutura semelhante a embrião somático com protoderme definida (seta). G: Estruturas globulares formadas a partir de calos nodulares. H: Seção das estruturas globulares formadas a partir da massa meristemática, com ausência de organização embriogênica definida. eg: estruturas globulares; es: estrutura globular semelhante a embrião somático; et: elementos traqueais; pr: primórdios radiculares; pt: protoderme.







**Figura 7.** Exemplos de embriões somáticos de origens uni e multicelular. A: Embrião somático de origem unicelular, que se destaca facilmente do calo de origem e não está fusionado aos demais embriões. B: Seção histológica de embrião somático unicelular, com protoderme caracterísrica e não fusionada ao explante de origem. C: Embrião somático de origem multicelular (seta), fusionado ao tecido de origem e a outros embriões somáticos. D: Estrutura embriogênica de origem multicelular, fusionado ao tecido de origem (seta) que dará origem a mais de um embrião somático.

#### 4 - DISCUSSÃO

O embrião de macaúba é semelhante ao de outras palmeiras, como *Washingtonia filifera* (DeMason, 1988), *Cocos nucifera* (Sugimura & Murakami, 1990) e *Elaeis guineensis* (Kanchanapoom & Domyoas, 1999). Os embriões de palmeira também não apresentam grãos de amido como reserva, como observado em macaúba. A principal diferenciação do embrião de macaúba em relação ao das demais palmeiras é a presença de invaginações da protoderme na região distal (Figuras 1A,C).

O acompanhamento dos eventos que ocorreram nos embriões zigóticos de macaúba ao longo dos 60 dias de cultivo em meio de indução de embriogênese somática permitiu associar o surgimento de estruturas globulares e massas meristemáticas a tecidos específicos do explante original. Ao final dos 60 dias de cultivo, as secções histológicas dos calos obtidos demonstravam uma diferenciação bastante evidente em relação aos tecidos originais (Figuras 6,7). Em alguns locais, houve rompimento dos tecidos do explante devido à intensa multiplicação celular e degeneração do meristema fundamental (ou parênquima). A protoderme se modificou inteiramente, tanto por deposição de compostos fenólicos, quanto pela intensa divisão celular, gerando novas camadas de células. Os cordões de procâmbio sofreram intensas multiplicações e diferenciação dos tecidos (Figuras 2E, 3C, 4E, 5B). Assim sendo, cortes histológicos nessa fase não seriam muito conclusivos quanto à origem dos tecidos embriogênicos.

Apesar da região da plúmula ter sofrido muitas divisões celulares, a região distal referente ao cotilédone foi a que teve mais resposta embriogênica (Figuras 2C,3A). Guerra & Handro (1998) também obtiveram calo embriogênico na região cotiledonar de embriões de *Euterpe edulis*.

No processo de indução de embriogênese somática, ocorreram dois tipos de formação de embriões. O primeiro deles ocorreu via origem unicelular, com a divisão em vários planos de células do meristema fundamental abaixo dos cordões de procâmbio (Figura 4C), principalmente na região distal do embrião. As células desta região, que no explante original possuem citoplasma menos denso que as células da periferia, passaram a apresentar citoplasma denso e núcleos e nucléolos mais evidentes (Figura 2D). Esta mudança na morfologia celular é um sinal da aquisição de competência embriogênica. Kanchanapoom & Domyoas (1999) descreveram o

surgimento de regiões meristemáticas a partir de células subepidermais de embriões zigóticos de *Elaeis guineensis* e descreveram o processo como tendo origem unicelular. Ao redor dos agrupamentos de células ou proembriões, foi observado um aparente espessamento da parede, causado pela liberação de pectinas, provavelmente pela dissolução da lamela média, o que propiciou a individualização dos pró-embriões (Figuras 2D,4B). A presença de agrupamentos celulares isolados também foi verificada na protoderme e em regiões próximas à plúmula, mas estes possíveis proembriões não se desenvolveram. Verdeil et al. (2001) acompanharam o surgimento de células embriogênicas em calos de *Cocos nucifera* e verificaram mudanças na parede celular como fechamento dos plasmodesmas, deposição de calose e surgimento de novas camadas externas. Segundo os autores, estes eventos se assemelham aos que ocorrem durante a megasporogênese em angiospermas, e levariam ao isolamento celular necessário para a reprogramação da célula e conseqüente início da embriogênese. You et al. (2006) verificaram alta correlação de deposição de calose na parede celular de células de *Eleutherococcus senticosus* com o início do desenvolvimento de proembriões. O aparente espessamento de parede celular ao redor dos pró-embriões também foi verificado em outros eventos de indução de embriogênese somática, como em calos de *Phoenix dactylifera* (Sané et al., 2006) e de berinjela (Tarré et al., 2004). Com 50 e 60 dias, estruturas semelhantes a embriões somáticos ocorreram no local correspondente à ocorrência de embriogênese pela via unicelular (Figuras 5D). O fato de só alguns dos embriões terem chegado a fases mais avançadas pode estar relacionado com competição entre os pró-embriões.

Além da formação de proembriões pela origem unicelular, também houve a formação de embriões somáticos via origem multicelular, com a formação de massas meristemáticas. O trabalho descreveu o surgimento de massas meristemáticas evidentes ao 40º dia de cultivo, originadas de intensas divisões das células procambiais (Figura 4A). Essas massas meristemáticas constantemente se fragmentavam, dando origem ao calo nodular e levando a formação de estruturas globulares semelhantes a embriões somáticos (Figuras 5B). Essas estruturas não possuíam protoderme e eram formadas por células meristemáticas, altamente citoplasmáticas, com núcleos evidentes e em intensa multiplicação (Figuras 5B). A partir do 60º. dia de cultivo, algumas destas estruturas sofreram epidermização, dando origem a embriões somáticos (Figura 6E). Esse processo de formação de

embriões é bastante similar ao descrito por Tisserat & DeMason (1980), em que os embriões somáticos de *P. dactylifera* se originavam a partir de calos nodulares, que histologicamente eram formados por células meristemáticas. Em *Cocos nucifera*, Saénz et al. (2006) também verificaram origem multicelular dos embriões somáticos que se formavam a partir de calos nodulares, com formação de zonas meristemáticas. A indução de calo nodular a partir da multiplicação de células perivasculares foi observada em *Elaeis guineensis* (Schwendiman et al., 1988) e em *Euterpe edulis* (Guerra & Handro, 1998), mas utilizando explantes foliares. Também se verificou a ocorrência de estruturas embriogênicas fusionadas ao tecido de origem (Figura 5G). Histologicamente, os embriões de origem multicelular apresentam-se fusionados ao tecido de origem (Williams & Maheswaran, 1986), podendo ocorrer também fusão de embriões somáticos.

Além da formação de embriões somáticos de origem multicelular, as massas meristemáticas também levaram à formação de primórdios radiculares (Figura 6D). Esses primórdios se distinguem dos embriões somáticos pela ausência de protoderme característica e pela ocorrência de elementos vasculares. Eventualmente, verificou-se a formação de raízes durante o processo de regeneração (dados não mostrados). Isso ocorreu provavelmente devido a desbalanceamento nas dosagens de auxinas presentes no meio de cultivo. Buffard-Morel et al. (1992) propuseram que um mesmo tipo de auxina pode induzir formação de raízes e de embriões somáticos em *C. nucifera*. Tarré et al. (2004) verificaram que o mesmo tipo de célula proveniente de tecido vascular do explante de *Solanum melongena* levou à formação de embriões somáticos e de primórdios radiculares.

As células procambiais também geraram elementos traqueais, provavelmente a partir de células predeterminadas para a formação do xilema. Possivelmente, essas células já se encontravam em um estágio mais avançado de determinação celular e o picloram agiu na sua maturação.

O acúmulo de amido nos calos de macaúba ocorreu geralmente em células que não possuíam características embriogênicas. Conforme verificado, o embrião zigótico de macaúba não contém amido como reserva, indicando que houve síntese *de novo*. Em muitos casos, as células com grãos de amido estavam localizadas próximas a regiões com intensa atividade meristemática. O acúmulo de amido, seja nas células embriogênicas ou em células adjacentes do explante, parece ser um fenômeno ligado à aquisição de competência embriogênica. Altas quantidades de



amido foram observadas durante o processo de formação de embriões somáticos em algumas espécies (Profumo & Gastaldo, 1995; Rodriguez & Wetzstein, 1998). Entretanto, o possível papel do amido no processo de embriogênese somática ainda não está claro. O mais provável é que o acúmulo de amido esteja relacionado com a pouca atividade mitótica das células que geralmente o armazenam, já que as células embriogênicas, geralmente em alta atividade mitótica, geralmente possuem menor acúmulo de amido.

O trabalho demonstrou a ocorrência de muitos pró-embriões e de alguns embriões somáticos na fase globular no início da formação, e pelas análises morfológicas, muito poucos chegaram a fases mais avançadas de desenvolvimento (vide capítulo 1). Dessa forma, mais estudos serão necessários para melhorar o processo de amadurecimento dos embriões globulares de macaúba.

A indução de embriogênese somática em embriões zigóticos de macaúba usando picloram levou a formação de embriões somáticos globulares pelas duas vias, unicelular e multicelular. Em espécies em que ocorreu a embriogênese por via multicelular, processos iniciais de embriogênese por via unicelular também foram relatados, mas esses embriões se degeneravam precocemente (Michaux-Ferrière et al., 1992; Alemanno et al., 1996). Em *Quercus suber*, as duas vias foram viáveis na regeneração de embriões somáticos (Puigderrajols et al., 2001). Muitos pró-embriões se desenvolveram a partir de células do meristema fundamental da região cotiledonar do embrião zigótico, principalmente até o 40º dia de cultivo. Após esta fase, deveriam ser notados vários embriões somáticos na fase globular, provenientes destes pró-embriões, mas poucos se desenvolveram. Esse período coincide com o crescimento das massas meristemáticas provenientes do procâmbio. Em *Theobroma cacao*, os pró-embriões se degeneram possivelmente em função da via multicelular de formação de embriões somáticos (Alemanno et al., 1996). Sabendo que a via multicelular de indução de embriões somáticos de macaúba é mais intensa a partir do 40º dia de indução, e que os pró-embriões começam a surgir entre o 10º e o 20º dias de cultivo, pode-se adotar novas estratégias de cultivo dos calos, visando o desenvolvimento dos pró-embriões de origem unicelular.

## 5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alemanno L, Berthouly M, Michaux-Ferrière N Histology of somatic embryogenesis from floral tissues cocoa. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 46: 187-194, 1996.

Arkcoll, D **New crops from Brazil**, In: Janick J, Simon EJ Advances in new crops p. 367-371 Timber press, Portland, OR, 1990.

Buffard-Morel J, Verdeil JL, Pannetier C Embryogenèse somatique du cocotier (*Cocos nucifera* L.) à partir d'explants foliaires: études histologiques. **Canadian Journal of Botany** 70: 735-741, 1992.

Chan JL, Saéñz L, Talavera C, Hornung R, Robert M, Oropeza C Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports** 17: 515-521, 1998.

DeMason DA Embryo structure and storage reserves histochemistry in the palm *Washingtonia filifera* **American Journal of Botany** 75: 330-337, 1988.

Duval Y, Engelmann F, Durand-Gasselín T Somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) In: Bajaj YPS (ed) **Biotechnology in Agriculture and Forestry 30: Somatic embryogenesis and synthetic seed I**, Springer-Verlag:Berlin, p. 335-352, 1995.

Euwens CJ. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera*) and cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum** 36:23-28, 1978.

Fki L, Masmoudi R, Drira N, Rival A An optimized protocol for plant regeneration from embryogenic suspension cultures of date palm, *Phoenix dactylifera* L., cv. Degls et Nour. **Plant Cell Reports** 21: 517-524, 2003.

Guerra MP, Handro W Somatic embryogenesis and plant regeneration in different organs of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae): control and structural features. **Journal of Plant Research** 111: 65-71, 1998.

Johansen D **Plant Microtechnique**. New York: McGraw Hill, 523p.,1940.

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

Lison L **Histochemie et cytochemie animals. Principes et methods. Vols. 1,2**. Paris: Gauthier-Villais, 1960.

Litz RE, Gray DJ Somatic embryogenesis for agricultural improvement. **World Journal of Microbiology & Biotechnology** 11: 416-425, 1995.

Motta PE, Curi N, Oliveira-Filho AT, Gomes JBV Ocorrência da macaúba em Minas Gerais: relação com atributos climáticos, pedológicos e vegetacionais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 37: 1023-1031, 2002.

Michaux-Ferrière N, Grout H, Carron MP Origin and ontogenesis of somatic embryos in *Hevea brasiliensis* (Euphobiaceae) **American Journal of Botany** 79: 174-180, 1992.

Michaux-Ferrière N., Carron M-P. Histology of early somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*: the importance of the timing of subculturing. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 19: 243-256, 1989.

O'Brien TP, McCully ME **The study of structure principles and selected methods**. Melbourne, Termarcarphi Pty. Ltd, 280p., 1981.

Perez-Núñez MT, Chan JL, Saenz L, Gonzalez T, Verdeil JL, Oropeza C. Improved somatic embryogenesis from *Cocos nucifera* (L.) plumule explants. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant** 42: 37-43, 2006.

Puigderrajols P, Mir G, Molinas M Ultrastructure of early secondary embryogenesis by multicellular and unicellular pathways in cork oak. **Annals of Botany** 87: 179-189, 2001.

Profumo P, Gastaldo P Somatic embryogenesis in horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) In: Bajaj YPS (ed) **Biotechnology in Agriculture and Forestry 30: Somatic embryogenesis and synthetic seed I**, Springer-Verlag:Berlin, p.233-245, 1995.

Raemarkers CJJM, Jacobsen E, Visser RGF Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. **Euphytica**, 81: 93-107, 1995.

Rodriguez APM, Wetzstein HY A morphological and histological comparison of the initiation and development of pecan (*Carya illionensis*) somatic embryogenesis cultures induced with naphthaleneacetic acid or 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **Protoplasma** 204: 71-83, 1998.

Saénz L, Azpeitia A, Chuc-Armendariz B, Chand JL, Verdeil JL, Hocher V, Oropeza C Morphological and histological changes during somatic embryo formation from coconut plumule explants. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**. 42: 19-25, 2006.

Sané, D, Aberlenc-Bertossi F, Gassama-Dia YK, Sagna M, Trouslot MF, Duval Y, Borgel A Histocytological analysis of callogenesis and somatic embryogenesis from cell suspensions of date palm (*Phoenix dactylifera*) **Annals of Botany**. 98: 301-308, 2006.

Schwendiman J, Pannetier C, Michaux-Ferriere N Histology of somatic embryogenesis from leaf explants of the oil palm *Elaeis guineensis*. **Annals of Botany** 62: 43-52, 1988.



Sugimura Y, Murakami T Structure and function of the haustorium in germinating Coconut palm seed. **JARQ** Paris 24: 1-14, 1990. 460p.

Tarré E, Magioli C, Margis-Pinheiro M, Sachetto-Martins G, Mansur E, Santiago-Fernandes LDR. *In vitro* somatic embryogenesis and adventitious root initiation have a common origin in eggplant (*Solanum melongena* L.). **Revista Brasileira de Botânica** 27: 79-84, 2004.

Tisserat B, DeMason DA A histological study of development of adventive embryos in organ cultures of *Phoenix dactylifera*. **Annals of Botany** 46: 465-472, 1980.

Verdeil JL, Hocher V, Huet C, Grosdemange F, Escoute J, Ferrière N, Nicole M Ultrastructural changes in coconut calli associated with the acquisition of embryogenic competence. **Annals of Botany** 88: 9-18, 2001.

Williams EG, Maheswaran G Somatic embryogenesis: factors influencing behaviour of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany** 57: 443-462, 1986.

You XL, Yi JS, Choi YE Cellular change and callose accumulation in zygotic embryos of *Eleutherococcus senticosus* caused by plasmolysing pretreatment result in high frequency of single-cell-derived somatic embryogenesis. **Protoplasma** 227: 105-112, 2006.

Zimmerman JL Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **The Plant Cell** 5: 1411-1423, 1993.

## CONCLUSÕES GERAIS

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, foi possível concluir que:

- É possível obter a embriogênese somática em macaúba a partir de embriões zigóticos.
- O picloram tem melhor efeito que o 2,4-D, NOA e CPA, na concentração de 9  $\mu\text{M}$ , na regeneração de embriões somáticos de macaúba.
- O TDZ, na concentração de 1  $\mu\text{M}$ , tem efeito benéfico na indução de embriogênese, principalmente quando utilizado junto com 2,4-D. Entretanto, o TDZ não tem bom efeito na fase de regeneração dos embriões somáticos de macaúba.
- O carvão ativado a 3  $\text{g.L}^{-1}$  tem efeito positivo na regeneração de embriões somáticos, possivelmente por reduzir a concentração das auxinas no meio de cultura.
- A regeneração de embriões somáticos de macaúba a partir de massas embriogênicas obtidas em embriões zigóticos ocorre após a redução da auxina picloram no meio de cultura, na presença de luz.
- É possível obter a embriogênese secundária de macaúba, utilizando o mesmo meio de indução ( $Y_3 + 9 \mu\text{M}$  de picloram), gerando um processo cíclico.
- A origem dos embriões somáticos a partir de embriões zigóticos pode ter multicelular ou unicelular. A origem unicelular ocorre primeiro, a partir de células do meristema fundamental da região distal do embrião zigótico. Já a origem multicelular ocorre posteriormente, com a formação de massas meristemáticas que se formam a partir de células procambiais.

## ANEXOS

**Tabela 1.** Efeito do TDZ e dos tipos de auxina na porcentagem de indução de calo tipo II em embriões zigóticos de macaúba.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TDZ	1	2,17E-19	2,17E-19	0,000	0,9975
Auxina	3	1,7216	0,5739	8,770	0,0002
TDZ x Auxina	3	0,6047	0,2016	3,080	0,0413
erro	32	2,0939	0,065		
Total	39	4,4202			
CV (%) = 85,27					
Média geral = 0,30					

**Tabela 2.** Efeito do carvão ativado, tipos de auxinas e do TDZ na porcentagem de formação de EGSEs (estruturas globulares semelhantes a embriões somáticos) a partir de calo tipo II de macaúba.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Carvão	1	1,60000	1,60000	19,075	0,0001
Auxina	1	0,042250	0,042250	0,504	0,4830
TDZ	1	1,346890	1,346890	16,057	0,0003
Carvão x Auxina	1	0,011560	0,011560	0,138	0,7129
Carvão x TDZ	1	1,7347E-18	1,7347E-18	0,000	0,9975
Auxina x TDZ	1	0,044890	0,044890	0,535	0,4698
Carvão x Auxina x TDZ	1	0,011560	0,011560	0,138	0,7129
erro	32	2,684160	2,684160		
Total	39	5,741310			
CV (%) = 49,64					
Média geral = 0,5835					

**Tabela 3.** Efeito de TDZ e dos tipos de auxina no número de EGSE regenerados a partir de calos tipo II de macaúba.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TDZ	1	14745,60	14745,60	8,323	0,0066
Auxina	1	4000,00	4000,00	2,258	0,1417
TDZ x Auxina	1	2102,50	2102,50	1,187	0,2832
erro	36	53783,00	1771,75		
Total					
CV (%) = 155,04					
Média geral = 27,15					