

Embriogénesis cigótica *in vitro* de *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd ex Mart. en medios con bencilaminopurina y carbón activado

Fiori Fernández, C.¹; Díaz Lezcano, M.I.²; González Segnana, L.R.²

¹Universidad Nacional de Asunción, Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas (CEMIT), San Lorenzo

²Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Agrarias, Carrera de Ingeniería Forestal, San Lorenzo

³Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Agrarias, Carrera de Ingeniería Agronómica, San Lorenzo

E mail del autor: c_fiori88@hotmail.com

Embriogénesis cigótica *in vitro* de *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd ex Mart. en medios con bencilaminopurina y carbón activado. El objetivo fue lograr la embriogénesis cigótica *in vitro* de *A. aculeata* en medios Murashige & Skoog (MS) con diferentes concentraciones de bencilaminopurina (BAP) y carbón activado (CA). El diseño utilizado fue completamente al azar. Los tratamientos consistieron en medios MS con 1, 2 y 4 mg.L⁻¹ de (BAP), medios con 2 g.L⁻¹ de CA y MS. Se utilizaron 45 embriones cigóticos de *A. aculeata* cultivados inicialmente en MS con 2 g.L⁻¹ de CA posteriormente subcultivados en medios MS con BAP 1, 2 y 4 ppm, 2 g.L⁻¹ de CA y MS. Se analizó el desarrollo de hojas. Se aplicaron Kruskal-Wallis y Mann-Whitney ($p < 0,05$). No existió diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0,05$), se suprimió la latencia en semillas obteniéndose plantines en 40 días.

Palabras clave: *Acrocomia aculeata*, bencilaminopurina, carbón activado, embrión cigótico

Effect of different concentrations of benzylaminopurine (BAP) on *in vitro* embryogenesis of *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd ex Mart. This study aimed to assess the effect of BAP on zygotic embryogenesis of *A. aculeata*. The design was completely random. Treatments consisted of MS media with 1, 2 and 4 mg.L⁻¹ of benzylaminopurine (BAP), media with 2 g.L⁻¹ of activated carbon (AC) and MS. 45 zygotic embryos of *A. aculeata* initially grown in MS with 2 g.L⁻¹ of CA subsequently subcultured in MS media with BAP 1, 2 and 4 ppm, 2 g.L⁻¹ CA and simple MS were used. Leaf development was analyzed. Kruskal-Wallis and Mann-Whitney ($p < 0,05$) were applied. There was no significant difference between treatments ($p > 0,05$), latency was suppressed in seeds, and seedlings developed in 40 days.

Keywords: *Acrocomia aculeata*, benzylaminopurine, activated carbon, zygotic embryo

INTRODUCCIÓN

Acrocomia aculeata (Jacq.) Lodd ex Mart. es una especie originaria de la vegetación de Paraguay y Brasil y se encuentra ampliamente distribuida en todo el territorio nacional como también en gran parte de América Tropical y Subtropical, encontrándose registradas también en

regiones de América Central (Crocomo y Melo, 1996; Sorol *et al.*, 2012).

Es una palmera cuyo estípite puede llegar a medir entre 10 a 15 m de altura con un diámetro de 20 a 30 cm. La región de los nudos está cubierta de espinos oscuros, puntiagudos de aproximadamente 10 cm de longitud, frecuentemente su estípite es revestido por la base de los

peciolos que permanecen adheridas a esta. Las hojas son verdes, ordenadas en diferentes planos, son espinadas midiendo entre 4 a 5 m, presentando aproximadamente 130 foliolos en cada lado de la región central (Lorenzi *et al.*, 1996.; Silva, 2005 mencionados en Schmidt, 2008).

En Paraguay es comúnmente conocida como *mbokaja* y generalmente sus frutos son usados como alimento en su estado natural, en especial en algunas culturas nativas, también es empleada para tratar enfermedades respiratorias, como laxantes, analgésicos, propiedades reconstituyentes, también es empleado como forraje para la alimentación de animales, como postes y techos y el carozo para combustible de calderas (FAO, 2002; Lima *et al.*, 2008; Traesel *et al.*, 2015). La Industria de jabones, detergentes y cosméticos nacionales utilizan el aceite de pulpa y almendra extraídos de plantaciones nativas (MAG, 2008).

Crece en forma natural en áreas abiertas del Cerrado y en las áreas más secas de los pastizales y esteros del sur (McDonald, 2007). Otra de sus potencialidades radica en que el endospermo de los frutos de *A. aculeata* posee una considerable cantidad de lípidos, proteínas y polisacáridos en su pared celular de almacenamiento, estos lípidos insaturados representan una excelente materia prima para la industria energética, siendo utilizados en el proceso de elaboración de aceite para biodiesel (Alang *et al.*, 1988; Demason, 1988; Aguiar y Mendonça, 2003; Panza *et al.*, 2004).

El potencial aceitero que posee tanto la almendra como la pulpa, representa un elevado valor en términos energéticos de alrededor de 35%, siendo ésta característica esencial para la producción

de biocombustible considerando un rendimiento en el fruto de 2500 a 4000 kg.ha⁻¹ (Teixeira, 2005; Pereira *et al.*, 2015). Souto (2008) menciona que de una hectárea es posible obtener aproximadamente 4000 litros de aceite, producción considerablemente mayor comparada con otros cultivos también aceiteros como el aguacate (*Persea americana*), ricino (*Ricinus communis*), colza (*Brassica napus*), maní (*Arrachis hipogaeae*), girasol (*Helianthus annuus*), tung (*Aleurites fordii*) y soja (*Glicine max*).

Sin embargo, *A. aculeata* presenta inconvenientes en la germinación de sus semillas ocasionando una lentitud, bajo porcentaje de germinación y pérdida de viabilidad por deshidratación debido a la latencia retardando la germinación entre uno a dos años (Caldas, 2006; González, 2010) constituyéndose de esta manera un factor muy limitante y restrictivo en la producción y rendimiento de la especie (Neto *et al.*, 2014). Cabe señalar que su cultivo fue declarado de interés nacional en el año 2005 debido a su valor económico, impulsando de esa manera una serie de investigaciones que posibiliten una exitosa domesticación de la especie (Sorol *et al.*, 2012).

La latencia es el estado en el cual una semilla viable no germina, aunque las mismas sean expuestas a condiciones de humedad, temperatura, luz y concentración de oxígeno ideales para hacerlo (Doria mencionado en Martínez *et al.*, 2013). Este fenómeno puede deberse a sustancias químicas inhibitorias entre las cuales se encuentran el ácido abscísico y la cumarina presentes en el endospermo de algunas semillas, las mismas dificultan la reacción del embrión retardando su germinación

(Schmidt, 2008; Bewley mencionado en Da Silva *et al.*, 2011; Ribeiro *et al.*, 2012). En los últimos tiempos fueron varios los estudios realizados con el objetivo de romper la latencia de las semillas y posibilitar una efectiva aclimatación y desarrollo de la especie (Monteiro *et al.*, 2012; Gonçalves *et al.*, 2013)

Un procedimiento eficaz y sencillo que puede dar solución a las técnicas convencionales de germinación cuyas productividades son muy bajas y en ocasiones nulas es el método de propagación *in vitro* de embriones, removiendo la misma y proporcionándole los medios físicos y químicos para su desarrollo posibilitando de este modo su desarrollo y crecimiento independientemente de la edad, tamaño y estadio de desarrollo en que fue escindido (Rocha, 1998; Castilla, 2012; Fiori *et al.*, 2016).

Específicamente consiste en aislar embriones de los óvulos de una planta y cultivarlos en un medio estéril que contenga nutrientes esenciales que les permita concluir su desarrollo normal y por ende germinar, es relativamente fácil de llevar a cabo en embriones maduros y sus posibilidades de éxito son bastante altas (Cardone *et al.*, 2010).

La técnica de rescate y multiplicación de embriones *in vitro* constituyen una solución alternativa y complementaria para el sector forestal a corto plazo, demostrando que ésta técnica es importante para los programas de protección y conservación de especies que presentan dificultades de propagación sexual, viabilidad y escasez de semillas, cruzamientos interespecíficos, latencia prolongada y recalcitrancia (Shibu y Guillespie, 1998; Benson, 2000).

El objetivo principal del trabajo consistió en establecer un protocolo que posibilite la embriogénesis cigótica de *Acrocomia aculeata* en medios de cultivo Murashige & Skoog con diferentes concentraciones de bencilaminopurina (BAP) y carbón activado (CA).

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización

El experimento se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología del Departamento de Producción Agrícola de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Asunción situada en la ciudad de San Lorenzo, Paraguay.

Población y fuente de explantes

Se utilizaron embriones cigóticos provenientes de frutos maduros de *A. aculeata* (Fig. 1A) colectados de diez individuos de las cuales se extrajeron diez frutos por planta madre, siendo éstas posteriormente secados a temperatura ambiente durante veinte días para facilitar la eliminación del pericarpio y posibilitar la obtención de las almendras con la ayuda de una prensa manual. Del lote total de 100 frutos, fueron seleccionados al azar 50 frutos considerando criterios como tamaño uniforme, ausencia de daños mecánicos causados por insectos y posibles signos de infecciones ocasionadas por patógenos.

Desinfestación de almendras

Antes de la extracción de los embriones las almendras fueron desinfestadas superficialmente (Fig. 1B) con solución de etanol al 90% durante 4 minutos seguido de una inmersión en hipoclorito de sodio al 20% por 20 minutos. Finalmente se efectuó un triple enjuague con agua

destilada esterilizada sumergiendo las almendras acompañadas de leves agitaciones durante un tiempo de tres minutos. Esta operación se repitió tres veces con el objetivo de eliminar excedentes de soluciones de etanol e hipoclorito que pudieran arrastrar las almendras, todo el proceso se llevó a cabo dentro de la cámara de flujo laminar de aire estéril.

Incisión de almendras

Las almendras desinfectadas inmediatamente fueron depositadas en placas de Petri esterilizadas y con el empleo de un bisturí y pinza de puntas finas se realizaron dos incisiones a los lados de cada almendra, en la zona media, tomando como referencia el punto de inserción del embrión el cual es ligeramente prominente, la segunda incisión fue acompañada con una torsión lateral para facilitar la fisión y de esa manera extraer el embrión de su interior (Fig. 1C).

Tratamientos y unidad experimental

Luego de la de extracción, los embriones fueron cultivados inicialmente en medios MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementados con carbón activado (CA) a razón de 2 g.L⁻¹ y expuestos a oscuridad inicial por 20 días. La ubicación de los embriones dentro de los frascos fue de la misma forma en que se encontraban en las almendras (posición vertical).

Después de producirse la germinación, luego de los 20 días de cultivo en MS con CA 2 g.L⁻¹ e incubación en oscuridad, los mismos fueron subcultivados en los cinco

tratamientos consistentes en: T₁ (control) = MS, T₂ = MS con 2 g.L⁻¹ de CA, T₃ = MS con 1 mg.L⁻¹ de BAP, T₄ = MS con 2 mg.L⁻¹ de BAP y T₅ = MS con 4 mg.L⁻¹ de BAP y expuestos a fotoperiodo constante de 16 horas de luz a 24 ± 1 °C. La unidad experimental estuvo conformada por tres frascos con un embrión cigótico cada uno totalizando de esa forma 45 embriones cultivados en total.

Variable

La variable analizada durante el proceso experimental consistió en la medición de la longitud de las hojas (cm) generadas por los embriones cigóticos sembrados *in vitro*. Para dicha operación se utilizó una regla milimetrada realizándose la medición luego del subcultivo de los embriones contenidos inicialmente en medios MS con CA a razón de 2 g.L⁻¹ en los diferentes tratamientos. Posterior al subcultivo se estableció un total de 40 días de medición divididos en dos períodos de 20 días.

Diseño experimental

El trabajo consistió en un diseño completamente al azar con cinco tratamientos y tres repeticiones. Para la observación de efectos entre tratamiento se aplicó la prueba de Krukal – Wallis y la prueba de Mann – Whitne (p<0,05) y para diferenciación entre comparaciones pareadas previa comprobación de normalidad en la distribución por Shapiro-Wilk con la ayuda del paquete estadístico Past[®].

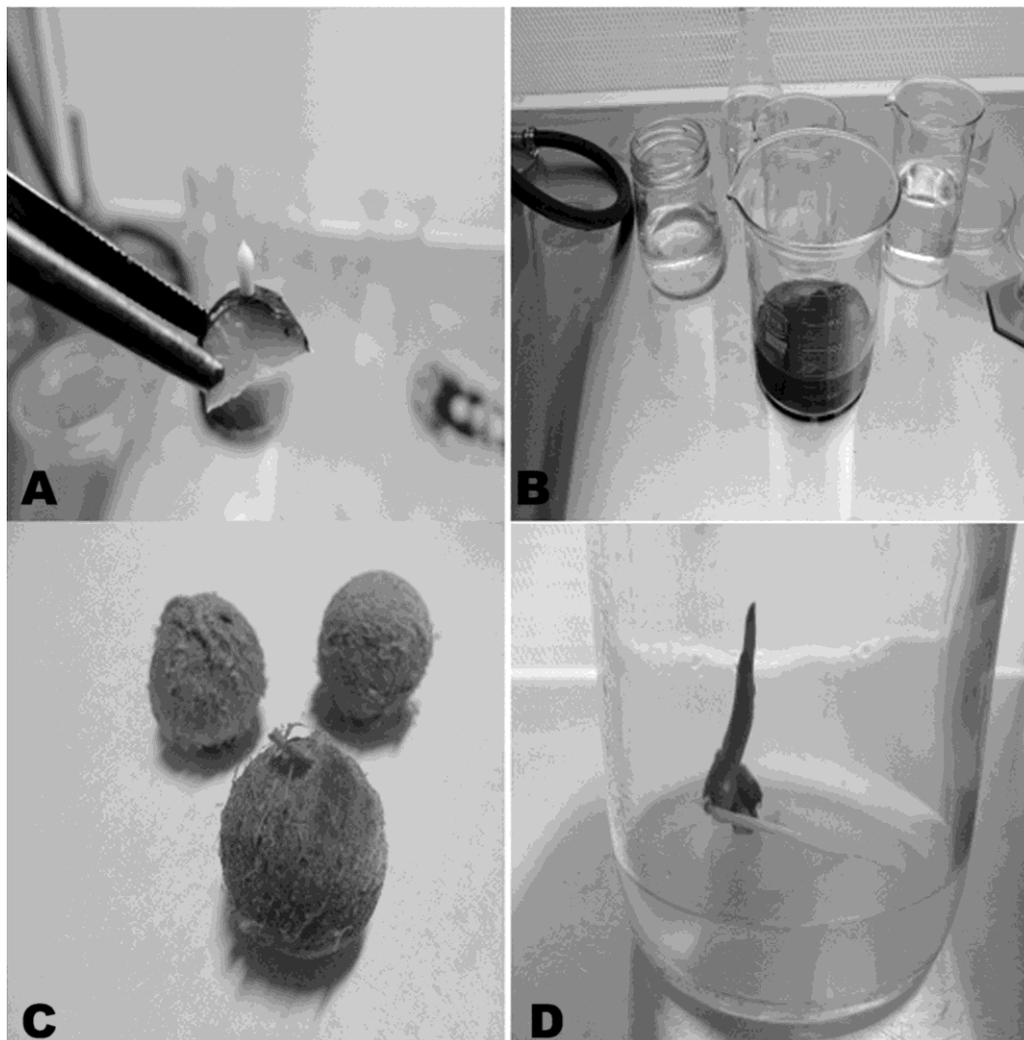


Fig. 1: Proceso experimental del cultivo de embriones cigóticos de *A. aculeata*, **A.** Frutos maduros de *A. aculeata* sin pericarpio, **B.** Desinfestación de almendras en la cámara de flujo laminar, **C.** Embrión cigótico extraído del endocarpio, **D.** Plántula obtenida en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) enriquecido con BAP luego de 40 días del aislamiento y cultivo *in vitro* del embrión.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Longitud de partes aéreas generadas

Las medias de longitud de partes aéreas medidas en centímetros se realizaron 20 y 40 días después del subcultivo, los mismos fueron sometidos a la prueba de normalidad mediante Shapiro – Wilk

verificándose que no seguían una distribución normal. Seguidamente se aplicó el test no paramétrico Kruskal – Wallis ($p < 0,05$) donde no se observó diferencias significativas entre tratamientos ($p = 0,14$) luego de 20 días del subcultivo ni luego de 40 días ($p = 0,08$). En la Tabla 1 se muestran las comparaciones

pareadas entre los diferentes tratamientos siendo éstas no significativas. mediante prueba de Mann - Whitney

Tabla 1. Comparaciones pareadas mediante de Mann – Whitney 20 días después del subcultivo de embriones cigóticos de *A. aculeata*.

	T ₁ Control	T ₂ MS+2g.L ⁻¹ CA	T ₃ 1 ppm BAP	T ₄ 2 ppm BAP	T ₅ 4 ppm BAP
T ₁ Control		0,2683 ^a	0,5066 ^a	0,8137 ^a	0,5066 ^a
T ₂ MS+2g.L ⁻¹ CA	0,2683 ^a		0,08086 ^a	0,184 ^a	0,5066 ^a
T ₃ 1 ppm BAP	0,5066 ^a	0,08086 ^a		1 ^a	0,08086 ^a
T ₄ 2 ppm BAP	0,8137 ^a	0,184 ^a	1 ^a		0,2612 ^a
T ₅ 4 ppm BAP	0,5066 ^a	0,5066 ^a	0,08086 ^a	0,2612 ^a	

Medias con letras comunes no son significativamente diferentes (p<0,05)

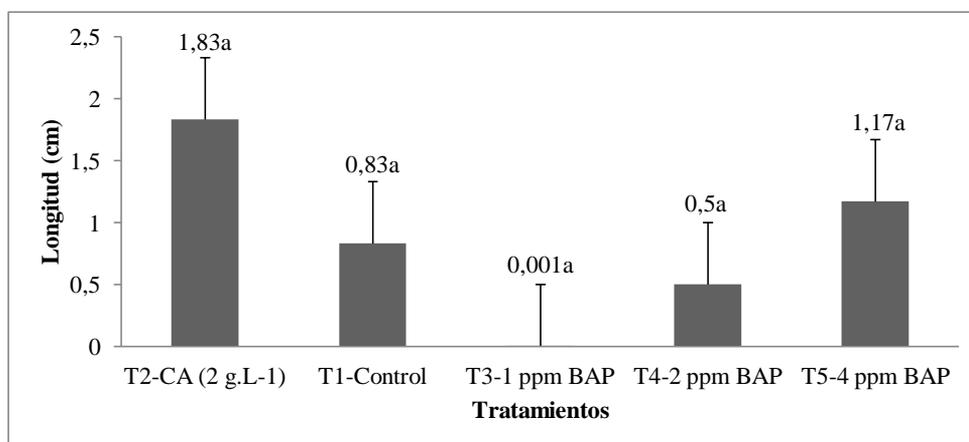


Fig. 2: Comparación de medias de longitud de partes aéreas de la primera medición, luego de 20 días del subcultivo de embriones cigóticos de *A. aculeata*.

En la Fig. 1 se observan las longitudes de hojas desarrolladas en los diferentes tratamientos luego de 20 días de incubación a fotoperiodo constante de 16 horas luz a 24 °C ± 1°. El mayor valor de longitud de hojas se observa en el T₂ consistente en un medio MS más 2 g.L⁻¹ de CA, la misma desarrolló una media de 1,83 cm seguida del T₅, MS más 4 ppm de BAP, expresando una media de 1,17 cm de longitud. El Control, conformado por medios MS sin ningún tipo de suplementación antioxidante ni BAP

presentó una media de 0,83 cm. El T₃, MS más 1 ppm de BAP no generó partes aéreas durante el desarrollo del experimento.

Ningún tratamiento arrojó diferencias significativas (p>0,05) respecto al T₁ (Control). La mayor longitud de partes aéreas en medios con BAP se observó en el T₂, MS+2 g.L⁻¹ de CA mientras que el resultado con menor expresión fue el T₃ consistente en la suplementación con BAP a razón de 1 ppm. La adición de CA a razón de 2 g.L⁻¹ en medios MS aparentemente resulta suficiente para la

generación de hojas en embriones cigóticos cultivados *in vitro* puesto que ningún tratamiento con BAP fue superior al mismo ni presentó significancia estadística.

Luego de 40 días se observaron leves cambios en cuanto a la longitud, aunque de igual forma no existieron diferencias significativas ($p > 0,05$) como se observa en la Tabla 2. El T₂ conformado por medios MS más 2 g.L⁻¹ de CA experimentó un leve crecimiento de 0,1 cm totalizando de

esa manera 1,93 cm, mientras que el T₅, medios con 4 ppm de BAP, alcanzó una longitud de 1,63 cm verificándose un crecimiento de 0,46 cm. El Control presentó una media de 1,07 cm siendo 0,24 cm mayor que 20 días antes, el T₄ consistente en medios con 2 ppm de BAP obtuvo una longitud de 0,83 cm, siendo 0,33 cm más que la medición anterior mientras que en el T₃ se experimentó una pequeña reacción de 0,3 cm. (Fig. 3).

Tabla 2. Comparaciones pareadas mediante de Mann – Whitney 40 días después del subcultivo de embriones cigóticos de *A. aculeata*

	T ₁ Control	T ₂ MS+2g.L ⁻¹ CA	T ₃ 1 ppm BAP	T ₄ 2 ppm BAP	T ₅ 4 ppm BAP
T ₁ Control		0,5497 ^a	0,6844 ^a	0,9924 ^a	0,8401 ^a
T ₂ MS+2g.L ⁻¹ CA	2,21 ^a		0,09352 ^a	0,3386 ^a	0,9807 ^a
T ₃ 1 ppm BAP	1,871 ^a	4,081 ^a		0,8899 ^a	0,2082 ^a
T ₄ 2 ppm BAP	0,5959 ^a	2,806 ^a	1,275 ^a		0,6169 ^a
T ₅ 4 ppm BAP	1,445 ^a	0,7652 ^a	3,316 ^a	2,041 ^a	

Medias con letras comunes no son significativamente diferentes ($p < 0,05$)

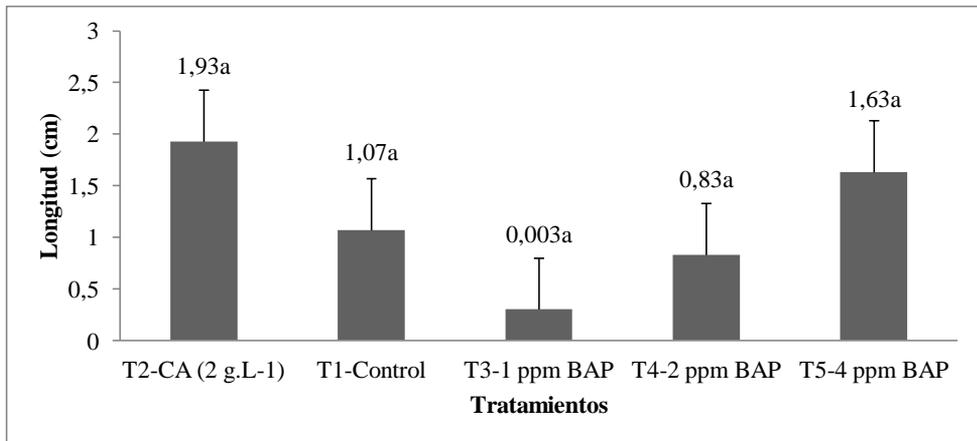


Fig. 3: Comparación de medias de longitud de partes aéreas correspondientes a la segunda medición, luego de 40 días del subcultivo de embriones cigóticos de *A. aculeata*.

El éxito de la germinación *in vitro* de embriones cigóticos es directamente proporcional al tamaño del mismo, cuanto menor es el tamaño del embrión mayor es su dependencia al medio de cultivo y sus componentes según exponen en sus resultados en cultivos de embriones de albaricoque Burgos y Ledbetter (1993) y Daorden *et al.* (2002).

En el momento de la extracción de los embriones, los mismos fueron de diferentes tamaños, llegando a contar con 3 y 4 mm de longitud aproximadamente (Fig. 1C) por lo que una buena suplementación en la preparación de los medios fue fundamental para lograr la germinación.

El tamaño del explante es un factor que puede afectar la respuesta embriogénica en palmas, en general los tamaños más pequeños responden mejor ante los diferentes tratamientos, probablemente porque existe una mayor cantidad de células expuestas al medio de cultivo, lo cual provoca un mayor estrés que fomenta el metabolismo celular (Fehér *et al.*, 2003).

De acuerdo a los resultados obtenidos por Quintero-García y Jaramillo-Villegas (2012) el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) ofrece un mejor soporte para el crecimiento y desarrollo de embriones cultivados *in vitro*.

Michelangeli de Clavijo *et al.* (2002) reportan que la germinación *in vitro* de embriones de *Bixa orellana* L. hasta su desarrollo en plántulas se logró en el medio MS con sacarosa (20 g.L⁻¹), sin regulador de crecimiento.

Los factores inmediatos relacionados al crecimiento de los explantes también lo son la temperatura, medio de cultivo y suplementaciones de sacarosa como fuente

de energía que genera efectos en la división celular (Arzate *et al.*, 2008).

Así mismo, la adición de carbón activado en los medios de cultivo además de prevenir la oxidación de los explantes favorece su desarrollo permitiendo un exitoso proceso de germinación como lo demuestran los resultados de Rodríguez *et al.* (1997) en sus trabajos de cultivo de embriones maduros e inmaduros de aguacatero.

Es posible que el carbón activado absorba compuestos fenólicos e inactive la polifenol oxidasa y peroxidasa ayudando a disminuir la oxidación y pardeamiento de los embriones cigóticos de *A. aculeata*, resultados similares fueron reportados por Moura *et al.* (2009).

Respecto a los reguladores de crecimiento, los explantes se encuentran bajo el control endógenos como exógenos y el balance de éstos es el que determinaría el resultado final en el desarrollo de explantes (Viñas y Jiménez, 2011).

Sin embargo, Soares *et al.*, (2014) también evidenciaron la ineficacia de la utilización de BAP tanto para la germinación de embriones de *A. aculeata* como para su posterior desarrollo.

Por otra parte, Martínez *et al.* (2012) demuestran que con la utilización de BAP fue posible incrementar el número de brotes *in vitro* por explante de *Sorghum bicolor* con el empleo de 0,22 mg.L⁻¹ del mismo en el medio de cultivo.

Delfrate *et al.* (2015) obtuvieron resultados exitosos en la diferenciación de callos embriogénicos de *A. aculeata*, estimulando el crecimiento y desarrollo mediante la implementación de BAP en los medios de cultivo.

Se demostró que el suministro de BAP en concentraciones de 0,05 mg.L⁻¹ podría

resultar efectivo en la germinación y desarrollo de hojas de la palma datilera (*Phoenix dactylifera* L.), especie monocotiledónea dioica ampliamente cultivada en regiones áridas, según los trabajos de Zouine & El Hadrami (2006).

Otros antecedentes de la efectividad del BAP en el desarrollo de hojas fueron las registradas por Sena *et al.*, (2007), los mismos exponen un buen desenvolvimiento y desarrollo de hojas de plántulas obtenidas por cultivo de embriones cigótico de la palma datilera *Phoenix dactylifera* L.

De acuerdo con Krikorian (1991), BAP es la citoquinina sintética que más se utiliza en el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, y según Pedroza (2009), si es adicionada al medio de cultivo en concentraciones de 0,03 a 3,0 mg.L⁻¹, estimula excelentes procesos de multiplicación celular posibilitando un buen desarrollo de hojas.

CONCLUSIONES

El medio de cultivo Murashigue y Skoog (1962) suplementado con carbón activado en dosis de 2 g.L⁻¹ permitió la germinación de la totalidad de los embriones cigóticos de *A. aculeata* cultivados *in vitro* durante un período de 20 días.

No se observaron diferencias significativas en cuanto a la longitud de hojas de las plántulas desarrolladas en los distintos tratamientos a partir de embriones cigóticos de *A. aculeata* cultivados *in vitro* durante 40 días en el medio MS suplementado o no con 1, 2 y 4 mg.L⁻¹ de BAP, en contrapartida el protocolo permitió obtener plantas enteras en un total de 40 días después del subcultivo

permitiendo el desarrollo efectivo de los mismos.

REFERENCIAS

- Krikorian, A. 1991. Medios de cultivo: Generalidades, composición y preparación. In: Roca, William M.; Mroginski, Luis A. (eds.). Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, CO. p. 41-77. (Publicación CIAT no. 151).
- Gonçalves, A.; Soares, T.; Pereira, P.; Monteiro, L. 2013. Water uptake and pre-germination treatments in macaw palm (*Acrocomia aculeata* - Arecaceae) seeds. *Journal of Seed Science* 35(1): 99-105
- Alang, Z.; Moir, G.; Jones, L. 1988. Composition, degradation and utilization of endosperm during germination in the oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Ann Bot* 61:261-268.
- Arzate, A.; Piña, J.; Zavaleta, M.; Hilda, A. 2008. Inducción de proembriones somáticos en ave del paraíso (*Strelitzia reginae* Banks). *Revista Fitotecnia Mexicana* 31(2): 183 - 186.
- González, A. 2010. Efectos del carbón activado (CA) y el ácido ascórbico en condiciones de luz y oscuridad sobre la oxidación de embriones zigóticos del mbokaja (*Acrocomia aculeata*) (Jacq.) en la germinación *in vitro*. Tesis de grado. San Lorenzo. Universidad Nacional de Asunción.
- Fehér, A.; Pasternak, T.; Dudits, D. 2003. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 74: 201-228. doi: 10.1023/A:1024033216561.

- Neto, A.; Guimarães, F.; Sales, J.; Fialho, E.; Silva, L.; Cândido, R. 2014. Dormancy breaking in macaw palm [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Loddiges ex Mart.] seeds. *Acta Scientiarum. Agronomy* 36(1): 43-50. doi:10.4025/actasciagron.v36i1.13220
- Fiori, C.; Díaz, M.; González, L. 2016. Enraizamiento *in vitro* de embriones cigóticos de *Acrocomia aculeata* (JACQ.) Lodd ex Mart. *Colombia Forestal*, 19(1), 67-78. doi <http://dx.doi.org/10.14483/udistrital.jour.colomb.for.2016.1.a05>
- Michelangeli, C.; Artioli, P.; Medina, M. 2002. Embriogénesis somática en onoto. *Agronomía Tropical* 52(4): 523-541.
- Sorol, C.; Haupenthal, D.; Reckziegel, M. 2012. Caracterización de la germinación, la plántula y el crecimiento de *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd ex Mart. *Rojasiana* 11(1 – 2): 21 – 30.
- DeMason, D. 1988. Embryo structure and storage reserve histochemistry in the palm *Washingtonia filifera*. *American Journal of Botany* 75(3): 330 - 337.
- Bewley, D. 1997. Seed germination and dormancy. *Plant Cell* 9: 1055-1066. doi: 10.1105/tpc.9.7.1055.
- Moura, E.; Yoshimitsu, S.; Contin, M.; de Sá Júnior, A.; Carvalho, M. 2009. Somatic embryogenesis in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from zygotic embryos. *Scientia Horticulturae* 119(2009): 447–454. doi: 10.1016/j.scienta.2008.08.033
- Benson, E. 2000. Special symposium; *in vitro* plant recalcitrance, an introduction. *In vitro Cell Dev. Biol. Plan.* 36: 141 – 148. doi 10.1007/s11627-000-0029-z
- Schmidt, F. 2008. Cultivo *in vitro* e embriogénesis somática de embriões zigóticos de macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Loddiges). Tesis doctoral. Minas Gerais. Universidades Federal de Vicosa.
- FAO (Organización de las Naciones Unidad para la Agricultura y la Alimentación). 2002. Estado de la información forestal del Paraguay. Proyecto GCP/RLA/133/EC. Información y análisis para el manejo forestal sostenible: integrando esfuerzos nacionales e internacionales en 13 países tropicales en América Latina. Santiago. Monografía de países Volumen 14. 195p
- Traesel, G.; Castro, L.; P. V. B. Silva, R. M. Muzzi, Kassuya, C. A. L. Kassuya, A. C. Arena y S. A. Oesterreich. 2015. Assessment of the cytotoxic, genotoxic, and mutagenic potential of *Acrocomia aculeata* in rats. *Genetics and Molecular Research* 14(1): 585-596. doi:org/10.4238/2015.January.26.13.
- Caldas, G. 2006. *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. - Areaceae: bases para o extrativismo sustentável. Tesis doctoral. Curitiba. Universidade Federal do Paraná.
- Pereira, G.; Alves, A.; Galveas, B.; Leo Carson, L. 2015. Parâmetros genéticos e diversidade em progênes de Macaúba com base em características morfológicas e fisiológicas. *Ciência Rura* 45(9): 1599-1605. doi:10.1590/0103-8478cr20140909.
- Souto, G. 2008. Agricultural insurance. Paraguay taps its potential for biofuel production. Fourth year/Second phase. Asunción. *Information and Communication*, IICA.50 p.

- Pedroza, J. 2009. Efecto del carbón activado, ácido indolacético (AIA) y bencilaminopurina (BAP) en el desarrollo de protocormos de *Epidendrum elongatum* Jacq. Bajo condiciones *in vitro*. *Revista Colombiana de Biotecnología* 10(1): 17 – 32.
- Zouine, J.; El Hadrami, I. 2007. Effect of 2, 4-D, glutamine and BAP on embryogenic suspension culture of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Scientia Horticulturae* 112(2007): 221–226. doi:10.1016/j.scienta.2006.12.041.
- Doria, J. 2010. Revisión Bibliográfica. Generalidades sobre las semillas: su producción, conservación y almacenamiento. *Cultivos Tropicales* 31(1):74-85
- Martínez, J.; Villegas, Y.; Enríquez, J.; Carrillo, J.; Vásquez, M. 2013. Estrategias de escarificación para eliminar la latencia en semillas de *Cenchrus ciliaris* L. y *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* (6): 1263-1272.
- Delfrate, J.; Lopes, L.; Amano, É.; Quoirin, M. 2015. Somatic embryogenesis in *Acrocomia aculeata* Jacq. (Lodd.) ex Mart using the thin cell layer technique. *Acta Botanica Brasílica* 29(4): 516-523. doi: 10.1590/0102-33062015abb0109.
- Shibu, J.; Gillespie, A. 1998. Allelopathy in black walnut (*Junglas nigra* L.) alley cropping spatio-temporal variation in soil juglone in a black walnut-corn (*Zea mays* L.) alley cropping system in the Midwestern USA. *Plan Soil*. 203: 191 - 197
- Monteiro, L.; Trombert, D.; Souza, Q. 2011. Structural evaluations of zygotic embryos and seedlings of the macaw palm (*Acrocomia aculeata*, Arecaceae) during *in vitro* germination. *Trees*. (2012) 26: 851-863. doi: 10.1007/s00468-011-0659-2
- Burgos, L.; Ledbetter, C. 1993. Improved efficiency in apricot breeding. Effects of embryo development and nutrient media on *in vitro* germination and seedling establishment. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 35: 217-222. doi: 0.1007/BF00037273
- Daorden, M.; Marín, J.; Arbeloa, A. 2002. Germinación *in vitro* de embriones inmaduros a distintas temperaturas de estratificación. *ITEA* 98(1): 71-80.
- Aguiar, M.; Mendonça, M. 2003. Morphoanatomy of the Euterpe precatória Mart. (Palmae) seed. *Revista Brasileira de Sementes* 25:(1) 37-42. doi: 10.1590/S0101-31222003000100007.
- MAG (Ministerio de Agricultura y Ganadería. 2008. Informe nacional sobre el estado de los recursos fitogenéticos para la agricultura y la alimentación. Dirección de Investigación Agrícola. Asunción. 102p.
- Lima, M.; Ramos, M.; Aiko, P.; Braga, J.; Siqueira, E. 2008. Qualidade nutricional da polpa de bocaiúva *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 28(Supl.): 90-94. doi.org/10.1590/S0101-20612008000500015
- Viñas, M.; Jiménez, V. 2011. Factores que influyen en la embriogénesis somática *in vitro* de palmas (Arecaceae). *Revista Colombiana de Biotecnología* 13(2): 229 – 24.
- McDonald, M. 2007. Revisión de la Situación Actual de Mbokaja

- (*Acrocomia totai*) en Paraguay. Informe final. 78p
- Monteiro, L.; Trombert, D.; se Souza, Q. 2012. Structural evaluations of zygotic embryos and seedlings of the macaw palm (*Acrocomia aculeata*, Arecaceae). *Trees* 26: 851- 863. doi: 10.1007/s00468-011-0659-2.
- Sena, N.; Ibrahim, A.; Ahmed, M. 2007. Desenvolvimento *in vitro* de embriões zigóticos de tamareira. *Revista Ciência Agronômica*. 38(3): 276-279.
- Rodríguez, N.; Fuentes, V.; Rodríguez, O.; Álvarez, M. 1997. Cultivo *in vitro* de embriones maduros e inmaduros de aguacatero (*Persea americana* Mill.). *Agricultura Técnica*, 57(2): 154–158.
- Crocomo, O.; Melo, M. 1996. *Acrocomia* Species (Macauba Palm). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. 35: 3-17.
- Quintero, O.; Jaramillo, S. 2012. Rescate y germinación *in vitro* de embriones inmaduros de cedro negro (*Juglans neotropica* Diels). *Acta Agronómica* 61(1): 52-60.
- Hammer, Ø.; Harper, D.; Ryan, P. (2001). PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Paleontología Electrónica* 4 (1): 9
- Da Silva, P; Cardoso, L.; Lopes, R.; Reis, N, Raimundo N. Vieira da C y Regina Caetano Q. 2011. *In vitro* rescue of interspecific embryos from *Elaeis guineensis* x *E. oleifera* (Arecaceae). *Rev. Biol. Trop.* 59 (3): 1081-1088.
- Martínez, S.; Gómez, R.; Posada, L.; Barbón, R.; Suárez, M.; Reyes, M Pérez, M.; Torres, D.; Pons, M.; Cárdenas, M.; Aguilera, A.; Tejeda, M. 2012. Efecto de dos citoquininas, ácido ascórbico y sacarosa en la obtención de plantas *in vitro* de *Sorghum bicolor* para la formación de callos. *Revista Colombiana de Biotecnología* 14(2): 101-110.
- Rocha, S. 1998. Princípios da Cultura de Tecidos Vegetais 1ra Edição. Plantina. *Embrapa Cerrados*.16 p.
- Cardone, S.; Pérez, G.; Picca, A. 2010. Polinización y fertilización *in vitro*. En: *Biología y mejoramiento vegetal II*, ed Gabriela Levitus, Viviana Echenique, Clara Rubinstein, Esteban Hopp y Luis Mroginski, 185-196. *Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria*. INTA, ARG, 648 p.
- Teixeira, L. 2005. Potencialidades de oleaginosas para produção de biodiesel. *Informe Agropecuário*. 26(229): 18-27. doi: 17.138.140/0001-23.
- Soares, T.; Gonçalves, J.; Pereira, P.; Monteiro, L. 2013. Use of phytohormones in overcoming macaw palm seed dormancy. *Acta Scientiarum. Agronomy* 35(4): 505-511.
- Panza, V.; Láinez, V.; Maldonado, M. 2004. Seed structure and histochemistry in the palm *Euterpe edulis*. *Botanical Journal of the Linnean Society* 145: 445-453. doi: 10.1111/j.1095-8339.2004.00293.x
- Castilla, Y. 2012. Revisión bibliográfica. Conservación de recursos fitogenéticos de cafeto (*Coffea* spp.) por métodos biotecnológicos: una alternativa para su preservación. *Cultivo Tropicales* 33(4): 29 – 39.