

**MARLÚCIA SOUZA PÁDUA**

**GERMINAÇÃO *IN VITRO*, INDUÇÃO E  
CARACTERIZAÇÃO DE MASSAS PRÓ-  
EMBRIOGÊNICAS DE DENDEZEIRO  
(*Elaeis guineensis* Jacq.)**

**LAVRAS - MG**

**2012**

**MARLÚCIA SOUZA PÁDUA**

**GERMINAÇÃO *IN VITRO*, INDUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO  
DE MASSAS PRÓ-EMBRIOGÊNICAS DE DENDEZEIRO  
(*Elaeis guineensis* Jacq.)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biologia Molecular, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador  
Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva

Coorientadora  
Prof. Dra. Vanessa Cristina Stein

LAVRAS – MG  
2012

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca da UFLA**

Pádua, Marlúcia Souza.

Germinação *in vitro*, indução e caracterização de massas pró-embriogênicas de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) / Marlúcia Souza Pádua. – Lavras : UFLA, 2012.

118 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Luciano Vilela Paiva.

Bibliografia.

1. Carboidratos. 2. Aclimatização. 3. Embriogênese somática. 4. Auxinas. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 660.65

**MARLÚCIA SOUZA PÁDUA**

**GERMINAÇÃO *IN VITRO*, INDUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO  
DE MASSAS PRÓ-EMBRIOGÊNICAS DE DENDEZEIRO  
(*Elaeis guineensis* Jacq.)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biologia Molecular, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 24 de fevereiro de 2012.

|                        |      |
|------------------------|------|
| Vanessa Cristina Stein | UFG  |
| Eduardo Alves          | UFLA |
| Evânia Galvão Mendonça | UFLA |

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva  
(Orientador)

LAVRAS – MG  
2012

*A Deus,  
por iluminar meus caminhos.*

## **OFEREÇO**

*Aos meus pais, Roberto Oliveira Pádua e Maria Luiza S. Oliveira,  
por todo amor e dedicação.*

## **DEDICO**

*Ao meu namorado Diego Pereira Vilela,  
família e amigos,  
pelo apoio e torcida*

## **AGRADEÇO**

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus por me dar força nas horas difíceis, me proteger e permitir a realização de muitos sonhos.

À Universidade Federal de Lavras e ao Laboratório Central de Biologia Molecular, pela oportunidade de estudo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela infraestrutura.

Ao meu orientador Luciano Vilela Paiva, por participar da minha formação acadêmica, por estar sempre pronto a escutar minhas ideias e pela confiança no desenvolvimento do projeto.

À minha coorientadora Vanessa Cristina Stein, pela atenção, ajuda e amizade.

Ao professor Eduardo Alves pela colaboração e disponibilidade na avaliação deste trabalho.

À Claudinha do Laboratório de Microscopia Eletrônica pela disponibilidade, paciência e prestatividade.

À Elô do Laboratório de Microscopia Eletrônica, pelo auxílio e simpatia.

Ao professor José Airton, pela atenção em solucionar dúvidas sobre as estatísticas deste trabalho.

Ao Luciano Coutinho pela ajuda e disponibilidade.

À Marinês pela imensa ajuda com as análises anatômicas das plântulas.

Ao Professor Evaristo Mauro de Castro e ao Professor Fabrício pela colaboração.

Aos laboratoristas Heliete, pela boa vontade de ajudar sempre e ao Fabrício pela prestatividade.

Aos pesquisadores Lenira e Ernesto da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (Epamig) pela atenção e disponibilidade na utilização dos equipamentos do laboratório.

Ao grupo Dendê pela ajuda com os experimentos e realização deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM) Flávia, Tânia, Luciene, Daniella, Kalynka, Luana, Mayara, Larissa, Gabriel, Luis Gustavo, Douglas pelo aprendizado e por tornarem os dias de trabalhos mais amenos e divertidos.

Aos colegas de disciplina pela ajuda com os trabalhos e dúvidas durante o curso Thaís Teixeira, Thaís Barros, Dalilha, Emanuelle, Letícia e Samuel.

À Evânia pelos ensinamentos, apoio e amizade construída durante esses anos.

À Danielle Pinheiro pela confiança e boa vontade em ajudar.

Ao Iron e Du pelo carinho e amizade.

Às amigas de república, minha família em Lavras, Déia, Aline, Fran e Laura, pelas conversas, ensinamentos de vida, amizade e carinho.

À minha família, irmão, padrinhos, tios e primos que sempre torcem por mim.

Aos meus pais pelo amor incondicional e por serem as pessoas mais importantes da minha vida. Meu pai, por acreditar no meu potencial e me incentivar sempre. Minha mãe pela força e exemplo de trabalho e garra.

Ao meu namorado Diego pela paciência, apoio, torcida e amor incondicional.

Ao meu sogro e cunhados pela torcida e alegria diante de minhas conquistas.

A todos que contribuíram de alguma forma para que este sonho se realizasse.

**Muito Obrigada**

## RESUMO

A cultura do dendezeiro apresenta dificuldades na propagação em larga escala por meio de métodos convencionais, por isso técnicas de cultura de tecidos podem potencializar a obtenção de mudas de híbridos elite. O objetivo deste trabalho foi otimizar a germinação *in vitro* do híbrido Manicoré, induzir massas pró-embriogênicas no híbrido Tenera e caracterizá-las quanto ao potencial embriogênico. Para otimizar a germinação *in vitro* utilizou-se embriões de diferentes idades (80, 90, 100 e 110 dias) que foram inoculados em meio MS ou Y3 suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose ou na ausência deste. Foram feitos cortes anatômicos para avaliar a formação dos tecidos nos diferentes tratamentos. Para avaliar o desenvolvimento dos embriões zigóticos *in vitro*, aqueles com idade entre 90 a 100 dias, após a polinização os mesmos foram inoculados em meio de cultivo MS ou Y3 modificado, suplementados com diferentes concentrações de sacarose (0,0; 30,0; 45,0 e 60 g.L<sup>-1</sup>) ou sorbitol (36 g.L<sup>-1</sup>). A taxa de germinação foi avaliada após 30 dias de cultivo e as plântulas foram transferidas para meio de cultivo Y3 modificado suplementado com GA<sub>3</sub> (0,0; 10 e 20 µM) ou com diferentes concentrações de ANA (0,0 e 5,37 µM) em combinações com BAP (0,0 e 2,21 µM). Após 45 dias foram avaliados os parâmetros: comprimento da parte aérea, número de folhas, presença de raiz e comprimento da raiz. Posteriormente as plântulas foram transferidas para casa de vegetação e a porcentagem de sobrevivência das plantas foi observada. Para indução das massas pró-embriogênicas foram utilizados fragmentos foliares de plântulas *in vitro*, inoculados em meio Y3 suplementados com 2,4-D ou picloram (0,0; 1,0; 3,0; 6,0; 9,0 mg.L<sup>-1</sup>). Após 90 dias foram avaliados a presença e o aspecto das massas pró-embriogênicas formadas, classificando-as em tipos e coletadas para testes citoquímicos e análises ultraestruturais. Os embriões que proporcionaram melhores porcentagens de germinação (88%) foram os de 100 dias inoculados em meio Y3 suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. Quanto à influência das concentrações de carboidratos na germinação, o meio MS suplementado com 36 g.L<sup>-1</sup> de sorbitol promoveu a germinação de 92% dos embriões zigóticos. Para o desenvolvimento das plântulas, o meio de cultivo suplementado com 20 µM de GA<sub>3</sub> promoveu maior comprimento da parte aérea, porém não diferiu estatisticamente de alguns tratamentos. As plântulas foram aclimatizadas com sucesso (85%) quando apresentavam raiz. A formação de massas celulares foi influenciada pela presença dos reguladores de crescimento, sendo que o meio de cultivo suplementado com picloram proporcionou maior porcentagem de explantes com massas pró-embriogênicas dos tipos 3 e 4. As massas celulares do tipo 1 apresentaram células alongadas, vacuolizadas e com rupturas na parede celular indicando possível morte celular, sendo células inviáveis. O tipo 2 apresentou células pequenas, isodiamétricas,

núcleo com nucléolo proeminente e numerosas mitocôndrias e amiloplastídeos, sendo indicada para obtenção de plantas por via indireta. Os tipos 3 e 4 apresentaram estruturas globulares contendo muitos grãos de amido. O tipo 3 apresentou núcleo com nucléolo visível, mitocôndrias, fenóis e lipídeos, demonstrando mais características embriogênicas que o tipo 4, possivelmente melhor para regeneração de plantas por via direta.

Palavras-chave: Carboidratos, Aclimatização, Auxinas, Embriogênese Somática.

## ABSTRACT

When it comes to large-scale propagation by conventional methods, growing oil palm is a difficult matter. Therefore, tissue culture techniques may increase the obtention of hybrid elite sprouts. The aim of this work was to optimize *in vitro* germination of hybrid “Manicoré”, as well as induce pro-embryogenic masses on hybrid “Tenera” and characterize them as for their embryogenic potential. In order to optimize *in vitro* germination, embryos of different ages were used (80, 90, 100 and 110 days) and inoculated in MS or Y3 media, supplemented or not with 30 g.L<sup>-1</sup> of sucrose. Anatomic cuts were performed in order to evaluate the tissue formation on the various treatments. To evaluate zygotic embryos growth *in vitro*, those aged from 90 to 100 days after pollination were inoculated in MS medium or Y3 modified, supplemented with different sucrose concentrations (0.0; 30.0; 45.0 and 60.0 g.L<sup>-1</sup>) or sorbitol (36 g.L<sup>-1</sup>). Germination rate was evaluated after 30 days of cultivation and the plantlets were transferred to Y3 medium supplemented with GA<sub>3</sub> (0.0; 10.0 and 20.0 μM) or with different concentrations of ANA (0.0 and 5.37 μM) combined with BAP (0.0 and 2.21 μM). After 45 days, the first parameters were analyzed: length of the aerial parts, number of leaves, presence of roots and length of the roots. Afterwards, the plantlets were transferred to a greenhouse and their survival percentage was observed. To induce the pro-embryogenic masses, leaf fragments of the plantlets were used *in vitro*, inoculated in Y3 medium, supplemented with 2,4-D or Picloram (0.0; 1.0; 3.0; 6.0; 9.0 mg.L<sup>-1</sup>). After 90 days, the presence and the aspect of the pro-embryogenic masses generated were evaluated and classified in types and collected to cytochemical tests and ultra-structural analyses. The embryos which proportionated better germination percentages (88%) were the 100-day-old ones supplemented with 30 g.L<sup>-1</sup> of sucrose. Regarding the influence of the concentrations of carbohydrates on the germination, MS medium supplemented with 36 g.L<sup>-1</sup> of sorbitol promoted the germination of 92% of the zygotic embryos. For the plantlets development, the culture media supplemented with 20 μM of GA<sub>3</sub> enhanced the length of the aerial parts, but it did not differ statistically from some treatments. The plantlets that had roots were successfully acclimatized (85%). The cell mass formation was influenced by the presence of growth regulators, being that the culture media supplemented with Picloram provided higher percentage of explants with pro-embryogenic masses from types 3 and 4. Cell masses from type 1 displayed elongated and vacuolated cells with ruptures on the cell wall, which may indicate cell death and, consequently, not viable cells. Type 2 has presented small, isodiametric cells, nucleus with prominent nucleolus and several mitochondria and amyloplasts, being indicated for indirect obtention of plants. Types 3 and 4 showed globular structures, containing several starch grains. Type 3 showed

nucleus with visible nucleolus, mitochondria, phenols and lipids, demonstrating more embryogenic characteristics than type 4, being possibly better for direct plant regeneration.

Keywords: Carbohydrates, Acclimatization, Auxins, Somatic embryogenesis.

## SUMÁRIO

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 1     | INTRODUÇÃO .....  | 15 |
| 2     | REFERENCIAL TEÓRICO.....  | 16 |
| 2.1.  | Aspectos gerais do dendezeiro .....   | 17 |
| 2.2   | Cultura de tecidos .....  | 19 |
| 2.2.1 | Cultivo de embriões zigóticos <i>in vitro</i> .....   | 19 |
| 2.2.2 | Embriogênese somática .....   | 21 |
| 2.3   | Anatomia de plântulas <i>in vitro</i> .....   | 23 |
| 2.3.1 | Análises microscópicas e ultraestruturais de calos e embriões somáticos.....  | 25 |
|       | CONSIDERAÇÕES GERAIS.....   | 28 |
|       | REFERÊNCIAS.....  | 29 |
|       | ARTIGO 1 Influência do meio e idade dos embriões zigóticos no cultivo <i>in vitro</i> de <i>Elaeis guineensis</i> Jacq.....                   | 38 |
| 1     | INTRODUÇÃO.....   | 39 |
| 2     | MATERIAL E MÉTODOS.....   | 43 |
| 2.1   | Material vegetal .....  | 43 |
| 2.2   | Desinfestação e germinação <i>in vitro</i> .....  | 43 |
| 2.3   | Anatomia das plântulas .....  | 44 |
| 3     | RESULTADOS E DISCUSSÃO .....  | 45 |
|       | CONCLUSÃO .....   | 63 |
|       | REFERÊNCIAS.....  | 64 |
|       | ARTIGO 2 Desenvolvimento <i>in vitro</i> de embriões zigóticos e aclimatização de plântulas de dendezeiro ( <i>Elaeis guineensis</i> Jacq.).  | 69 |
| 1     | INTRODUÇÃO.....   | 70 |
| 2     | MATERIAL E MÉTODOS.....   | 74 |
| 2.1   | Material vegetal .....  | 74 |
| 2.2   | Efeito de diferentes meios de cultura e concentrações de sacarose na germinação.....  | 74 |
| 2.3   | Efeito de reguladores de crescimento no desenvolvimento de plântulas <i>in vitro</i> .....  | 76 |
| 2.4   | Aclimatização.....  | 77 |
| 3     | RESULTADOS E DISCUSSÃO .....  | 77 |
|       | CONCLUSÃO .....   | 86 |
|       | REFERÊNCIAS .....   | 87 |
|       | ARTIGO 3 Indução e caracterização de massas pró-embriogênicas de dendezeiro ( <i>Elaeis guineensis</i> Jacq.) via embriogênese somática ..... | 91 |
| 1     | INTRODUÇÃO.....   | 92 |
| 2     | MATERIAIS E MÉTODOS.....  | 95 |
| 2.1   | Material vegetal .....  | 95 |
| 2.2   | Desinfestação e obtenção das plântulas.....   | 95 |
| 2.3   | Indução a embriogênese somática.....  | 96 |

|            |  |            |
|------------|--|------------|
| <b>2.4</b> | <b>Análises histoquímicas.....</b>                 | <b>98</b>  |
| <b>2.5</b> | <b>Microscopia eletrônica de transmissão .....</b> | <b>98</b>  |
| <b>3</b>   | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>                | <b>98</b>  |
|            | <b>CONCLUSÃO .....</b>                             | <b>113</b> |
|            | <b>REFERÊNCIAS.....</b>                            | <b>115</b> |
|            | <b>ANEXOS.....</b>                                 | <b>119</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

O dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) tem se destacado economicamente devido à crescente demanda por parte da indústria alimentícia e farmacêutica por óleos vegetais (Boari, 2008) e pela sua capacidade de produção de combustíveis, como fonte de energias alternativas e renováveis o que desperta grande interesse devido às preocupações com o meio ambiente e as previsões de que os combustíveis fósseis derivados do petróleo estão se extinguindo (GHASSAN et al., 2003).

Devido a esta situação o Governo Federal, por meio da implantação do Programa Nacional de Biocombustíveis, incentiva a expansão desta cultura. O dendezeiro destaca-se entre as oleaginosas pela alta produção de óleo, em torno de 4 a 6 toneladas de óleo/hectare, e sua produção é 1,5 vezes maior do que a de óleo de coco, duas vezes maior que a do óleo de oliva e dez vezes maior do que a do óleo de soja, sendo a última a espécie mais destinada para o fornecimento de óleo no Brasil (FURLAN et al., 2003).

Além disso, a dendeicultura por ser uma cultura perene e de cultivo exclusivamente manual contribui, em termos sociais, com o desenvolvimento do país, gerando empregos fixos durante todo ano. Em termos ambientais, as plantações de dendê possuem alta capacidade para fixar carbono e proteger o solo contra erosão, sendo uma importante alternativa para a ocupação das áreas desmatadas. Além disso, seu óleo é renovável não contribuindo para o efeito estufa (HOMMA et al., 2000; VEIGAS; MÜLLER, 2000).

Uma das principais dificuldades na expansão da cultura é a disponibilidade de mudas em escala comercial. Por ser uma palmácea e ter um único meristema, não é possível a propagação por métodos convencionais como estaquia, sendo produzida exclusivamente por sementes, as quais podem apresentar dormência e germinação lenta.

A germinação de sementes é atualmente o método mais utilizado para obtenção de mudas, porém a porcentagem de plantas obtidas ainda é muito baixa, em torno de 30% dos lotes semeados, além da demora na germinação que pode levar até três anos (LUIS; BEZERRA; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2010; MANEHONON et al., 2009).

Dessa forma o cultivo *in vitro* pode ser uma alternativa para reduzir o tempo e proporcionar maiores taxas de embriões germinados, pois permite a retirada de barreiras físicas, como o duro endocarpo, e o fornecimento de nutrientes necessários ao desenvolvimento dos embriões.

Outra possibilidade promissora para a produção de mudas em escala, utilizando a biotecnologia, seria a embriogênese somática, no entanto esta ainda necessita de muitos estudos (MORCILLO et al., 2007).

A embriogênese somática é o processo pelo qual células haplóides ou somáticas multiplicam-se e passam por diferentes estádios embriogênicos originando uma planta sem ocorrer à fusão de gametas. Existem duas vias para induzir a embriogênese somática: a direta e a indireta. A última passa pela fase intermediária de calos, que posteriormente originam embriões somáticos (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999). Nesta etapa as análises microscópicas são uma ferramenta importante para verificar características embriogênicas dos calos e avaliar anormalidades no desenvolvimento dos embriões.

Apesar de trabalhos de embriogênese somática para o dendezeiro já terem sido realizados com sucesso observa-se uma demora no processo de obtenção de plantas. Portanto, são indispensáveis tentativas para otimização do processo de embriogênese somática visando à produção de mudas clonadas em menor tempo e em escala que atendam a demanda nacional.

Neste contexto, o presente trabalho, teve como objetivos: otimizar a germinação e desenvolvimento *in vitro* de *Elaeis guineensis* híbrido Manicoré, induzir e caracterizar massas pró-embriogênicas no híbrido Tenera.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. Aspectos gerais do dendzeiro

*Elaeis guineensis* Jacq., conhecida popularmente como dendzeiro, é uma palmeira, monocotiledônea perene, monoica, oleaginosa e de longo ciclo de vida (MORCILLO et al., 2007). Originária da Costa Ocidental da África (Guiné Bissau) foi introduzida no Brasil pelo sul da Bahia no século XVI (CARVALHO, 2009; VALOIS, 1997). Atualmente, é cultivada no sul da Bahia, na Amazônia Ocidental e também próximo à Belém do Pará (BIONDI; MONTEIRO; GLASS, 2008; CLEMENT; LLERAS-PÉREZ; LEEUWEN, 2005).

O dendzeiro possui grande importância econômica mundial devido ao óleo extraído de seu fruto. Dois tipos de óleos podem ser extraídos, o óleo de palma extraído industrialmente da polpa do fruto e o óleo de palmiste extraído da amêndoa (BOARI, 2008; KONAN et al., 2005). Comercialmente, estes dois tipos de óleos, são utilizados em várias áreas da indústria. O óleo de palma possui ampla utilização na alimentação humana, na fabricação de margarinas, panificação, biscoito, massas, tortas entre outros. Já o óleo de palmiste é valorizado nas indústrias farmacêutica, cosmética e de perfumaria (BOARI, 2008; FURLAN et al., 2003; KONAN et al., 2005).

Atualmente o óleo de dendê vem sendo foco econômico para fonte de energia renovável (URQUIAGA; ALVES; BOODEY, 2005) como o biocombustível. Isso ocorreu graças ao declínio das reservas naturais de petróleo e gás natural além de fatores relacionados ao aquecimento global que abriram novas perspectivas para o óleo de palma (ANUÁRIO..., 2008). O dendê é considerado uma das oleaginosas mais produtivas entre as culturas comerciais, pois rende em média, 4 mil kg de óleo por hectare (FURLAN et al., 2003).

A alta produção de óleo se deve aos híbridos melhorados possuírem grande quantidade de óleo por cacho, entre eles dois se destacam: o híbrido Tenera e o BRS Manicoré. O híbrido Tenera, obtido do cruzamento entre Dura “Deli” x Psifera de origem La Mé, produz 25 toneladas de óleo/cacho/hectare (BIONDI; MONTEIRO; GLASS, 2008). O híbrido Manicoré é resultante do cruzamento entre a espécie africana dendê (*Elaeis guineensis*) x caiaué (*Elaeis oleifera*) espécie de origem americana que também apresenta alta produção de óleo, em torno de 30 toneladas cacho/hectare. Sua principal característica é ter herdado a resistência ao amarelecimento fatal, uma anomalia letal de etiologia desconhecida, que acomete as plantações de dendezeiro causando grandes prejuízos. Além disso, as plantas são de porte baixo facilitando a coleta dos cachos, o que pode prolongar sua vida útil. Outra característica é possuir óleo menos saturado com alto teor de oleína, que favorece a produção de biodiesel de alta qualidade (BARCELOS; SANTOS, 2000; BOARI, 2008; COLLARES, 2011; CORDEIRO; ALVES; MACIEL, 2009).

Atualmente a produção mundial de óleo de dendê atinge aproximadamente 50.000 mil toneladas métricas. Apesar de a produção ter sido duplicada de 2001 até os dias atuais o fornecimento não atende a demanda mundial (ANUÁRIO..., 2011).

A partir deste fato existe a necessidade de aumentar as áreas plantadas de dendezeiro. Todavia essa cultura apresenta dificuldades na produção de mudas em larga escala, devido às características biológicas das plantas, ou seja, possuírem um único meristema que impede assim a propagação por meio de estacas. O principal método utilizado atualmente para a produção é o via sementes, porém a germinação é lenta, podendo levar até três anos e a taxa de germinação é baixa, em torno de 30% (LUIS; BEZERRA; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2010; MANEHON et al., 2009).

## 2.2 Cultura de tecidos

A cultura de tecidos vegetais é a expressão usada para designar o cultivo *in vitro* de células, tecidos e órgãos de plantas (GALLO; CROCOMO, 1995; TREVISAM, 2005), baseada na “totipotencialidade” das células, ou seja, nas características de que qualquer célula do organismo vegetal contém toda a informação genética necessária para a formação de uma planta completa. Para expressar esse potencial as células podem ser induzidas em condições de cultivo ideais, principalmente aquelas relacionadas ao meio de cultura, decisivo para desdiferenciação e regeneração *in vitro* (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999; HABERLANDT, 1902).

A composição e concentração dos reguladores de crescimento no meio de cultivo são fatores determinantes no crescimento e no padrão de desenvolvimento da maioria dos sistemas de cultura de tecidos (FERREIRA; HU, 1998). Os reguladores de crescimento de plantas são substâncias sintéticas que em concentrações baixas influenciam nos processos fisiológicos, sendo altamente requeridos para a expressão da citodiferenciação e da morfogênese em sistemas *in vitro* (FRANKENBERGER JÚNIOR; ARSHAD, 1995).

Diversos trabalhos de cultura de tecidos para o dendezeiro já foram relatados com sucesso entres eles a germinação de embriões zigóticos (ANGELO et al., 2007; CARDOSO et al., 2010), a criopreservação de embriões zigóticos (ENGELMANN et al., 1995); a obtenção de embriões somáticos (TECHATO; HILAE, 2007); a regeneração de embriões somáticos (THUZAR et al., 2011) e suspensão celular (TOUCHET; DUVAL; PANNETIER, 1991).

### 2.2.1 Cultivo de embriões zigóticos *in vitro*

Dentre as técnicas de cultura de tecidos, a cultura de embriões zigóticos, destaca-se como um método alternativo, por reproduzir *in vitro* o

desenvolvimento normal dos embriões. Essa técnica permite estudar as necessidades nutricionais e físicas dos embriões durante o desenvolvimento *in vitro*, possibilitando a obtenção de plantas em menor tempo, principalmente para espécies que apresentam germinação lenta devido à dormência de suas sementes, como é o caso da palmeira, dendezeiro (PEREIRA et al., 2006; PINHEIRO, 1986).

A determinação do meio de cultura é o fator mais importante na cultura de embriões, visto que a concentração e as diferentes constituições salinas dos meios de cultivo interferem na germinação e no desenvolvimento das plântulas (SOUZA et al., 2003).

Diferentes meios de cultivo têm sido relatados por ter efeitos favoráveis na germinação. Em estudos com híbridos de dendezeiro testando o meio MS e Y3 (EEUWENS, 1978), verificou-se que o meio de cultivo que proporcionou melhores resultados foi o Y3 (CARDOSO et al., 2010). Em embriões de mururu, a interação entre a concentração de sacarose e a idade fisiológica dos embriões proporcionou diferenças significativas nas taxas de germinação de embriões imaturos e maduros (PEREIRA et al., 2006), o mesmo pôde ser verificado em coquinho-azedo no qual tal interação foi determinante para o desenvolvimento dos embriões (RIBEIRO et al., 2011). A sacarose tem sido a fonte de carbono mais utilizada, porém outras fontes de carbono são relatadas para germinação de embriões zigóticos *in vitro* como: manitol, sorbitol, glucose, frutose e glicose (ANGELO et al., 2007; REGO-OLIVEIRA et al., 2003; TECHATO; HILAE, 2007).

A necessidade de uma fonte exógena de açúcares pode ser dependente da espécie e do estágio de desenvolvimento dos embriões. Geralmente os embriões imaturos requerem maiores concentrações de sacarose quando comparados com embriões maduros ou próximos da maturação. Estes podem

germinar em meio de cultivo contendo apenas sais e ágar, dispensando parcialmente ou totalmente as fontes de carboidratos (HU; FERREIRA, 1998).

A introdução de reguladores de crescimento ao meio de cultivo pode promover o desenvolvimento e alongamento das plântulas *in vitro*. Os reguladores de crescimento suprem possíveis carências dos teores endógenos de hormônios nos explantes, promovendo assim o alongamento e multiplicação da parte aérea das plântulas *in vitro* (FERREIRA; HU, 1998). As classes de reguladores de crescimento mais citadas para esta finalidade são as giberelinas e citocininas.

O uso desses reguladores de crescimento em palmeiras é utilizado para promover o crescimento das plantas e aumentar o número de folhas, visando acelerar o processo de produção de hastes comerciais e assim agregar valor econômico as mudas de diversas palmeiras (LEDÓ et al., 2007; TAVARES et al., 2007).

### **2.2.2 Embriogênese somática**

A embriogênese somática, também denominada de adventícia ou assexual, é o processo pelo qual células haplóides ou somáticas desenvolvem-se sem a fusão de gametas, dando origem a uma planta (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999; WILLIAMS; MAHESWARAN, 1986). Durante a embriogênese somática, as células haplóides ou diplóides em diferentes estágios de diferenciação podem ser induzidas por estímulos ambientais ou químicos, reprogramando e adquirindo novas competências morfogênicas (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999).

Os embriões somáticos podem ser originados por duas vias de regeneração: a direta e a indireta. A embriogênese somática direta consiste na formação dos embriões somáticos diretamente dos explantes, sem a formação de estágios intermediários de calos. Por outro lado, na embriogênese somática

indireta, os embriões somáticos se formam a partir de um calo, que apresenta células em diferentes estágios de diferenciação (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999).

Os calos são massas de células desorganizadas, que se multiplicam desordenadamente podendo se diferenciar em tecidos ou órgãos e possuem a capacidade de responderem às injúrias, que podem ser químicas ou físicas (TORRES; CALDAS, 1990). Diferentes tipos de calos podem ser induzidos no meio de cultivo, dentre estes o calo embriogênico, que origina em sua superfície pequenos embriões somáticos, que se individualizam e são capazes de regenerarem plantas completas (ANGELO et al., 2009; GRANDO et al., 1993).

Em ambos os métodos, o embrião somático segue a mesma sequência de desenvolvimento do embrião zigótico, ou seja, a passagem pelos estádios globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar, num processo ontogenético, no qual no final ocorre a formação de uma estrutura bipolar, constituída de ápice caulinar e radicular (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999; JURGENS; MAYER, 1992). Contudo estes se diferem dos embriões zigóticos por serem livres de correlações físicas, fisiológicas e genéticas, possuindo sistema vascular fechado, sem conexão vascular com os tecidos do explante inicial (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999; ZIMMERMAN, 1993).

Dentre as técnicas da cultura de tecidos, a embriogênese somática é citada como o método mais promissor para a multiplicação do dendezeiro (MORCILLO et al., 2007), visto que por meio deste processo pode-se obter clones em escala comercial. O potencial deste processo é reforçado pela característica biológica do dendezeiro, que impossibilita sua propagação vegetativa por meio do plantio convencional de estacas, pela presença de único meristema.

A embriogênese somática vem sendo amplamente estudada em diversas palmeiras como em macaúba (MOURA; MOTOIKE, 2009), coqueiro

(FERNANDO; GAMAGE, 2000; KARUNARATNE; PERIYAPPERUMA, 1990), açazeiro (LEDÓ; LAMEIRA; MENEZES, 2007), tamareira (SANÉ et al., 2006); pupunha (STEINMACHER et al., 2007), dendezeiro (ANGELO et al., 2009; CARVALHO, 2009; GUEDES, 2008; KANCHANAPOOM; DOMYOAS, 1999; PATCHARAPISUTSIN; KANCHANAPOOM, 1996; TE-CHATO; HILAE, 2007). Todavia alguns desses pesquisadores utilizam altas concentrações de auxinas o que pode gerar problemas futuros, como variações somaclonais.

Os reguladores de crescimento exercem grande influência durante todo processo de embriogênese somática, principalmente nas etapas de proliferação, manutenção e diferenciação dos calos. A maioria das espécies necessita de elevadas concentrações de auxina e reduzidas concentrações de citocininas para a indução de calos e para a regeneração e obtenção de brotos utiliza-se dosagens mínimas de auxinas e aumenta-se as concentrações de citocininas (LENIS-MANZANO et al., 2010).

As auxinas estão envolvidas com a indução e a iniciação de embriões somáticos, são necessárias para a formação de agregados embriogênicos, a partir de células individuais, expressando a totipotência das células competentes (KOMAMINE et al., 1992). Em geral, na maioria das espécies, o processo de iniciação ocorre em meio de cultivo suplementado com altas concentrações de 2,4-D. As auxinas, como o 2,4-D, são consideradas substâncias responsáveis pelo desencadeamento dos processos de dediferenciação e rediferenciação, alterando determinação e conferindo novas competências às células responsivas presentes nos explantes (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999).

### **2.3 Anatomia de plântulas *in vitro***

As análises anatômicas permitem visualizar modificações estruturais nos tecidos das plântulas durante o desenvolvimento *in vitro*. Essas alterações

estruturais são influenciadas pela condição *in vitro*, que favorece ou dificulta a sobrevivência em ambiente *ex vitro* (BEZERRA; ALOUFA; LICHSTON, 2009). As plântulas desenvolvidas *in vitro* podem apresentar morfologia externa, anatomia e fisiologia anormais, o que faz com que algumas vezes não estejam aptas a suportarem a transferência direta para o campo ou mesmo para a aclimatização, necessitando de uma pré-aclimatização (BEZERRA; ALOUFA; LICHSTON, 2009; DOUSSEAU et al., 1995).

A alta mortalidade de plantas durante a transição do ambiente *in vitro* para o *ex vitro*, em consequência de desordens anatômicas, tem sido considerado uma limitação para o sucesso da micropropagação na maioria das espécies (BARBOZA et al., 2006). As análises anatômicas auxiliam na seleção dos explantes que possivelmente suportam melhor as mudanças de ambiente (HAZARIKA, 2006).

As alterações nas estruturas e na funcionalidade dos órgãos e tecidos observados *in vitro* se devem principalmente a alta umidade relativa, baixa irradiância e elevadas concentrações de sais e de carboidratos, que são utilizados para fornecer carbono e energia (POSPÍSILOVÁ et al., 1999). Além disso, as concentrações do dióxido de carbono nos frascos de cultivo interferem na fotossíntese (FUJIWARA; KOZAI, 1995; HAZIRA, 2006; JEONG; FUJIWARA; KOZAI, 1995).

Dentre as principais modificações que as plantas mantidas *in vitro* podem apresentar citam-se a baixa funcionalidade dos estômatos, o sistema vascular pouco desenvolvido e reduzida capacidade de sustentação, devido a modificações no esclerênquima e colênquima, o que dificulta a sobrevivência das plantas (CAMPOSTRINI; OTONI, 1996).

Atualmente existem poucos estudos anatômicos do gênero *Elaeis*, e a maior parte deles estão voltados para os programas de melhoramento genético, demonstrando a necessidade de mais estudos visando otimizar as condições de

cultivo *in vitro* deste gênero de grande importância econômica (LUIS; BEZERRA; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2010).

### **2.3.1 Análises microscópicas e ultraestruturais de calos e embriões somáticos**

As análises histológicas permitem avaliar o potencial embriogênico dos calos, distinguir os calos embriogênicos dos não embriogênicos e compreender o desenvolvimento e a morfogênese das células dos calos. Durante a regeneração é possível diferenciar as estruturas formadas e o processo de regeneração (organogênese direta ou indireta, embriogênese somática direta ou indireta) e, além disso, permite a caracterização dos estádios embriogênicos em globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar. Já no processo de regeneração *in vitro* pode-se observar a presença ou ausência de sincronia dos embriões somáticos e a identificação de falhas na formação do embrião somático a fim de prevenir a obtenção de plantas anormais (FILIPPI; APPEZZATO-DA-GLÓRIA; RODRIGUEZ, 2001; NOGUEIRA, 2006).

Na microscopia fotônica pode ser realizada a análise histoquímica por meio de corantes químicos que possibilitam a visualização de características embriogênicas, como a presença de amido, evidenciada pelo lugol, que é um indicador do alto metabolismo das células. A formação da parede celular, com azul de toluidina, permite visualizar os tecidos do embrião somático, o meristema fundamental, procâmbio e protoderme que indicam a formação normal dos embriões somáticos e o estágio de desenvolvimento (FILLIPI et al., 2001; MOURA, 2007).

Vários autores utilizaram microscopia fotônica, eletrônica de varredura e de transmissão para analisar o desenvolvimento de embriões somáticos. Em *Drosera spathulata* Labill, os calos que apresentavam agrupamento de células pequenas e isodiamétricas visualizadas pela microscopia fotônica e microscopia

eletrônica de varredura, originaram embriões, passando pelos estádios cordiforme, torpedo e cotiledonar (BOBÁK et al., 2004).

Por meio da microscopia eletrônica de transmissão pode-se visualizar estruturas internas das células como a espessura da parede celular, núcleo, nucléolo, amiloplastídeos, mitocôndrias, vacúolos e por meio destes inferir o potencial embriogênico destas células (GATICA-ARIAS; ARRIETA-ESPINOZA; ESQUIVEL, 2008; STEINER et al., 2005).

Segundo Thuzar et al. (2011), por meio de análises histológicas dos calos de *Elaeis guineensis* foi possível confirmar que o desenvolvimento do embrião ocorreu via embriogênese somática. Características de células embriogênicas e não embriogênicas em *Passiflora* spp foi observada por Figueiredo et al. (2007), utilizando microscópio eletrônico de transmissão (MET). Os calos embriogênicos se caracterizam pela presença de células isodiamétricas, pequenas, núcleo grande com nucléolo proeminente, mitocôndrias de formato arredondado, citoplasma com pouco espaço intercelular e sistema celular organizado. Calos não embriogênicos apresentam em maior parte células grandes, alongadas, vacuoladas, com espaços intercelulares e sistema celular desorganizado, não sendo viáveis (FIGUEIREDO et al., 2007; NOGUEIRA et al., 2007).

A presença de numerosas mitocôndrias e amiloplastídeos predizem a intensa atividade do metabolismo celular, relacionando este padrão bioquímico como fonte primária de energia necessária para a intensa divisão celular e para o desenvolvimento dos embriões (CANGAHUALA-INOCENTE et al., 2004). Segundo Martin et al. (2000), o consumo dos grãos de amido promove energia para o desenvolvimento do embrião somático, sugerindo uma ativa regulação do acúmulo de grãos de amido em calos embriogênicos.

O espessamento da parede celular indica o processo de individualização e formação de embriões (LIU et al., 2006) e a presença de grandes ou numerosos

vacúolos está envolvido no processo de degradação do conteúdo celular, sendo que o vacúolo desempenha papel essencial no processo de morte celular programada (LAM; FUKUDA; GREENBERG, 2000).

As análises do material *in vitro* permitem confirmar e também detectar possíveis falhas durante o processo de embriogênese somática, reduzindo gastos e otimizando o tempo, possibilitando aperfeiçoar o processo e fornecer informações importantes sobre o cultivo *in vitro* (FILLIPI et al., 2001).

## CONSIDERAÇÕES GERAIS

O dendezeiro vem se destacando economicamente no mercado mundial, pela alta produção de frutos e óleos, sendo amplamente utilizado na indústria alimentícia, cosmética e com grande potencial para biocombustíveis. No aspecto social, pelo fato de ser uma cultura perene, atua na geração de empregos durante o ano todo e no aspecto ambiental, por possuir alta capacidade de fixar o carbono, minimiza o efeito estufa.

Contudo a produção comercial de mudas não atende a demanda mundial, sendo necessária a busca por técnicas que maximizem essa produção. Com este intuito, estudos sobre a germinação *in vitro* do dendezeiro são fundamentais, pois devido à dormência de suas sementes, em campo, a porcentagem de germinação é relativamente baixa e demorada sendo necessários até três anos para que a germinação ocorra.

Além da germinação *in vitro*, outra técnica de cultura de tecidos, que vem sendo estudada em palmeiras, é a embriogênese somática, sendo essa uma ótima opção para a produção de mudas em larga escala, visto que o dendezeiro possui apenas um meristema, o que impossibilita a sua propagação por métodos convencionais, como a estaquia. Apesar de vários autores já terem proposto protocolos de embriogênese somática em dendezeiro, dificuldades são encontradas devido à demora na obtenção de plantas, além da alta probabilidade de variação somaclonal decorrente do uso de reguladores de crescimento em altas concentrações.

Esse fato leva a necessidade de otimizar os protocolos e de estudos envolvendo reguladores de crescimento, para o entendimento do comportamento e fisiologia de todo o processo de cultivo *in vitro* do dendezeiro.

## REFERÊNCIAS

ANGELO, P. C. da S. et al. Embryogenic calli induced in interspecific (*Elaeis guineensis* x *E. oleifera*) hybrid zygotic embryos. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, MG, v. 9, p. 274-277, mar. 2009.

\_\_\_\_\_. **Resgate de embriões híbridos de dendezeiro x caiaué**. Manaus: EMBRAPA, 2007. 4 p. (Comunicado Técnico, 49).

ANUÁRIO da agricultura brasileira. São Paulo: FNP, 2008. 502 p

\_\_\_\_\_. São Paulo: FNP, 2011. 482 p.

BARBOZA, S. B. S. C. et al. Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 2, p. 185-194, fev. 2006.

BARCELOS, E.; SANTOS, J. A. dos. Características agrônômicas das sementes de dendê produzidas pela Embrapa. Manaus: EMBRAPA, 2000. 2 p.

BEZERRA, K. C. de M.; ALOUFA, M. A. I.; LICHSTON, J. E. Estudo da anatomia de plântulas da espécie *Malus domestica* Borkn var. golden delicious cultivada *in vitro*. **Plant Cell Culture Micropropagation**, Lavras, v. 5, n. 1, p. 9-18, Mar. 2009.

BIONDI, A.; MONTEIRO, M.; GLASS, V. **O Brasil dos agrocombustíveis: palmáceas, algodão, milho e pinhão-manso: impacto das lavouras sobre a terra, o meio e a sociedade**. Brasília: ONG Repórter Brasil, 2008. 48 p.

BOARI, A. de J. Estudos realizados sobre o amarelecimento fatal do dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.). Belém: EMBRAPA, 2008. 59 p. (Documentos, 348).

BOBÁK, M. et al. The histological analysis of indirect somatic embryogenesis on *Drosera spathulata* Labill. **Acta Physiologiae Plantarum**, Berlin, v. 26, n. 3, p. 353-361, Sept. 2004.

CAMPOSTRINI, E.; OTONI, W. C. **Aclimatização de plantas: abordagens recentes**. Lavras: ABCTP, 1996. 12 p.

CANGAHUALA-INOCENTE, G. C. et al. Patterns of protein and carbohydrate accumulation during somatic embryogenesis of *Acca sellowiana*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 3, p. 217-224, mar. 2009.

CARDOSO, O. et al. Obtenção de plântulas de híbridos de dendezeiro por cultivo *in vitro*. **Revista Ciências Agrárias**, Piracicaba, v. 53, n. 2, p. 177-181, jul./dez. 2010.

CARVALHO, M. Embriogênese somática a partir de folhas imaturas e flores desenvolvidas *in vitro* de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.). 2009. 70 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2009.

CLEMENT, C. R.; LLERAS-PÉREZ, E.; LEEUWEN, J. van. O potencial das palmeiras tropicais no Brasil: acertos e fracassos das últimas décadas. **Agrociências**, Montevideu, v. 9, n. 1/2, p. 67-71, 2005.

COLLARES, D. Produção de cultivares e sementes de dendê na Embrapa. **Agroenergia em Revista**, Brasília, v. 2, p. 30-31, maio 2011.

CORDEIRO, A. C. C.; ALVES, A. B.; MACIEL, F. C. da S. **Informações técnicas para a implantação de lavoura de dendê em Roraima**. Boa Vista: EMBRAPA-Centro de Pesquisa Agroflorestal de Roraima, 2009. 12 p. (Documentos, 25).

DOUSSEAU, S. et al. Cryopreservation of zygotic embryos and kernels of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Seed Science Research**, Cambridge, v. 5, p. 81-86, June 1995.

EEUWENS, C. J. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera*) and cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 36, p. 23-28, Jan. 1978.

ENGELMANN, F. et al. Cryopreservation of zygotic embryos and kernels of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Seed Science Research**, Cambridge, v. 5, p. 81-86, Sept. 1995.

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

FERREIRA, A. G.; HU, C. Y. Cultura de embriões. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI; EMBRAPA-CNPQ, 1998. v. 1, p. 371-393.

FIGUEIREDO, M. A. et al. Indução *in vitro* de calos em duas espécies de maracujazeiro nativo. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 288-290, jul. 2007. Suplemento.

FILIPPI, S. B.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; RODRIGUEZ, A. P. M. Variações morfológicas de embriões somáticos obtidos a partir de inflorescências de bananeira. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 58, n. 4, p. 711-716, out./dez. 2001.

FRANKENBERGER JÚNIOR, N.; ARSHAD, N. **Phytohormones in soils: microbial production and function**. New York: M. Dekker, 1995. 503 p.

FUJIWARA, K.; KOZAI, T. Physical microenvironment and its effects. In: AITKEN-CHRISTIE, J.; KOZAI, T.; SMITH, M. L. (Ed.). **Automation and environmental control in plant tissue culture**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. p. 319-367.

FURLAN, L. F. et al. Potencialidades regionais estudo de viabilidade econômica dendê. Boa Vista: SUFRAMA, 2003. 12 p.

GALLO, L. A.; CROCOMO, O. G. A cultura de tecidos em fitopatologia. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, p. 494-506.

GATICA-ARIAS, A. M.; ARRIETA-ESPINOZA, G.; ESQUIVEL, A. M. E. Plant regeneration via indirect somatic embryogenesis and optimisation of genetic transformation in *Coffea arabica* L. cvs. Caturra and Catuaí. **Electronic Journal Biotechnology**, Santiago, v. 11, p. 717-758, Jan. 2008.

GHASSAN, T. Q. et al. A combustion performance and emissions of ethyl ester of a waste vegetable oil in a water-cooled furnace. **Applied Thermal Engineer**, Lisboa, v. 23, p. 285-293, Dec. 2003.

GRANDO, M. F. et al. Indução de calos e regeneração de plantas em três genótipos de aveia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v. 5, n. 2, p. 139-144, jul. 1993.

GUEDES, R. da S. **Embriogênese somática e regeneração de plantas de dendezeiro**. 2008. 94 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal do Acre, Rio Branco, 2008.

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

HABERLANDT, G. Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. **Sitzungsber Naturwissenschaft**, Wienheim, v. 111, p. 69-92, 1902.

HAZARIKA, B. N. Morpho-physiological disorders *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 108, p. 105-120, Apr. 2006.

HOMMA, A. K. O. et al. Bases para uma política de desenvolvimento da cultura do dendezeiro na Amazônia. In: VIEGAS, I. de J. M.; MÜLLER, A. A. (Ed.). **A cultura do dendezeiro na Amazônia brasileira**. Belém: EMBRAPA, 2000. p. 110-121.

HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. Cultura de embriões. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI; EMBRAPA-CNPq, 1998. v. 1, p. 371-393.

JEONG, B. R.; FUJIWARA, K.; KOZAI, T. Environmental control and photoautotrophic micropropagation. In: JANICK, J. (Ed.). **Horticultural reviews**. New York: Wiley, 1995. p. 125-173.

JURGENS, G.; MAYER, U. *Arabidopsis*. In: BARD, J. (Ed.). **Embryos: a colour atlas of developing embryos**. London: Wolfe, 1992. p. 32-37.

KANCHANAPOOM, K.; DOMYOAS, P. The origin and development of embryoids in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq) embryo culture. **ScienceAsia**, Bancoc, v. 25, p. 195-202, Mar. 1999.

KARUNARATNE, S.; PERIYAPPERUMA, K. Culture of immature embryos of coconut, *Cocos nucifera* L: callus proliferation and somatic embryogenesis. **Plant Science**, Cambridge, v. 8, p. 13-22, Jan. 1990.

KOMAMINE, A. et al. Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures: physiology, biochemistry, and molecular biology. **In Vitro Cell & Development Biology Plant**, Wallingford, v. 28, p. 11-14, Jan. 1992.

KONAN, E. E. et al. A modeling approach of the *in vitro* conversion of oil palm (*Elaeis guineensis*) somatic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 84, p. 99-112, Aug. 2005.

LAM, E.; FUKUDA, H.; GREENBERG, J. Programmed cell death of tracheary elements as a paradigm in plants. **Plant Molecular Biology**, Wageningen, v. 44, p. 245-253, Oct. 2000.

LEDÓ, A. da S. et al. Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos e aclimação de plântulas de coqueiro-anão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 2, p. 147-154, fev. 2007.

LEDÓ, A. da S.; LAMEIRA, O. A.; MENEZES, I. C. de. **Embriogênese somática e regeneração de plantas em açazeiro**. Rio Branco: EMBRAPA, 2002. 21 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 34).

LENIS-MANZANO, S. J. et al. Histologia da embriogênese somática induzida em embriões de sementes maduras de *Urochloa brizantha* apomítica. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 5, p. 435-441, maio 2010.

LIU, C. et al. Shoot regeneration and somatic embryogenesis from needles of redwood (*Sequoia sempervirens* (D. Don.) Endl.). **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 25, p. 621-628, Feb. 2006.

LUIS, Z. G.; BEZERRA, K. M. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Adaptability and leaf anatomical features in oil palm seedlings produced by embryo rescue and pre-germinated seeds. **Brazilian Journal Plant Physiology**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 3, p. 209-215, Nov. 2010.

MANEHONON, M. B. et al. Effect of storage and heat treatments on the germination of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) seed. **African Journal of Agricultural Research**, Pretoria, v. 4, n. 10, p. 931-937, Oct. 2009.

MARTIN, A. B. et al. Differences in the contents of total sugars, starch and sucrose in embryogenic and non-embryogenic calli from *Medicago arborea* L. **Plant Science**, Cambridge, v. 154, p. 143-151, May 2000.

MORCILLO, F. et al. EgAP2-1, an AINTEGUMENTA-like (AIL) gene expressed in meristematic and proliferating tissues of embryos in oil palm. **Planta**, Berlin, v. 226, n. 6, p. 1353-1362, Nov. 2007.

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

MOURA, E. F.; MOTOIKE, S. Y. Induction of somatic embryogenesis in immature seeds of guava tree cv. Paluma. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 2, p. 507-511, jun. 2009.

NOGUEIRA, R. C. **Caracterização de calos embriogênicos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.)**. 2006. 41 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

NOGUEIRA, R. C. et al. Análise ultraestrutural de calos embriogênicos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 48-50, jul. 2007. Suplemento.

PATCHARAPISUTSIN, W.; KANCHANAPOOM, K. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) callus. **Journal of the Science Society of Thailand**, Bancoc, v. 22, n. 1, p. 13-20, 1996.

PEREIRA, J. E. S. et al. Germinação in vitro de embriões zigóticos de murmuru (*Astrocaryum ulei*). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 2, p. 251-256, mar/abr. 2006.

PINHEIRO, C. M. B. **Germinação de sementes de palmeiras**: revisão bibliográfica. Teresina: EMBRAPA-UEPAE, 1986. 102 p.

POSPÍSILOVÁ, J. et al. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 42, n. 4, p. 481-497, Aug. 1999.

REGO-OLIVEIRA, L. do V. et al. Influência da fonte e concentração de carboidrato no crescimento vegetativo e enraizamento *in vitro* de *Oncidium varicosum* Lindl.(Orchidaceae). **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n. 2, p. 265-272, 2003.

RIBEIRO, L. M. et al. Germinação de embriões zigóticos e desenvolvimento *in vitro* de coquinho-azedo. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 58, n. 2, p. 133-139, mar./abr. 2011.

SANÉ, D. et al. Histocytological analysis of callogenesis and somatic embryogenesis from cell suspensions of date palm (*Phoenix dactylifera*). **Annals of Botany**, Oxford, v. 98, p. 301-308, June 2006.

SOUZA, A. V. de et al. Germinação de embriões e multiplicação *in vitro* de *Lychnophora pinaster* Mart. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, p. 1532-1538, dez. 2003. Edição especial.

STEINER, N. et al. Effect of carbon source on morphology and histodifferentiation of *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. **Brazilian Archives Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, p. 895-903, Nov. 2005.

STEINMACHER, D. A. et al. Somatic embryogenesis in peach palm using the thin cell layer technique: induction, morpho-histological aspects and AFLP analysis of somaclonal variation. **Annals of Botany**, Oxford, v. 100, p. 699-709, Mar. 2007.

TAVARES, A. R. et al. Efeito da aplicação de ácido giberélico no crescimento da palmeira-ráfia. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 31, n. 6, p. 999-1004, abr. 2007.

TE-CHATO, S.; HILAE, A. High-frequency plant regeneration through secondary somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq. var. *tenera*). **Journal of Agricultural, Science and Technology**, Tehran, v. 3, n. 2, p. 345-357, Oct. 2007.

THUZAR, M. et al. Efficient and rapid plant regeneration of oil palm zygotic embryos cv. 'Tenera' through somatic embryogenesis. **Acta Physiologiae Plantarum**, Berlin, v. 33, p. 123-128, May 2011.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP; EMBRAPA-CNPH, 1990. 433 p.

TOUCHET, B. de; DUVAL, Y.; PANNETIER, C. Plant regeneration from embryogenic suspension cultures of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 10, p. 529-532, Aug. 1991.

TREVISAM, R. Análises histológicas e bioquímicas em calos de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake cultivados *in vitro* sob interação nutricional de boro e cálcio. 2005. 167 p. Tese (Doutorado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2005.

URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; BOODEY, R. M. Produção de biocombustíveis A questão do balanço energético. **Revista de Política Agrícola**, Brasília, v. 14, n. 1, p. 42-46, jan./mar. 2005.

VALOIS, A. C. C. Comunicado técnico da cultura do dendê na Amazônia. Boa Vista: EMBRAPA, 1997. 7 p.

VIEGAS, I. de J. M.; MÜLLER, A. A. **A cultura do dendezeiro na Amazônia Brasileira**. Belém: UFAM, 2000. 374 p.

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

ZIMMERMAN, J. L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **Plant Cell**, Oxford, v. 5, p. 1411-1423, Oct. 1993.

**ARTIGO 1** Influência do meio e idade dos embriões zigóticos no cultivo *in vitro* de *Elaeis guineensis* Jacq.

## RESUMO

O cultivo do dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) vem adquirindo grande importância econômica, devido à crescente demanda por óleos vegetais, utilizados nas indústrias alimentícia, medicinal, cosmética e mais recentemente na produção de biocombustível. A propagação da espécie é limitada pela produção de mudas, devido ao principal método de produção em campo ser via semente, pois estas demandam um longo período para germinar e apresentam baixas taxas de germinação. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da idade dos embriões (tempo após polinização), do meio de cultivo e da presença de carboidratos na germinação *in vitro* de embriões zigóticos de *Elaeis guineensis* Jacq híbrido Manicoré. Os embriões de 80, 90 100 e 110 dias após a antese foram inoculados em meio de cultura MS ou Y3 modificado e acrescidos ou não com 3% de sacarose. Os meios foram renovados após 30 dias de inoculação, onde as plântulas permaneceram por mais 45 dias e posteriormente foram coletadas para as análises histológicas. Observou-se que, na ausência de sacarose no meio de cultivo, os embriões não germinaram. Resultados superiores para a porcentagem de germinação (88%) foram obtidos utilizando-se embriões com 100 dias após antese, cultivados em meio MS, não diferindo estatisticamente do meio de cultivo Y3. Para os parâmetros avaliados embriões de 90 dias em meio Y3 apresentaram melhores resultados para o número e comprimento da raiz. Pode-se concluir que embriões de 90 dias cultivados em meio de cultivo Y3 geram plântulas com melhores condições para a transferência para fase de aclimatização.

Palavras-chave: Sacarose, Y3, MS, Anatomia, Cultivo de embriões.

### ABSTRACT

Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) cultivation has been gaining economic importance, due to the rising demand for vegetal oils, used in food, medicinal and cosmetic industries and, most recently, in biofuels production. The propagation of the species is limited by the sprouts production, due to the fact that the main method of production in field is via seeds which demand a long period to germinate and present low germination rate. The aim of this work was to evaluate the effect of the embryos' age (time after pollination), the culture media and of the presence of carbohydrates upon the germination *in vitro* of zygotic embryos of *Elaeis guineensis* Jacq, hybrid Manicoré. The embryos of 80, 90, 100 and 110 days after anthesis were inoculated in a MS media or Y3 modified and added or not with 3% of sucrose. The media were renewed after 30 days of inoculation, where the plantlets remained for more 45 days and were, afterwards, collected for histological analyses. It could be observed that the embryos did not germinate in the absence of sucrose in the culture medium. Superior results for the germination percentage (88%) were obtained using embryos with 100 days after the anthesis, cultivated in MS medium, which did not differ statistically from the Y3 medium. As for the evaluated parameters, the 90-day-old embryos showed better results for number and length of roots in Y3 medium. It is possible to conclude that 90-day-old embryos, cultivated in Y3 medium, generate plantlets with better conditions to be transferred to the acclimatization step.

Keywords: Sucrose, Y3, MS, Anatomy, Embryos cultivation.

## 1 INTRODUÇÃO

O dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.), pertencente à família Arecaceae, se caracteriza como uma monocotiledônea perene, monoica, oleaginosa e de longo ciclo de vida (MORCILLO et al., 2007). Essa cultura vem se destacando pela quantidade de óleo produzido nos genótipos melhorados, em torno de 6.000 Kg.ha<sup>-1</sup>, sendo muito superior, quando comparado, por exemplo, com a soja, que é a espécie mais cultivada para este fim, e que produz em torno de 500 kg.ha<sup>-1</sup>. Outro fator relevante é a dos óleos produzidos, os quais podem ser destinados para indústrias alimentícia, medicinal, cosmética bem como para a produção de biocombustível (BOARI, 2008; MYA et al., 2010). Este interesse tem sido reforçado pela necessidade de produção de combustíveis por meio de fontes de energia alternativas e renováveis, devido às preocupações com o meio ambiente, e pelo fato de os combustíveis fósseis derivados do petróleo possuírem reservas finitas (GHASSAN et al., 2003).

As pesquisas com o dendezeiro têm possibilitado a geração de plantas altamente produtivas e adaptadas, como é o caso do híbrido interespecífico, denominado Manicoré, proveniente do cruzamento de *Elaeis guineensis* x *Elaeis oleifera*. Esse híbrido produz grande quantidade de óleo, com produção de aproximadamente 30 toneladas de óleo por cacho/ hectare/ano e possui resistência ao amarelecimento fatal, uma anomalia ainda de causa desconhecida, que acomete as plantações de dendezeiro causando grandes prejuízos (CAMPOS, 2011).

Atualmente o Brasil destina 95.000 hectares no cultivo do dendezeiro e possui aproximadamente 75.000.000 de hectares com áreas propícias a dendeicultura (ANUÁRIO..., 2008). Existe uma ação governamental para estimular a expansão da cultura em aproximadamente sete anos com a produção de 12.000.000 de sementes por ano (COLLARES, 2011).

Essa grande demanda deve ser acompanhada pela disponibilidade de mudas em escala comercial. Por ser uma monocotiledônea e ter meristema único não é possível propagar esta espécie por microestaquias. A propagação normalmente é realizada por meio de sementes que demandam um longo período de tempo para germinar (1 a 3 anos) e apresentam baixas taxas de germinação (aproximadamente 30%) (LUIS; BEZERRA; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2010; MANEHONON et al., 2009). Diante disso verifica-se a necessidade do desenvolvimento de técnicas que aperfeiçoem a germinação reduzindo o tempo para o estabelecimento de novos plantios.

A cultura de tecidos, pode ser usada como ferramenta útil para a otimização da germinação dos embriões de *E. guineensis* Jacq, mediante o seu isolamento e cultivo em condições apropriadas (TORRES; CALDAS; BUSO, 1998).

A composição do meio de cultivo é um dos principais fatores que influenciam a retomada do desenvolvimento do embrião zigótico em cultura *in vitro*, sendo necessário estabelecer um balanço de nutrientes adequado para a regeneração do embrião em cultura (SURANTHRAN et al., 2011). Dentre os nutrientes presentes no meio de cultura, a sacarose se destaca como a fonte de carboidrato mais utilizada e que também regula a osmolaridade do meio de cultura. Embriões imaturos, normalmente, requerem fontes de carboidrato para o seu desenvolvimento e quanto mais jovens os embriões, maior a osmolaridade requerida (HU; FERREIRA, 1998).

Além da germinação, as estruturas anatômicas das plântulas *in vitro* são de extrema importância para o sucesso na fase de aclimatização. O desenvolvimento da parte aérea bem como do sistema radicular podem ser avaliados mediante análises histológicas.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da idade dos embriões (tempo após polinização) no meio de cultivo, da presença de carboidratos na

germinação de embriões de *Elaeis guineensis* Jacq. e analisar o desenvolvimento das plântulas por meio de parâmetros anatômicos.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Material vegetal**

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório Central de Biologia Molecular e no Laboratório de Anatomia Vegetal, da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG. Frutos imaturos de *Elaeis guineensis* Jacq. híbrido Manicoré, de diferentes dias após a polinização (80, 90, 100 e 110), foram cedidos pela empresa Denpasa – Pará para os experimentos de germinação.

### **2.2 Desinfestação e germinação in vitro**

Os frutos foram lavados em hipoclorito de sódio (1,25%) e posteriormente quebrados, utilizando-se morça, para retirada do epicarpo, mesocarpo e endocarpo, possibilitando assim a exposição das amêndoas.

As amêndoas foram lavadas em água corrente, levadas para câmara de fluxo e imersas em álcool 70% durante 30 segundos. Em seguida, foram transferidas para uma solução de hipoclorito de sódio (1,25%) adicionando-se três gotas de tween a cada 100 mL de solução e após este processo foram lavadas por três vezes em água destilada autoclavada, sob agitação contínua. Após a desinfestação, os embriões foram isolados das amêndoas, inoculados em meio de cultivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e Y3 modificado (EEUWENS, 1978) sem adição dos aminoácidos e suplementado ou não com 3% de sacarose. Na sequência o pH foi ajustado para  $5,7 \pm 0,1$ , o meio solidificado com ágar 0,6% (p/v) e vertidos em placas de Petri.

Após a inoculação, os embriões foram mantidos por 30 dias em fotoperíodo de 16 horas à temperatura de  $26 \pm 2$  °C. Posteriormente foram

transferidos para frascos magenta, contendo o mesmo meio de cultura, onde permaneceram por mais 45 dias sob as mesmas condições citadas anteriormente.

A porcentagem de germinação e o tamanho dos embriões foram avaliados aos 30 dias após a inoculação, considerando-se neste caso embriões que apresentaram pelo menos a radícula. Após, 75 dias da inoculação dos embriões, as plântulas foram avaliadas em relação aos seguintes parâmetros: número de folhas, tamanho da parte aérea, presença de raiz e tamanho do sistema radicular.

### **2.3 Anatomia das plântulas**

Plântulas após 75 dias de cultivo *in vitro* foram coletadas e fixadas F.A.A.70 (JOHANSEN, 1940) por um período de 48 horas, sendo então transferidas para etanol 70% e mantidas até as análises. Os cortes transversais das folhas e raízes foram realizados em micrótomo de mesa de acordo com a metodologia descrita por Melo et al. (2007). Os cortes foram clarificados com hipoclorito de sódio 50% por 10 minutos, lavados duas vezes em água destilados por 10 minutos, corados com solução de safranina e azul de Astra (safrablau 7:3) por 30 segundos sendo em seguida lavados em água destilada e montados em lâmina com glicerina 50% (KRAUS; ARDUIN, 1997).

As lâminas foram observadas e fotografadas em microscópio fotônico acoplado à câmera digital. As fotomicrografias foram utilizadas para as medições dos parâmetros anatômicos em programa de análise de imagem (Imagetool – UTHSCSA) calibrado com régua microscópica fotomicrografada nos mesmos aumentos. Para cada característica anatômica foram realizadas quatro medições para cada repetição.

Nas folhas foram avaliadas as seguintes características: espessura da epiderme das faces abaxial e adaxial, espessura do mesofilo, espessura da cutícula, espessura da hipoderme, espessura do esclerênquima, espessura do

floema e o diâmetro das células de metaxilema na nervura central. Na raiz foram avaliadas: espessura da epiderme, espessura do córtex, espessura da exoderme, espessura da endoderme, diâmetro total da raiz, diâmetro do cilindro vascular, diâmetro das células de metaxilema, espessura do floema, área total da raiz e área do cilindro vascular.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com dois tipos de meio de cultura (MS e Y3), duas concentrações de sacarose (presença e ausência) e quatro idades dos embriões (80, 90, 100, 110 dias) após polinização, sendo realizadas cinco repetições contendo cinco embriões cada.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, utilizando-se o programa SISVAR<sup>®</sup> (FERREIRA, 2008).

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A germinação de embriões de *E. guinensis* Jacq. híbrido Manicoré foi influenciada pela composição do meio de cultura, presença de sacarose no meio de cultura e pela idade do embrião, ocorrendo diferenças estatísticas entre os tratamentos.

Foi observado que os embriões com 80, 90, 100 e 110 dias, cultivados em meio de cultura MS e Y3 com adição de sacarose germinaram enquanto aqueles cultivados nos mesmos meios de cultura sem adição de sacarose não germinaram (Figura 1).

A maior porcentagem de germinação (88%) foi obtida utilizando-se embriões com 100 dias, inoculados no meio de cultura MS, acrescido de sacarose, no entanto, essa porcentagem não diferiu estatisticamente dos tratamentos, contendo embriões de 90 e 110 dias cultivados no mesmo meio de cultura (72% e 76% germinação respectivamente).

Comportamento semelhante foi observado quando os embriões foram cultivados em meio Y3 modificado não havendo diferenças estatísticas entre os tratamentos contendo embriões de 100 e 110 dias.

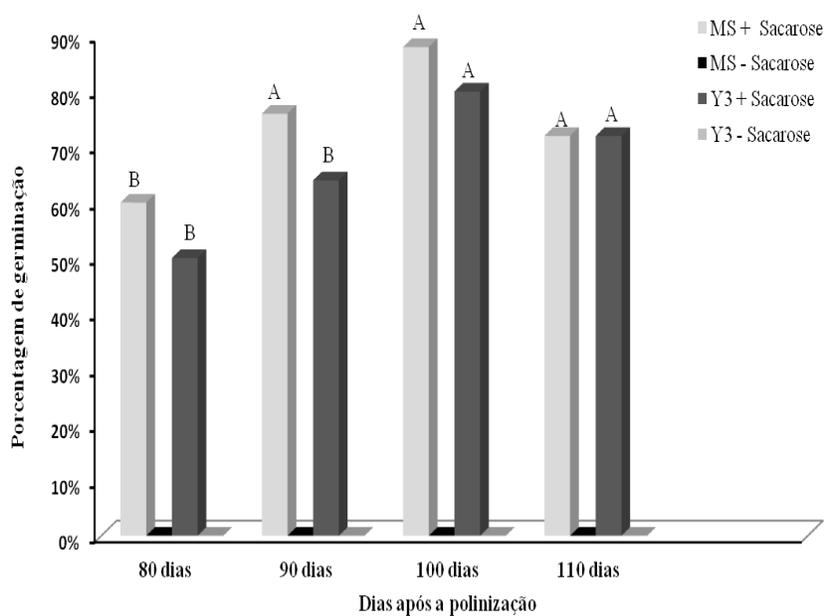


Figura 1 Porcentagem de germinação in vitro de embriões de *E. guineensis* Jacq. híbrido Manicoré, com 80, 90, 100 e 110 dias após antese, inoculados em diferentes meios de cultura.

No caso de embriões de dendezeiro híbrido BRS Manicoré, a presença de fonte de carboidratos foi indispensável para o desenvolvimento dos embriões, independentemente dos estádios de desenvolvimento que se encontram nos meios de cultivo MS e Y3.

As fontes de carboidrato no meio de cultura, para a germinação de embriões, influenciam em vários processos metabólicos, afetando o crescimento

e mantendo a osmolaridade adequada para a fase de desenvolvimento do embrião (HU; FERREIRA, 1998).

Cardoso et al. (2010), avaliando a germinação do híbrido CN 470 de dendezeiro em meio de cultivo MS e Y3 completo e meia força, observaram a maior porcentagem de germinação (85,18%) no tratamento com o meio de cultura MS.

Torres et al. (2005) verificaram que a adição de sacarose ao meio de cultivo foi determinante para o crescimento e desenvolvimento dos embriões de *Heliconia rostrata*. Pereira et al. (2006), avaliando a germinação de embriões de *Uncaria guianensis* (Wild) DC., verificaram 100% de germinação na presença de 15 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, independente da concentração do meio de cultivo MS. Nunes et al. (2008), estudando diferentes concentrações de sacarose e estádios fisiológicos de maturação dos frutos na germinação de pinhão-manso, verificaram que uma maior concentração de sacarose (60 g.L<sup>-1</sup>) proporcionou maior número de embriões imaturos germinados (83,68%). Ribeiro et al. (2011) não obtiveram raízes e bainha foliar em plântulas germinadas a partir de embriões de frutos maduros cultivados em meio sem sacarose, relacionando este fato com a falta de reservas de carboidratos suficientes para o desenvolvimento completo da planta.

Além da germinação *in vitro*, a aclimação de plântulas tem sido uma limitação na micropropagação de muitas espécies, principalmente de palmeiras. A transferência de um ambiente protegido, estéril, com açúcares e com umidade saturada, para ambiente não estéril, sem açúcares e com reduzida umidade, tem levado à perda de plantas, baixa taxa de crescimento e período prolongado na obtenção de plantas completamente aclimatizadas (SOUZA JÚNIOR; BARBOZA; SOUZA, 2001).

Portanto, a partir do momento que se conhece as alterações estruturais que podem ocorrer na plântula é, possível aperfeiçoar e até mesmo controlar as

condições de cultivo *in vitro*, para maximizar a sobrevivência das mesmas na aclimatização (APÓSTOLO; BRUTTI; LLORENTE, 2005).

Neste trabalho foram analisados alguns parâmetros estruturais como tamanho dos embriões germinados, tamanho da parte aérea, número de folhas, presença de raiz e tamanho da raiz (tabela 1).

Tabela 1 Comprimento dos embriões germinados – cm (EG) após 30 dias e comprimento da parte aérea - cm (CA), número de folhas (NF), número de raízes (PR) e comprimento da raiz – cm (CR) de plântulas de *Elaeis guineensis* Jacq. híbrido Manicoré, após 75 dias de cultivo em meio MS e Y3 acrescido de sacarose.

| Idade (dias) | Meio de cultura | EG (cm) | CA (cm) | NF     | NR     | CR (cm) |
|--------------|-----------------|---------|---------|--------|--------|---------|
| 80           | MS              | 0,91 B  | 1,37 B  | 1,37 B | 0,12 A | 0,37 A  |
| 90           |                 | 0,96 B  | 2,05 A  | 2,12 A | 0,00   | 0,00    |
| 100          |                 | 1,24 A  | 1,56 B  | 0,62 B | 0,25 A | 0,33 A  |
| 110          |                 | 0,80 B  | 1,36 B  | 1,87 A | 0,00   | 0,00    |
| 80           | Y3              | 1,13 a  | 2,00 a  | 2,00 a | 0,12 b | 0,15 b  |
| 90           |                 | 0,67 b  | 1,27 b  | 2,62 a | 0,50 a | 0,53 b  |
| 100          |                 | 0,79 b  | 1,12 b  | 0,50 b | 0,62 a | 2,91 a  |
| 110          |                 | 0,79 b  | 2,22 a  | 2,50 a | 0,12 b | 0,07 b  |

Letras maiúsculas diferentes significam que os dados diferem entre si, na coluna, com 0,05% de significância e letras minúsculas diferentes significam que os dados diferem entre si, na coluna com 0,05% de significância.

Como pode ser observado o meio de cultivo Y3 proporcionou melhores condições para os parâmetros relacionados com a formação de raízes. Isso provavelmente deve estar relacionado com a maior quantidade de sais presentes no meio de cultura MS e a diferente fonte de nitrogênio, quando comparado com o meio de cultura Y3. Segundo Assis e Teixeira (1998), a influencia do meio de cultura no enraizamento está relacionada à relação carbono/nitrogênio. Geralmente moderadas deficiências de nitrogênio são mais benéficas ao enraizamento do que excesso ou mesmo níveis adequados desse elemento. Segundo Ribeiro et al. (2011), uma maior concentração de sais no meio de cultivo MS (100%) inibiu o desenvolvimento radicular de plântulas de dendezeiro, corroborando também com Ferreira et al. (2002), que estudando eixos embrionários de cupuaçu em diferentes concentrações salinas verificaram que uma alta disponibilidade de nutrientes podem impedir a obtenção de raízes em plântulas.

Diferenças anatômicas nas folhas também foram observadas nos tratamentos com os meios de cultivo MS e Y3 associados às diferentes idades após polinização (Figura 2).

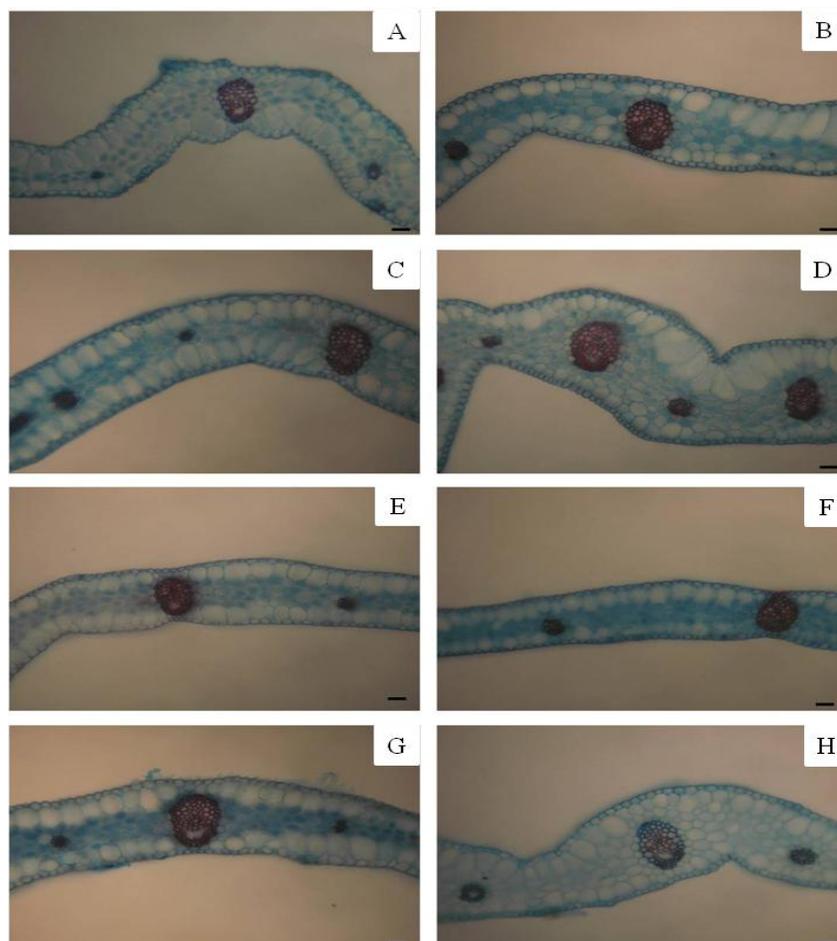


Figura 2 Fotomicrografias de folhas de plântulas de *E. guineensis* híbrido Manicoré germinadas a partir de embriões com 80 (A), 90 (C), 100 (E) e 110 (G) dias após polinização mantidos em meio de cultura MS e 80 (B), 90 (D), 100 (F), 110 (G) dias após polinização mantidos em meio de cultura Y3. Barras = 100  $\mu$ m.

Com relação ao parâmetro espessura da epiderme adaxial e abaxial das plântulas no meio de cultivo MS, todas as idades apresentaram a epiderme desenvolvida. Somente em plântulas obtidas de embriões após 100 dias da antese obtiveram-se resultados inferiores para ambos os parâmetros e o mesmo foi observado para o meio Y3. Quanto à deposição de cutícula, plântulas obtidas

de embriões de 110 dias após antese, cultivados em meio MS e provenientes de embriões com 90 dias cultivados em meio Y3 apresentaram melhores resultados para deposição de cutícula. Em relação à hipoderme não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos (Tabelas 2).

Tabela 2 Características anatômicas de folhas de plântulas de dendezeiro de híbrido Manicoré, germinadas *in vitro* a partir de embriões de diferentes idades. Espessura da epiderme adaxial (EAD) e abaxial (EAB) e espessura da cutícula (EC), espessura da hipoderme adaxial (HAD) e abaxial (HAB) de folhas de plântulas.

| Idade (dias) | Meio de cultura | EAD ( $\mu\text{m}$ ) | EAB ( $\mu\text{m}$ ) | EC ( $\mu\text{m}$ ) | HAD ( $\mu\text{m}$ ) | HAB ( $\mu\text{m}$ ) |
|--------------|-----------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 80           | MS              | 17,77 A               | 20,78 AB              | 8,33 AB              | 51,66 A               | 65,92 A               |
| 90           |                 | 17,09 A               | 18,93 B               | 9,03 A               | 51,64 A               | 73,11 A               |
| 100          |                 | 13,98 B               | 15,02 C               | 7,24 B               | 47,86 A               | 67,85 A               |
| 110          |                 | 18,57 A               | 22,36 A               | 9,11 A               | 53,32 A               | 68,04 A               |
| 80           | Y3              | 16,74 ab              | 18,59 a               | 5,95 c               | 49,75 a               | 63,89 b               |
| 90           |                 | 18,50 a               | 21,28 a               | 8,60 a               | 42,25 a               | 86,62 a               |
| 100          |                 | 14,83 b               | 15,51 b               | 7,12 bc              | 45,54 a               | 68,79 b               |
| 110          |                 | 17,28 a               | 21,44 a               | 8,33 a               | 45,30 a               | 59,66 b               |

Letras maiúsculas diferentes significam que os dados diferem entre si, na coluna, com 0,05% de significância e letras minúsculas diferentes significam que os dados diferem entre si, na coluna com 0,05% de significância.

A espessura da cutícula na folha pode ter diferentes funções relacionadas com proteção e resistência da folha, reduzindo digestibilidade por herbívoros, limitando a entrada de patógenos e a exsudação de água e nutrientes e também facilita no processo de aclimatização de plantas *in vitro* (AKIN; ROBINSON, 1982; RATHI, 1998). A espessura da cutícula varia de acordo com as condições ambientais (TAIZ; ZEIGER, 2004) e a carência de cera epicuticular sobre folhas de plantas *in vitro* se dá graças à alta umidade no frasco de cultivo, sendo que a rápida desidratação das plantas cultivadas *in vitro* quando transferidas para casa de vegetação é correlacionada, dentre outros fatores, com a baixa deposição de cutícula e cera epicuticular e alta redução do mesofilo das folhas (MACHADO; BIASI, 2011).

Tabela 3 Características anatômicas de folhas de plântulas de dendezeiro de híbrido Manicoré, germinadas *in vitro* a partir de embriões de diferentes idades. Espessura do mesofilo (EM), espessura do esclerênquima (EE) e espessura do floema (EF) e diâmetro do metaxilema (DM) de folhas de plântulas de *E. guineensis* Jacq. híbrido Manicoré, germinadas *in vitro* a partir de embriões de diferentes idades.

| Idade (dias) | Meio de cultura | EM ( $\mu\text{m}$ ) | EE ( $\mu\text{m}$ ) | EF ( $\mu\text{m}$ ) | DM ( $\mu\text{m}$ ) |
|--------------|-----------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| 80           | MS              | 88,08 AB             | 58,79 B              | 46,05 AB             | 49,28 A              |
| 90           |                 | 74,69 B              | 50,52 AB             | 35,16 C              | 38,04 B              |
| 100          |                 | 89,71 AB             | 58,79 AB             | 57,86 A              | 43,88 AB             |
| 110          |                 | 99,94 A              | 70,46 A              | 57,05 AB             | 45,72 A              |
| 80           | Y3              | 95,54 ab             | 78,34 a              | 52,83 b              | 52,54 a              |
| 90           |                 | 153,90 c             | 100,84 b             | 40,28 a              | 49,06 ab             |
| 100          |                 | 81,55 a              | 69,37 a              | 37,86 a              | 40,98 c              |
| 110          |                 | 110,74 c             | 73,44 a              | 39,88 a              | 42,35 bc             |

Letras maiúsculas diferentes significam que os dados diferem entre si, na coluna, com 0,05% de significância e letras minúsculas diferentes significam que os dados diferem entre si, na coluna com 0,05% de significância.

A maior espessura do mesofilo e maior espessura do esclerênquima também foram observadas em plântulas obtidas de embriões com 90 dias e cultivadas em meio Y3. O aumento na espessura da folha, especialmente pelo alongamento ou adição de células, está relacionado à redução na resistência do mesofilo ao dióxido do carbono (NOBEL, 1977) e correlacionado com aumento de fatores potencialmente limitantes a fotossíntese, como a RuBisco, carregadores de elétrons ou condutância estomatal (BJORKMAN, 1981). Chazdon e Kaufman (1993), estudando duas espécies de Piper, observaram que a capacidade fotossintética estava correlacionada com a espessura do mesofilo.

O desenvolvimento do sistema de sustentação é relevante para a aclimatização, pois reduzida capacidade de sustentação (esclerênquima e colênquima) pode ser limitante nesse processo (CAMPOSTRINI; OTONI, 1996). Soares (2003), ao comparar folhas de Ingá (*Inga vera*) *in vitro* e *ex vitro*, afirma que as ausências de tecidos de sustentação nas folhas de plantas micropropagadas as tornam menos resistentes e com aparência mais frágil.

Em relação ao desenvolvimento das folhas, os parâmetros espessura do mesofilo, do esclerênquima, do floema e o diâmetro do metaxilema demonstraram bons resultados quanto se utilizou plântulas obtidas de embriões zigóticos de 110 dias após antese em meio de cultura MS e embriões de 90 dias após antese em meio de cultivo Y3, com exceção da espessura do floema.

Com relação ao enraizamento, as plântulas provenientes de embriões com 90 e 110 dias mantidas em meio MS não apresentaram raízes. Já as plântulas provenientes de embriões com 80 dias e 100 dias cultivadas em meio MS, provenientes de embriões com 80, 90, 100 e 110 dias cultivadas em meio Y3 apresentaram enraizamento e foi possível avaliar os parâmetros anatômicos (Figura 3).

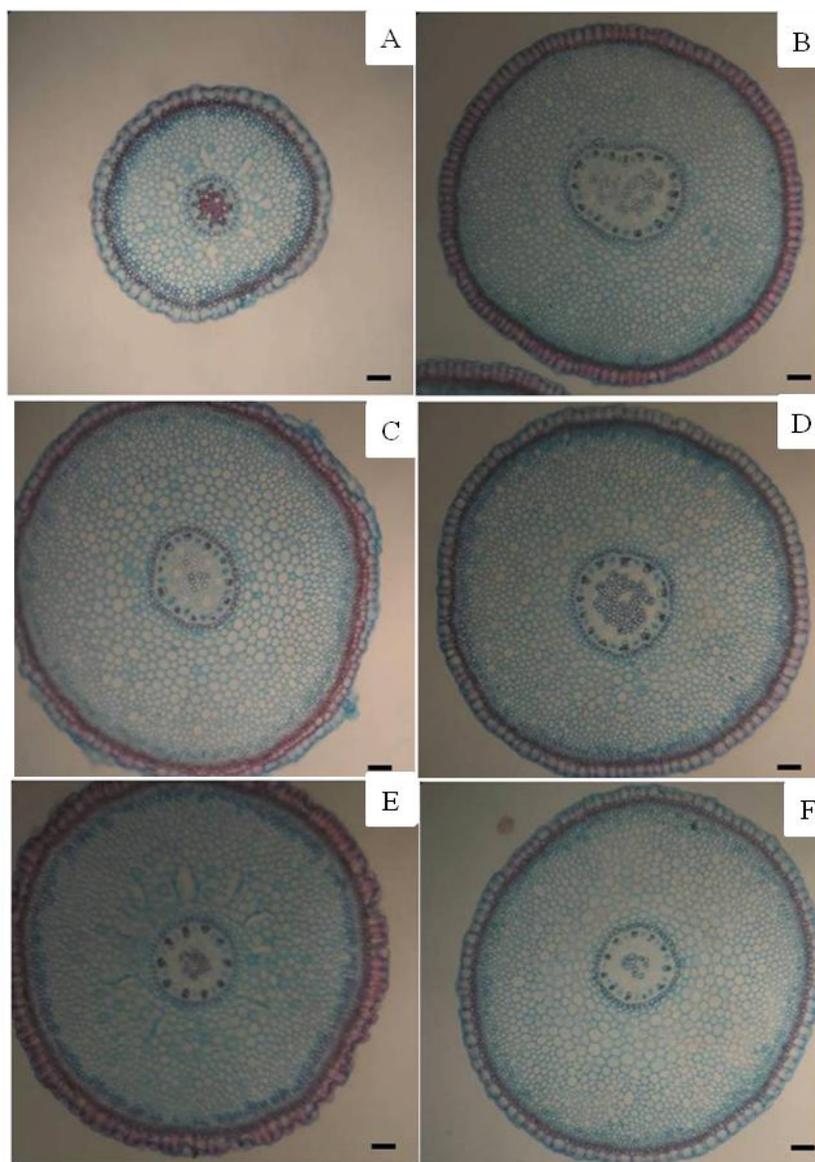


Figura 3 Fotomicrografias das raízes de plântulas de *E. guineensis* híbrido Manicoré germinadas a partir de embriões com 80 (A) e 100 (B) dias após polinização mantidas em meio MS, embriões com 80 (C), 90 (D), 100 (E), 110 (F) dias após polinização mantidos em meio Y3. Barras = 100  $\mu$ m.

Para os parâmetros analisados na raiz: a área total da raiz, diâmetro total da raiz, espessura do córtex, área do cilindro vascular e diâmetro do cilindro

vascular o tratamento contendo o meio de cultivo MS associado à idade de 100 dias e 80 dias após polinização não diferiram estatisticamente (tabela 4 e 5).

Em meio Y3 a área total da raiz, o diâmetro total da raiz e a espessura da epiderme se destacaram em embriões de 100 dias após a polinização. Para a espessura do córtex foram obtidos melhores resultados em embriões de 80 e 110 dias após antese, este parâmetro não diferiu estatisticamente. Quanto à área do cilindro vascular e ao diâmetro do cilindro vascular resultados superiores foram obtidos com embriões de 90 dias após a polinização, sendo que o parâmetro diâmetro do cilindro vascular não diferiu estatisticamente dos embriões com 80 dias após antese (tabelas 4 e 5).

Tabela 4 Características anatômicas de raízes de plântulas de dendezeiro de híbrido Manicoré, germinadas *in vitro* a partir de embriões de diferentes idades. Área total da raiz (AR) e diâmetro total da raiz (DR), espessura da epiderme (EE.) de plântulas de *E. guineensis* Jacq. híbrido Manicoré, germinadas *in vitro* a partir de embriões de diferentes idades.

| Idade (dias) | Meio de cultura | AR (mm <sup>2</sup> ) | DR (µm)   | EE (µm)  |
|--------------|-----------------|-----------------------|-----------|----------|
| 80           | MS              | 0,75 B                | 978,07 B  | 52,86 A  |
| 90           |                 | 0,00                  | 0,00      | 0,00     |
| 100          |                 | 1,60 A                | 1430,10 A | 48,54 A  |
| 110          |                 | 0,00                  | 0,00      | 0,00     |
| 80           | Y3              | 1,84 a                | 1,53 a    | 45,49 b  |
| 90           |                 | 1,68 b                | 1,46 b    | 50,65 ab |
| 100          |                 | 1,83 a                | 1,53 a    | 55,41 a  |
| 110          |                 | 1,65 b                | 1,45 b    | 42,92 c  |

Letras maiúsculas diferentes significam que os dados diferem entre si, na coluna, com 0,05% de significância e letras minúsculas diferentes significam que os dados diferem entre si, na coluna com 0,05% de significância.

Tabela 5 Características anatômicas de raízes de plântulas de dendezeiro de híbrido Manicoré, germinadas *in vitro* a partir de embriões de diferentes idades. Espessura do córtex (EC), área do cilindro vascular (ACV) e diâmetro cilindro vascular (DCV) de raízes de plântulas de *E. guineensis* Jacq. híbrido Manicoré, germinadas *in vitro* a partir de embriões de diferentes idades.

| Idade (dias) | Meio de cultura | EC (mm) | ACV (mm <sup>2</sup> ) | DCV (mm) |
|--------------|-----------------|---------|------------------------|----------|
| 80           | MS              | 0,28 B  | 0,02 B                 | 0,19 B   |
| 90           |                 | 0,00    | 0,00                   | 0,00     |
| 100          |                 | 0,41 A  | 0,12 A                 | 0,40 A   |
| 110          |                 | 0,00    | 0,00                   | 0,00     |
| 80           | Y3              | 0,49 a  | 0,09 b                 | 0,34 a   |
| 90           |                 | 0,44 b  | 0,10 a                 | 0,37 a   |
| 100          |                 | 0,45 b  | 0,08 b                 | 0,32 b   |
| 110          |                 | 0,49 a  | 0,06 b                 | 0,29 c   |

Letras maiúsculas diferentes significam que os dados diferem entre si, na coluna, com 0,05% de significância e letras minúsculas diferentes significam que os dados diferem entre si, na coluna com 0,05% de significância.

Quanto à espessura da exoderme, da endoderme, diâmetro do metaxilema e espessura do floema, em raízes de plântulas mantidas no meio MS não foi observado diferenças estatísticas (Tabela 6). As plântulas mantidas em meio Y3 provenientes de embriões com 80 dias apresentaram maior espessura da exoderme e da endoderme. Esse parâmetro não diferiu estatisticamente nas plântulas provenientes de embriões com 90 dias (Tabela 6) que também apresentaram maior diâmetro do metaxilema.

Tabela 6 Características anatômicas de raízes de plântulas de dendezeiro de híbrido Manicoré, germinadas *in vitro* a partir de embriões de diferentes idades. Espessura da exoderme (EEX), espessura da endoderme (EEN), diâmetro do metaxilema (DM) e espessura do floema de raízes (EF) de plântulas de *E. guineensis* Jacq. híbrido Manicoré germinadas *in vitro* a partir de embriões de diferentes idades.

| Idade (dias) | Meio de cultura | EEX ( $\mu\text{m}$ ) | EEN ( $\mu\text{m}$ ) | DM ( $\mu\text{m}$ ) | EF ( $\mu\text{m}$ ) |
|--------------|-----------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|
| 80           | MS              | 33,22 b               | 16,80 b               | 18,56 b              | 38,63 b              |
| 90           |                 | 0,00 a                | 0,00 a                | 0,00 a               | 0,00 a               |
| 100          |                 | 36,91 b               | 17,19 b               | 17,89 b              | 37,92 b              |
| 110          |                 | 0,00 a                | 0,00 a                | 0,00 a               | 0,00 a               |
| 80           | Y3              | 51,50 c               | 18,58 b               | 16,47 a              | 37,29 b              |
| 90           |                 | 35,69 a               | 17,12 ab              | 19,33 b              | 38,56 bc             |
| 100          |                 | 45,10 b               | 15,80 a               | 17,45 a              | 41,52 c              |
| 110          |                 | 35,25 a               | 17,35 ab              | 16,48 a              | 34,16 a              |

Letras maiúsculas diferentes significam que os dados diferem entre si, na coluna, com 0,05% de significância e letras minúsculas diferentes significam que os dados diferem entre si, na coluna com 0,05% de significância.

Alguns parâmetros avaliados podem interferir no processo de aclimatização em maior grau como: a área do cilindro vascular, o diâmetro do cilindro vascular e o diâmetro do metaxilema. Esses aspectos analisados mostraram-se melhores em meio de cultivo Y3 onde foram utilizados embriões de 90 dias após antese. Os parâmetros acima relacionados são determinantes no processo de condução de água e nutrientes para toda a planta.

Segundo Jesus et al. (2010), a condutividade hidráulica da raiz está diretamente relacionada com o diâmetro do cilindro vascular e o bom desenvolvimento dele garante o suprimento adequado de água e sais minerais requeridos para a parte aérea.

## **CONCLUSÃO**

A sacarose é indispensável para a germinação de embriões de *Elaeis guineensis* Jacq. híbrido Manicoré.

Altas taxas de germinação podem ser obtidas em meio de cultivo MS com embriões zigóticos de 90, 100 e 110 dias após a polinização e para o meio de cultivo Y3 com embriões de 100 e 110 dias após antese.

O tratamento com meio de cultivo Y3 e embriões zigóticos de 90 dias após antese foi o que destacou para os parâmetros de número e comprimento de raízes como também para os parâmetros anatômicos das folhas e das raízes relacionados com as melhores condições para a aclimatização das plântulas.

## REFERÊNCIAS

AKIN, D. E.; ROBINSON, E. L. Structure of leaves and stems of arrowleaf and crimson clovers as related to *in vitro* digestibility. **Crop Science**, Ohio, v. 22, p. 24-29, Apr. 1982.

ANUÁRIO da agricultura brasileira. São Paulo: FNP, 2008. 502 p

APÓSTOLO, N. M.; BRUTTI, C. B.; LLORENTE, B. E. Leaf anatomy of *Cynara scolymus* L. in successive micropropagation stages. **In vitro Cell & Developmental Biology-Plant**, Wallingford, v. 41, p. 307-313, June 2005.

ASSIS, T. F. de; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: SPI/EMBRAPA, 1998. p. 184-185.

BJORKMAN, O. Responses to different quantum flux densities. In: LANGE, O. L. et al. (Ed.). **Encyclopedia of plant physiology new series**. Berlin: Springer-Verlag, 1981. p. 57-107.

BOARI, A de J. Estudos realizados sobre o amarelecimento fatal do dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.). Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Amazônia Oriental Ministério da Agricultura, Pecuária e Jacq.). Belém: EMBRAPA, 2008. 59 p. (Documentos, 348).

CAMPOS, J. I. **Produtores podem encomendar sementes do híbrido de dendê BRS Manicoré**. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/snt>>. Acesso em: 19 dez. 2011.

CAMPOSTRINI, E.; OTONI, W. C. **Aclimatização de plantas: abordagens recentes**. Brasília: ABCTP, 1996. 12 p.

CARDOSO, O. et al. Obtenção de plântulas de híbridos de dendezeiro por cultivo *in vitro*. **Revista Ciências Agrárias**, Piracicaba, v. 53, n. 2, p. 177-181, jul./dez. 2010.

CHAZDON, R. L.; KAUFMANN, S. Plasticity of leaf anatomy of two rain forest shrubs in relation to photosynthetic light acclimation. **Functional Ecology**, Cambridge, v. 7, p. 385-384, Dec. 1993.

COLLARES, D. Produção de cultivares e sementes de dendê na Embrapa. **Agroenergia em Revista**, Brasília, v. 2, p. 30-31, maio 2011.

EEUWENS, C. J. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera*) and cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 36, p. 23-28, Jan. 1978.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análise e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Lavras, v. 6, p. 36-4, out. 2008.

FERREIRA, M. G. R. et al. Resposta de eixos embrionários de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.) à concentração de sais, doses de sacarose e renovação do meio de cultivo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, p. 246-248, abr. 2002.

GHASSAN, T. Q. et al. A combustion performance and emissions of ethyl ester of a waste vegetable oil in a water-cooled furnace. **Applied Thermal Engineer**, Lisboa, v. 23, p. 285-293, Dec. 2003.

HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. Cultura de embriões. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI; EMBRAPA-CNPq, 1998. v. 1, p. 371-393.

JESUS, A. M. S. et al. Observações anatômicas em plantas de *Coffea arabica* L. obtidas por enraizamento de estacas. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 57, n. 2, p. 175-180, mar./abr. 2010.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw Hill Book, 1940. 523 p.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica: UFRRJ, 1997. 198 p.

LUIS, Z. G.; BEZERRA, K. M. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Adaptability and leaf anatomical features in oil palm seedlings produced by embryo rescue and pre-germinated seeds. **Brazilian Journal Plant Physiology**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 3, p. 209-215, Nov. 2010.

MACHADO, M. P.; BIASI, L. A. Morfoanatomia das folhas do porta-enxerto de videira 'VR043-43' (*Vitis vinifera* L. × *Vitis rotundifolia* michx.) em diferentes condições de cultivo. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, Curitiba, v. 9, n. 1, p. 73-78, jan./mar. 2011.

MANEHONON, M. B. et al. Effect of storage and heat treatments on the germination of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) seed. **African Journal of Agricultural Research**, Pretoria, v. 4, n. 10, p. 931-937, Oct. 2009.

MELO, H. C. et al. Alterações anatômicas e fisiológicas em *Setaria anceps* Stapf ex Massey e *Paspalum paniculatum* L. sob condições de déficit hídrico. **Hoehnea**, São Paulo, v. 34, n. 2, p. 145-153, mar. 2007.

MORCILLO, F. et al. EgAP2-1, an AINTEGUMENTA-like (AIL) gene expressed in meristematic and proliferating tissues of embryos in oil palm. **Planta**, Berlin, v. 226, n. 6, p. 1353-1362, Nov. 2007.

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

MYA, T. et al. Efficient and rapid plant regeneration of oil palm zygotic embryos cv. 'Tenera' through somatic embryogenesis. **Acta Physiologiae Plantarum**, Berlin, v. 33, p. 123-128, May 2010.

NOBEL, P. S. Internal leaf area and cellular CO<sub>2</sub> resistance: photosynthetic implications of variations with growth conditions and plant species. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 40, p. 137-144, Jan. 1977.

NUNES, C. F. et al. Diferentes suplementos no cultivo *in vitro* de embriões de pinhão-mansão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 1, p. 9-14, jan. 2008.

PEREIRA, R. de C. A. et al. Germinação, avaliação do ácido giberélico e posição do explante no alongamento *in vitro* de *Uncaria guianensis* (Aublet) Gmelin Rubiaceae (unha-de-gato). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 4, p. 637-642, jul./ago. 2006.

RATHI, A. S. Role of leaf cuticular thickness in resistance against powdery mildew disease in peas. **Indian Journal Research**, New Delhi, v. 11, p. 136-139, May 1998.

RIBEIRO, L. M. et al. Germinação de embriões zigóticos e desenvolvimento *in vitro* de coquinho-azedo. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 58, n. 2, p. 133-139, mar./abr. 2011.

SOARES, G. A. **Aspectos do cultivo *in vitro* do ingazeiro (*Inga vera* Willd, subsp. *affinis* (DC.) T. D. Penn.)**. 2003. 107 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

SOUZA JÚNIOR, E. E. de; BARBOZA, S. B. S. C.; SOUZA, L. A. C. Efeito de substratos e recipientes na aclimação de plântulas de abacaxizeiro *Ananas comosus* (L.) Merrill cv. pérola. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 31, n. 2, p. 147-151, jul./dez. 2001.

SURANTHRAN, P. et al. Effect of plant growth regulators and activated charcoal on *in vitro* growth and development of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq. var. Dura) zygotic embryo. **African Journal of Biotechnology**, Pretoria, v. 10, n. 52, p. 10600-10606, Sept. 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1998. v. 1, 509 p.

TORRES, A. C. et al. Efeito da sacarose, cinetina, isopentenil adenina e zeatina no desenvolvimento de embriões de *Heliconia rostrata in vitro*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 3, p. 789-792, jul./set. 2005.

**ARTIGO 2 Desenvolvimento *in vitro* de embriões zigóticos e aclimatização  
de plântulas de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.)**

## RESUMO

O dendezeiro é uma monocotiledônea perene que se propaga por meio de sementes, porém sua germinação em campo é lenta e em baixa porcentagem, devido à dormência de suas sementes. Os objetivos deste trabalho foram avaliar o efeito de diferentes meios de cultura e da fonte e concentrações de carboidratos na germinação *in vitro* de embriões zigóticos de dendezeiro. Também foi avaliado o efeito da presença de reguladores de crescimento no desenvolvimento das plântulas *in vitro* e a taxa de sobrevivência destas quando aclimatizadas. Os embriões zigóticos foram inoculados em meio de cultivo MS e Y3 modificado, suplementados com diferentes concentrações de sacarose (0,0; 30,0; 45,0 e 60 g.L<sup>-1</sup>) e sorbitol (36 g.L<sup>-1</sup>) e após 30 dias a taxa de germinação foi avaliada. Posteriormente, as plântulas foram transferidas para meio de cultivo Y3 suplementado com diferentes concentrações de GA<sub>3</sub> (0,0; 10 e 20 µM) e diferentes concentrações de ANA (0,0 e 5,37 µM) combinada com diferentes concentrações de BAP (0,0 e 2,21 µM). Após 75 dias da inoculação foram avaliados os parâmetros: comprimento da parte aérea, número de folhas, presença e comprimento da raiz, peso fresco e seco da parte aérea e da raiz. Resultados superiores de porcentagem de germinação (92%) foram obtidos em meio de cultivo MS suplementado com 36 g.L<sup>-1</sup> de sorbitol. Para o desenvolvimento das plântulas o meio suplementado com 20 µM de GA<sub>3</sub> promoveu um comprimento da parte aérea, porém não diferiu estatisticamente dos tratamentos com a adição de reguladores de crescimento. As plântulas com raiz obtiveram 85% de sobrevivência sendo mais indicadas para aclimatização.

Palavras-chave: Germinação, Carboidratos, MS, Y3, Reguladores de crescimento.

## ABSTRACT

Oil palm is a perennial monocotyledon that is propagated by seeds, though its germination in field is slow, due to the dormancy of its seeds. The aims of this work were to evaluate the effect of different culture media and the concentration of carbohydrates upon the germination *in vitro* of zygotic Oil palm embryos. The effect of the presence of growth regulators on the development of the plantlets *in vitro*, as well as their survival rate after being acclimatized was also evaluated. The zygotic embryos were inoculated in MS medium and Y3 modified, supplemented with different concentrations of sucrose (0.0; 30.0; 45.0 and 60 g.L<sup>-1</sup>) and sorbitol, (36 g.L<sup>-1</sup>) and after 30 days, the germination rate was evaluated. Afterwards, the plantlets were transferred to the Y3 medium supplemented with different concentrations of GA<sub>3</sub> (0.0; 10.0 and 20.0 μM) and different concentrations of ANA (0.0 and 5.37 μM) combined with different concentrations of BAP (0.0 and 2.21 μM). After 75 days of inoculation, the following parameters were evaluated: length of the aerial parts, number of leaves, presence and length of the roots, fresh and dry weight of the aerial parts and of the roots. Superior results of germination percentage (92%) were obtained in MS culture medium supplemented with 36 g.L<sup>-1</sup> of sorbitol. The medium supplemented with 20 μM of GA<sub>3</sub> enhanced the length of the aerial parts, but it did not differ statistically from the treatments with growth regulators. The plantlets with roots had 85% of survival, being more indicated for acclimatization.

Keywords: Germination, Carbohydrates, MS, Y3, Growth regulators.

## 1 INTRODUÇÃO

Os combustíveis derivados de petróleo são a principal fonte de energia no mundo, porém o aumento da demanda, associado às preocupações ambientais e a previsões de que este recurso se extinguirá, torna indispensável à busca por novas fontes de energia, de preferência renováveis (GHASSAN et al., 2003; SOARES et al., 2011). A produção de biocombustíveis utilizando óleos de espécies vegetais torna-se uma boa alternativa renovável e biodegradável. Ainda mais, que o Brasil possui amplas dimensões territoriais e uma grande diversidade edafoclimática, com inúmeras espécies a serem exploradas (SOARES et al., 2011).

Entre as várias espécies de plantas oleaginosas, as palmeiras são as mais promissoras para produção de biodiesel (NUNES et al., 2008; SOARES et al., 2011). Dentre estas, o dendzeiro se destaca como uma das oleaginosas mais produtivas entre as culturas comerciais, rendendo, em média, quatro mil kg de óleo por hectare, correspondendo a 1,5 vezes a produtividade do óleo de coco, a duas vezes a do óleo de oliva e mais do que dez vezes a do óleo de soja (FURLAN et al., 2003), permitindo assim sua utilização em larga escala.

Devido à importância econômica do dendzeiro, estudos de melhoramento genético têm buscado desenvolver híbridos que possam agregar características de interesse econômico. O cruzamento entre a espécie africana *E. guineensis* x *E. oleifera* de origem americana, gerou o híbrido BRS Manicoré, obtido pela Embrapa Amazônia, que possui como principais características, herdadas de *E. oleifera*, a resistência ao Amarelecimento fatal, o porte baixo e a qualidade do óleo, juntamente com a alta produção de óleo, herdada de *E. guineensis* (COLLARES, 2011). Essas características fazem com que este híbrido seja de grande interesse comercial, o que aumenta a demanda para produção de sementes que é a principal forma de propagação do dendzeiro. Essa espécie possui dormência nas sementes, demandando no campo, um

período longo para germinação (1 a 3 anos) e baixa taxa de germinação, em torno de 30% (LUIS; BEZERRA; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2010; MANEHONON et al., 2009). Essas dificuldades, retardam o processo para obtenção de mudas em escala comercial e conseqüentemente implementação de novos plantios.

No intuito de acelerar a produção de mudas em escala comercial, a cultura de tecidos, por meio do cultivo de embriões zigóticos pode ser uma ferramenta favorável para a redução do tempo de germinação e obtenção de mudas, com alta qualidade fitossanitária (SOARES et al., 2011). No cultivo *in vitro*, o tipo de carboidrato e a dosagem são considerados fatores determinantes para aumentar as taxas de germinação *in vitro* dos embriões (HU; FERREIRA, 1998; REGO-OLIVEIRA et al., 2003).

Dentre os carboidratos utilizados na cultura de tecidos, o sorbitol vem sendo utilizado com sucesso como fonte de energia para germinação de embriões de dendezeiro. De acordo com o trabalho de Te-chato e Hilae (2007), a adição de sorbitol ao meio de cultivo proporcionou a germinação de 100% de embriões somáticos de *Elaeis guineensis* Jacq. var. Tenera utilizando 36 g.L<sup>-1</sup> de sorbitol. Diante dos resultados apresentados por esses autores pode-se perceber a importância da fonte de carbono para maximizar a germinação de embriões zigóticos.

Os objetivos deste trabalho foram avaliar a germinação *in vitro* de embriões zigóticos de *Elaeis guineensis* híbrido BRS Manicoré, submetidos a dois meios de cultura contendo diferentes fontes de carboidratos, o efeito de reguladores de crescimento no desenvolvimento das plântulas *in vitro* e a taxa de sobrevivência das plantas na fase de aclimatização.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Material vegetal**

O trabalho foi realizado no Laboratório Central de Biologia Molecular, da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG. Os frutos imaturos de *Elaeis guineensis* híbrido Manicoré de 90 a 100 dias após a polinização foram cedidos pela empresa Denpasa – Pará.

Os frutos foram previamente lavados em hipoclorito de sódio (1,25%), posteriormente quebrados utilizando-se morça para retirada do epicarpo, mesocarpo e endocarpo, expondo-se as amêndoas. As amêndoas foram lavadas em água corrente e levadas para câmara de fluxo laminar para desinfestação, onde foram imersas em álcool 70% durante 30 segundos. Em seguida foram transferidas para solução de hipoclorito de sódio (1,25%) contendo três gotas de tween para cada 100 mL de solução e mantidos nela por 20 minutos. Posteriormente, as amêndoas foram lavadas em água destilada e autoclavada por três vezes de cinco minutos, sob agitação contínua.

### **2.2 Efeito de diferentes meios de cultura e concentrações de sacarose na germinação**

Para avaliação do potencial de germinação, os embriões desinfestados foram isolados das amêndoas e inoculados em placas de Petri contendo 45 mL de meio de cultivo. Foram testados os dois meios de cultivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e Y3 modificado (EEUWENS, 1976) com diferentes concentrações de carboidratos, conforme descrito na tabela 1.

Tabela 1 Meios de cultivo utilizados nos tratamentos para avaliar a germinação dos embriões zigóticos.

| Tratamento | Meio de cultura | Fonte de carboidrato | Concentrações<br>(g.L <sup>-1</sup> ) |
|------------|-----------------|----------------------|---------------------------------------|
| T1         |                 |                      | 0                                     |
| T2         |                 |                      | 30                                    |
| T3         | MS              | Sacarose             | 45                                    |
| T4         |                 |                      | 60                                    |
| T5         | MS              | Sorbitol             | 36                                    |
| T6         |                 |                      | 0                                     |
| T7         |                 |                      | 30                                    |
| T8         | Y3              | Sacarose             | 45                                    |
| T9         |                 |                      | 60                                    |
| T10        | Y3              | Sorbitol             | 36                                    |

Os embriões foram mantidos em fotoperíodo de 16 horas à temperatura de  $26 \pm 2$  °C até os 30 dias após a inoculação. Após este período, a porcentagem de embriões germinados foi avaliada. O experimento foi conduzido em delineamento em blocos casualizados, com fatorial 2 x 5, composto por cinco repetições com cinco embriões cada. A análise dos dados foi realizada pelo teste de Kruskal e Wallis (1952), considerando significância de 5%.

### 2.3 Efeito de reguladores de crescimento no desenvolvimento de plântulas *in vitro*

Com a finalidade de avaliar o efeito dos reguladores de crescimento no desenvolvimento de plântulas *in vitro* de dendezeiro, os embriões germinados após 30 dias de cultivo em meio Y3 suplementado com  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose, foram transferidos para frascos magenta contendo 50 mL de meio de cultura Y3 modificado (EEUWENS, 1976), acrescidos de diferentes concentrações dos reguladores de crescimento GA3 (ácido giberélico), ANA (ácido naftaleno acético) e BAP (6-Benzilaminopurina) conforme a tabela abaixo:

Tabela 2 Tratamentos com reguladores de crescimento para avaliar o desenvolvimento de embriões zigóticos germinados em plântulas, após 30 dias de cultivo em meio Y3 suplementado com  $30 \text{ g.L}^{-1}$ .

| Regulador de crescimento | Concentrações ( $\mu\text{M}$ ) |
|--------------------------|---------------------------------|
| –                        | –                               |
| ANA                      | 5,37                            |
| BAP                      | 2,21                            |
| ANA + BAP                | 5,37+ 2,21                      |
| GA <sub>3</sub>          | 10                              |
| GA <sub>3</sub>          | 20                              |

Os meios de cultura foram suplementados com 3% de sacarose, solidificados com 0,6% de ágar e o pH aferido para 5,8. Após a inoculação, os

embriões foram mantidos em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas e temperatura de  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ .

A avaliação foi realizada 75 dias após a incubação, sendo analisados os parâmetros: tamanho da parte aérea, número de folhas, presença e tamanho da raiz, peso fresco e seco da parte aérea e raiz.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados com cinco repetições constituídas de cinco explantes cada.

Os dados dos parâmetros analisados foram submetidos à análise de variância (ANAVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, utilizando-se o programa SISVAR (FERREIRA, 2008).

#### **2.4 Aclimatização**

Para a aclimatização foram utilizadas 100 plântulas com raiz e 100 sem raiz cultivadas durante 90 dias em sala de crescimento, em meio de cultura Y3 suplementado com  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose de acordo com as condições de cultivo descritas no item 2.2. As raízes foram lavadas em água corrente, para retirada de resíduos do meio de cultivo, e as plântulas transplantadas para tubos de polietileno de  $56 \text{ cm}^3$  contendo substrato de casca de pinus. Após o plantio, os tubetes foram transferidos para casa de vegetação contendo controle de temperatura e umidade.

Ao final de 60 dias a porcentagem de sobrevivência das plântulas foi avaliada e as que sobreviveram foram consideradas aclimatizadas.

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A porcentagem de germinação dos embriões submetidos a diferentes condições de cultivo *in vitro* pode ser observada na Figura 1. Os embriões cultivados em meio MS, contendo  $36 \text{ g.L}^{-1}$  sorbitol (T5) apresentaram 92% de

germinação, no entanto não diferiram estatisticamente dos tratamentos com mesmo meio de cultivo, contendo sacarose nas concentrações de 30 (T2) e 45 g.L<sup>-1</sup> (T3) e dos tratamentos com o meio de cultivo Y3 contendo sacarose em todas as concentrações avaliadas.

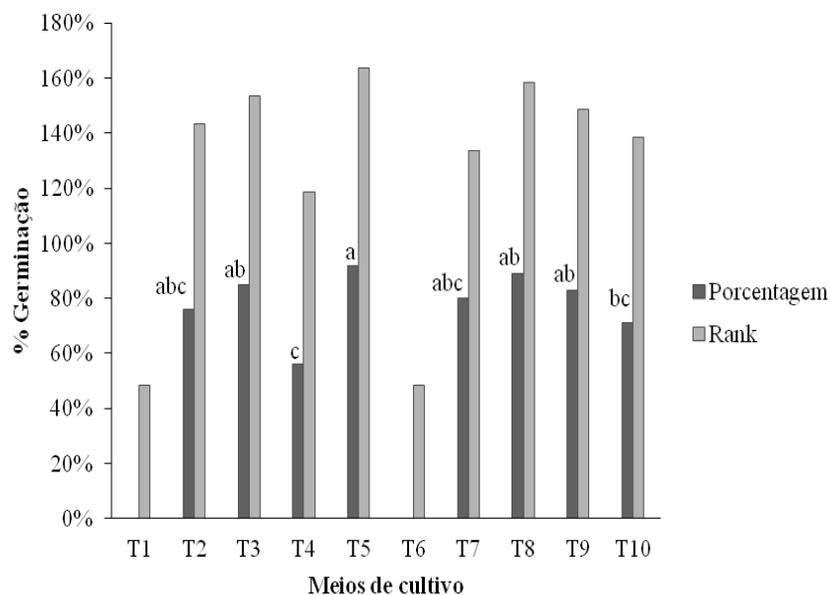


Figura 1 – Porcentagem de germinação *in vitro* de embriões de *E. guineensis* Jacq. híbrido Manicoré, inoculados nos tratamentos com o meio de cultivo MS suplementado com carboidratos: T1 = sem carboidrato, T2 = com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, T3 = 45 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, T4 = 60 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e T5 = 36 g.L<sup>-1</sup> de sorbitol e nos tratamentos com o meio de cultivo Y3 modificado suplementado com carboidratos: T6 = sem a adição de carboidratos, T7 = com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, T8 = 45 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, T9 = 60 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e T10 = 36 g.L<sup>-1</sup> de sorbitol. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis 5%.

As porcentagens de germinação obtidas neste trabalho são consideradas altamente relevantes quando comparadas com as taxas obtidas pelo método convencional (aproximadamente 30%), que se baseia na germinação direta das sementes, sem o resgate dos embriões (MANEHON et al., 2009).

Neste trabalho, os resultados obtidos para germinação, utilizando sorbitol como fonte de carbono, confirmam os encontrados por Te-chato e Hilae

(2007) com embriões somáticos de dendezeiro híbrido Tenera que obtiveram 100% de embriões germinados.

Porcentagens semelhantes de embriões germinados em meio de cultivo Y3 foram observadas por Cardoso et al. (2010), quando testaram os meios MS e Y3 completo e meia força. Nesses testes eles obtiveram maiores taxas de germinação (85,18%) em meio de cultivo Y3 completo para o híbrido CN514.

Resultados similares também foram obtidos com embriões zigóticos de pupunha avaliando os meios de cultivo MS, Y3 e WH (WHITE, 1942), em que maiores taxas de germinação (95,5%) foram obtidas em meio de cultura Y3, mas estes valores não diferiram estatisticamente do meio de cultivo MS (STEINMACHER, 2005).

A adição de fontes de carboidratos no meio de cultivo é essencial para o desenvolvimento dos embriões de dendezeiro. Como pode ser observado na figura 1, nos tratamentos sem adição de açúcares (T1 e T6), não houve germinação dos embriões.

Esses resultados corroboram os estudos de Hu e Ferreira (1998), que destacam a necessidade de uma fonte exógena de açúcares quando os embriões estão imaturos, pois não possuem fonte de nutrientes em seus cotilédones.

Nunes et al. (2008) observaram que a taxa de germinação de embriões imaturos aumentou proporcionalmente ao acréscimo de sacarose no meio de cultivo, sendo que as maiores taxas de germinação (83,68%) foram obtidas na concentração de 60 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. Pereira, J. et al. (2006), avaliando a germinação de embriões maduros e imaturos de murmuru em concentrações crescentes de sacarose, concluíram que o meio de cultivo suplementado com 15 g.L<sup>-1</sup> proporcionou maiores taxas de germinação para os embriões maduros e 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose para os imaturos.

Angelo et al. (2007) também avaliaram diferentes fontes de carboidratos como glicose e sacarose, associadas aos meios MS sólido e líquido para

embriões de dendezeiro e obtiveram melhores resultados em meio de cultivo MS líquido suplementado com 20 g.L<sup>-1</sup> ou 30 g.L<sup>-1</sup> de glicose. Rego-Oliveira et al. (2003), avaliando a suplementação do meio de cultivo com glicose, maltose e sacarose em diferentes concentrações, concluíram que o tratamento com 60 g.L<sup>-1</sup> de sacarose foi o mais adequado para germinação de embriões de *Oncidium varicosum*.

A necessidade de uma menor quantidade de sacarose no meio de cultivo pode ser favorável a etapas futuras de aclimatização, pois altas concentrações podem promover alterações nas estruturas e na funcionalidade dos órgãos (POSPÍSILOVÁ et al., 1999) devido a condição autotrófica reduzida da plântula *in vitro* (BARBOZA et al., 2006). Portanto, os resultados obtidos neste trabalho são favoráveis, pois altas taxas de germinação também foram obtidas na menor concentração de sacarose avaliada (30 g.L<sup>-1</sup>) em ambos os meios de cultivo MS e Y3 (Figura 1).

A suplementação de reguladores de crescimento no meio de cultivo demonstrou ter efeito favorável para os parâmetros comprimento da parte aérea (CPA) e comprimento da raiz (CR) (Tabela 3). A presença de reguladores de crescimento no meio de cultivo afetou favoravelmente o aumento da parte aérea.

Tabela 3 - Valores médios para comprimento da parte aérea - cm (CPA), número de folhas (NF), presença de raiz (PR) e comprimento de raízes - cm (CR) de plântulas de *E. guineensis* após 45 dias de cultivo na presença dos reguladores de crescimento.

| Tratamentos                                  | CPA (cm) | NF     | PR (%) | CR (cm) |
|--|----------|--------|--------|---------|
| Controle                                     | 2,00 b   | 1,90 a | 32 a   | 3,60 a  |
| 5,37 $\mu$ M de ANA                          | 4,00 ab  | 2,33 a | 34 a   | 1,60 b  |
| 2,21 $\mu$ M de BAP                          | 4,44 a   | 1,88 a | 30 a   | 2,10 b  |
| 5,37 $\mu$ M de ANA<br>+ 2,21 $\mu$ M de BAP | 3,94 ab  | 2,44 a | 20 a   | 2,40 ab |
| 10 $\mu$ M de GA <sub>3</sub>                | 4,66 a   | 1,77 a | 38 a   | 2,66 ab |
| 20 $\mu$ M de GA <sub>3</sub>                | 6,22 a   | 1,88 a | 20 a   | 1,80 b  |
| CV (%)                                       | 42,14    | 41,18  |        | 29,19   |

As médias seguidas pelas mesmas letras nas colunas não diferem significativamente entre si pelo teste de comparação de médias de Tukey a 5% de probabilidade.

Neste trabalho o crescimento das plântulas cultivadas em meio de cultivo suplementado com giberelinas não foi acompanhado pela expansão da área foliar, sendo necessário um balanço de reguladores no meio de cultivo. Esse fato pode estar relacionado à função das giberelinas, que geralmente promovem o alongamento das células (TORRES; CALDAS; BUSO, 1998).

Resultados semelhantes foram encontrados por Pereira, R. et al. (2006), avaliando o comprimento de brotos de unha de gato, após 45 dias de cultivo. Os autores observaram o maior comprimento na presença de GA<sub>3</sub>, porém na ausência deste regulador não houve diferenças estatísticas.

Ledo et al. (2001), avaliando o crescimento de plântulas de açaizeiro *in vitro*, na presença dos reguladores ANA e BAP, reportaram maior comprimento da parte aérea em meio de cultivo com a introdução ANA combinado com BAP. Reis et al. (2008) avaliaram o comprimento dos brotos de *Melissa officinalis* em meio de cultivo MS na presença e ausência do regulador de crescimento BAP e concluíram que na ausência desse regulador o comprimento dos brotos foi maior.

Embora as plântulas tendam a crescer mais na presença de GA<sub>3</sub>, verifica-se uma área foliar reduzida, em comparação as plântulas cultivadas nos outros tratamentos (Figura 2). Esse regulador afetou negativamente a área foliar das plantas cultivadas *in vitro*.

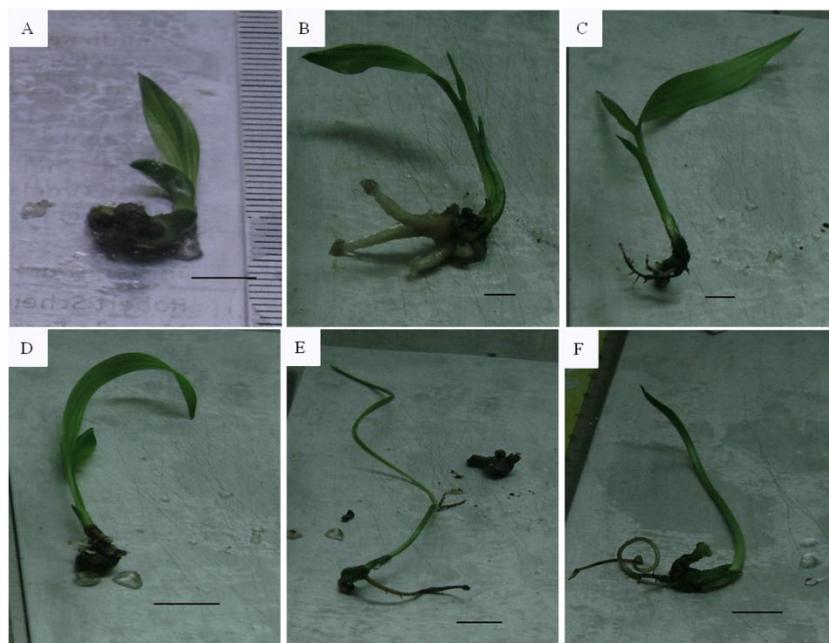


Figura 2 Plântulas germinadas *in vitro* com 75 dias de cultivo. A – Plântula em meio de cultivo Y3 ausência de reguladores de crescimento, B – 5,37  $\mu\text{M}$  de ANA, C – 2,21  $\mu\text{M}$  de BAP, C – 5,37  $\mu\text{M}$  de ANA x 2,21  $\mu\text{M}$  de BAP, D - 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{GA}_3$  e E – 20  $\mu\text{M}$  de  $\text{GA}_3$ . Barras = 1 cm

No entanto, em estudos no campo, com aplicação de  $\text{GA}_3$  em palmeiras Ráfia com um ano de idade, observou-se um aumento no comprimento dos pecíolos, lâminas foliares e altura da planta (TAVARES et al., 2007).

Para os parâmetros número de folhas e presença de raízes não foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos. Esperava-se um melhor comportamento para o parâmetro número de folhas nas plantas cultivadas no meio de cultura suplementado com BAP visto que o regulador de crescimento citocinina está relacionado com a formação de folhas (TORRES et al., 1999) e uma maior presença de raízes no tratamento com ANA, pois esta auxina é relacionada com a formação de raízes (ASSIS; TEIXEIRA, 1998). Uma possível explicação seria a não homogeneidade nas concentrações endógenas

dos hormônios (auxina e citocinina) presentes nos embriões estudados, embora todos estivessem de 90 a 100 dias de idade após antese.

Com relação aos parâmetros de biomassa não foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos para massa fresca da parte aérea, no entanto, para este mesmo parâmetro analisado nas raízes, foi verificado um comportamento superior nas plântulas cultivadas na presença de auxinas (tabela 2). Esse resultado condiz com a expectativa da presença de auxinas exógenas favorecerem um maior desenvolvimento do sistema radicular.

Tabela 4 Biomassa de plântulas de dendezeiro híbrido Manicoré aos 45 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultura suplementado com reguladores de crescimento. Valores médios para massa fresca parte aérea – mg (MFA), massa seca parte aérea - mg (MSA), massa fresca raiz – mg (MFR), massa seca raiz – mg (MSR) de plântulas de *E. guineensis* aos 75 dias.

| Tratamentos                                  | MFA<br>(mg) | MSA<br>(mg) | MFR<br>(mg) | MSR<br>(mg) |
|--|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Controle                                     | 0,300 a     | 0,021 c     | 0,020 b     | 0,004 bc    |
| 5,37 $\mu$ M de ANA                          | 0,190 a     | 0,034 ab    | 0,071 a     | 0,012 ab    |
| 2,21 $\mu$ M de BAP                          | 0,200 a     | 0,027 bc    | 0,042 ab    | 0,008 abc   |
| 5,37 $\mu$ M de ANA<br>+ 2,21 $\mu$ M de BAP | 0,290 a     | 0,041 a     | 0,026 b     | 0,007 abc   |
| 10 $\mu$ M de GA <sub>3</sub>                | 0,170 a     | 0,024 bc    | 0,021 b     | 0,014 a     |
| 20 $\mu$ M de GA <sub>3</sub>                | 0,190 a     | 0,026 bc    | 0,018 b     | 0,003 c     |
| CV (%)                                       | 48,58       | 29,37       | 70,00       | 78,29       |

As médias seguidas pelas mesmas letras nas colunas não diferem significativamente entre si pelo teste de comparação de médias de Tukey a 5% de probabilidade.

Resultados diferentes foram obtidos por Villa et al. (2005) os quais observaram que o peso seco da parte aérea de amoreira preta foi maior em meio de cultivo suplementado com apenas BAP.

Adição dos reguladores de crescimento, citocininas e auxinas em combinação, induziram uma maior massa seca da parte aérea nas plântulas, entretanto, essa associação não favoreceu de forma similar o desenvolvimento de raízes e conseqüentemente da massa seca.

As plantas, com e sem raízes obtidas *in vitro*, foram também testadas quanto à capacidade de sobrevivência nas condições *ex vitro*, por isso foram plantadas em substrato e avaliadas após 60 dias.

Uma porcentagem de sobrevivência em torno de 85% foi observada em plântulas contendo raízes e de 40% naquelas desprovidas de sistema radicular.



Figura 3 Mudas de dendezeiro (*E. guineensis* Jacq.) híbrido Manicoré em fase de aclimatização, aos 30 dias de cultivo em casa de vegetação.

Essa mesma taxa de sobrevivência também foi obtida com plantas de dendezeiro, medindo acima de seis cm de comprimento, aclimatadas em substrato composto de areia, casca de coco e farelo de arroz carbonizada (1:1:1) (THUZAR et al., 2011).

Steinmacher (2005) também verificou que plântulas de pupunha obtidas no cultivo *in vitro* com menos de seis cm de comprimento tinham menor taxa de sobrevivência.

## **CONCLUSÃO**

A suplementação de fontes de carboidrato foi essencial para promover altas taxas de germinação de embriões zigóticos *in vitro* de dendezeiro híbrido BRS Manicoré.

O fornecimento de reguladores de crescimento promoveu maior crescimento da parte aérea diferindo do tratamento controle. O tratamento com ANA e BAP (TD) foram os mais indicados neste trabalho, pois, visualmente, promoveram plântulas com maior área foliar.

As plântulas com raiz estão mais aptas à fase de aclimatização, pois obtiveram 85% de sobrevivência demonstrando a necessidade da formação do sistema radicular.

## REFERÊNCIAS

ANGELO, P. C. da S. et al. **Resgate de embriões híbridos de dendezeiro x caiaué**. Manaus: EMBRAPA, 2007. 4 p. (Comunicado Técnico, 49).

ASSIS, T. F. de; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: SPI/EMBRAPA, 1998. p. 184-185.

BARBOZA, S. B. S. C. et al. Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 2, p. 185-194, fev. 2006.

CARDOSO, O. et al. Obtenção de plântulas de híbridos de dendezeiro por cultivo *in vitro*. **Revista Ciências Agrárias**, Piracicaba, v. 53, n. 2, p. 177-181, jul./dez. 2010.

COLLARES, D. Produção de cultivares e sementes de dendê na Embrapa. **Agroenergia em Revista**, Brasília, v. 2, p. 30-31, maio 2011.

EEUWENS, C. J. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera*) and cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 36, p. 23-28, Jan. 1978.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análise e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Lavras, v. 6, p. 36-4, out. 2008.

FURLAN, L. F. et al. Potencialidades regionais estudo de viabilidade econômica dendê. Boa Vista: SUFRAMA, 2003. 12 p.

GHASSAN, T. Q. et al. A combustion performance and emissions of ethyl ester of a waste vegetable oil in a water-cooled furnace. **Applied Thermal Engineer**, Lisboa, v. 23, p. 285-293, Dec. 2003.

HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. Cultura de embriões. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI; EMBRAPA-CNPq, 1998. v. 1, p. 371-393.

KRUSKAL, W. H.; WALLIS, W. A. Use of ranks in one-criterion variance analysis. **Journal of the American Statistical Association**, Chicago, v. 47, n. 260, p. 583-621, Dec. 1952.

LEDO, A. da S. et al. Cultura *in vitro* de embriões zigóticos de açaizeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 3, p. 468-472, dez. 2001.

LUIS, Z. G.; BEZERRA, K. M. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Adaptability and leaf anatomical features in oil palm seedlings produced by embryo rescue and pre-germinated seeds. **Brazilian Journal Plant Physiology**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 3, p. 209-215, Nov. 2010.

MANEHONON, M. B. et al. Effect of storage and heat treatments on the germination of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) seed. **African Journal of Agricultural Research**, Pretoria, v. 4, n. 10, p. 931-937, Oct. 2009.

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

NUNES, C. F. et al. Diferentes suplementos no cultivo *in vitro* de embriões de pinhão-mansão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 1, p. 9-14, jan. 2008.

PEREIRA, J. E. S. et al. Germinação *in vitro* de embriões zigóticos de murmurú (*Astrocaryum ulei*). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 2, p. 251-256, mar./abr. 2006.

PEREIRA, R. de C. A. et al. Explante no alongamento *in vitro* de *Uncaria guianensis* (AUBLET) Gmelin Rubiaceae (unha-de-gato). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 4, p. 637-642, jul./ago. 2006.

POSPÍSILOVÁ, J. et al. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 42, n. 4, p. 481-497, Aug. 1999.

REGO-OLIVEIRA, L. do V. et al. Influência da fonte e concentração de carboidrato no crescimento vegetativo e enraizamento *in vitro* de *Oncidium varicosum* Lindl.(Orchidaceae). **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n. 2, p. 265-272, 2003.

REIS, É. S. et al. Influência do meio de cultura na germinação de sementes *in vitro* e taxa de multiplicação de *Melissa officinalis* L. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 55, n. 3, p. 160-167, maio/jun. 2008.

SOARES, J. D. R. et al. Germinação de embriões e crescimento inicial *in vitro* de macaúba. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 5, p. 773-778, maio 2011.

STEINMACHER, D. A. **Germinação *in vitro*, criopreservação e embriogênese somática em pupunha**. 2005. 123 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

TAVARES, A. R. et al. Efeito da aplicação de ácido giberélico no crescimento da palmeira-ráfia. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 31, n. 6, p. 999-1004, abr. 2007.

TE-CHATO, S.; HILAE, A. High-frequency plant regeneration through secondary somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq. var. tenera). **Journal of Agricultural, Science and Technology**, Tehran, v. 3, n. 2, p. 345-357, Oct. 2007.

THUZAR, M. et al. Efficient and rapid plant regeneration of oil palm zygotic embryos cv. 'Tenera' through somatic embryogenesis. **Acta Physiologiae Plantarum**, Berlin, v. 33, p. 123-128, May 2011.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1998. v. 1, 509 p.

VILLA, F. et al. Multiplicação *in vitro* da amoreira-preta 'Ébano' em diferentes concentrações de meio MS e BAP. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 3, p. 582-589, maio/jun. 2005.

WHITE, P. R. Plant tissue cultures. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 11, p. 615-628, 1942.

**ARTIGO 3** Indução e caracterização de massas pró-embriogênicas de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) via embriogênese somática

## RESUMO

A embriogênese somática constitui o método mais promissor para se propagar em larga escala o dendezeiro, devido às características biológicas da planta. Por esta palmeira ter meristema único, o método de propagação mais utilizado é o sexual, via sementes. No caso do dendezeiro, este processo é dificultado pela baixa taxa germinação de suas sementes e longo período requerido para obtenção de plantas. A biotecnologia, mediante as técnicas de embriogênese somática contribui para maior eficiência na propagação dessa espécie. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos das auxinas 2,4-D e picloram na indução de massas pró-embriogênicas em explantes foliares de *Elaeis guineensis* híbrido Tenera e caracterizá-las de forma citoquímica e ultraestrutural quanto às características embriogênicas. Para indução das massas pró-embriogênicas, fragmentos foliares de plântulas *in vitro* foram inoculados em meio de cultivo Y3 suplementado com 2,4-D ou picloram em diferentes concentrações (0,0; 1,0; 3,0; 6,0 e 9,0 mg.L<sup>-1</sup>). Após 90 dias foram avaliadas presença e ausência das massas celulares. Ambos reguladores de crescimento foram eficientes na indução destas massas, independentemente, das concentrações utilizadas. Estas foram posteriormente classificadas quanto à cor e formato em quatro tipos, (tipo 1 – translúcido e alongado, tipo 2 – Desuniforme e translúcido, tipo 3 – bege e globular e tipo 4 - branco e globular). Por possuírem características anatômicas e ultraestruturais de células embriogênicas, as massas celulares, classificadas como tipos 2, 3 e 4, foram consideradas, promissoras, com o intuito de viabilizar um método de propagação assexuada em larga escala para o dendezeiro.

Palavras-chave: Potencial embriogênico, Picloram, 2,4-D, Núcleo grande, Grãos de amido.

### ABSTRACT

Somatic embryogenesis is the most promising method to propagate oil palm in large scale, due to the plant biologic characteristics. Since this palm has a single meristem, sexual propagation, via seeds, is the most used method. As for the oil palm, this process is complicated by the low germination rate of its seeds and by the long period required for the obtention of plants. Biotechnology, using techniques of somatic embryogenesis, contributes to a higher efficiency of the propagation of this species. The aim of this work was to evaluate the effect of auxins 2,4-D and Picloram on the induction of pro-embryogenic masses in leaf explants of *Elaeis guineensis*, hybrid Tenera, and make cytochemical and ultra-structural characterizations. To induce the pro-embryogenic masses, leaf fragments of the plantlets were inoculated in Y3 medium supplemented with different concentrations of 2,4-D or Picloram (0.0; 1.0; 3.0; 6.0 and 9.0 g.L<sup>-1</sup>). After 90 days, the presence and the absence of cell masses were evaluated. Both growth regulators were efficient on the induction of these masses, regardless of the used concentrations. Afterwards, these were classified, as for their color and format, into four types (type 1 – clear and elongated, type 2 – clear and aqueous, type 3 – beige and globular and type 4 – white and globular). Because they had anatomic and ultra-structural characteristics of embryogenic cells, the cell masses, classified as types 2, 3 and 4, were considered promising, in order to enable an asexual propagation method in large scale for the oil palm.

Keywords: Embryogenic potential, Picloram, 2,4-D, Big nucleus, Starch grains.

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o dendezeiro (*Elaeis guineensis*), vem se destacando entre as plantas oleaginosas, pela alta produção de óleo por cacho, podendo no caso de genótipos melhorados atingir acima de 6.000 Kg.ha<sup>-1</sup>. Além disso, o óleo produzido é diversificado e de altíssima qualidade sendo amplamente utilizado nas indústrias alimentícia, medicinal e cosmética. Recentemente, o dendê, tem despertado interesse por ser uma boa alternativa para produção do biocombustível visto que é uma fonte de óleo renovável (BOARI, 2008; FURLAN et al., 2003; GHASSAN et al., 2003).

Com o intuito de incentivar a expansão do cultivo do dendezeiro visando uma maior oferta de biocombustível o Governo Brasileiro lançou em 2002 o Programa Nacional de Biocombustíveis (AGROANALYSIS, 2007).

Essa expansão está condicionada a disponibilidade de mudas para a implementação de novos plantios. A propagação convencional por sementes tem como dificuldade, no caso da espécie do dendezeiro, a baixa taxa de germinação de suas sementes e o longo período demandado para a obtenção das mudas (LUIS; BEZERRA; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2010; MANEHON et al., 2009).

A manipulação de plantas cultivadas *in vitro* tem possibilitado de forma eficiente a propagação em larga escala de várias espécies, inclusive palmáceas (KANCHANAPOOM; DOMYOAS, 1999; MOURA, 2007; STEINMACHER et al., 2007). Nesse caso há a necessidade de se identificar as melhores condições de cultivo para cada espécie. Dentre as técnicas de cultivo *in vitro*, a embriogênese somática vem se destacando como método de multiplicação, pois permite a obtenção de plantas a partir de células haplóides ou somáticas sem a necessidade de fusão de gametas. Esse processo pode ocorrer *in vitro* por duas vias, a direta sem a fase intermediária de formação de calos e a indireta com a formação de calos (GUERRA; TORRES; TEXEIRA, 1998).

Normalmente, durante a embriogênese somática indireta ocorre a formação de diferentes tipos de calos, sendo que alguns possuem potencial para gerar plantas. O acompanhamento citológico e ultraestrutural durante a embriogênese somática é uma importante ferramenta que permite distinguir células de calos com potencial embriogênico dos não embriogênicos e identificar possíveis falhas durante a formação do embrião somático (FILLIPI; APPEZZATO-DA-GLORIA; RODRIGUEZ, 2001; MOURA et al., 2008; STEINER et al., 2005).

Diante do exposto o objetivo deste trabalho foi avaliar a ação dos reguladores de crescimento picloram e 2,4-D na indução de massas pró-embriogênicas em explantes foliares de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) híbrido Tenera e analisar o potencial embriogênico destas por meio de testes citoquímicos e ultraestruturais.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Material vegetal**

O trabalho foi realizado no Laboratório Central de Biologia Molecular e Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME) ambos pertencentes à Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG. Os frutos imaturos de *Elaeis guineensis* do híbrido Tenera foram cedidos pela empresa Denpasa – Pará.

### **2.2 Desinfestação e obtenção das plântulas**

Os frutos de aproximadamente 90 a 100 dias após a polinização foram previamente lavados em hipoclorito de sódio (1,25%), posteriormente quebrados para retirada do epicarpo, mesocarpo e endocarpo, expondo as amêndoas. Essas foram lavadas em água corrente e levadas para câmara de fluxo laminar para

desinfestação. As amêndoas foram imersas em álcool 70% durante 30 segundos, em seguida em hipoclorito de sódio (1,25%) contendo tween e lavadas em água destilada autoclavada por três vezes durante cinco minutos sob agitação contínua. Os embriões foram isolados das amêndoas e inoculados em placas de Petri contendo meio de cultivo Y3 modificado (EEUWENS, 1978), suplementado com 45 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,6% (p/v) de ágar, pH ajustado em 5,7± 0,1.

Após a inoculação os embriões foram mantidos em fotoperíodo de 16 horas à temperatura de 26 ± 2 °C. Posteriormente foram transferidos para frascos magenta, contendo o mesmo meio de cultura, onde foram subcultivados a cada 30 dias.

### **2.3 Indução a embriogênese somática**

Para indução de massas pró-embriogênicas foram utilizados folhas das plântulas obtidas *in vitro*. Os explantes foliares de aproximadamente 0,5 cm foram inoculados, com a face adaxial em contato com o meio de cultivo Y3 (EEUWENS, 1978) contendo diferentes concentrações de picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridinocarboxílico) ou 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) conforme a tabela 1.

Tabela 1 Tratamentos com os reguladores de crescimento 2,4-D ou picloram em diferentes concentrações para indução de massas pró-embriogênicas.

| Tratamento | Regulador de crescimento | Concentrações<br>(mg.L <sup>-1</sup> ) |
|------------|--------------------------|--|
| T1         |                          | 0                                      |
| T2         |                          | 1,0                                    |
| T3         | 2,4-D                    | 3,0                                    |
| T4         |                          | 6,0                                    |
| T5         |                          | 9,0                                    |
| T6         |                          | 0                                      |
| T7         |                          | 1,0                                    |
| T8         | Picloram                 | 3,0                                    |
| T9         |                          | 6,0                                    |
| T10        |                          | 9,0                                    |

Os meios foram suplementados com 3% de sacarose, solidificados com 0,6% de ágar e o pH, aferido para  $5,7 \pm 0,1$ . Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento na ausência de luz, a uma temperatura de  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ . Após, 90 dias de incubação foram avaliadas a porcentagem de massas celulares desenvolvidas e os tipos formados, caracterizados de acordo com o formato e coloração.

Os dados de presença e ausência de massas celulares produzidas nos explantes foliares foram submetidos à análise de variância (SAS<sup>®</sup>), sendo as médias comparadas pelos Modelos Lineares não Generalizados.

## **2.4 Análises histoquímicas**

As massas celulares obtidas foram fixadas em FAA (formol, ácido acético e etanol) durante 72 horas e conservadas em etanol 70%. Posteriormente foi realizada a desidratação em série etílica, infiltrados em álcool + resina (50%) overnight; em seguida em resina pura durante 48 horas e depois emblocados em resina Leica de acordo com o protocolo do fabricante. As amostras foram seccionadas com espessura de 5 µm em micrótomo rotativo e coradas com Azul de toluidina 0,05% e solução de lugol fraca e em seguida montadas em lâmina e visualizadas em microscópio fotônico, Zeiss Scope.A1 acoplado com câmera.

## **2.5 Microscopia eletrônica de transmissão**

Para análise em microscópio eletrônico de transmissão, as amostras das massas celulares foram imersas em solução fixativa (Karnovsky modificado, glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2,0%, tampão cacodilato 0,05M, pH 7,2) por 24 horas e preparadas de acordo com o protocolo descrito por Bossola e Russel (1998). A visualização das amostras foi realizada em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109.

## **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os reguladores de crescimento (2,4-D e picloram) adicionados ao meio de cultivo Y3 mostraram-se eficientes na indução de massas celulares em folhas de dendezeiro híbrido Tenera. Como pode ser observado na Figura 1, houve formação dessas massas, independente do regulador de crescimento e das concentrações utilizadas, no entanto, nos tratamentos na ausência destes reguladores (T1 e T6) não foi verificado o processo da calogênese (Figura 2).

As massas celulares obtidas não foram homogêneas, sendo possível classificá-las em quatro tipos de acordo com as características que

apresentavam. As massas celulares denominadas tipo 1, possuíam aspectos de células alongadas e translúcidas, as do tipo 2, desuniformes e translúcidas, as do tipo 3, globulares com coloração bege e as do tipo 4, globulares com coloração branca.

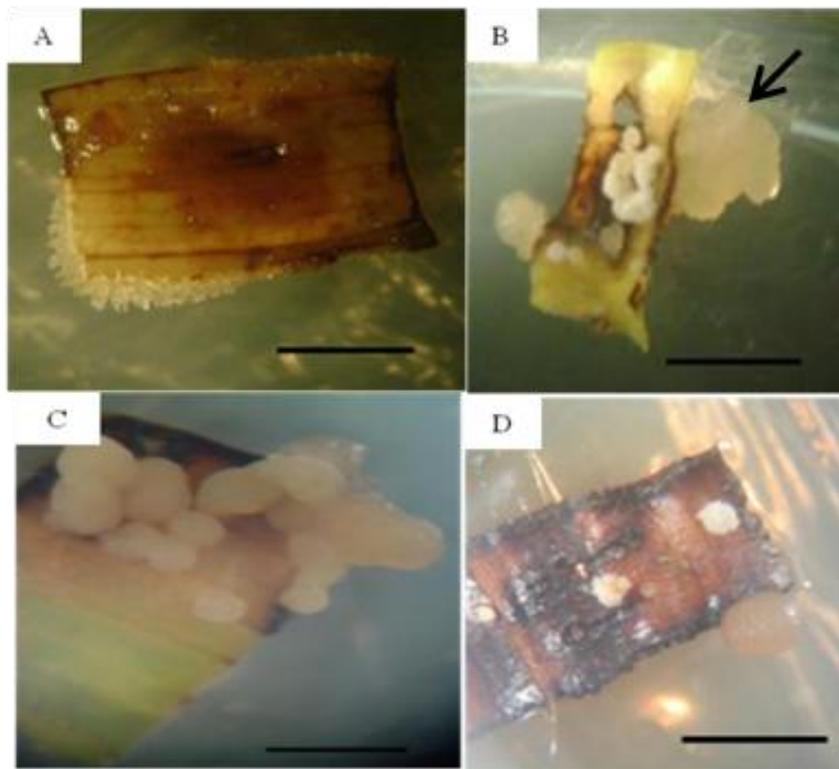


Figura 1 Tipos de massas celulares produzidas em explantes foliares de dendezeiro (*E. guineensis*) híbrido Tenera, caracterizados pelo aspecto. A) Tipo 1 - Translúcidos e alongados, B) Tipo 2 - Desuniforme e translúcido, C) Tipo 3 - Bege e globular e D) Tipo 4 - Branco e globular. Barras = 0,25 mm.

Esses resultados corroboram com os obtidos por Bravin, Valentin e Yokoya (2006), que ao induzir calos em explantes foliares de *Hypnea musciformis*, observaram a proliferação de quatro tipos diferentes quanto à morfologia externa e posição na folha.

Lamb et al. (2002), em estudos com aveia, também verificaram a formação de diferentes tipos de calos, sendo alguns friáveis de coloração amarela, caracterizados como embriogênicos, outros esbranquiçados, definidos como organogênicos, e outros calos com aspecto aquoso e translúcido caracterizados como incapazes de gerar plantas.

Os tipos de massas celulares obtidas foram influenciados pelo regulador de crescimento, assim como pela dosagem utilizada (Figura 2). A maior proporção das massas celulares tipo 1, foram geradas quando se utilizou o regulador de crescimento 2,4-D com a menor dosagem (T1). As demais dosagens deste regulador também permitiram a formação destas massas, mas em quantidade inferiores. A suplementação do regulador de crescimento picloram não favoreceu o surgimento deste tipo de massas celulares, quando comparado com o regulador 2,4-D. As massas celulares do tipo 2, foram geradas somente quando se utilizou o regulador de crescimento 2,4-D, na dosagem de  $3\text{mg.L}^{-1}$  (T3). A formação das massas celulares tipo 3, foram favorecidas quando se forneceu o regulador picloram, com exceção na dosagem de  $3\text{mg.L}^{-1}$  (T8). As do tipo 4, foram obtidas com 2,4-D na dosagem de  $3\text{mg.L}^{-1}$  (T4) e também com picloram, nas dosagens de  $1\text{mg.L}^{-1}$  (T7) e  $9\text{mg.L}^{-1}$  (T10) (Figura 3).

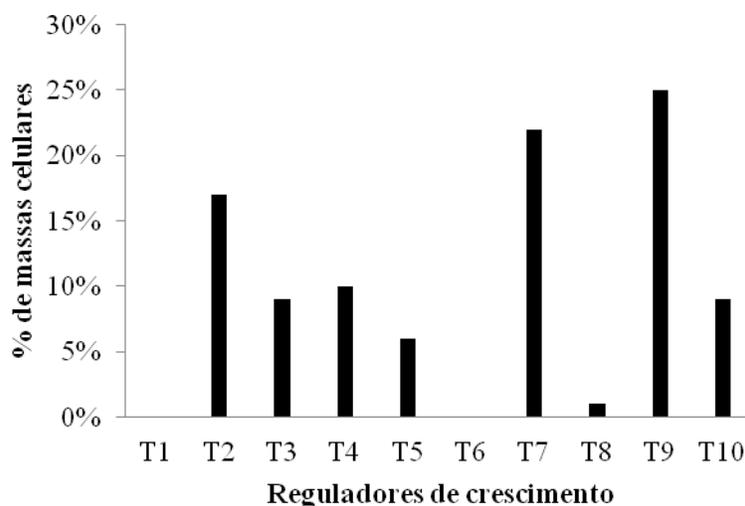


Figura 2 Porcentagem de formação de massas celulares em explantes foliares de dendezeiro (*Elaeis guineensis*) híbrido Tenera, induzidos em diferentes tipos e concentrações de reguladores de crescimento.

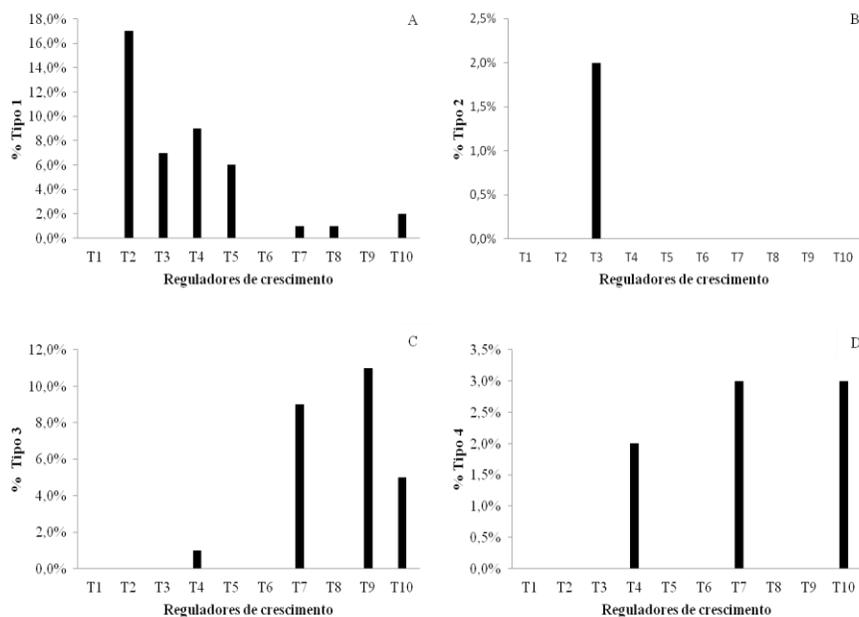


Figura 3 Porcentagem de formação de diferentes tipos de massas celulares em explantes foliares de dendezeiro (*Elaeis guineensis*) híbrido Tenera, induzidos em diferentes tipos

e concentrações de reguladores de crescimento. A) Tipo 1, B) tipo 2, C) tipo 3 e D) tipo 4.

A ação das auxinas 2,4-D e picloram também foram avaliadas em embriões zigóticos de macaúba e foi verificado, que o regulador de crescimento picloram, na dosagem de 9  $\mu\text{M}$ , foi mais eficiente para a produção de calos embriogênicos (MOURA, 2007).

As características externas dos calos podem ser específicas da espécie, dificultando a padronização da coloração e morfologia externa dos calos embriogênicos. O potencial embriogênico dos calos pôde ser identificado pelas análises anatômicas e ultraestruturais.

As análises histoquímicas das massas celulares presentes no tipo 1 mostraram a presença de células alongadas e dispersas quando corados com azul de toluidina (Figura 4 A) e ausência de grãos de amido quando coradas com lugol (Figura 4 B). As do tipo 2 apresentaram células pequenas, isodiamétricas (Figura 4 C), e fortemente coradas com lugol pela presença de grãos de amido (Figura 4 D). No tipo 3 houve formação de estruturas globulares (Figura 4 E) com células pequenas e isodiamétricas, e possível sítio de desdiferenciação com o início da formação de centros meristemáticos ou do procâmbio, presença de algumas células se desprendendo ao redor da estrutura globular e muitos grãos de amido (Figura 4 F). No caso das massas celulares do tipo 4 foi observado a formação de estruturas globulares com células pequenas e isodiamétricas, sendo algumas células se destacando da periferia da estrutura globular (Figura 4 G) e outras células com grãos de amido (Figura 4 H).

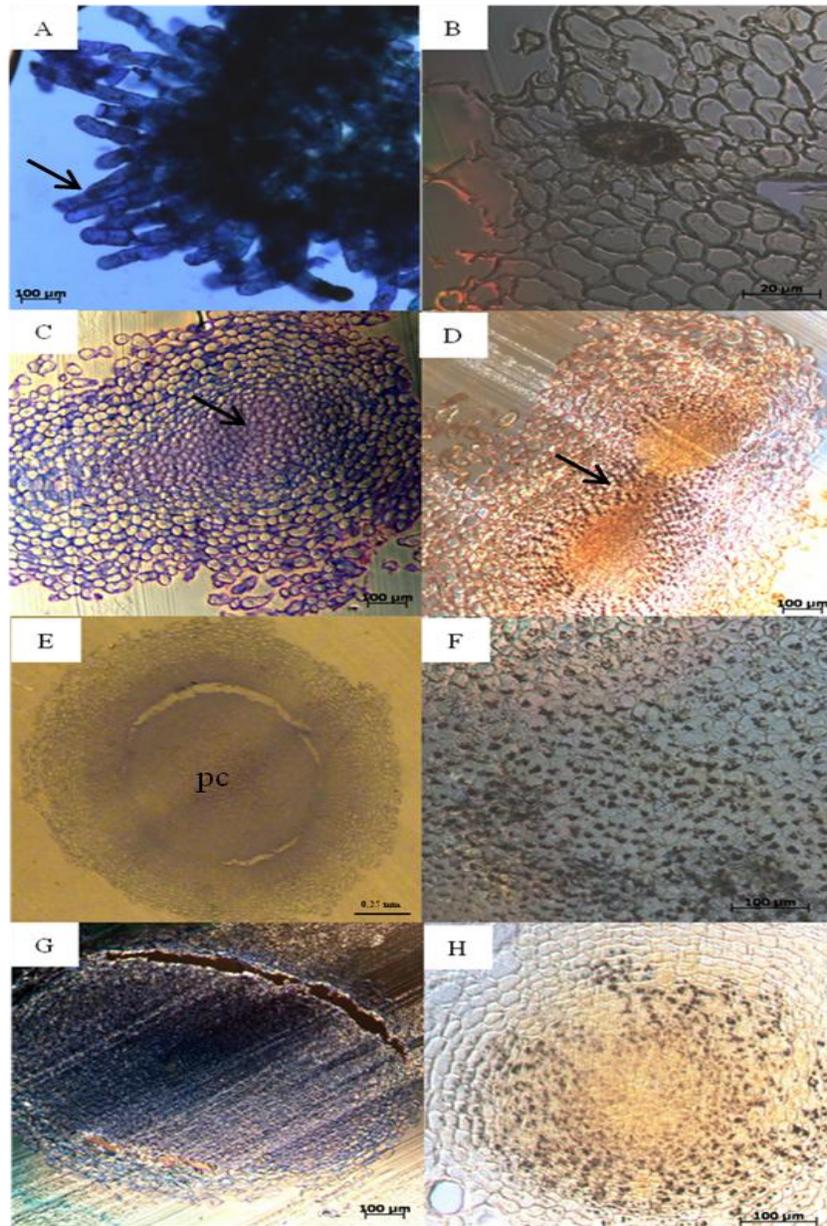


Figura 4 – Análises histoquímicas de massas celulares obtidas de explantes foliares de *E. guineensis* híbrido tenra. A) Tipo 1 – Células coradas com azul de toluidina, presença de células alongadas e dispersas (setas) e B) células coradas com lugol não apresentaram amido. C) Tipo 2 células do interior reagindo fortemente ao corante azul de toluidina (setas) e D) com lugol, detectando a presença de amido (setas). E) Tipo 3 células coradas

com azul de toluidina, destacando a formação de uma estrutura globular com início da formação do procâmbio e F) presença de amido reagindo ao corante lugol (setas). G) Tipo 4 células coradas com azul de toluidina, demonstrando intensa afinidade pelo corante e células pequenas de formato arredondado, H) lugol reagindo aos grãos de amido. Procâmbio (Pc).

Tipos celulares semelhantes às deste trabalho foram visualizadas por Steiner et al. (2005), em células de calos de *Araucaria angustifolia*. Um tipo apresentou células isodiamétricas, pequenas e com citoplasma denso, formando agregados de células embriogênicas, que deram origem ao proembrião e o outro tipo possuía células alongadas e vacuolizadas, semelhantes ao tipo 1 deste trabalho, que não originaram embriões.

As células do tipo 2 deste estudo foram semelhantes as observadas por Carvalho (2009) em calos de dendezeiro. As células pequenas, isodiamétricas, coradas fortemente e com núcleo grande, foram consideradas regiões meristemáticas. Esses autores verificaram que a formação dos embriões teve origem nessas regiões meristemáticas dos calos.

A formação dos três tecidos fundamentais protoderme, meristema fundamental e procâmbio; ocorre durante as fases iniciais de desenvolvimento dos embriões somáticos. Todavia podem ser diferentes de acordo com as condições de cultivo, como citado por Carvalho (2009), que observou em embriões somáticos de dendezeiro a formação da protoderme e do cordão procambial nas estruturas globulares. Já Moura (2007) observou apenas a protoderme em estruturas globulares de macaúba.

Neste estudo, a formação do procâmbio e o início de formação da protoderme ocorreu somente no tipo 3. A protoderme não estava bem definida, apresentando células se desprendendo ao redor da estrutura globular que também foram visualizadas nas massas celulares do tipo 4 (Figuras 2E e 2G).

A presença de células se soltando da periferia de estruturas globulares também foi visualizada em macaúba e foram correlacionadas com degradação da parede celular (MOURA, 2007).

O armazenamento de amido no embrião, em células embriogênicas ou em células adjacentes é um fenômeno que comumente indica a aquisição de competência embriogênica (MOURA, 2007), sendo os grãos de amido produzidos anteriormente para sustentar e iniciar o desenvolvimento dos embriões somáticos. Steinmacher et al. (2011), analisando histoquimicamente o processo de embriogênese somática de pupunha, observaram que a acumulação de amido geralmente precede o desenvolvimento de embriões somáticos.

Mikula et al. (2004) relataram grande quantidade de amido observado em células embriogênicas de calos de *Gentiana punctata*, relacionando este padrão bioquímico como fonte de energia para intensa divisão celular e necessária para o desenvolvimento dos embriões.

Observações semelhantes foram realizadas por Canhoto, Mesquita e Cruz (1996), em *Feijoa sellowiana*, cujas células embriogênicas apresentaram núcleo bem desenvolvido, com nucléolo proeminente contendo grânulos de amido.

As análises por meio de microscópio eletrônico de transmissão permitiram visualizar que as células dos calos tipo 1 demonstraram presença de vacúolos grandes (Figura 7A), ausência de conteúdo celular (Figura 7 B) e espaços intercelulares marcantes (Figura 7C), juntamente com o formato alongado evidenciado pelo corante azul de toluidina (Figura 1A), pode-se inferir que estes tipos de massas celulares não apresentaram características embriogênicas.

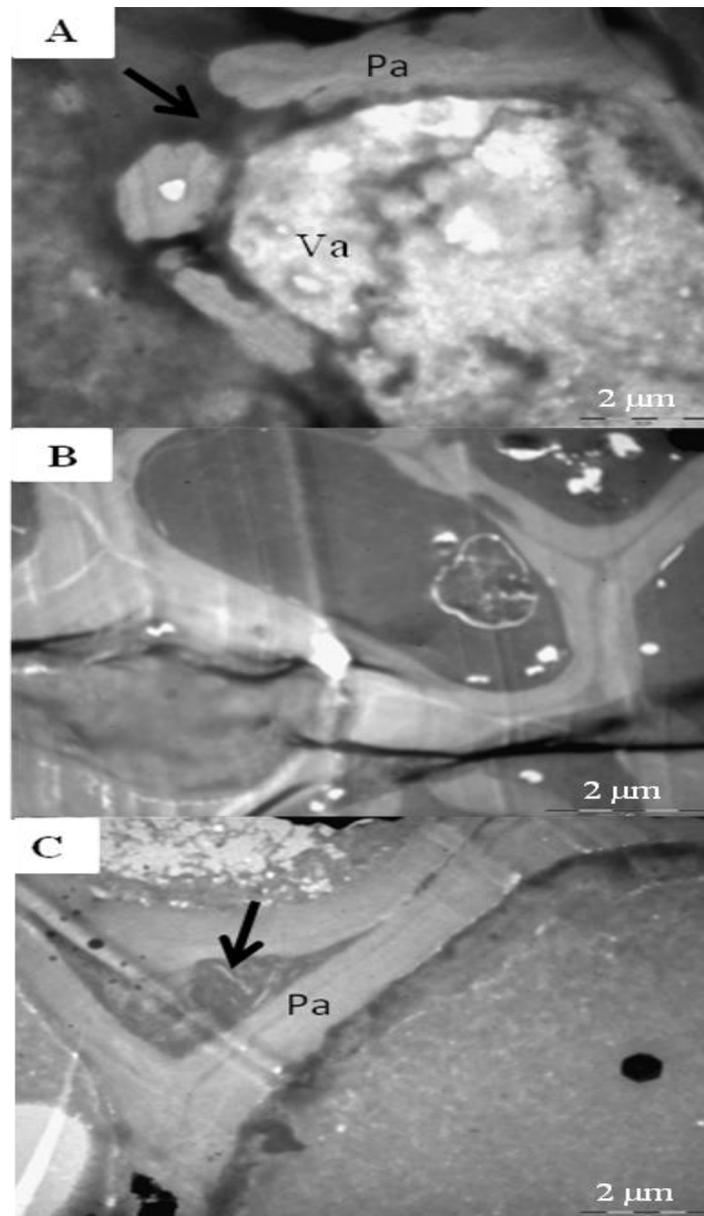


Figura 5 Eletromicrografia de transmissão das massas celulares do tipo 1 obtidos de explantes foliares de dendezeiro (*E. guineensis* Jacq.). A) Vacúolo ocupando totalmente o citoplasma e parede celular com rupturas (setas). B) Células com ausência de organelas. C) Grandes espaços intercelulares (setas). Parede celular (Pa) e vacúolo (Va).

Células alongadas são ditas não embriogênicas, pois possuem grandes vacúolos, e a vacuolização é definida como um marcador precoce de morte celular (FILONOVA et al., 2000; LAM; FUKUDA; GREENBERG, 2000).

As células do tipo 2, apresentaram núcleo com nucléolo proeminente, citoplasma denso, alta relação núcleo/citoplasma, presença de amiloplastídeos próximos ao núcleo, paredes grossas com pouco espaço intercelular, numerosas mitocôndrias e plasmodesmos (Figura 8).

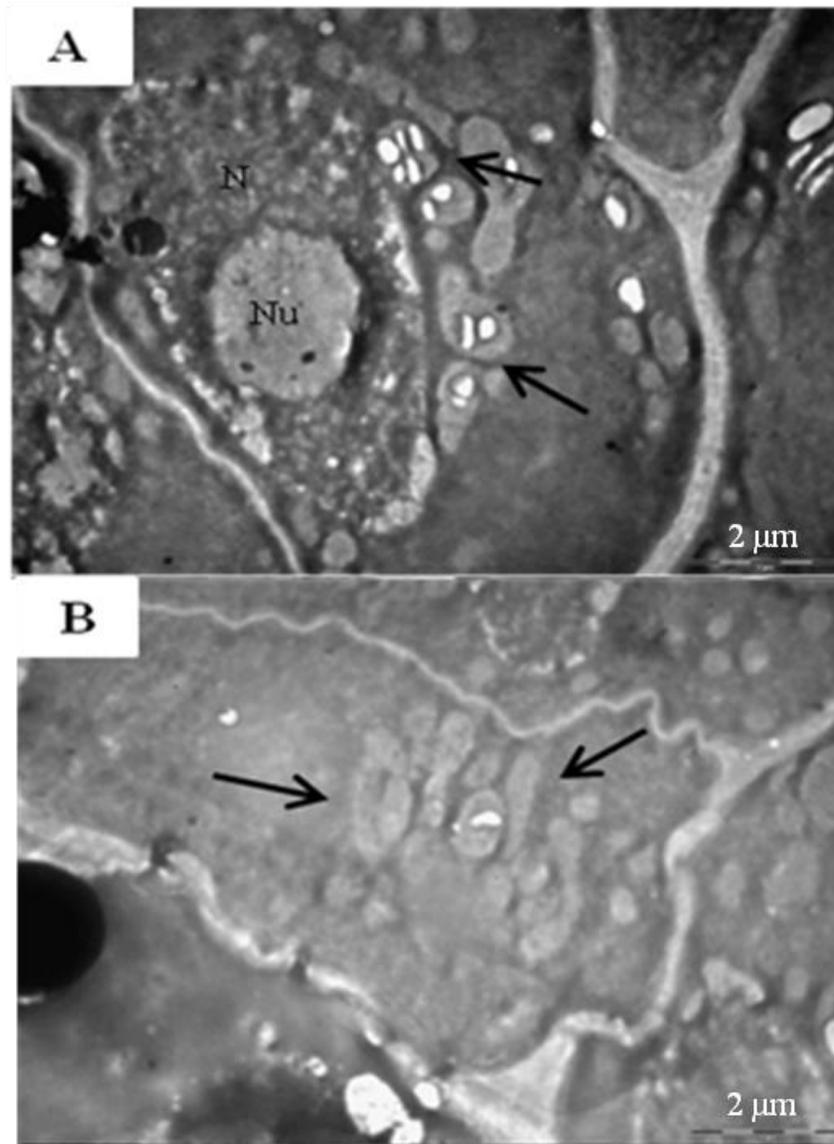


Figura 6 Eletromicrografia de transmissão de massas celulares do tipo 2 de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.). A) Células com núcleo grande e nucléolo proeminente, muitos amiloplastídeos ao redor do núcleo (setas). B) Numerosas mitocôndrias (setas). Parede celular (Pa), núcleo (N) e nucléolo (Nu).

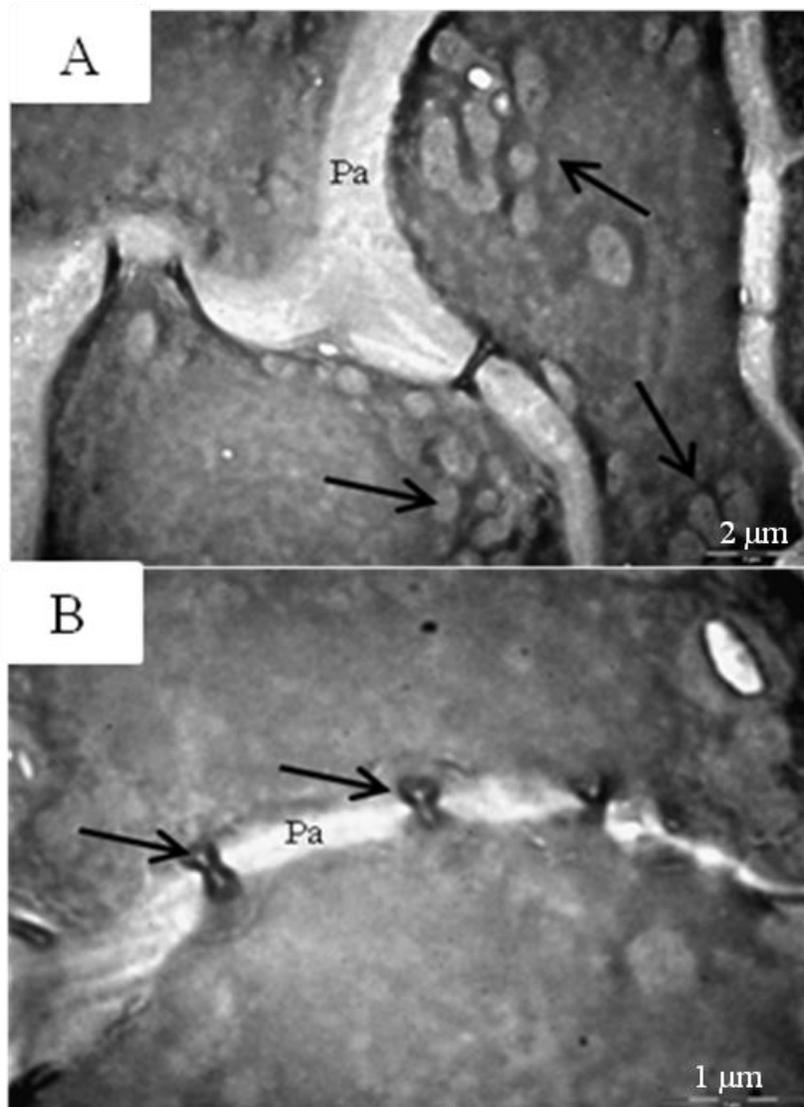


Figura 7 Eletromicrografia de transmissão de massas celulares do tipo 2 de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.). A) Parede celular espessa com poucos espaços entre as celulares e contendo mitocôndrias (setas). B) Plasmodesmos (setas). Parede celular (Pa).

Células do tipo 3 pelas análises ultraestruturais mostraram núcleo com nucléolo aparente, muitos amiloplastídeos, mitocôndrias, retículo

endoplasmático, presença de fenóis, lipídeos e paredes celulares delgadas (Figura 8).

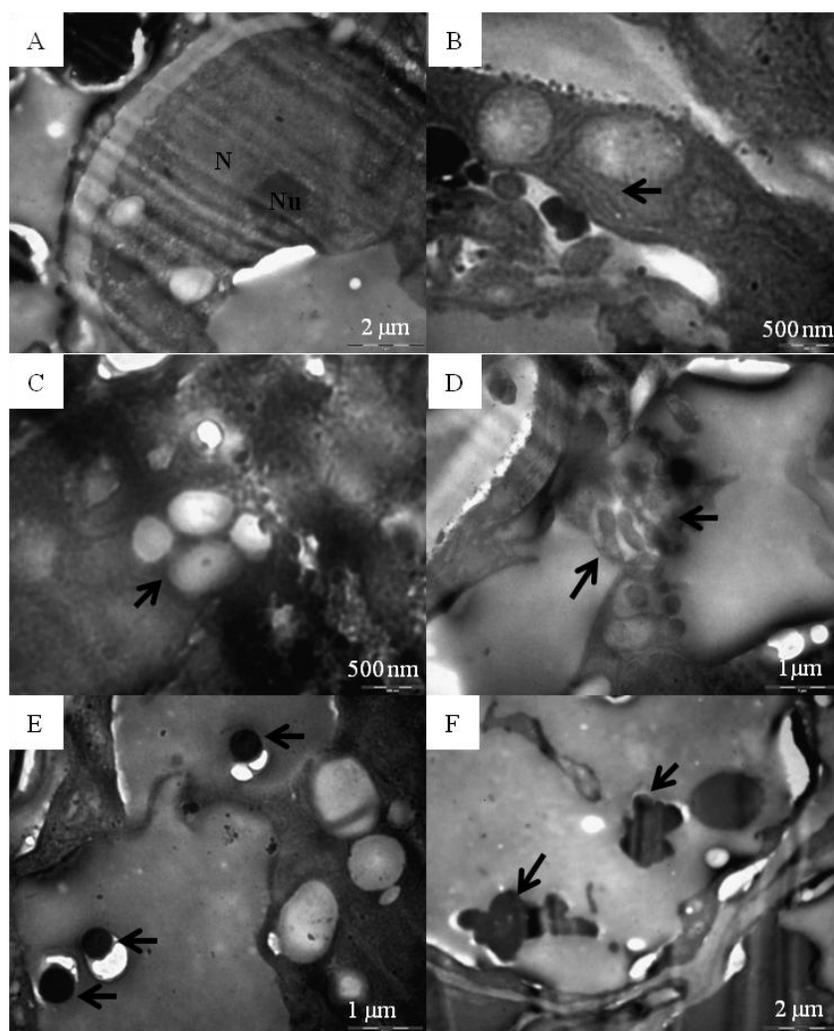


Figura 8 Eletromicrografia de transmissão de massas celulares do tipo 3 de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.). A) Células com núcleo grande, nucléolo aparente e parede celular espessa. B) Presença de muitas mitocôndrias (setas). C) Retículo endoplasmático (setas). D) Presença de numerosos amiloplastídeos (setas). E) Muitos lipídeos (setas) e F) grande quantidade de fenóis (setas).

Nas células do tipo 4 também foi possível visualizar paredes celulares grossas com poucos espaços intercelulares, muitas mitocôndrias e amiloplastídeos (Figura 9).

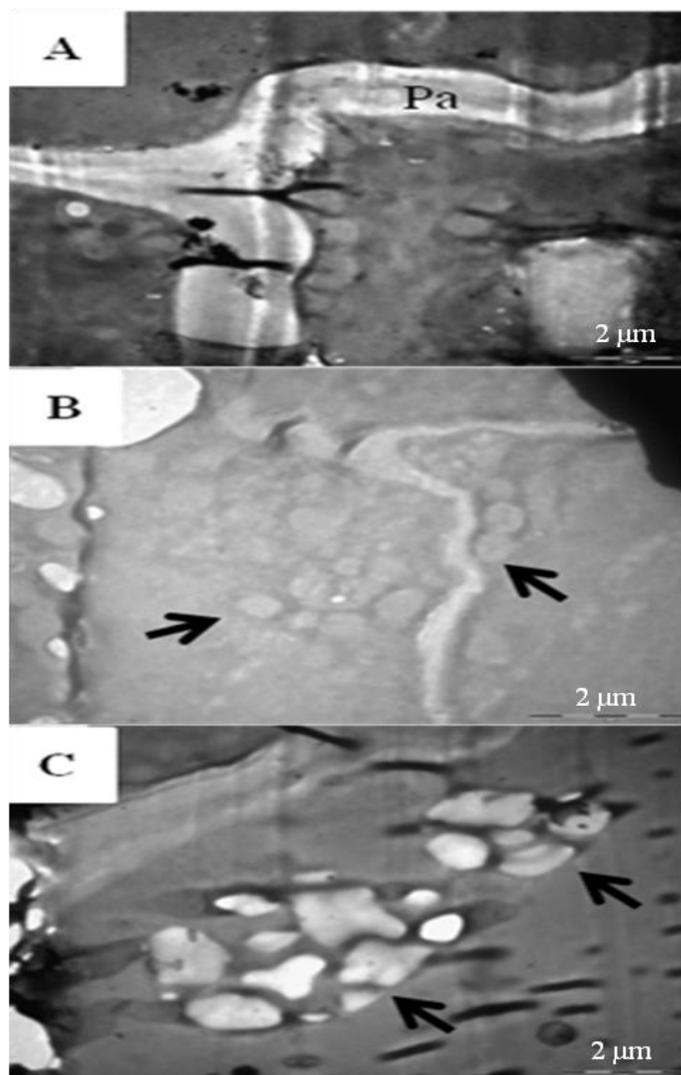


Figura 9 – Eletromicrografia de transmissão de massas celulares de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.). A) Parede celular delgada. B) Presença de numerosas mitocôndrias (setas) e C) células ricas em amiloplastídeos (setas).

Verdeil et al. (2001), analisando células de calos de *Coconut* também, encontraram núcleo volumoso com dois nucléolos, parede celular de espessura uniforme, amiloplastídeos e plasmodesmos, semelhantes as encontradas nas células do tipo 2 deste trabalho.

Os plasmodesmos são canais que permitem a conexão entre as células vizinhas para troca de moléculas funcionais e estruturais com velocidade superior à observada no transporte através de membranas (CONCENÇO et al., 2007).

Segundo Verdeil et al. (2001), as células embriogênicas passam por modificações quando adquirem a competência para formar os pró-embriões. Esses autores observaram o espessamento da parede celular com a senescência dos tecidos circundantes, aumento de amiloplastídeos ao redor do núcleo e este deixa de ser esférico, ocorrendo inúmeras divisões mitóticas. Posteriormente, a formação dos pró-embriões os autores descrevem que as células retornam as características observadas nas células meristemáticas, ou seja, núcleo esférico, menor número de amiloplastídeos agora presentes no citoplasma, paredes finas e presença de plasmodesmos.

Aslam et al. (2011), avaliando histologicamente embriões somáticos de tamareira observaram células pequenas com características meristemáticas, presença de núcleo e citoplasma denso semelhantes as células das estruturas globulares do tipo 3 deste estudo.

Características embriogênicas semelhantes às visualizadas neste trabalho também foram observadas, em calos obtidos de antera de ingazeiro, com a presença de núcleo grande com nucléolo proeminente, mitocôndrias, grãos de amido e retículo endoplasmático (STEIN et al., 2010).

A presença de grãos de amido promove energia para o desenvolvimento do embrião somático, sugerindo uma ativa regulação do acúmulo de grãos de amido em calos embriogênicos (MARTIN et al., 2000).

Em *Feijoa sellowiana* foi observado que as células com características embriogênicas apresentavam núcleo bem desenvolvido com nucléolo proeminente, grânulos de amido e muitas mitocôndrias. A presença de numerosas mitocôndrias está relacionada ao alto metabolismo das células, devido ao fato de que esta organela é responsável pela respiração celular (CANHOTO; MESQUITA; CRUZ, 1996).

Portanto, as análises ultraestruturais permitiram visualizar características embriogênicas nas massas celulares dos tipos 2, 3 e 4. Sendo que o tipo 3 apresentou estrutura globular com muitos grãos de amido e características ultraestruturais que permitem inferir um maior potencial embriogênico deste tipo, denominando as de massas pró-embriogênicas.

## CONCLUSÃO

A suplementação das auxinas 2,4-D e picloram possibilitaram a formação de quatro tipos de massas celulares, independentemente das concentrações do regulador de crescimento utilizado.

O regulador de crescimento picloram na concentração de 1 mg.L<sup>-1</sup> é o mais indicado para induzir massas pró-embriogênicas dos tipos 3 e 4.

Com base nas características ultraestruturais e nas porcentagens de produção de massas pró-embriogênicas, o tipo 3 é o mais indicado para regenerar plantas por via direta, pois obteve maiores porcentagens de explantes com massas pró-embriogênicas (9%) em relação ao tipo 2, que apesar de ser induzido por via indireta possui baixas taxas de explantes com calos (2%).

As massas celulares do tipo 1 não apresentaram características embriogênicas, sendo constituída de células alongadas, vacuoladas e com degradação da parede celular, inferindo estarem em processo de apoptose.

## REFERÊNCIAS

- AGROANALYSIS. **Biodiesel II**: no Brasil, falta execução. Brasília, 2007.  
Disponível em:  
<[http://www.agroanalysis.com.br/materia\\_detalhe.php?idMateria=287](http://www.agroanalysis.com.br/materia_detalhe.php?idMateria=287)>. Acesso em: 10 jan. 2012.
- ASLAM, J. et al. Somatic embryogenesis, scanning electron microscopy, histology and biochemical analysis at different developing stages of embryogenesis in six date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars. **Journal of Biological Sciences**, Lahore, v. 18, p. 369-380, June 2011.
- BOARI, A. de J. Estudos realizados sobre o amarelecimento fatal do dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.). Belém: EMBRAPA, 2008. 62 p. (Documentos, 348).
- BOSSOLA, J. J.; RUSSELL, L. D. **Electron microscopy**. 2<sup>nd</sup>. ed. Boston: Jones and Bartlett, 1998. 670 p.
- BRAVIN, I. C.; VALENTIN, Y. Y.; YOKOYA, N. S. Formação de calos e regeneração de segmentos apicais de *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux (*Gigartinales, Rhodophyta*): obtenção de culturas axênicas e efeitos da concentração do Ágar. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 175-182, jan./mar. 2006.
- CANHOTO, J. M.; MESQUITA, J. F.; CRUZ, G. S. Ultrastructural changes in cotyledons of *Pineapple guava* (Myrtaceae) during somatic embryogenesis. **Annals of Botany**, Oxford, v. 78, n. 4, p. 513-521, May 1996.
- CARVALHO, M. Embriogênese somática a partir de folhas imaturas e flores desenvolvidas in vitro de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.). 2009. 73 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2009.
- CONCENÇO, G. et al. Plasmodesmos: transporte simplástico de herbicidas na planta. **Planta Daninha**, Viçosa, MG, v. 25, n. 2, p. 423-432, abr. 2007.

EEUWENS, C. J. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera*) and cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 36, p. 23-28, 1978.

FILLIPI, S. B.; APPEZZATO-DA-GLORIA, B.; RODRIGUEZ, A. P. M. Variações morfológicas de embriões somáticos obtidos a partir de inflorescências de bananeira. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 58, n. 4, p. 711-716, out./dez. 2001.

FILONOVA, L. H. et al. Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm Norway spruce. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 113, n. 24, p. 4399-4411, Dec. 2000.

FURLAN, L. F. et al. Potencialidades regionais estudo de viabilidade econômica dendê. Brasília: SUFRAMA, 2003. 12 p.

GHASSAN, T. Q. et al. A Combustion performance and emissions of ethyl ester of a waste vegetable oil in a water-cooled fumace. **Applied Thermal Engineer**, Lisboa, v. 23, p. 285-293, Dec. 2003.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1998. p. 533-568.

KANCHANAPOOM, K.; DOMYOAS, P. The origin and development of embryoids in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) embryo culture. **ScienceAsia**, Bancoc, v. 25, p. 195-202, Mar. 1999.

LAM, E.; FUKUDA, H.; GREENBERG, J. Programmed cell death of tracheary elements as a paradigm in plants. **Plant Molecular Biology**, Wageningen, v. 44, p. 245-253, Oct. 2000.

LAMB, C. R. C. et al. Embriogênese somática e regeneração de plantas a partir de embrião maduro de aveia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 2, p. 123-130, fev. 2002.

LUIS, Z. G.; BEZERRA, K. M. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Adaptability and leaf anatomical features in oil palm seedlings produced by embryo rescue and pre-germinated seeds. **Brazilian Journal Plant Physiology**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 3, p. 209-215, Nov. 2010.

MANEHONON, M. B. et al. Effect of storage and heat treatments on the germination of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) seed. **African Journal of Agricultural Research**, Pretoria, v. 4, n. 10, p. 931-937, Oct. 2009.

MARTIN, A. B. et al. Differences in the contents of total sugars, starch and sucrose in embryogenic and non-embryogenic calli from *Medicago arborea* L. **Plant Science**, Cambridge, v. 154, p. 143-151, May 2000.

MIKULA, A. et al. Ultrastructural changes in zygotic embryos of *Gentiana punctata* L. during callus formation and somatic embryogenesis. **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica**, Krakow, v. 46, p. 109-120, Dec. 2004.

MOURA, E. F. **Embriogênese somática em macaúba: indução, regeneração e caracterização anatômica**. 2007. 66 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.

MOURA, E. F. et al. Histological study of somatic embryogenesis induction on zygotic embryos of macaw palm (*Acrocomia aculeate* (Jacq.) Lodd. ex Martius). **Plant Cell Tissue Organ Culture**, Lavras, v. 95, p. 175-184, July 2008.

STEIN, V. C. et al. Ultrastructural calli analysis of *Inga vera* Willd. subsp. *Affinis* (DC.) T.D. Penn. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 34, n. 5, p. 789-796, mar. 2010.

STEINER, N. et al. Effect of carbon source on morphology and histodifferentiation of *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, n. 6, p. 895-903, Nov. 2005.

STEINMACHER, D. A. et al. Somatic embryogenesis in peach palm using the thin cell layer technique: induction, morpho-histological aspects and AFLP analysis of somaclonal variation. **Annals of Botany**, Oxford, v. 100, p. 699-709, July 2007.

\_\_\_\_\_. Temporary immersion system improves *in vitro* regeneration of peach palm through secondary somatic embryogenesis. **Annals of Botany**, Oxford, v. 104, p. 1-13, Jan. 2011.

VERDEIL, J. L. et al. Ultrastructural changes in coconut calli associated with the acquisition of embryogenic competence. **Annals of Botany**, Oxford, v. 88, p. 9-18, Feb. 2001.

## ANEXOS

Tabela 1 Componentes e suas concentrações do meio de cultivo Y3 (EEUWENS, 1978).

|                 | Componentes                           | Concentração final<br>mg/L |
|-----------------|---------------------------------------|----------------------------|
| Macronutrientes | NH <sub>4</sub> Cl                    | 535                        |
|                 | KNO <sub>3</sub>                      | 2020                       |
|                 | MgSO <sub>4</sub> .XH <sub>2</sub> O  | 247                        |
|                 | KCl                                   | 1492                       |
|                 | NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      | 271,12                     |
|                 | CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O  | 294                        |
| Micronutrientes | KI                                    | 8,3                        |
|                 | H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>        | 3,1                        |
|                 | MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O   | 8,49                       |
|                 | ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O  | 7,2                        |
|                 | NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O | 0,24                       |
|                 | CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O  | 0,15                       |
|                 | NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O  | 0,024                      |
|                 | CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O  | 0,24                       |
| Ferro           | Na <sub>2</sub> EDTA                  | 37,3                       |
|                 | FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O  | 27,8                       |

|             |                |      |
|-------------|----------------|------|
| Vitaminas   | Mio-inositol   | 100  |
|             | Piridoxina HCl | 0,05 |
|             | Tiamina HCl    | 0,5  |
|             | Glicina        | 2    |
| Aminoácidos | l-glutamina    | 100  |
|             | l-arginina     | 100  |
|             | l-asparagina   | 100  |