



MARCELO PICAÑO DE FARIAS

**CARACTERIZAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO
FLORAL DE *Elaeis oleifera* (H.B.K.) CORTÉS**

LAVRAS – MG

2014

MARCELO PICANÇO DE FARIAS

**CARACTERIZAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO FLORAL DE
Elaeis oleifera (H.B.K.) CORTÉS**

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

Orientador

Dr. Manoel Teixeira Souza Junior

Coorientador

Dr. Guy de Capdeville

LAVRAS – MG

2013

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Farias, Marcelo Picanço de.

Caracterização do desenvolvimento floral de *Elaeis oleífera*
(H.B.K) Cortés / Marcelo Picanço de Farias. – Lavras : UFLA,
2014.

72 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Manoel Teixeira Souza Junior.

Bibliografia.

1. *Elaeis oleífera*. 2. *Elaeis oleífera* - Anatomia. 3.
Inflorescência. 4. *Elaeis oleífera* – Morfologia. 5. Hibridação in situ
por fluorescência. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 584.5

MARCELO PICANÇO DE FARIAS

**CARACTERIZAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO FLORAL DE
Elaeis oleifera (H.B.K.) CORTÉS**

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

APROVADA em 26 de março de 2013.

Dr. Guy de Capdeville EMBRAPA AGROENERGIA

Dra. Sara de Almeida Rios EMBRAPA AMAZÔNIA OCIDENTAL

Dr. Alexandre Alonso Alves EMBRAPA AGROENERGIA

Dr. Manoel Teixeira Souza Junior
Orientador

LAVRAS – MG

2013

A Deus,
Aos meus pais Maria Picanço e Ademar Farias (*in memoriam*),
À minha esposa Carolina e aos meus familiares.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade de cursar o Mestrado.

Ao prof. Manoel Teixeira, pela orientação dos trabalhos.

Ao prof. Guy, pela coorientação, paciência, amizade, confiança e por acreditar que eu seria capaz.

Ao prof. Luciano Paiva pela colaboração nas aulas ministradas.

Aos meus amigos de laboratório: Rosana, Ana Cristina, Tomas, André, Luis, Priscila. Por estarmos juntos sempre, na tristeza, na alegria...

À Embrapa Agroenergia pela disponibilidade de equipamentos, espaço e bolsas de estudos para desenvolver as pesquisas, ao Cenargen pela cooperação e suporte de pessoal e laboratório.

Aos que estiveram sempre à disposição para as coletas feitas no CPAA: Raimundo Cunha, Bruno, Daniela, Paulo César, Wanderlei. A todos do CERU pela amizade, cuidado e colaboração.

Aos meus sogros Ana e Ronaldo pela ajuda incondicional durante a estada em Lavras.

A todos que torceram pelo meu êxito e também àqueles que torceram contra.

“O que nos move é o desafio de evoluir cada vez mais”, frase que levarei para sempre comigo.

Obrigado.

RESUMO GERAL

O objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização da estrutura anatômica do sistema reprodutivo do Caiaué (*Elaeis oleifera* (Kunth) Cortés) em nível celular, partindo do primórdio da inflorescência até o desenvolvimento completo da flor das amostras BR 174, Coari e Manicoré. Das inflorescências e flores coletadas, algumas foram fixadas e embebidas em resina Technovit 7100® e outras em parafina. Cortes ultrafinos transversais das inflorescências foram realizados para comparação entre as subamostras com microscopia de luz e, para fotodocumentação, foram utilizadas objetivas de 10X até 40X. Para Microscopia Eletrônica de Varredura, fez-se dissecação das flores e partes da inflorescência. Observou-se que as subamostras estudadas apresentaram os mesmos padrões de desenvolvimento floral, no entanto ocorreram variações pontuais e temporais entre eles. O caiaué apresentou as mesmas estruturas e fases de desenvolvimento encontradas para a palma de óleo. As imagens foram obtidas utilizando microscópio de luz Axiophot Zeiss e Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) Zeiss DSM 962. A análise citológica de microsporócitos de flores masculinas de *Elaeis oleifera* (Kunth) Cortés e a identificação dos diferentes estádios meióticos (leptóteno, paquíteno, díade e tétrade) nas regiões apical, central e basal da ráquila e da inflorescência permitiram identificar o melhor estágio de desenvolvimento floral (inflorescências da folha +14) para selecionar microsporócitos em fase de paquíteno, fase esta ideal para análises citogenéticas utilizando FISH de elevada resolução. Desta forma o trabalho visou auxiliar futuros estudos envolvendo técnicas de hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) e de cultura de micrósporo para obtenção de plantas haploides.

Palavras-chave: *Elaeis oleifera*. Anatomia. Inflorescência. Morfologia Citogenética. FISH.

GENERAL ABSTRACT

The objective of this study was to characterize the anatomical structure of the reproductive system of caiaué (*Elaeis oleifera* (Kunth) Cortés) at the cellular level, starting from the inflorescence primordium until the complete development of the flower from subsamples BR 174, Coari and Manicoré. From the inflorescences and flowers collected some were fixed and embedded in Technovit 7100 ® resin and others in paraffin. Transverse ultrathin sections of inflorescences flowers were performed to compare the subsamples using light microscopy and photo documentation. For scanning electron microscopy analysis, flowers were dissected in their parts and images were obtained using a Zeiss Axiophot light microscope and Scanning Electron Microscope (SEM) Zeiss DSM 962. The results showed that all three subsamples studied had the same pattern of floral development, however specific and temporal variations occurred between them. The caiaué showed the same structures and stages of development found for palm oil. The cytological analysis of plant mother cells isolated from male flowers of *E. oleifera* (Kunth) Cortés and the identification of different meiotic stages (leptotene, pachytene, dyad and tetrad) at the apical, central and basal portions of the raquila allowed the identification of the best stage of floral development (inflorescence leaf +14) to select microsporocytes in pachytene stage. This stage is ideal for cytogenetic studies using high resolution Fluorescent In Situ Hybridization analysis aiming at helping future genetic and the production of haploid plants studies.

Keywords: *Elaeis oleifera*. Anatomy. Inflorescence. Morpholog. Citogenetic. FISH.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	
1	INTRODUÇÃO	9
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
	REFERÊNCIAS	21
	SEGUNDA PARTE - ARTIGOS	27
	ARTIGO 1 Caracterização do desenvolvimento floral da palma de óleo americana por técnicas microscópicas	27
	ARTIGO 2 Determinação de estádios meióticos em <i>Elaeis oleifera</i> (H.B.K.) cortés	59
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	71

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A família Arecaceae Schultz possui 2.800 espécies e cerca de 190 gêneros, apresentando uma distribuição pantropical (TOMLINSON, 1990). Os centros de diversidade estão localizados na Malásia e América do Sul (EISERHARDT et al., 2011), locais que apresentam níveis de umidade elevados (SALM et al., 2007). As espécies de Arecaceae possuem grandes diferenças morfológicas em seus órgãos vegetativos e reprodutivos, com isto ocupam os mais variados *habitats* (DRANSFIELD et al., 2008).

Muitas espécies de palmeiras possuem grande importância econômica mundial. Cita-se como exemplo, o uso dos frutos e das sementes de *Cocos nucifera* L., *Phoenix dactylifera* L. e *Elaeis guineensis* Jacq. na culinária e para a produção de biocombustíveis. Já outras espécies assumem importância em comunidades locais, além de serem largamente utilizadas como ornamentais e em projetos de paisagismos (PERERA et al., 2010).

Cocoseae Mart. é uma tribo pertencente à família Arecoideae e alguns de seus gêneros são amplamente distribuídos na América do Sul (DRANSFIELD et al., 2008). Na classificação proposta por Dransfield et al. (2005), Cocoseae foi subdividida em três tribos: Attaleinae Drude (11 gêneros), Bactridinae Drude (quatro gêneros) e Elaeidinae Drude (à qual pertencem *Elaeis guineensis* e *Elaeis oleifera*).

As inflorescências em Arecaceae podem ser de dois tipos, segundo Tomlinson (1990): (1) *hapaxanthly*, surgindo a partir do meristema apical, que é convertido apenas para a reprodução após um longo período vegetativo, o que resulta em uma curta fase de floração, levando o indivíduo à morte após esta fase. Este fenômeno ocorre em apenas 5% das espécies de palmeiras (ADAM et

al., 2005); (2) tipo pleonântico, em que as inflorescências são produzidas continuamente em um meristema apical indeterminado, a partir de meristemas interfoliares. Este é o tipo mais comum correspondendo a 95% das espécies de palmeiras (ADAM et al., 2005).

As inflorescências podem ser ramificadas ou em espiga, apresentando variações nas brácteas, bractéolas e perfis (DRANSFIELD et al., 2008). Dentro da família Arecaceae, foram observadas tendências na evolução das estruturas florais incluindo a progressão para diclinia (flores unissexuais) e os indivíduos de monoicos para dioicos (DRANSFIELD et al., 2008). Dessa forma, flores em diversos estágios de diclinia podem ser encontradas, tanto em indivíduos dioicos quanto monoicos, assim como diferentes padrões de organização das flores nas raques e raquilas (DRANSFIELD et al., 2008).

A organização das flores diclinas em tríades, em que uma flor pistilada central associa-se a duas flores estaminadas laterais, é considerada uma possível sinapomorfia para a subfamília Arecoideae (DRANSFIELD et al., 2008). Na tribo Cocoseae, são consideradas sinapomorfias a presença de estaminódios que se fundem, formando um anel ao redor do ovário, além da formação da espata, que envolve a inflorescência (DRANSFIELD et al., 2008; BAKER et al., 2011).

A diclinia em algumas flores ocorre pelo aborto de estames ou pistilos, levando a flor à unissexualidade (MITCHELL; DIGGLE, 2005). Estudos do desenvolvimento floral de flores diclinas revelaram que esta condição é ocasionada pela interrupção das divisões celulares nas regiões produtoras dos estames e carpelos (DAHER et al., 2010). Masmoudi-Allouche et al., (2009) aplicaram reguladores de crescimento em flores pistiladas de *Phoenix dactylifera*, em fase anterior à diferenciação celular do estaminódio e, como resultado, houve o desenvolvimento de estames férteis, produzindo grãos de pólen viáveis, demonstrando com isso que não ocorre morte celular dos tecidos.

O gineceu das espécies da família Arecaceae é, normalmente, constituído por três carpelos (DRANSFIELD et al., 2008), mas a poliandria é um fenômeno comum em Arecaceae e ocorre em diversos grupos (DRANSFIELD et al., 2008).

Em geral os estudos relacionados ao desenvolvimento reprodutivo das espécies palmáceas em nível histológico são escassos, uma vez que o desenvolvimento reprodutivo é longo com uma série de fases ou eventos (PERERA et al., 2010). Este fato se aplica aos estudos relacionados com o desenvolvimento completo da inflorescência em palmeiras, entretanto, alguns estudos merecem destaque como é o caso dos estudos de Barfod e Uhl (2001) que trabalharam com *Aphandra natalia*, de KÜCHMEISTER; SILBERBAUER-GOTTSBERGER; GOTTSBERGER (1997) com *Euterpe precatoria* e os estudos relacionados ao desenvolvimento da flor de *Dypsis* (RUDALL et al., 2003).

Em algumas espécies da família Arecaceae foram revelados mecanismos de termogênese que, dentre outras implicações, contribui para a formação de tubo polínico e difusão do perfume floral (BARFOD; HAGEN; BORCHESSENIUS, 2011). Recentemente estudos abrangentes relacionados ao desenvolvimento de inflorescência e flores foram realizados para a tribo Cocoseae, com *C. nucifera* (GUEVARA; JAUREGUI, 2008; PERERA et al., 2010) e *E. guineensis* (ADAM et al., 2005). Nestes trabalhos, foi demonstrado que o tempo para a diferenciação da inflorescência é longo, podendo levar de dois a três anos.

Em *E. guineensis*, espécie monoica, Adam et al. (2005) observaram o desenvolvimento de tríades nos indivíduos femininos, porém as flores estaminadas tornam-se estéreis ao fim do desenvolvimento.

Em Arecaceae, as características florais possuem grande valor taxonômico, pois ajudam a delimitar grupos monofiléticos, como foi observado no gênero *Chamaedorea*, que possui grande número de espécies (ASKGAARD

et al., 2008), e no gênero *Raphis* (GIDDEY; SPICHIGER; STAUFFER, 2009), em que dois grupos podem ser distinguidos por meio de características do filete.

As populações naturais de caiaué podem ser encontradas desde a América Central até o norte da América do Sul (Suriname, Colômbia e extremo noroeste do Brasil) (GHESQUIÈRE et al., 1987). A palmeira caiaué tem tronco do tipo estipe, possui porte baixo medindo até cinco metros quando adulto. Nas folhas, os folíolos são dispostos em um mesmo plano sobre a raque, conferindo aspecto liso às folhas, sendo esta uma das principais diferenças entre o caiaué e a palma de óleo. O comprimento das folhas é muito variável, uma planta adulta pode conter até 42 folhas funcionais e o comprimento varia de 4,2 a 7,4 m (CORLEY; TINKER, 2003; CUNHA et al., 2009). Quanto ao aspecto reprodutivo, o caiaué é uma planta monoica, cujas flores masculinas e femininas são produzidas em diferentes ciclos sexuais (CUNHA et al., 2009).

Características como a resistência ao ataque de pragas, a tolerância a terrenos úmidos e a resistência a doenças, em especial ao Amarelecimento Fatal, que é o maior problema do cultivo da palma de óleo na América (Bergamin Filho ET al., 1998), bem como a resistência à *Fusarium sp.*, doença que atinge a palma de óleo na África (MICHIELSE; MARTIJN, 2009), torna esta espécie um importante ativo para o melhoramento genético da palma de óleo.

O interesse nessa espécie baseia-se principalmente no seu porte reduzido (cerca de 5 cm/ano) (CORLEY; TINKER, 2003) e na qualidade do óleo, que possui maior teor de ácidos graxos insaturados, aproximadamente 78% contra 48% da palma de óleo (RAMOS, 2006). Segundo Choo et al. (1996), o óleo também possui um alto teor de caroteno, cerca de 3.000 ppm, contra 700 ppm na palma de óleo, além de possuir uma alta concentração de vitamina E (700–1.500 ppm), esteróis (3.500– 4.000 ppm) sendo, também rico em tocotrienóis (LUBRANO; ROBIN, 1997).

Elaeis oleifera apresenta relativa facilidade de hibridação com *E. guineensis*, produzindo híbridos interespecíficos (HIE) viáveis, e que se constituem em uma fonte de grande variabilidade genética a ser explorada pelos melhoristas (ALVES et al., 2011). Segundo Cunha et al. (2009), populações com grande variabilidade genética podem então ser obtidas, favorecendo assim a seleção de indivíduos, híbridos interespecíficos, que reúnam as características favoráveis das duas espécies.

Este trabalho teve como objetivo principal analisar a morfologia e anatomia floral de *E. oleifera* de forma a caracterizar estruturalmente, por meio de avaliações morfoanatômicas, as inflorescências e flores da mesma. Pretendeu-se, ainda, verificar a presença de estruturas florais reduzidas nas flores estaminadas e pistiladas, caracterizando-as morfoanatomicamente quando presentes.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

O óleo de palma é considerado uma das mais sólidas alternativas para a produção de biocombustíveis. Sua produtividade pode variar entre 4 e 5 toneladas de óleo de polpa e de 1 a 1,5 tonelada de óleo de palmiste por hectare/ano (MÜLLER; ALVES, 1998). A versatilidade do óleo, tem tornado a cultura importante para atender à crescente demanda por óleos vegetais, nas áreas alimentícia, medicinal, cosmética, industrial e, principalmente, para a produção de biocombustíveis (BARCELOS; NUNES; CUNHA, 2000).

Os maiores produtores mundiais de palma de óleo são a Indonésia, Malásia, Tailândia, Nigéria, e Colômbia(ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO, 2012). O Brasil ocupa a 9ª posição no *ranking*, com uma área plantada, no ano de 2012, de 150.000 hectares e a produção próxima de 250.000 toneladas(ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO, 2012). O país consome 411,6 mil toneladas de óleo de palma e derivados, mas para atender esta demanda ainda é necessário importar em torno de 260,3 mil toneladas.

No Brasil, a região Amazônica possui, segundo o Zoneamento Agroecológico da palma de óleo, cerca de 32 milhões de hectares com aptidão para a expansão da cultura. Somente no estado do Pará existem mais de 5,5 milhões de hectares com aptidão edafoclimática para o cultivo de palma de óleo (TRINDADE et al., 2005). Essa atividade agroindustrial com uso intensivo de mão de obra poderá ser uma alternativa promissora na diminuição do fluxo migratório das populações rurais para os centros urbanos (BARCELOS et al., 1995).

A família Arecaceae é constituída por plantas pertencentes à divisão Magnoliophyta, classe Liliopsida, sendo a única família botânica da ordem

Arecales (CHIA et al., 2009). São plantas perenes, arborescentes, com representantes dioicos e monoicos, de morfologia variada. A característica monoica ocorre em 68% dos gêneros da família Arecaceae. As raízes podem ser subterrâneas ou aéreas. Os estipes são geralmente lenhosos, simples, ocasionalmente ramificados formando touceiras. Quando aéreo, em geral, o estipe pode apresentar-se liso ou densamente coberto por espinhos. As folhas são formadas essencialmente por um eixo no qual são distinguidas três regiões: bainha, pecíolo e limbo (ADAM et al., 2007; DRANSFIELD et al., 2007).

O limbo é uma lâmina foliar constituída pela raque, variando dentro do gênero e da espécie. Quanto à disposição dos folíolos, as folhas podem ser: pinadas, quando os folíolos dispõem-se ao longo da raque de espaço a espaço e, palmadas, quando a raque é muito curta ou inexistente. As inflorescências podem ser interfolares, intrafolares ou axilares, paniculadas e constituídas por brácteas, espata e raquis (MARCATO; PIRANI, 2001).

A raquis pode apresentar ramificações de diversas ordens, chamadas ráquias. As flores são pequenas e numerosas, curtas pediceladas ou sésseis, pouco vistosas, unissexuadas ou raramente bissexuais, trímeras, actinomorfas, geralmente diclamídeas, mas podendo ser também heteroclamídeas ou raramente monoclamídeas. O androceu tem seis estames dispostos em duas séries de três, com estaminoides presentes. O gineceu é, geralmente, gamocarpelar, ovário súpero, tricarpelar, trilocular, triovular, mas frequentemente apenas um dos três se apresenta fértil (MARCATO; PIRANI, 2001; SOUZA; LORENZI, 2008).

Os frutos são do tipo drupa ou baga e geralmente apresentam três camadas: exocarpo, mesocarpo e endocarpo. O exocarpo pode ser liso, com presença de espinhos ou escamoso, o mesocarpo é de natureza fibrosa, seca ou fibrosa-suculenta e o endocarpo pode ser fino, membranoso, celulósico, espesso ou lignificado (MIRANDA et al., 2001).

As ráfides são onipresentes na família Arecaceae, sendo encontradas em raízes, caules, folhas, flores e frutos. A sua presença ocasional em embriões também foi relatada, além de ser uma característica comum na subfamília Arecoideae (ZONA, 2004).

O gênero *Elaeis* (do grego “*Elaion*”, que significa óleo), pertence à classe *Liliopsida* (*Monocotiledônea*), ordem *Arecales* (*Palmales*), família *Areaceae* (*Palmae*), subfamília *Arecoideae*, tribo *Cocoseae* (*Cocoinaeae*) e, subtribo *Elaeidinae* (DRANSFIELD et al., 2005). Pertencem a este gênero duas espécies de interesse econômico, a palma de óleo ou palma africana *E. guineensis* Jacq., e o caiaué ou palma americana *E. oleifera* (Kunth) Cortés (CUNHA et al., 2009; DRANSFIELD et al., 2005).

As populações naturais de caiaué podem ser encontradas desde a América Central até o norte da América do Sul (Suriname, Colômbia e extremo noroeste do Brasil) (MEUNIER, 1975; GHESQUIÈRE et al., 1987). Esta região é considerada o provável centro de origem de *E. oleifera*, devido à ocorrência de maior diversidade morfológica (OOI et al., 1981), sendo que a bacia amazônica seria considerada um centro secundário de diversificação do *caiaué* (MEUNIER, 1975; GHESQUIÈRE et al., 1987).

Na Amazônia, é muito frequente a ocorrência da espécie sobre manchas de solos de origem antropogênica, denominadas “terra preta de índio”, com características de alta fertilidade em virtude dos elevados teores de fósforo, cálcio e matéria orgânica (MEUNIER, 1975; OOI et al., 1981; CORLEY; TINKER, 2003; CUNHA et al., 2009).

A palmeira caiaué possui tronco tipo estipe, medindo até 5 metros de altura quando adulto. Por volta dos 15 anos de idade, o estipe curva-se sobre o solo permanecendo a parte terminal ereta, mantendo a coroa foliar a 2-3 metros de altura (procumbência). As raízes podem atingir até um metro de comprimento e são formadas em toda a extensão do tronco procumbente, mas ocorre maior

concentração destas no ponto de emergência do tronco. Nas folhas, os folíolos são dispostos em um mesmo plano sobre a raque, conferindo aspecto liso às folhas, uma das principais diferenças entre o caiaué e a palma de óleo. O comprimento das folhas é muito variável. De maneira geral, uma planta adulta pode conter até 42 folhas funcionais e seu comprimento pode variar de 4,2 a 7,4 m (CORLEY; TINKER, 2003; CUNHA et al., 2009).

Quanto ao aspecto reprodutivo, o caiaué é uma planta monoica, cujas flores masculinas e femininas são produzidas em diferentes ciclos sexuais (CUNHA et al., 2009). Em condições de campo, a ocorrência de alogamia é da ordem de 95%, enquanto que a autofecundação é de 5%, aproximadamente (RAMOS, 2006).

As inflorescências do caiaué são protegidas pela espata, que são espádices compostas por espigas, formadas na axila de cada folha. A inflorescência feminina é envolta por duas espatas protegendo a raque floral, que apresenta comprimento de 15 a 30 cm, suportando as ráquulas que medem de 4 a 9 cm de comprimento, terminadas em ápice não-pontiagudo (CUNHA et al., 2009).

A flor feminina é formada por seis pétalas rodeadas por duas ou três pequenas brácteas e mede cerca de 8 mm de comprimento e 6 mm de largura. O ovário é trilocular, apresentando três estigmas persistentes, que são de coloração amarelo-esverdeada quando imaturos e vermelho-alaranjada após a antese (CUNHA et al., 2009).

A inflorescência masculina está disposta sobre uma raque floral de 10 a 15 cm de comprimento, em espiral, contendo entre 40 a 200 ráquulas, medindo 8 a 14 cm de comprimento e aproximadamente 1 cm de diâmetro (CORLEY; TINKER, 2003; CUNHA et al., 2009) e sempre protegida pela espata.

Quanto às exigências agroclimáticas, o cultivo da espécie é favorecido pela ocorrência de temperaturas entre 24 e 28°C, número de horas de insolação

próximo de 2.000 ao ano e nunca inferior a 1.500 horas (BARCELOS et al., 1995; BASTOS, 2000). A umidade relativa deve situar-se na faixa de 75 a 90%, e a pluviosidade favorável é de cerca de 2.000 mm/ano, regularmente distribuída. Em geral, as variações pluviométricas anuais se refletem na definição do sexo das inflorescências e na produção dos cachos no intervalo de até 28 meses, além da redução da emissão foliar. A distribuição uniforme da água melhora a proporção entre os sexos (feminino/total da produção da inflorescência) e ocorre uma redução na taxa de aborto das inflorescências imaturas (BASTOS, 2000; CARR, 2011).

O caiaué tem sido utilizado nos programas de melhoramento genético da palma de óleo desde 1927. No Brasil, extensas coletas de germoplasma foram realizadas na região Amazônica desde o início dos anos 1980, pela Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Brasil) e pelo CIRAD (Centro de Cooperação Internacional em Pesquisa Agronômica para o Desenvolvimento, França), objetivando formar um banco de germoplasma que constitui atualmente uma valiosa fonte de material genético (BASTOS, 2000).

Os materiais reunidos desde a década de 80 formam uma das mais completas coleções de germoplasma de caiaué mantidas na América do Sul. O Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da espécie foi agrupado de acordo com o local de origem, em 6 grupos: Grupo I (Rio Solimões), Grupo II (Rio Negro) próximo à região de Manaus-AM, Grupo III (Rio Madeira) neste grupo cerca de 70% das subamostras foram coletadas em “terra preta de índio”, áreas com alta fertilidade do solo, Grupo IV (Rio Amazonas), Grupo V (BR 174) ao longo do eixo rodoviário Manaus-AM – Boa Vista-RR, coleta feita na região de Caracaraí - RR, no km 490 da rodovia e estradas vicinais e Grupo VI (Manaus). O material do Grupo V se caracteriza morfológicamente por apresentar plantas de altura reduzida (Barcelos, 1986). Segundo Cunha et al. (2009), a região mais bem representada na coleção é a do Rio Madeira (Manicoré).

O cultivo do caiaué ainda não é viável economicamente devido ao seu baixo rendimento de óleo, que corresponde aproximadamente 25% do total produzido pelo *E. guineensis* (OOI et al., 1981). No entanto, as duas espécies se hibridizam com facilidade, gerando descendentes férteis, com rendimentos em torno de 90% daquele obtido com a de palma comercial (MORETZSOHN et al., 2002), os quais se constituem em uma importante fonte de variabilidade genética a ser explorada pelos melhoristas (BARCELOS, 1986; HARTLEY, 1986; ALVES et al., 2011).

Resultados preliminares de cruzamentos interespecíficos entre *E. oleifera* x *E. guineensis* indicam claramente que algumas das populações mais promissoras, como por exemplo o híbrido BRS Manicoré, são capazes de atingir uma produção de cachos igual ou superior à palma de óleo e com taxa de extração de óleo na indústria em torno de 20% (BARCELOS, 1998).

Em palmeiras, nos últimos anos, uma ampla gama de estudos ontogenéticos têm sido desenvolvidos com diversos objetivos. Estas informações são muito profícuas, uma vez que o sistema reprodutivo em palmeiras é um indicador útil das relações filogenéticas e dos eventos evolutivos que ocorrem nas espécies (ADAM et al., 2005).

Dentre os estudos sobre anatomia floral em palmeiras, podemos citar o trabalho de KAHN; GLUCHY (2002), em que esses analisaram a variabilidade morfológica das flores pistiladas de *Astrocaryum urostachys* em regiões da Amazônia equatoriana, encontrando pouca variabilidade dos caracteres morfoanatômicos do desenvolvimento floral e da inflorescência. Guevarae Jáuregui (2008) estudaram a estrutura anatômica de flores estaminadas e pistiladas de *Cocos nucifera* e observaram, além da estrutura floral, que as flores desta espécie apresentam um conjunto de caracteres anatômicos que dificulta a predação.

Perera et al. (2010) estudaram os primeiros estádios de desenvolvimento da inflorescência e da flor em *C. nucifera* L. e observaram que o desenvolvimento reprodutivo em coco consiste em uma sequência de eventos individuais que abrangem mais de dois anos. Morfogênese floral é o maior evento, levando cerca de um ano, enquanto a determinação do sexo é um processo rápido que ocorre dentro de um mês. Os autores identificaram três fases principais do desenvolvimento reprodutivo, sendo: i) a transição da gema axilar em inflorescência axilar; ii) a formação dos botões florais, e iii) a definição do sexo dos botões florais.

Reis (2012), utilizando estudos morfoanatômicos, estudou seis espécies da tribo Cocoseae encontrando ovários triloculares, com um óvulo por lóculo, anátropo, bitegumentado, com presença de compostos fenólicos no tegumento interno.

Estudos da ontogênese em *E. guineensis* são também relatados. Williams e Thomas (1970) estudaram a morfologia floral e observaram a ocorrência de hermafroditismo e anomalias em inflorescências de plantas em diferentes idades. Van Heel, Breure e Mendez (1987) estudaram o desenvolvimento da inflorescência e da flor em *E. guineensis* L., determinando o estágio morfológico em que se define o sexo da inflorescência e confirmando o tipo de ramificação presente na tríade floral corresponde a um cincino. Adam et al. (2005) realizaram uma minuciosa descrição do desenvolvimento da inflorescência de *E. guineensis*, em nível histológico e celular de todos os estágios, partindo do primórdio do eixo central até o completo desenvolvimento da inflorescência.

Os dados de Adam et al. (2005) foram fundamentais para o desenvolvimento do presente trabalho, uma vez que serviram de base para os estudos aqui propostos relativos ao desenvolvimento floral em *E. oleifera*.

REFERÊNCIAS

- ADAM, H. et al. Functional characterization of MADS box genes involved in the determination of oil palm flower structure. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 58, n. 6, p. 1245-1259, Mar. 2007.
- ADAM, H. et al. Reproductive development complexity in the African oil palm (*Elaeis guineensis*, Arecaceae). **American Journal of Botany**, Saint Louis, v. 92, n. 11, p.1836–1852, Nov. 2005.
- ALVES, S. A. O. et al. In vitro protocol optimization for development of interespecific hybrids of oil palm (*Elaeis oleifera* (H.B.K) Cortés x *Elaeis guineensis* Jacq.). **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Amsterdam, v. 2, n. 3, p. 1-6, Aug. 2011.
- ASKGAARD, A. et al. Floral structure in the neotropical palm genus *Chamaedorea* (Arecaceae, Arecaceae). **Anales Del Jardín Botánico de Madrid**, Madrid, v. 65, n. 2, p. 197–210, July/Dec. 2008.
- BAKER, W. J. et al. Phylogenetic relationships among arecoid palms (Arecaceae: Arecaceae). **Annals of Botany, Exeter**, v.108, n. 8, p. 1417-1432, Feb. 2011.
- BACELAR-LIMA, C. G.; MEDONÇA, M. S.; BARBOSA, T. S. T. C. Morfologia floral de uma população de tucumã, *Astrocaryum aculeatum* G. Mey. (Arecaceae) na Amazônia central. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 36, n. 4, p. 407–412, out./dez. 2006.
- BARCELOS, E.; NUNES, C. D.; CUNHA, R. N. V. Melhoramento genético e produção de sementes comerciais de dendeeiro. In: VIÉGAS, I. J.; MÜLLER, A. A. **A cultura do dendeeiro na Amazônia Brasileira**. Belém. Embrapa Amazônia Oriental, 2000. p. 145-174.
- BARCELOS, E. **Étude de la diversité génétique du genre *Elaeis* (*E. oleifera* (Kunth) et *E. guineensis* Jacq.), par marqueurs moléculaires (RFLP et AFLP)**. 1998. 137 p. Tese (Doutorado) – École Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier, France, 1998.
- BARCELOS, E. et al. Dendê. Brasília: Embrapa –SPI, **Coleção Plantar**, Brasília, v. 32, n. 32, p. 10-11, 1995.

BARCELOS, E. **Características genético e ecológicas de populações naturais de caiaué (*Elaeis oleifera* (H.B.K) Cortés na Amazônia Brasileira.** 1986. Dissertação Mestrado. 108 p. Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 1986.

BARCELOS, E. **Características genético e ecológicas de populações naturais de caiaué (*Elaeis oleifera* (H.B.K): cortés na Amazônia Brasileira.** 1986. 108 p. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 1986.

BARFOD, A. S.; HAGEN, M.; BORCHESNIUS, F. Twenty-five years of progress in understanding pollination mechanisms in palms (Arecaceae). **Annals of Botany**, Saint Louis, v. 108, n. 2, p. 1503–1516, Feb. 2011.

BARFOD, A. S.; UHL, N. W. Floral development in *Aphandra* (Arecaceae). **American Journal of Botany**, Saint Louis, v. 88, n. 8, p. 185–195, Aug. 2001.

BASTOS, T. X. Aspectos agroclimáticos do dendezeiro na Amazônia Oriental. In: VIÉGAS, I. J. M.; MÜLLER, A. A. (Ed.). **A cultura do dendezeiro na Amazônia Brasileira.** Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2000. p. 47-59.

BERGAMIN-FILHO, A. et al. Análise temporal do amarelecimento fatal do dendezeiro como ferramenta para elucidar sua etiologia. **Fitopatologia Brasileira**, Lavras, v. 23, n. 3, p. 391-396, set. 1998.

CARR, M. K. V. The water relations and irrigation requirements of oil palm (*Elaeis guineensis*): a review. **Experimental Agriculture**, Cambridge, v. 47, n. 4, p. 629-652, Sept. 2011.

CHIA, G. S. et al. Repetibilidade da produção de cachos de híbridos interespecíficos entre o caiaué e o dendezeiro. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 39, n. 2, p. 249-254, 2009.

GHESEQUIÈRE, M. Polymorphisme enzymatique chez *Elaeis oleifera* H.B.K. (*E. melanococca*). **Oléagineux**, Paris, v. 42, n. 4, p. 143-150, 1987.

CHOO, Y. M. et al. Recovered oil from palm-pressed fiber: a good source of natural carotenoids, vitamin E and sterols. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Saint Bolder, v. 73, n. 5, p. 599-602, May 1996.

CORLEY, R. H. V.; TINKER, P. B. **The oil palm.** 4. ed. Great Britain: Blackwell Science, 2003.

CUNHA, R. N. V. et al. Domesticação e melhoramento de caiaué. In: BORÉM, A.; LOPES, M. T. G.; CLEMENT, C. R. (Ed.). **Domesticação e melhoramento: espécies amazônicas**. Viçosa: Editora da Universidade Federal de Viçosa. 2009. p. 275-293.

DAHER, A. et al. Cell cycle arrest characterizes the transition from a bisexual floral bud to a unisexual flower in *Phoenix dactylifera*. **Annals of Botany**, Saint Louis, v. 106, n. 2, p. 255–266, June 2010.

DRANSFIELD, J. et al. **Genera palmarum: the evolution and classification of palms**. Richmond: Royal Botanical Gardens, 2008.

DRANSFIELD, J. et al. **Genera palmarum**. 2nd. ed. London: Royal Botanic Gardens, 2007.

DRANSFIELD, J. et al. A new phylogenetic classification of the palm family, *Arecaceae*. **Kew Bulletin**, Richmond, v. 60, n. 4, p. 559–569, Sept. 2005.

EISERHARDT, W. L. et al. Geographical ecology of the palms (*Arecaceae*): determinants of diversity and distribution across spatial scales. **Annals of Botany**, Saint Louis, v. 108, n. 8, p. 1391–1416, Dec. 2011.

GHESEQUIÈRE, M. et al. Enzymatic polymorphism in *Elaeis oleifera* HBK (*E. melanococca*): analysis of populations in the amazon basin. **Oleagineux**, Paris, v. 42, n. 4, p. 151-153, 1987.

GIDDEY, A.; SPICHIGER, R. E.; STAUFFER, F. W. Comparative floral structure and systematic in the Asian palm genus *Raphis* (*Arecaceae*, *Coryphoideae*). **Flora Morphology**, Freiberg, v. 204, n. 5, p. 347–357, Jan. 2009.

GUEVARA, L.; JÁUREGUI, D. Anatomía floral de *Cocos nucifera* L. (*Arecaceae*, *Arecoideae*). **Acta Botanica Venezuelica**, Caracas, v. 31, n. 1, p. 35–48, June 2008.

HARDON, J. J.; RAO, V.; RAJANAIDU, N. A review of oil-palmbreeding. In: RUSSELL, G. E. (Ed.). **Progress in plant breeding**. London: Butterworths, 1985. p. 139–163.

HARTLEY, C. W. S. **La palma de aceite**. 2. ed. México: Continental, 1986.

JALANI, B. S. Improvement of oil through breeding and biotechnology. **Journal of the American Chemists Society**, Saint Boulder, v.74, n. 11, p. 1451-1455, May 1997.

KAHN, F.; GLUCHY, D. Variation in morphology of the pistillate flower of *Astrocaryum urostachys* (Palmae) in Amazonian Ecuador. **Nordic Journal of Botany**, Lund, v.22, n. 3, p. 353–360, Mar. 2002.

KÜCHMEISTER, H.; SILBERBAUER-GOTTSBERGER, I.; GOTTSBERGER, G. Flowering, pollination nectar standing crop, and nectaries of *Euterpe precatoria* (Arecaceae), an Amazonian rain forest palm. **Plant Systematics and Evolution**, Jena, v. 206, n. 1-4, p. 71–97, Mar. 1997.

LUBRANO, C.; ROBIN, J. R. Major compounds study in fruit pulp oils of six Guiana Palms species. **Acta Botanica Gallica**, França, v. 144, p. 495-499, 1997.

MARCATO, A. C.; PIRANI, J. R. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: palmas (Arecaceae). **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 19, p. 45-54, 2001.

MASMOUDI-ALLOUCHE, F. In vitro hermaphroditism induction in date palm female flower. **Plant Cell Reports**, Bélgica, v. 28, n. 1, p. 1–10, 2009.

MEUNIER, J. Le palmier de huile americain, *Elaeis melanococca*. **Oléagineux**, Paris, v. 30, n. 2, p. 51-62, Jan. 1975.

MICHELSE, B. C.; MARTIJN, R. E. P. Pathogen profile update: *fusarium oxysporum*. **Molecular Plant Pathology**, Malden, v. 10, n. 3, p. 311–324, May 2009.

MIRANDA, I. P. A. et al. Frutos de Palmeiras da Amazônia. **Creative**, Manaus, v. 1, p. 120, 2001.

MITCHELL, C. H.; DIGGLE, P. K. The evolution of unisexual flowers: morphological and functional convergence results from diverse developmental transitions. **American Journal of Botany**, Saint Louis, v. 97, n. 7, p. 1068–1076, July 2005.

MORETZSOHN, M. C. Genetic diversity of Brazilian oil palm (*Elaeisoleifera* H.B.K.) germplasm collected in the Amazon Forest. **Euphytica**, Wageningen, v. 124, n. 1, p. 35-45, 2002.

MULLER, A. A.; ALVES, R. M. Avaliação de materiais genéticos de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) no Estado do Pará: uma alternativa desolução para o amarelecimento fatal. Belém, PA: Embrapa CPATU, (Embrapa CPATU. **Pesquisa em Andamento**, Belém, v. 174. 5p. 1998.

OOI, S. C. et al. Oil palm genetic resources native *E. oleifera* populations in Brazil offer promising sources. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 16, n. 3, p. 385-395, maio/jun. 1981.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO. Disponível em:<www.fao.org>. Acesso em: 02 maio 2012.

PERERA, P. I. P. et al. Early inflorescence and floral development in *Cocosnucifera* L. (Arecaceae: Arecoideae). **South African Journal of Botany**, Matieland, v. 76, n. 3, p. 482–492, 2010.

RAMOS, E. J. A. **Potencial produtivo de híbridos interespecíficos entre dendezeiro e caiauezeiro nas condições do Nordeste Paraense**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2006.

REIS, S. B. **Estrutura floral de espécies da tribo Cocoseae e aliados (Arecaceae)**. 2012. 60 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal)-Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

RENARD, J. L.; NOIRET, J. M.; MEUNIER, J. Sources and ranges of resistance to *Fusarium* wilt in the oil palms *Elaeis guineensis* and *Elaeis melanococca*. **Oléagineux**, Paris, v.35, n. 8-9, p. 387–392, 1980.

RUDALL, P. J. et al. Floral anatomy in *Dypsis* (Arecaceae-Arecaeae): a case of complex synorganization and stamen reduction. **Botanical Journal of the Linnean Society**, Oxford, v. 143, n. 2, p. 115–133, Oct. 2003.

SALM, R. et al. Cross-scale determinants of palm species distribution. **Acta Amazonica**, Manaus, v.37, n. 1, p. 17–26, jan./mar. 2007.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**. Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Ed. 2. Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, Nova Odessa, 2008.

TAM, T. K. **The oil palm and other characteristics of interspecific (*Elaeis guineensis* x *E. oleifera*) hybrids planted in Malaysia and their significance for future breeding programmes.** International Developments in Oil Palm (Earp, D A and Newall, W eds.) Incorporated Society of Planters. Kuala Lumpur. p. 27-38, 1977.

TOMLINSON, P. B. **The Structural Biology of Palms.** Oxford: Clarendon Press, Oxford University Press, 1990.

VAN HEEL, W. A.; BREURE, C. J.; MENDEZ, T. The early development of inflorescences and flowers of the oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) seen through the scanning electrons microscope. **Blumea**, Leiden Branch, v. 32, p. 67-78, 1987.

WILLIAMS, C. N.; THOMAS, R. L. Observations on sex differentiations in the oil palm, *Elaeis guineensis* L. **Annals of Botany**, Saint Louis, v. 32, n. 4, p. 957-963, 1970.

ZONA, S. Raphides in palm embryos and their systematic distribution. **Annals of Botany**, Saint Louis, v. 93, n. 4, p. 415-421, Feb. 2004.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS**ARTIGO 1 Caracterização do desenvolvimento floral da palma de óleo americana por técnicas microscópicas**

Marcelo Picanço de Farias⁽¹⁾, Manoel Teixeira Souza Júnior⁽²⁾, Rosana Falcão⁽³⁾, Raimundo Nonato Vieira da Cunha⁽⁴⁾, Julcéia Camillo⁽⁵⁾, Guy de Capdeville⁽²⁾

⁽¹⁾Universidade Federal de Lavras, *Campus* Universitário, CEP 37200-000 Lavras, MG. E-mail: mpfarias@gmail.com ⁽²⁾Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica - PqEB s/nº - W3 Norte (final), CEP 70770-901, Brasília, DF. E-mail: manoel.souza@embrapa.br, guy.capdeville@embrapa.br ⁽³⁾Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – Parque Estação Biológica - PqEB - Av. W5 Norte (final), CEP 70770-917 Brasília, DF. E-mail: rosana.falcao@embrapa.br ⁽⁴⁾Embrapa Amazônia Ocidental, Rodovia AM-010, Km 29, Zona Rural, Caixa Postal 319, CEP: 69010-970 Manaus, AM. E-mail: raimundo.cunha@cpaa.embrapa.br ⁽⁵⁾Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, CEP 70910-900 Brasília, DF. E-mail: julceia@gmail.com.

Artigo preparado de acordo com as normas para submissão da Pesquisa Agropecuária Brasileira

Resumo – O objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização da estrutura anatômica do sistema reprodutivo do Caiaué (*Elaeis oleifera* (Kunth) Cortés) em nível celular, partindo do primórdio da inflorescência até o desenvolvimento completo da flor das subamostras de origem BR 174, Coari e Manicoré. As inflorescências e flores foram coletadas, fixadas e embebidas em resina Technovit 7100® ou parafina. Cortes ultrafinos transversais das inflorescências foram realizados para comparação entre as subamostras com microscopia de luz e para fotodocumentação utilizando objetivas de 10X até 40X. Para Microscopia Eletrônica de Varredura, fez-se dissecação das flores e de partes da inflorescência. As imagens foram obtidas utilizando microscópio de luz Axiophot Zeiss e Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) Zeiss DSM 962. Observou-se que as subamostras estudadas apresentaram os mesmos padrões de desenvolvimento floral, no entanto ocorreram variações pontuais e temporais entre elas. O caiaué apresentou as mesmas estruturas e fases de desenvolvimento encontradas para a palma de óleo.

Termos para indexação: *Elaeis oleifera*, anatomia, inflorescência, morfologia.

Microscopy characterization of floral development of american oil palm

Abstract - The objective of this study was to characterize the anatomical structure of the reproductive system caiaué (*Elaeis oleifera* (Kunth) Cortés) at the cellular level, starting from the inflorescence primordium until the complete development of the flower of the subsamples of origin BR 174, Coari and Manicoré. The inflorescences and flowers were collected, fixed and embedded in Technovit 7100 ® resin or paraffin. Ultrathin cross-sections of inflorescences were performed to compare the subsamples with light microscopy and photo documentation using objectives of 10X to 40X. For scanning electron microscopy studies, flowers and inflorescence parts were dissected and analyzed using a Zeiss Axiophot light microscope and the Scanning Electron Microscope (SEM) Zeiss DSM 962. The images obtained showed that the subsamples studied had the same pattern of floral development, however specific and temporal variations occurred between them. The caiaué showed the same structures and stages of development found for palm oil.

Index terms: *Elaeis oleifera*, anatomy, inflorescence, morphology.

Introdução

O caiaué (*Elaeis oleifera*) e o dendê (*Elaeis guineensis*) pertencem à família Arecaceae, a qual possui 2.800 espécies e cerca de 190 gêneros com distribuição pantropical (Tomlinson, 1990). Os centros de diversidade da família Arecaceae estão localizados na Malásia e América do Sul (Eiserhardt et al., 2011), locais de umidade elevada, com regime pluviométrico acima de 2.000 mm/ano (Salm et al., 2007). As espécies de Arecaceae possuem grandes diferenças morfológicas em seus órgãos vegetativos e reprodutivos, por apresentarem tais características estas têm a capacidade de se adaptarem aos mais variados *habitats* (Dransfield et al., 2008).

As populações naturais de Caiaué podem ser encontradas desde a América Central até o norte da América do Sul (Ghesquière et al., 1987). A palmeira Caiaué tem tronco do tipo estipe e porte baixo, medindo até cinco metros. Nas folhas, os folíolos são dispostos em um mesmo plano sobre a raque, conferindo aspecto crespo às folhas, diferente da palma de óleo. Uma planta adulta pode conter até 42 folhas funcionais, com comprimento entre 4,2 e 7,4 m (Corley & Tinker, 2003; Cunha et al., 2009). É uma planta monoica, cujas flores masculinas e femininas são produzidas em diferentes ciclos sexuais (Cunha et al., 2009).

O interesse nessa espécie *E. oleifera* baseia-se em diversos fatores, como o porte reduzido (Corley & Tinker, 2003) e a alta qualidade do óleo, que possui maior teor de ácidos graxos insaturados que a palma de óleo/dendê (78% vs. 48%) (Ramos, 2006). Segundo Choo et al. (1996), o óleo do caiaué também possui um alto teor de caroteno, cerca de 3.000 ppm (vs. 700 ppm em dendê), além de possuir uma alta concentração de

vitamina E (700-1.500 ppm), esteróis (3.500– 4.000 ppm) e elevados níveis de tocotrienóis (Lubrano & Robin, 1997). Adicionalmente, a tolerância a terrenos úmidos e a resistência ao ataque de pragas e doenças, em especial ao Amarelecimento Fatal (AF) – que é o maior problema do cultivo da palma de óleo na América (Bergamin Filho et al., 1998) e ao *Fusarium* sp. – doença que atinge a palma de óleo na África (Michielse et al., 2009), aumentam a relevância da espécie para o melhoramento genético da palma de óleo.

Elaeis oleifera apresenta relativa facilidade de hibridação com *E. guineensis*, produzindo grande variabilidade genética em híbridos interespecíficos (HIE) (Alves et al., 2011). Segundo Cunha et al. (2009), esta variabilidade favorece a seleção de indivíduos que reúnam as características favoráveis das duas espécies.

A Embrapa deu início ao programa de melhoramento na década de 1980, com o objetivo de desenvolver cultivares de híbridos interespecíficos (HIE) tão produtivos quanto as da palma de óleo africana. Em 2010, a Embrapa lançou o cultivar de HIE Manicoré recomendado para área de incidência de AF (Cunha & Lopes, 2010).

Considerando as importantes diferenças acima mencionadas e, considerando ainda que não existe nenhum estudo descrevendo o desenvolvimento das estruturas reprodutivas em *E. oleifera*, o objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização da estrutura anatômica do sistema reprodutivo *E. oleifera* (Kunth) Cortés em nível celular, partindo do primórdio da inflorescência até o desenvolvimento completo da flor.

Material & Métodos

O material para o estudo foi coletado no Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da palma de óleo da EMBRAPA/CPAA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária/Centro de Pesquisas Agroflorestais da Amazônia Ocidental) na Estação Experimental do Rio Urubu - localizado no município de Rio Preto da Eva – AM, com latitude 2°35' S, longitude 59°28' W e altitude 200 m. O clima de acordo com a classificação de Köppen é do tipo Ami: quente úmido, tropical chuvoso, com variação anual de temperatura inferior a 5°C sem definição de estações verão e inverno. A temperatura média anual é de 27°C, com temperatura média máxima de 32°C e mínima de 21°C. A umidade relativa média anual é de 85% e a insolação média total anual é de 1.940 horas. A pluviosidade anual média é de aproximadamente 2.100 mm (Agritempo, 2012). Segundo a classificação brasileira de solos, o tipo de solo é do tipo Latossolo amarelo de textura muito argilosa 2:1 (Miranda et al., 2003).

Foram coletadas inflorescências em diferentes estádios de desenvolvimento reprodutivo. As subamostras das três origens BR 174, Coari e Manicoré, cujas plantas com idades de 26, 8 e 26 anos, respectivamente. O número atribuído às inflorescências foi correspondente ao número atribuído às folhas, seguindo o diagrama da filotaxia da palma de óleo (Figura 1).

No presente trabalho foi feita a coleta individual de inflorescências localizadas entre a folha -30 e a folha +22, conforme escala definida por Henry (1955). As inflorescências -30 até 0 foram

fixadas inteiras, sem dissecação. Entre as inflorescências +1 até +11 a ráquila foi retirada da ráquis e fixada. Nas inflorescências localizadas entre a folha +12 e a +22, as flores em formação foram retiradas individualmente da ráquila e fixadas.

A fixação das inflorescências foi feita em paraformaldeído a 4%, em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, com pH 7,0. O material foi submetido a vácuo por 1h e mantido por 24h em temperatura de 4°C. As amostras foram desidratadas em séries etanólicas com graduação crescente (20, 30, 40, 70, 90 e 100%, v/v) durante 2h e mantidas a 4°C.

Para as análises histológicas, as amostras foram fixadas em FAA 70 (FAA 70 - formol 40%, 5 mL; álcool 70%, 90 mL e ácido acético glacial, 5 mL) durante 48h, desidratadas por meio de uma série etanólica com graduação crescente (30, 50, 70, 95 e 100%, v/v) por 2h em cada solução e então infiltradas com dois tipos de resinas. Parte das amostras foi infiltrada em resina Technovit 7100® (LKB Pharmacia, Uppsala, Sweden) segundo o protocolo do fabricante. Para a montagem das lâminas, os blocos foram cortados em secções de 3,5 µm de espessura utilizando ultramicrótomo (Leica Ultracut UCT), sendo os cortes coletados em lâminas de vidro. As secções foram coradas com solução aquosa de azul de toluidina a 1% e montadas em Permount. Após montadas, as lâminas foram analisadas e fotodocumentadas em microscópio de luz Axiophot 2 Zeiss. A outra parte das amostras foi infiltrada com Paraplast X-Tra® utilizando a seguinte metodologia: as amostras foram desidratadas em etanol 95% (v/v) por 30 min seguindo-se três passagens em etanol absoluto por 30 min cada e então imersas por 45 min em solução etanol absoluto: xileno, 1:1 e 3 vezes em xileno 100%

por 45 min. Após a infiltração, pastilhas de Paraplast X-Tra[®] foram adicionadas na solução a cada 2h. As amostras foram transferidas para estufa a 55°C e 1/3 do volume dos frascos foi substituído por Paraplast X-Tra[®] líquido por 3 vezes, em intervalos de aproximadamente 4h. A mistura de parafina/xileno foi substituída por Paraplast X-Tra[®] líquida pura e o material vegetal foi então emblocado. As amostras foram preparadas em formas de alumínio em placa aquecedora a 55°C, e colocadas para polimerizar em temperatura ambiente por 24 horas.

Para a montagem das lâminas, os blocos foram cortados em secções de 7 µm de espessura em micrótomo rotativo (Leica, RM 2145, Alemanha). As secções foram coradas com solução alcoólica de Fast Green a 1% e montadas em Permount. As lâminas preparadas foram observadas ao microscópio de luz Axiophot Zeiss.

Posteriormente as amostras foram desidratadas em três séries de etanol absoluto, secas em ponto crítico Balzers (CPD 020, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein), aderidas com fita dupla-face de carbono a um suporte adequado (stubs) e submetidas ao recobrimento com uma camada de 20 nm de ouro utilizando o metalizador Sputtering Bal-Tec (Manchester, New Hampshire, USA) e finalmente visualizadas em Microscópio Eletrônico de Varredura modelo Zeiss DSM 962, utilizando-se 80 µA de amperagem e 10 kV de voltagem.

Resultados e Discussão

O início do desenvolvimento das inflorescências em *E. oleifera* ocorre entre 24 a 36 meses antes da antese. O seu desenvolvimento acompanha o das folhas, uma vez que toda a estrutura da inflorescência está inserida nas axilas das mesmas, sendo contínuas e envoltas por uma bráctea modificada. Em *E. guineensis* o período de desenvolvimento observado da inflorescência é semelhante ao de *E. oleifera* (Adam et al., 2005). Perera et al. (2010) mostraram que em *Cocos nucifera* o período entre o surgimento do primórdio da inflorescência e a antese foi de dois anos.

O meristema da inflorescência no estágio foliar -30 das subamostras das origens Coari e Manicoré foi mais desenvolvido comparativamente a subamostra de BR174 (Figura 2a), uma vez que a cúpula meristemática apical deste último se desenvolve apenas no estágio -24. Esta diferença no desenvolvimento pode ser alterada por condições extrínsecas como condições ambientais e intrínsecas como a idade das plantas e genótipo. Em *E. guineenses*, sob condições ambientais favoráveis e em plantas jovens (9 anos), um primórdio de meristema foliar é emitido a cada duas semanas. Em plantas velhas (20 anos) este período passa a ser de uma folha por mês (Corley & Tinker, 2003).

As inflorescências das subamostras de origem BR174, Coari e Manicoré possuem crescimento do tipo pleonântico correspondendo a um padrão encontrado para a tribo Cocoseae (Dransfield et al., 2008), uma vez que estas se desenvolvem a partir de meristemas interfoliares. Outros estudos mostraram que o desenvolvimento das inflorescências em outros

gêneros da família *Cocoseae* é muito semelhante (Adam et al., 2005; Dransfield et al., 2005; Perera et al., 2010). As inflorescências das subamostras das origens BR 174, Coari e Manicoré estão dispostas em panículas, como ocorre com as demais espécies de *Cocoseae* (Dransfield et al., 2008), possuindo um maior número de ramificações nas raques, que parece ocorrer em menor frequência nas espécies pertencentes à família *Arecaceae*.

A inflorescência é composta por um eixo central, a ráquis, que mede entre 9 a 25 cm de comprimento, e possui inflorescências masculinas que contêm entre 20 e 200 ráquias. Quando a espécie possui inflorescências femininas, estas contêm entre 100 e 170 ráquias. A inflorescência masculina se desenvolve podendo atingir um comprimento de 40 cm, semelhante ao da inflorescência feminina na maturidade. Ambas são compostas por ráquias, sendo que cada uma possui entre 1.400 a 1.600 flores estaminadas e aproximadamente 35 flores pistiladas. Brácteas florais protegem as flores, sendo aquelas que protegem as flores masculinas menores em relação às que protegem as flores femininas.

As inflorescências das subamostras aqui estudadas possuem uma bráctea diferenciada, também chamada de espata, que se torna lignificada quando exposta e que envolve toda a inflorescência. Ela é composta pela bráctea peduncular e pelo profilo, estas são umas das características consideradas sinapomórficas para a tribo *Cocoseae* (Dransfield et al., 2008). Ambas as estruturas (bráctea e profilo) são folhas modificadas utilizadas como uma espécie de proteção da inflorescência, tornando-se fibrosas com a progressão do seu desenvolvimento, até sofrerem necrose do tecido. Em *Arecaceae*, as brácteas e o profilo são diferentes ou até

mesmo inexistentes entre os grupos e, segundo Dransfield et al. (2008), podem ter se desenvolvido para a proteção das inflorescências e parece haver uma tendência de redução do comprimento e largura dessas estruturas. O perfil e o pedúnculo da bráctea atingem cerca de 45 cm de comprimento. Segundo Adam et al. (2005), em *E. guineensis* o meristema do perfil surge no estágio foliar -24 enquanto, no presente estudo, para as subamostras de Coari e Manicoré, este surgiu nos estádios foliares -23 e -25, respectivamente (Figura 2b).

Os meristemas da inflorescência, o da ráquila e o floral, quando ativados para a produção dos seus respectivos órgãos, possuem padrões de desenvolvimento semelhantes das camadas celulares. A camada L2 funciona como uma espécie de reservatório de células, realizando a reposição continuamente, dando origem a meristemas laterais, que por sua vez se desenvolvem em novos órgãos. Padrão semelhante de desenvolvimento celular foi observado em *E. guineensis* (Adam et al., 2005) e em *C. nucifera* (Perera et al., 2010).

As camadas exteriores de células na periferia da cúpula, por meio de divisões anticlinais, são responsáveis pelo aumento do diâmetro da mesma, que irão dar origem a outros órgãos, como brácteas e ráquias (Figura 2c). Já as células do centro da cúpula realizam divisões periclinais, aumentando o comprimento do eixo da ráquis. Nas espécies *E. guineensis* e *C. nucifera*, comparativamente a *E. oleifera*, são encontrados os mesmos padrões de desenvolvimento celular da protoderme, inclusive em meristemas apicais de folhas (Adam et al., 2005; Perera et al., 2010; Jouannic et al., 2011).

Nas subamostras BR174, Coari e Manicoré, o surgimento do meristema da ráquila, foi observado na folha -6 (Figura 2d). Neste estágio não houve diferença entre as subamostras, sendo possível observar que todos os meristemas da ráquila iniciaram juntos o seu desenvolvimento. Entretanto, na folha -5 de Coari (Figura 2e), a taxa de desenvolvimento do meristema da ráquila é mais rápida, possibilitando observar a estrutura da bráctea floral.

A ráquila tem início na base das brácteas laterais, com crescimento do eixo da ráquila realizado por divisões anticlinais e o desenvolvimento das ráquulas se dá de forma acrópeta (Figura 2f). Os resultados indicam que o desenvolvimento da inflorescência consiste de várias fases de expansão, com taxas de crescimento lento e rápido alternados em ciclos, como descrito por Adam et al. (2005) em *E.guineensis*. Perera et al. (2010) trabalhando com *C. nucifera* observaram que existem dois tipos distintos de taxa de crescimento, associados a diferentes tipos de células.

As ráquulas produzem um número maior de brácteas florais (Figura 3a) quando a inflorescência é masculina e brácteas florais em menor número, quando se trata de uma inflorescência feminina. Cada bráctea contém um meristema floral em sua axila, esta observação foi feita na folha +2 (Figura 3b). O meristema da ráquila possui a mesma organização do meristema da ráquis. Nestes, há uma região mais superficial caracterizada pela organização das células em três camadas sobrepostas L1, L2 e L3 (do inglês *Layer1*, *Layer2* e *Layer3*) (Vaughan, 1955) (Figura 3b).

O meristema da ráquila possui uma forma cônica e na sua periferia apresenta algumas divisões periclinais nas células adjacentes à camada L1. Estas divisões mais tarde darão origem às brácteas florais, que têm seu desenvolvimento acrópeto. As células que compõe a cúpula meristemática possuem as seguintes características: tamanho reduzido com formas isodiamétricas, alta relação núcleo-citoplasmática, núcleo central, coloração intensa e nenhum vacúolo presente.

As tríades florais encontradas nas subamostras aqui estudadas são características da subfamília Arecoideae (Dransfield et al., 2008). Em *E. oleifera* a tríade floral é constituída por dois estames laterais e uma flor pistilada central, ladeadas pela bractéola 1. Este é o mesmo padrão encontrado para *E. guineensis* (Adam et al., 2005). As flores estão dispostas em espiral em torno do eixo da ráquila. O desenvolvimento da tríade floral nas subamostras estudadas se dá inicialmente pelo desenvolvimento das flores estaminadas seguida da flor pistilada. Uhl (1976) trabalhando com o gênero *Ptychosperma* e Adam et al. (2005) com *E. guineensis*, encontraram a mesma ordem de desenvolvimento da tríade floral.

A sequência de desenvolvimento observada ilustra que a tríade floral é simpodial e helicoide. Um novo meristema surge na axila da bráctea floral, formado inicialmente pelo meristema da ráquila. Isto ocorre na folha +2 de todas as subamostras. Este meristema apresenta uma nova forma no ápice, a bracteóla 1, e desenvolve-se então em uma flor estaminada 1, na folha +3 (Figura 3c). Cada flor tem na sua base uma bractéola.

Durante o desenvolvimento da ráquila, as células dos tecidos centrais possuem um núcleo pequeno e o citoplasma corresponde ao maior volume celular (Figura 3e), neste estágio, o sexo da inflorescência pode ser identificado nas três subamostras estudadas. O primórdio meristemático da flor feminina é maior em relação ao da flor masculina, além disso, a inflorescência feminina apresenta um menor número de flores por ráquila. Os estudos com *E. guineensis* para identificar a diferenciação sexual floral foram realizados inicialmente por Van Heel et al. (1987), Corley & Tinker (2003) e Adam et al. (2005). Nesses estudos os autores observaram as diferentes características anatômicas, como o número de brácteas e o número de flores inserido na base das ráquulas, comparando entre inflorescência masculina e feminina.

A flor feminina continua o seu desenvolvimento na axila da bractéola 1, onde um novo ápice surge e dá origem a duas bractéolas antes de desenvolver uma flor estaminada, folha +6 (Figura 3f). Durante o seu desenvolvimento, os pedúnculos das flores estaminadas alongam-se até o seu amadurecimento (Figura 4a). A partir deste momento, as flores estaminadas começam a sofrer necrose, até que são totalmente degradadas antes da antese da flor pistilada. Segundo Baker et al. (2011), a família Arecaceae é um grupo importante para se estudar as variações da diclinia e da dicogamia, já que ambas são predominantes dentro deste clado.

A variação na diclinia foi observada nas subamostras estudadas, com presença de estaminódios em diferentes graus de desenvolvimento. Em *E. guineensis* (subtribo Elaeidinae) (Adam et al., 2005) e *Astrocaryum aculeatum* (subtribo Bactridinae) (Bacelar-Lima et al., 2006), as flores são diclinas e possuem estaminódios. Segundo Dransfield

et al. (2008), as flores em Arecaceae tendem à diclinia e em quase totalidade das subfamílias pode-se encontrar espécies diclinas e monoclinas. Entre as flores pistiladas é comum observar estaminódios (Mitchell & Diggle, 2005) e tal característica é relatada em diversas espécies de Arecaceae (Dransfield et al., 2008). Em *E. oleifera* foi constatada a presença dessa estrutura nas flores pistiladas em todas as subamostras. A taxa de crescimento e desenvolvimento dos estaminódios é muito maior do que o observado para o pistilo, sendo que, em dado momento, o estaminódio cessa o seu desenvolvimento e necrosa antes da antese da flor pistilada.

Observações realizadas nas subamostras BR174, Coari e Manicoré indicam que a tríade floral surge a partir de um único meristema, formando um conjunto de flores simpodiais. Segundo Tomlinson (1990), a tríade floral representa uma característica ancestral da tribo Cocoseae. Dentro desta tribo, foram caracterizados diferentes modos de organização da inflorescência. Em *Beccariophoenix madagascariensis*, a inflorescência possui flores de ambos os sexos, apresentando tríades florais em quase sua totalidade, com exceção de alguns pares de flores masculinas localizados na extremidade distal. Este é considerado um grupo de gêneros menos especializados dentro da tribo Cocoseae (Uhl, 1988). Outro modo de organização ocorre com um dos maiores membros especializado da tribo Cocoseae, *Polyandrocos pectinatus* (Uhl, 1988). Esta espécie possui uma separação espacial das flores estaminadas mais acentuada (na extremidade distal da inflorescência) e tríades na base da inflorescência, permitindo assim a ocorrência de alogamia. Já, em *Cocos nucifera*, as flores estaminadas e pistiladas são separadas, tanto

espacialmente quanto temporalmente, dentro da mesma inflorescência (Tomlinson, 1990; Perera et al., 2010).

Segundo Adam et al. (2005), dentro da tribo Cocoseae, a espécie *E. guineenses* é considerada a mais evoluída, uma vez que sua dioiccia é realizada em separado, produzindo flores masculinas e femininas na mesma planta, mas separadas em inflorescências masculinas e femininas. Esta característica também foi observada em *E. oleifera*, nas subamostras BR 174, Coari e Manicoré. No entanto, é possível observar na inflorescência feminina estames não funcionais. Uma explicação para a presença de estames não funcionais é a representação de um estágio intermediário de uma progressão evolucionária que envolve a perda da tríade floral ancestral para dar lugar a inflorescências unissexuais plenas (Dransfield et al., 2008).

No estágio de folha +10, os órgãos começam a se desenvolver nas flores estaminadas a partir do início e desenvolvimento das sépalas. Após iniciar e desenvolver as três pétalas, o meristema floral inicia os primórdios dos estames. Nesta fase não se observa qualquer desenvolvimento da flor pistilada.

Os órgãos florais são submetidos a alongamento através de divisões celulares em suas bases. O desenvolvimento de estames é favorecido da divisão de células ativas em suas regiões superiores, dando origem às anteras. As flores estaminadas não funcionais são maiores em relação à flor pistilada neste momento (Figura 4a), porém, durante a próxima fase de desenvolvimento, a flor pistilada aumenta o seu tamanho e a flor estaminada permanece do mesmo tamanho da fase anterior (Figura 4b). Nas inflorescências femininas da maioria das espécies das

subtribos Salacinae e Calaminae, ambas pertencentes à subfamília Calamoideae, as flores pistiladas produzem também estames não funcionais (Barfod et al., 2011).

O perianto trímero, encontrado nas flores pistiladas e estaminadas das tribos Cocoseae, Reinhardtieae e Roystoneae, é característica esperada para monocotiledôneas (Remizowa et al., 2010). Segundo Dransfield et al. (2008), as espécies de palmeiras possuem cálice e corola distintos. Nas três subamostras estudadas, o cálice é curto e vascularizado. Em outras espécies de Cocoseae, como *E. guineensis* (Elaeidinae) (Adam et al., 2005), em *C. nucifera* (Attaleinae) (Guevara & Jáuregui, 2008, Perera et al., 2010), em *Acrocomia aculeata* (Bactridinae), em *Allagoptera campestris* (Attaleinae) e em *Reinhardtia gracilis* (Reinhardtieae) as sépalas também são vascularizadas.

A tribo Cocoseae apresenta como característica um pistilo composto de três carpelos com um óvulo cada, possui placentação axial, são anátropos e bitegmentados. Essas características são esperadas para espécies de Arecaceae (Dransfield et al., 2008).

Na folha +13 de Coari, é possível a visualização dos três carpelos livres, apresentando o gineceu trilocular e triovular, além dos dois estaminoides (Figura 4c). O desenvolvimento dos órgãos florais internos é realizado por meio de divisões celulares em sua região distal.

Um canal estilar é formado entre os carpelos, estendendo-se desde o estigma até a cavidade do ovário, sendo que este futuramente dará origem ao canal do tubo polínico antes da fertilização (Figura 4d). Na maturidade (folha +18), o perfil e o pedúnculo da bráctea que protegem a inflorescência sofrem ruptura.

O gineceu tricarpelar encontrado nas subamostras estudadas em estádios iniciais de desenvolvimento (+13) é livre, sendo que no final do desenvolvimento é completamente fundido em sua base. A fusão completa dos carpelos é encontrada nas famílias Bactridinae, Roystoneae e Elaeidinae. Em Attaleinae e Reinhardtiae, ocorre uma fusão parcial dos carpelos. Na espécie *C. nucifera* (Attaleinae), os carpelos são livres (Guevra & Jáuregui, 2008; Perera et al., 2010). Em *E. guineensis* (Elaeidinae) (Adam et al., 2005), no início do desenvolvimento, os carpelos estão livres, mas na fase final eles se tornam sincárpicos. Essa característica de diferentes tipos de desenvolvimento dos carpelos livres ou fusionados observados nas espécies da tribo Cocoseae foram elementos para embasar a filogenia proposta por Baker et al. (2011), em que a tribo Roystoneae é irmã de Cocoseae e Reinhardtiae.

Na família Arecaceae, a presença de carpelos livres é descrita para várias espécies (Stauffer et al., 2009) e, segundo Remizowa et al. (2010), é uma condição ancestral que caracteriza inúmeras espécies de monocotiledôneas.

As flores pistiladas de *E. oleifera* possuem formato arredondado e sua coloração varia do amarelo até a cor roxa atingida ao final da polinização. Tais flores são trímeras, heteroclamídeas, com verticilos alternados. O gineceu das subamostras é tricarpelar, sincárpico e com a posição do ovário súpero.

As flores pistiladas são sésseis, apresentam cálice e corola trímeros, actinomorfas, gamossépalas e gamopétalas. O estilete é terminal comestigma carnoso e trifido sobressaindo-se à corola. As sépalas e pétalas são imbricadas.

Os estaminódios são livres e fundem-se na base e formam um anel que envolve os carpelos. O verticilo é oposto à pétala e duplicado como nas flores estaminadas.

O perianto e o estigma da flor pistilada de Caiuê apresentam coloração branca e, após a polinização, se tornam violeta. A partir deste momento, o amadurecimento do fruto demora em torno de 5 a 6 meses, dependendo das condições ambientais, passando por colorações de verde até alaranjado, quando maduro.

A presença de idioblastos fenólicos e ráfides nas subamostras das origens BR174, Coari e Manicoré (Figura 4e; 4f) é uma característica marcante das espécies de *Arecaceae* e são encontrados próximo à inserção do óvulo, no estigma, próximo à epiderme externa do ovário, e nas pétalas e sépalas (Rudall et al., 2003; Stauffer & Endress, 2003; Adam et al., 2005; Perera et al., 2010). A distribuição dos compostos fenólicos e das ráfides (idioblastos) nas subamostras estudadas apresentou variação quanto à localidade e quantidade, sendo que as anteras apresentaram maior ocorrência de compostos fenólicos. De acordo com a literatura, o composto fenólico mais abundante nas flores de *E. oleifera* é o estragole (1-methoxy-4-2 (propenil) benzeno) (Gomes, 2011).

Idioblastos contendo cristais de oxalato de cálcio foram encontrados em maior quantidade em volta dos carpelos. Sua presença tem sido interpretada como uma forma de proteção para os óvulos. De acordo com Prychid et al. (1999), estes cristais são considerados como produtos residuais ou como agentes protetores da planta contra a herbivoria por insetos e animais.

O primórdio do meristema de uma flor estaminada funcional é visível na axila das brácteas florais na folha +4 da subamostra Coari (Figura 5a). O meristema possui uma forma elíptica e todas as células apresentam o núcleo maior que o citoplasma. O desenvolvimento da flor estaminada funcional segue o mesmo padrão da flor pistilada. A sépala é o primeiro órgão iniciado na base do meristema floral (Figura 5b) folha +11 da subamostra BR 174.

Na folha +13 da subamostra BR 174, é possível ver o início do desenvolvimento dos estames que surgem a partir dos flancos do meristema floral (Figura 5c). Na subamostra Coari, na folha +14, é possível observar o saco polínico e os microsporócitos além do acúmulo de polifenóis nas bordas da antera (Figura 5d).

A flor estaminada funcional de caiaué possui seis estames, cada um composto por uma antera de forma bilobada apoiada por um filamento. Cada estame é composto por quatro sacos polínicos agrupados em pares dentro de cada lóbulo. As anteras são formadas por três camadas concêntricas: uma epiderme, uma camada média transitória e uma zona interior representada por células mãe dos micrósporos (Figura 5e).

A inflorescência masculina amadurece da mesma forma que a inflorescência feminina. As sépalas possuem uma coloração amarela, enquanto que as pétalas são incolores. Na folha +18 de todas as subamostras, foi observada a formação de pólen maduro (Figura 5f).

As subamostras das origens BR174, Coari e Manicoré da subtribo Elaeidinae apresentam flores diplostêmores, com seis estames dispostos em dois verticilos. As anteras, presentes na tribo Cocoseae, são dorsifixas, introrsas, bitecas e apresenta epiderme persistente. O número de camadas

médias observado foi três. Essa característica foi encontrada em outras espécies de Cocoseae, como em *C. nucifera* (Guevara & Jáuregui, 2008), *E. guineensis* (Adam et al., 2005) e em outras Arecaceae, como em *Sommieria* (Stauffer et al., 2004).

O anel estamidal encontrado nas subamostras BR 174, Coari e Manicoré da espécie *E. oleifera* é uma sinapomorfia da tribo Cocoseae, os estaminódios das subamostras possuem características anatômicas semelhantes às pétalas das subamostras. Nas subamostras estudadas, não foi observada a presença de grãos de pólen nos estaminódios, apenas um aglomerado de células no centro do saco polínico. Giddey et al. (2009), trabalhando com *Rhapis*, observou dois verticilos de estaminódios alternos aos carpelos, apresentando filetes comprimidos e anteras que não produziram grãos de pólen.

Durante as fases seguintes os órgãos reprodutivos das flores pistiladas reduzem a taxa de desenvolvimento. Na base dos carpelos, um grupo de células meristemáticas dará origem ao ovário, o estigma do carpelo se desenvolve e, na região central do estigma, ocorre uma vascularização das células. Ocorre, também, acúmulo de polifenóis na região distal e nas bordas.

Os botões florais possuem formato alongado, apresentando ápice agudo, e a sua coloração varia do amarelo ao marrom. O cálice das subamostras estudadas são trímeros, apresentando sépalas imbricadas do tipo centralizada. As pétalas são trímeras e imbricadas em todas as subamostras.

As flores do Caiuê são pequenas e numerosas, sésseis, unissexuadas ou raramente bissexuais, trímeras e possuem um plano de

simetria actinomorfa. O androceu possui seis estames dispostos em duas séries de três, com estaminoides presentes. O gineceu é gamocarpelar, possuindo ovário súpero, tricarpelar, trilocular e triovular.

Conclusão

O presente trabalho comprova através de observações morfoanatômicas que não há diferença no desenvolvimento das estruturas florais da inflorescência entre as subamostras estudadas. Também não foram encontradas diferenças entre as espécies *E. oleifera* e *E. guineensis*. Estas possuem os mesmos comportamentos reprodutivos, alternando ciclos masculino e feminino; os estádios de desenvolvimento entre as duas espécies coincidem temporalmente e estruturalmente até o completo amadurecimento do pólen na folha +18, além disso, comprovou-se que o caiaué possui todas as características anatômicas pertencentes à tribo Cocoseae.

REFERÊNCIAS

ADAM, H.; JOUANNIC, S.; ESCOUTE, J.; DUVAL, Y.; VERDEIL, L.; TREGGAR, J.W. Reproductive development complexity in the African oil palm (*Elaeis guineensis*, Arecaceae). **American Journal of Botany**, v. 92, p.1836–1852, 2005.

ALVES, S.A.O.; LEMOS, O.F.; SANTOS-FILHO, B.G.; SILVA, A.L.L. In vitro protocol optimization for development of interespecific hybrids of oil palm (*Elaeis oleifera* (H.B.K) Cortés x *Elaeis guineensis* Jacq.). **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 2, p.1-6, 2011.

ASKGAARD, A.; STAUFFER, F.W.; HODEL, D.R.; BARFOD, A.S. Floral structure in the neotropical palm genus *Chamaedorea* (Arecoideae, Arecaceae). **Anales Del Jardín Botánico de Madrid**, v. 65, p. 197–210, 2008.

BAKER, W.J.; NORUP, M.V.; CLARKSON, J.J.; COUVREUR, T.L.P.; DOWE, J.L.; LEWIS, C.E.; PINTAUD, J-C.; SAVOLAINEN, V.; WILMOT, T.; CHASE, M.W. Phylogenetic relationships among arecoid palms (Arecaceae: Arecoideae). **Annals of Botany**, v.108, p. 1417-1432, 2011.

BACELAR-LIMA, C.G.; MEDONÇA, M.S.; BARBOSA, T.S.T.C. Morfologia floral de uma população de tucumã, *Astrocaryum aculeatum* G. Mey. (Arecaceae) na amazônia central. **Acta Amazonica**, v. 36, p. 407–412, 2006.

BARFOD, A.S.; UHL, N.W. Floral development in *Aphandra* (Arecaceae). **American Journal of Botany**, v. 88, p. 185–195, 2001.

BARFOD, A.S.; HAGEN, M.; BORCHESSENIUS, F. Twenty-five years of progress in understanding pollination mechanisms in palms (Arecaceae). **Annals of Botany**, v. 108, p. 1503–1516, 2011.

BERGAMIN-FILHO, A.; AMORIM, I.; LARANJEIRA, F.F. BERGER, R.D.; HAU, B. Hau, B. Análise temporal do amarelecimento fatal do dendezeiro como ferramenta para elucidar sua etiologia. **Fitopatologia Brasileira**, v. 23, p. 391-396, 1998.

CHOO, Y.M.; YAP, S.C.; OOI, C.K.; MA, S.H.; ONG, A.S.H. Recovered oil from palm-pressed fiber: A good source of natural carotenoids, vitamin E and sterols. **J. Am. Oil and Technol Chem. Soc.**, v. 73, p. 599-602, 1996.

CORLEY, R.H.V.; TINKER, P.B. **The Oil Palm**. Great Britain, Blackwell Science Ltd. 2003. 562 p. 4 ed.

CUNHA, R.N.V.; LOPES, R.; ROCHA, R.N.C.; LIMA, W.A.A.; TEIXEIRA, P.C.; BARCELOS, E.; RODRIGUES, M.R.L. Domesticação e melhoramento de caiaué. In: BORÉM, A.; LOPES, M.T.G.; CLEMENT, C.R. (Ed.). **Domesticação e melhoramento: espécies amazônicas**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 2009. p. 275-293.

CUNHA, R. N. V.; LOPES, R. BRS Manicoré: Híbrido Interespecífico entre o Caiaué e o Dendezeiro Africano Recomendado para Áreas de Incidência de Amarelecimento-Fatal. **Comunicado Técnico 85**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental. 2010. 4p

DAHER, A.; ADAM, H.; CHARBRILLANGE, N.; COLLIN, M.; MOHAMED, N.; TREGEAR, J.W.; ABERLENC-BERTOSSI, F. Cell cycle arrest characterizes the transition from a bisexual floral bud to a unisexual flower in *Phoenix dactylifera*. **Annals of Botany**, v. 106, p. 255–266, 2010.

DRANSFIELD, J.; UHL, N.W.; ASMUSSEN, C.B.; BAKER, W.J.; HARLEY, M.M.; LEWIS, C.E. A new phylogenetic classification of the palm family, Arecaceae. **Kew Bulletin**, v. 60, p. 559–569, 2005.

DRANSFIELD, J.; UHL, N.W.; ASMUSSEN, C.B.; BAKER, W.J.; HARLEY, M.M.; LEWIS, C.E. **Genera palmarum – The evolution and classification of palms**. Richmond: 24 Royal Botanical Gardens, Kew, 2008. 744 p. Kew Publishing.

EISERHARDT, W.L.; SVENNING, J.C.; KISSLING, W.D.; BALSLEV, H. Geographical ecology of the palms (Arecaceae): determinants of diversity and distribution across spatial scales. **Annals of Botany**, v.108, p. 1391–1416, 2011.

GHESEQUIÈRE, M.; BARCELOS, E.; SANTOS, M.M.; AAMBLARD, P. Enzymatic polymorphism in *Elaeis oleifera* HBK (*E. melanococca*) – analysis of populations in the amazon basin. **Oleagineux**, v. 42, p. 151-153, 1987.

GOMES, S.M.S. **Polinizadores e semioquímicos do dendezeiro híbrido (*Elaeis oleifera* (H.B.K) Cortés X *Elaeis guineensis* JACQ)**. 2011. 65p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

GIDDEY, A.; SPICHIGER, R.E.; STAUFFER, F.W. Comparative floral structure and systematic in the Asian palm genus *Raphis* (Arecaceae, Coryphoideae). **Flora**, v. 204, p. 347–357, 2009.

GUEVARA, L.; JÁUREGUI, D. Anatomía floral de *Cocos nucifera* L. (Arecaceae, Arecoideae). **Acta Botanica Venezuelica**, v. 31, p. 35–48, 2008.

JOUANNIC, S.; LARTAUD, M.; HERVÉ, J.; COLLIN, M.; ORIEUX, Y.; VERDEIL, J.L.; TREGGAR, J.W. The shoot apical meristem of oil palm (*Elaeis guineensis*; Arecaceae): developmental progression and dynamics. **Annals of Botany**, v. 108, p. 1477-1487, 2011.

KÜCHMEISTER, H.; SILBERBAUER-GOTTSBERGER, I.; GOTTSBERGER, G. Flowering, pollination nectar standing crop, and nectaries of *Euterpe precatoria* (Arecaceae), an Amazonian rain forest palm. **Plant Systematics and Evolution**, v. 206, p. 71–97, 1997.

LUBRANO, C.; ROBIN, J.R. Major compounds study in fruit pulp oils of six Guiana Palms species. **Acta Botanica Gallica**, v. 144, p. 495-499, 1997.

MASMOUDI-ALLOUCHE, F.; CHÂARI-RKHIS, A.; KRIAÂ, W.; GARGOURI-BOUZID, R.; JAIN, S.M.; DRIRA, N. In vitro hermaphroditism induction in date palm female flower. **Plant Cell Reports**, v. 28, p. 1–10, 2009.

MICHIELSE, B.C.; MARTIJN, R.E.P. Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. **Molecular Plant Pathology**, v. 10, p. 311–324, 2009.

MITCHELL, C.H.; DIGGLE, P.K. The evolution of unisexual flowers: morphological and functional convergence results from diverse developmental transitions. **American Journal of Botany**, v. 97, p. 1068–1076, 2005.

PERERA, P.I.P.; HOCHER, V.; WEERAKON, L.K.; YAKANDAWALA, D.M.D.; FERNANDO, S.C.; VERDEIL, J.L. Early inflorescence and floral development in *Cocosnucifera* L. (Arecaceae: Arecoideae). **South African Journal of Botany**, v.76, p. 482–492, 2010.

PRYCHID, C.J.; RUDALL, P.J. Calcium oxalate crystals in monocotyledons: structure and systematics. **Annals of Botany**, v. 84, p.725-739, 1999.

EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL. **Potencial produtivo de híbridos interespecíficos entre dendezeiro e caiauezeiro nas Condições do Nordeste Paraense**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2006. 23p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 247). Disponível em:

<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/397090/1/Doc247.pdf>. Acesso em: 04/09/2012.

REMIZOWA, M.V.; SOKOLOFF, D.D.; RUDALL, P.J. Evolutionary history of the monocot flower. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v.97, p. 617–645, 2010.

RUDALL, P.J.; ABRANSON, K.; DRANSFIELD, J.; BAKER, W. Floral anatomy in *Dypsis* (Arecaceae-Arecaeae): a case of complex synorganization and stamen reduction. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 143, p. 115–133, 2003.

SALM, R.; SALLES, N.V.; ALONSO, W.J.; SCHUCK-PAIM, C. Cross-scale determinants of palm species distribution. **Acta Amazonica**, v. 37, p. 17–26, 2007.

STAUFFER, F.W.; ENDRESS, P.K. Comparative morphology of female flowers and systematic in Geonomeae (Arecaceae). **Plant Systematic and Evolution**, v.242, p. 171-203, 2003.

STAUFFER, F.W.; BAKER, W.J.; DRANSFIELD, J.; ENDRESS, P.K. Comparative floral structure and systematics of Pelagodoxa and Sommieria (Arecaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.146: p. 27–39, 2004.

STAUFFER, F.W.; BARFOD, A.; ENDRESS, P.K. Floral structure in Licuala peltata (Arecaceae: Coryphoideae) with special reference to the architecture of unusual labyrinthine nectar. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.161, p.66–77, 2009.

TOMLINSON, P.B., 1990. **The Structural Biology of Palms**. Oxford: Clarendon press, Oxford University Press, 1990. 492p. Oxford University Press.

UHL, N.W. Developmental studies in Ptychosperma (Palmae). II. The staminate and pistillate flowers. **American Journal of Botany**, v. 63, p. 97–109, 1976.

VAN HEEL, W.A.; BREURE, C.J.; MENDEZ, T. The early development of inflorescences and flowers of the oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) seen through the scanning electrons microscope. **Blumea**, v. 32, p. 67-78, 1987.

VAUGHAN, J. G. The morphology and growth of the vegetative and reproductive apices of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., *Capsella bursa-pastoris* (L.) Medicis and *Anagallis arvensis* L. **Journal of the Linnaean Society of London (Botany)**, v. 55, p. 279–301, 1955.

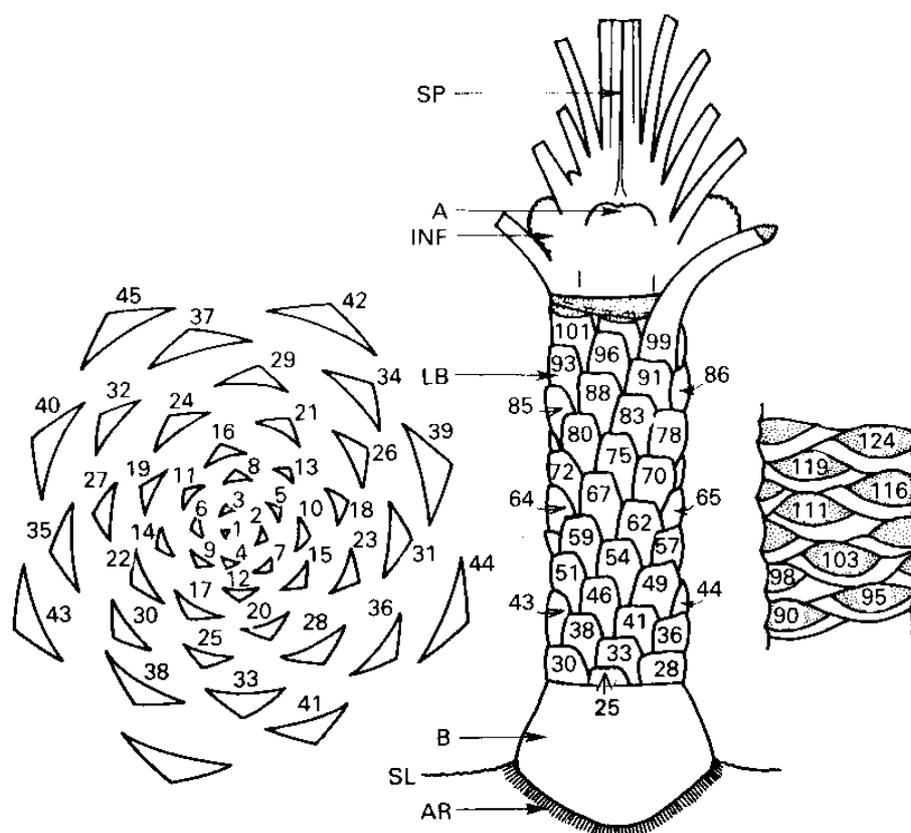


Figura 1 Diagrama da filotaxia da palma de óleo. A representação diagramática do estipe mostra a porção superior do ápice (A) rodeado pelas folhas, com a flecha (SP) acima e as folhas maduras com inflorescência (INF) dispostas lateralmente. As bases das folhas estão numeradas em ordem cronológica de formação a partir da base. Na base do bulbo da palma de óleo (B), ao nível do solo (SL), ocorrem raízes adventícias (AR). Adaptado de Henry (1955) e J.W.A.I.F.O.R (1961).

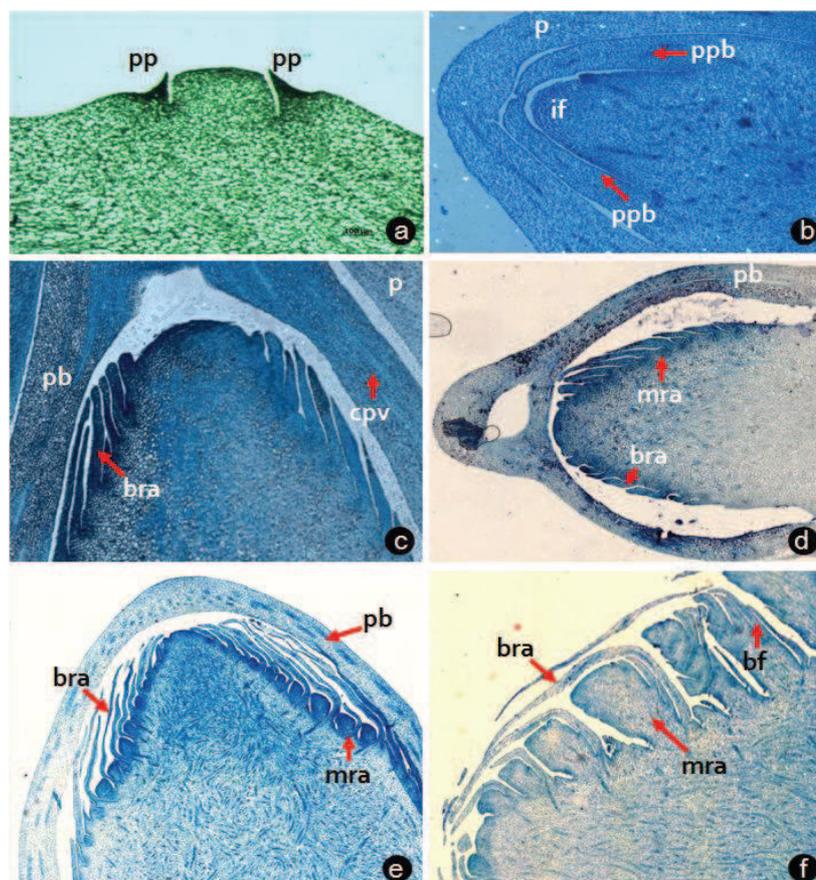


Figura 2 Cortes longitudinais do desenvolvimento da inflorescência em Caiuê visualizados com Microscopia de Luz. **a.** Meristema da inflorescência da subamostra Manicoré no estágio da folha - 30. **b.** Subamostra Coari no estágio da folha -20, meristema do pedúnculo da bráctea. **c.** Brácteas da ráquila em desenvolvimento da subamostra Manicoré da folha - 7. **d.** Início do meristema da ráquila da subamostra BR 174 da folha -6. **e.** Individualização do meristema da ráquila da subamostra Coari, folha -5. **f.** Meristemas das brácteas florais da subamostra Coari, no estágio da folha -1. *Abreviaturas:* bf, bráctea floral; bra, bráctea da ráquila; cpv, canal pró-vascular; if, inflorescência; mra, meristema da ráquila; p, propilo; pb, pedúnculo da bráctea, pbra, primórdio da bráctea da ráquila; pp, primórdio do próprilo; ppb, primórdio do pedúnculo da bráctea.

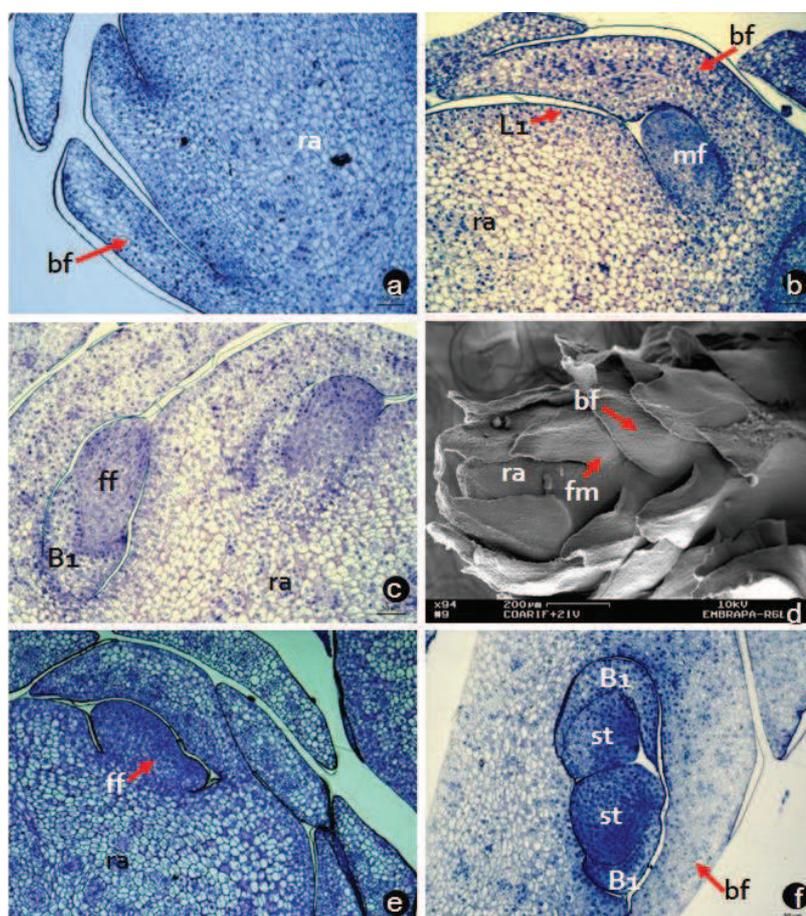


Figura 3. Desenvolvimento das brácteas florais e flores, visualizado com Microscopia de luz e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). **a.** Estádio da folha 0 da subamostra Manicoré. **b.** Desenvolvimento de brácteas florais e camada celular L1 no estágio da folha +2 da subamostra Coari. **c.** Meristema floral feminino e a bractéola 1 no estágio da folha +3 da subamostra Coari. **d.** Desenvolvimento de brácteas florais no estágio da folha +2 da subamostra Coari. **e.** Meristema floral feminino no estágio da folha +2 da subamostra Manicoré. **f.** Desenvolvimento da flor pistilada e estaminoides no estágio da folha +6 da subamostra Manicoré. *Abreviaturas:* B1, bractéola 1; bf, bráctea floral; ff, flor feminina; fm, flor masculina; L1, layer 1; mf, meristema floral; ra, ráquila, st, estaminoide.

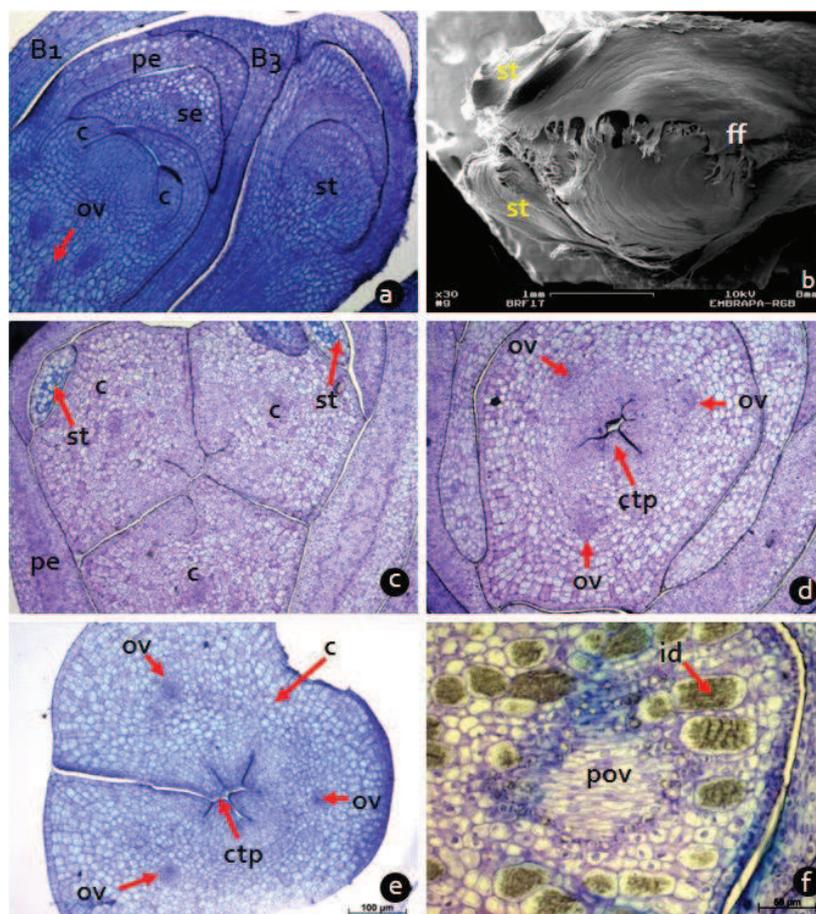


Figura 4. Micrografias de luz e de MEV do desenvolvimento da flor trímica. **a.** Corte transversal da flor pistilada acompanhada da flor estaminada. **b.** MEV da tríade floral no estágio da Folha +17 da subamostra BR 174. **c.** Ovário trilocular no estágio da Folha +13 da subamostra BR174. **d.** Canal do tubo polínico no estágio da Folha +14 da subamostra Coari. **e.** carpelos fusionados da subamostra BR 174. **f.** Ovário da flor pistilada no estágio da Folha +12 da subamostra Coari. *Abreviaturas:* B1, bractéola 1; B3, bractéola 3; c, carpelo; ff, flor feminina; id, idioblasto; ov, óvulo; pe, pétala; se, sépala; pov, primórdio do ovário; st, estaminoide.

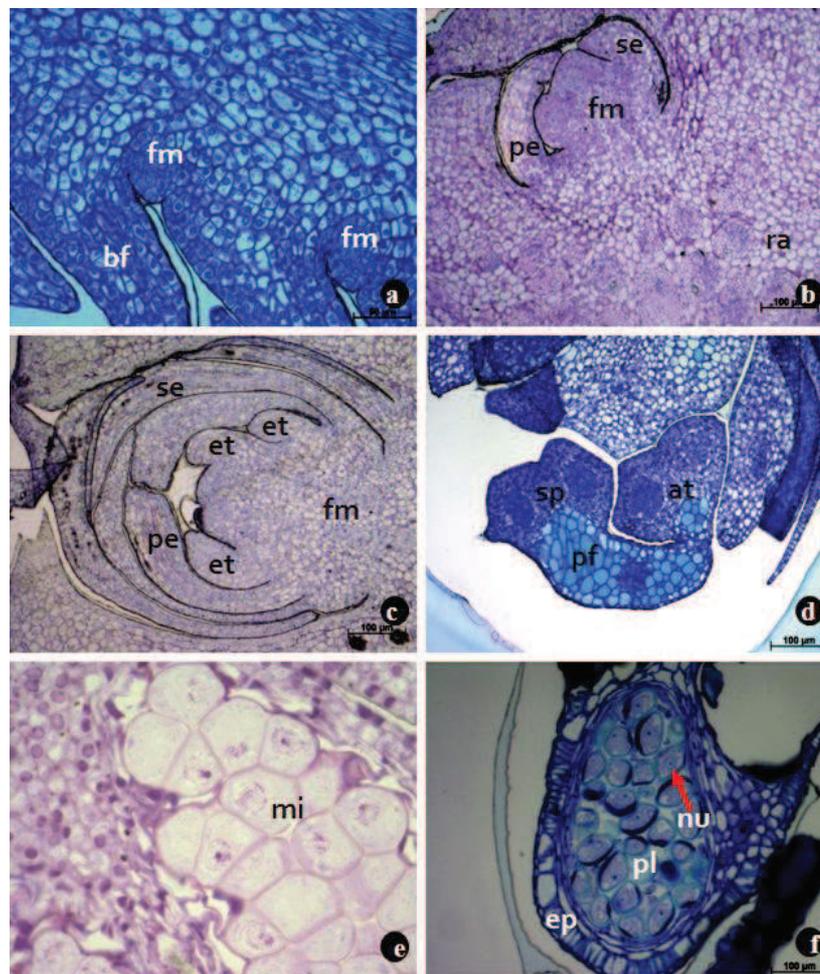


Figura 5. Desenvolvimento da flor estaminada. **a.** Corte longitudinal do meristema da flor estaminada, na axila da Folha +4 da subamostra Coari. **b.** Desenvolvimento de sépalas na Folha +11 da subamostra BR174. **c.** Surgimento do meristema dos estames. **d.** Corte transversal evidenciando o saco polínico no estágio da Folha +15 da subamostra Coari. **e.** Corte longitudinal dos microsporócitos em estágio de paquíteno da Folha +14 da subamostra Coari. **f.** Corte transversal do saco polínico apresentando grãos de pólen maduros na Folha +18 da subamostra Manicoré. *Abreviaturas:* at, antera; ep, epiderme; et, estame; mi, microsporócito; nu, núcleo; pf, polifenol; pl, pólen.

ARTIGO 2 **Determinação de estádios meióticos em *Elaeis oleifera***
(H.B.K.) cortés

Marcelo Picanço de Farias*⁽¹⁾

Luiz Henrique Galli Vargas⁽²⁾

André Pereira Leão⁽²⁾,

Eduardo Fernandes Formighieri⁽²⁾

Alexandre Alonso Alves⁽²⁾

Guy de Capdeville⁽²⁾

Manoel Teixeira Souza Júnior⁽²⁾

Artigo preparado de acordo com a NBR 6022 (ABNT, 2003)

*⁽¹⁾ Universidade Federal de Lavras, *Campus* Universitário, CEP 37200-000 Lavras, MG. E-mail: mpfarias@gmail.com

⁽²⁾ Embrapa Agroenergia Parque Estação Biológica - PqEB s/nº - W3 Norte (final), CEP 70770-901 Brasília, DF. E-mail: zealotrs@gmail.com, andre.leão@embrapa.br, eduardo.formighieri@embrapa.br, alexandre.alonso@embrapa.br, guy.capdeville@embrapa.br, manoel.souza@embrapa.br.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi realizar a análise citológica de microsporócitos em flores masculinas do Caiaué (*Elaeis oleifera* (H.B.K) Cortés) e também a identificação dos diferentes estádios meióticos nas regiões apical, central e basal da ráquila e da inflorescência. Para o estudo utilizou-se a inflorescência desenvolvida na folha +14 da subamostra Coari. As flores foram removidas da inflorescência, seguidas de maceração, digestão dos microsporócitos utilizando enzimas pectolítica, celulase e citohelicase em concentrações iguais de 1% e coloração com DAPI sobre lâmina de vidro. As lâminas foram observadas e fotodocumentadas com auxílio de microscopia de contraste de fase. A análise citológica de microsporócitos de flores masculinas de *Elaeis oleifera* (H.B.K) Cortés e a identificação dos diferentes estádios meióticos (leptóteno, paquíteno, díade e tétrade) nas regiões apical, central e basal da ráquila e da inflorescência permitiram identificar o melhor estágio de desenvolvimento floral (inflorescências da folha +14) para selecionar microsporócitos em fase de paquíteno, fase esta ideal para análises citogenéticas utilizando FISH de elevada resolução. Desta forma o trabalho visou auxiliar futuros estudos envolvendo técnicas de hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) e de cultura de micrósporo para obtenção de plantas haploides.

Palavras-chave: *Elaeis oleifera*. Inflorescência. Citogenética. FISH. GISH.

Introdução

Os programas de melhoramento genético da palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.), espécie de origem africana, têm buscado a introgressão de genes de interesse no germoplasma do caiaué (*Elaeis oleifera* (H.B.K) Cortés), espécie de origem americana.

A hibridação interespecífica entre o caiaué $2n=32$ e a palma de óleo $2n=32$, tem sido explorada com o objetivo de desenvolver cultivares tão produtivas quanto as de palma de óleo, aliada à resistência a pragas e doenças, principalmente ao amarelecimento fatal, alta taxa de óleos insaturados e reduzido crescimento do tronco características do caiaué (BARCELOS et al., 2002).

Quando se trabalha com qualquer grupo vegetal a fim de desenvolver novas combinações e cruzamentos, é necessário conhecer o número, o tamanho e a forma dos cromossomos, além de marcadores úteis para o reconhecimento de cada par cromossômico. A partir das informações citogenéticas de duas espécies de plantas, pode-se prever a viabilidade de um possível híbrido. Moraes-Fernandes et al. (2000) enfatizam que o conhecimento sobre relações citotaxonômicas, estrutura citogenética e história evolutiva das espécies envolvidas nos cruzamentos também é importante para a escolha da espécie doadora de características como resistência a doenças e fornecem contribuição valiosa ao melhoramento varietal (Moraes-Fernandes, 1982).

Este trabalho objetivou a análise citológica de microsporócitos de flores masculinas de caiaué (*E. oleifera* (H.B.K.) Cortés) e a identificação dos diferentes estádios meióticos (leptóteno, paquíteno, díade e tétrade)

nas regiões apical, central e basal da ráquila e da inflorescência. Desta forma, este trabalho visa auxiliar futuros estudos envolvendo técnicas de hibridação *in situ* por fluorescência (FISH), GISH (Hibridização Genômica *in situ*) e de cultura de micrósporo para obtenção de plantas haploides.

Material e Métodos

O estudo foi realizado no Laboratório de Microscopia Eletrônica (LME) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN) e o material utilizado da subamostra Coari pertence ao Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Amazônia Ocidental (CPAA) - Campo Experimental do Rio Urubu.

A coleta da inflorescência masculina de caiaué foi realizada antes da antese. No presente estudo, utilizou-se a inflorescência desenvolvida na axila da folha +14 da subamostra Coari, uma vez que foi identificado nesta folha microsporócitos em estádios meióticos próximos ao de paquíteno. O número atribuído à inflorescência corresponde ao da folha, seguindo uma numeração crescente, a partir da folha flecha (zero).

As flores masculinas foram removidas da ráquila e fixadas em etanol absoluto: ácido acético (3:1), mantidas por 24 horas a 4 °C e guardadas em etanol 70% gelado. As anteras foram removidas da estrutura da flor estaminada e colocadas sobre uma lâmina de vidro para microscopia. Aplicou-se 20µl de ácido acético 60% sobre a lâmina e realizou-se um esmagamento da antera para liberação dos microsporócitos dos sacos polínicos. Posteriormente procedeu-se a

coloração com DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindole) utilizado por Capdeville et al.(2009) com modificações. Após montadas, as lâminas foram analisadas e fotodocumentadas em microscópio de fluorescência Axiophot Zeiss.

A digestão e preparo das lâminas para GISH das anteras em estágio de paquíteno ou intermediários, ou seja, entre zigóteno e paquíteno ou entre paquíteno e diplóteno, foram selecionadas com o auxílio do DAPI. Foram utilizadas, preferencialmente, as anteras mais próximas ao estágio de paquíteno. Após a seleção, as anteras foram lavadas três vezes em H₂O mili-Q por 5 min e, em seguida, em tampão citrato 0,01M preparando assim as anteras para a digestão enzimática. As anteras foram digeridas em concentrações iguais das seguintes enzimas: pectoliase (SIGMA) 1%, celulase Onozuka R-10 (SERVA) 1% e citohelicase (SIGMA) 1%. Depois de imergidas na solução enzimática, as anteras foram colocadas em uma câmara úmida a 37°C por um período de 2 horas para realizar a digestão. Após a digestão, a solução de enzimas foi retirada e as anteras foram lavadas com etanol 70% por 5 min seguindo de outra lavagem em etanol 100% por mais 5 minutos. Em seguida, retirou-se o álcool e adicionou-se solução de Carnoy sobre as anteras, macerando-as com auxílio de um estilete. Vinte microlitros da suspensão macerada de microsporócitos foram colocados em uma lâmina limpa e desengordurada sobre uma placa aquecida a, aproximadamente, 55°C. A estes 20 µL foram adicionados de 6 a 10 gotas de ácido acético 60% e a gota maior formada sobre a lâmina foi espalhada por 2 minutos com auxílio de um estilete. Ao final, as lâminas foram lavadas com solução de Carnoy gelada e permitidas secar sobre a placa aquecida. As

lâminas foram observadas com auxílio de microscopia de contraste de fase com a finalidade de selecionar aquelas com a qualidade adequada para o procedimento de GISH. Para fixar os cromossomos sobre as lâminas, estas foram mantidas em etanol 100% por 12 horas a -20°C. A concentração enzimática foi baseada nos protocolos de Budiman et al. (2003), Capdeville et al. (2009), Fonsêca et al. (2010), Pedrosa-Harand et al. (2009) e Szinay et al. (2008).

Resultados e Discussão

Experimentos preliminares envolvendo diversas fases foliares revelaram que a partir da folha +14 é possível isolar uma maior variedade de estádios meióticos. Importante ressaltar ainda, que não foram observadas anomalias meióticas no material estudado.

A Figura 2 ilustra os diferentes estádios meióticos em microsporócitos. O primeiro estágio meiótico da prófase I, denominado leptóteno, pode ser visualizado na Figura 2a. Na Figura 2b, pode-se observar o estágio de paquíteno, outra subdivisão da prófase I. Nesta fase ocorre um importante evento chamado de *crossing-over* ou recombinação gênica, levando a uma maior variabilidade genética dos filhos em relação aos pais. Nela os cromossomos se apresentam menos compactados e com braços cromossômicos mais estendidos, quando comparados aos cromossomos em metáfase. Isto permite um elevado grau de resolução espacial, facilitando consideravelmente o mapeamento físico de

sequências gênicas de interesse, incluindo clones BAC (*bacterial artificial chromosome*) e YAC (*yeast artificial chromosome*) utilizando a técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) (CAPDEVILLE et al., 2009).

Na prófase II, ocorre a citocinese meiótica do tipo sucessivo, em que o final da meiose I é seguido da formação de uma parede celular entre os dois núcleos originando, assim, a díade (Figura 2c).

Ao final da meiose II, os cromossomos atingem os polos e cada conjunto de cromátides é rodeado por uma membrana nuclear, caracterizando a telófase II. Após a citocinese, forma-se um grupo de 4 células haploides, as tétrades (Figura 2d). Estas tétrades irão dar origem ao pólen imaturo ou micrósporos, que são utilizados, por exemplo, para cultura visando à produção de plantas haploides, com objetivo de diminuir o tempo necessário para geração de cultivares puras e ampliar a eficiência de seleção, tanto para caracteres quantitativos como para qualitativos, facilitando, portanto, a identificação de genótipos superiores (MORAES-FERNANDES, 1990). Um exemplo disso, foi o trabalho de Lantos et al. (2006) no qual os autores utilizaram micrósporos uninucleados para desenvolver plantas haploides de trigo.

Pode-se perceber que o desenvolvimento meiótico da flor masculina ocorre de forma acrópeta, ou seja, de baixo para cima na planta da subamostra Coari. Evidenciou-se, ainda, a diferença de desenvolvimento floral entre as regiões basal, central e apical, tanto da inflorescência, quanto da ráquila.

Este estudo gerou importantes informações da citogenética básica em inflorescências de *E. oleifera*. Foram identificados e caracterizados

diferentes estádios de desenvolvimento meióticos da flor masculina de caiaué, que auxiliará futuros estudos envolvendo técnicas como a de FISH e GISH e, também, na cultura de micrósporo.

Conclusão

Concluiu-se que o desenvolvimento meiótico da flor masculina ocorre de forma acrópeta na subamostra Coari. Além disso, a folha +14 possui todos os estádios meióticos. Portanto é nesta fase foliar que se devem concentrar os estudos de isolamentos: de paquíteno para FISH, GISH e micrósporo para cultura *in vitro*.

ABSTRACT

The purpose of this research was to perform the cytological analysis of the microsporocyte in male flowers of Caiaue (*Elaeis oleifera* (H.B.K) Cortés) as well as to identify the different meiotic stages of the apical, central and basal regions of the raquilla and of the inflorescence. Inflorescences developed on the +14 leaf of the subsample Coari were used for this study. Flowers were removed from the inflorescence, followed by maceration, enzymatic digestion of the microsporocytes (pectolytic, cellulase, and cytohelicase, in equal concentrations of 1%), and stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) in a glass slide. The observation and documentation of the glass slides were done with the assistance of phase contrast microscopy. The cytological analysis of isolated microsporocytes from male flowers of *E. oleifera* (H.B.K) Cortés, and the identification of different meiotic stages (leptotene, pachytene, dyad and tetrad) at the apical, central and basal regions of the raquilla allowed the identification of the best stage of floral development (inflorescence on the +14 leaf) to select microsporocytes in pachytene stage. This is the ideal phase to use high-resolution Fluorescent In Situ Hybridization (FISH). Therefore, this research aimed at assisting future studies using high-resolution FISH analysis for the production of haploid plants.

Keywords: *Elaeis oleifera*. Inflorescence. Cytogenetic. FISH. GISH.

REFERÊNCIAS

BARCELOS, E. et al. Genetic Diversity and relationship in American and African oil palm as revealed by RFLP and AFLP molecular markers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, n.8, p.1105-1114, 2002.

CAPDEVILLE, G; SOUZA JÚNIOR, M.T.; SZINAY, D.; DINIZ, L.E.C.; WIJNKER, E.; SWENNEN, R.; KEMA, G.H.J.; JONG, H.D. The potential of high-resolution BAC-FISH in Banana breeding. **Euphytica**, v. 166, p. 431-443, 2009.

CUNHA, R.N.V.; LOPES, R.; ROCHA, R.N.C.; LIMA, W.A.A.; TEIXEIRA, P.C.; BARCELOS, E.; RODRIGUES, M.R.L. Domesticação e melhoramento de caiaué. In: Borém, A.; Lopes, M.T.G.; Clement, C.R. (Eds.). **Domesticação e melhoramento: espécies amazônicas**. Cap. 14. Viçosa, MG. p. 275-293, 2009.

LANTOS C. L.; PÁRICSI, S.; ZOFAJOVA, A.; WEYEN, J.; PAUK, J.. Isolated microspore culture of wheat (*Triticum aestivum* L.)with Hungarian cultivars. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 50, p. 31-35, 2006.

BARCELOS, E. et al. Genetic Diversity and relationship in American and African oil palm as revealed by RFLP and AFLP molecular markers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, n.8, p.1105-1114, 2002.

CAPDEVILLE, G; SOUZA JÚNIOR, M.T.; SZINAY, D.; DINIZ, L.E.C.; WIJNKER, E.; SWENNEN, R.; KEMA, G.H.J.; JONG, H.D. The potential of high-resolution BAC-FISH in Banana breeding. **Euphytica**, v. 166, p. 431-443, 2009.

CUNHA, R.N.V.; LOPES, R.; ROCHA, R.N.C.; LIMA, W.A.A.; TEIXEIRA, P.C.; BARCELOS, E.; RODRIGUES, M.R.L. Domesticação e melhoramento de caiaué. In: Borém, A.; Lopes, M.T.G.; Clement, C.R. (Eds.). **Domesticação e melhoramento: espécies amazônicas**. Cap. 14. Viçosa, MG. p. 275-293, 2009.

LANTOS C. L.; PÁRICSI, S.; ZOFAJOVA, A.; WEYEN, J.; PAUK, J.. Isolated microspore culture of wheat (*Triticum aestivum* L.)with Hungarian cultivars. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 50, p. 31-35, 2006.

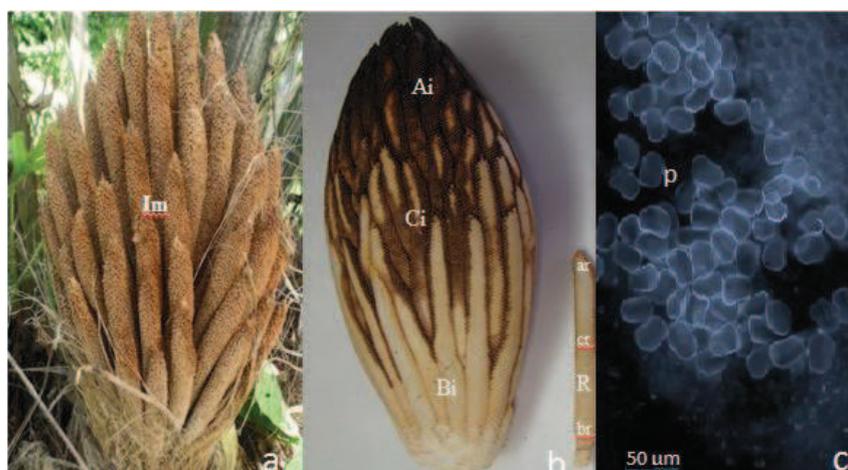


Figura 1. Inflorescências e pólen de *Elaeis oleifera* (caiaué – subamostra Coari). a) Inflorescência masculina em antese. Im = inflorescência masculina; b) inflorescência masculina jovem (folha +14). Ai = ápice inflorescência; ar = ápice da ráquila; Bi = base da inflorescência; br = base da ráquila; Ci= centro da inflorescência; cr = centro da ráquila; R= ráquila; e c) imagem obtida por microscopia de luz evidenciando pólen maduros (folha +18). p = pólen.

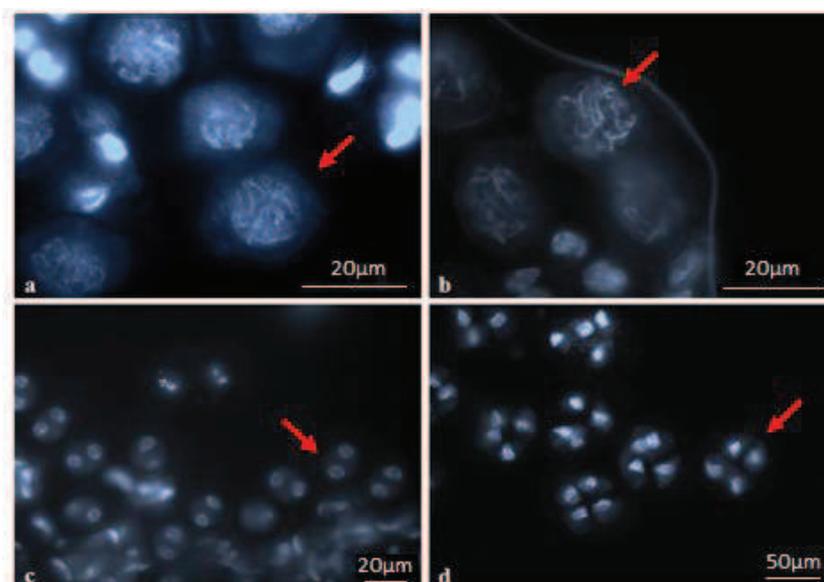


Figura 2. Estádios meióticos de *Elaeis oleifera* subamostra Coari folha +14. a) Fase Prófase I – leptóteno no ápice da ráquila localizada no centro da inflorescência. b) Fase Prófase I - paquíteno no centro da ráquila localizada no centro da inflorescência. c) Fase Telófase I – díade no centro da ráquila localizada no centro da inflorescência. d) Telófase II – tétrade na base da ráquila localizada na base da inflorescência.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se através de estudos de anatomia e através de estudos citogenéticos que o caiaué ainda necessita de novas observações para se ter um melhor entendimento dos fatores naturais que interferem no desenvolvimento da biologia reprodutiva e comportamental desta espécie.

Os estudos de anatomia são muito importantes para se ter um entendimento de como a espécie *E. oleiferase* comporta. É preciso aprofundar o conhecimento sobre as condições edáficas ideais para a cultura, o desenvolvimento floral, os estádios em que ocorrem as fases de meiose e mitose.

Estudos futuros do caiaué utilizando a citogenética como plataforma serão facilitados, pois foi mostrado neste trabalho em qual local físico ocorrem as fases meióticas ideais para se obter resultados promissores, além disso, foi possível mostrar que variações ambientais interferem fortemente na reprodução do caiaué.

O desenvolvimento floral do caiaué não deve ser estudado apenas em caráter metodológico ou científico, mas como conhecimento prático para a pessoa responsável pelo programa de melhoramento da palma de óleo, auxiliando na tomada de decisão de quando será realizada a polinização para alcançar o máximo de resultados positivos. A tecnologia para a solução de tal problema é relevante para o agronegócio da palma de óleo brasileiro.

A baixa taxa de polinização do híbrido interespecífico de caiaué com a palma de óleo, pode ser minimizada com este estudo. Utilizando-se de polinização assistida, será possível aumentar a taxa de fecundação gerando uma maior porcentagem de frutos viáveis para programas de melhoramento da palma de óleo.

Incentivos dados pelo Governo Federal para aumentar a área de cultivo da palma de óleo, no Brasil, e a necessidade mais eminente de encontrar fonte de

combustíveis “limpos”, com menores danos ao meio ambiente, tornam fundamentais estudos sobre o processo de aumento de produção de óleo de palma de óleo no país. O caiué entra nesta cadeia como fonte de variabilidade genética, podendo produzir mais óleo, com maior qualidade e reduzindo o uso de agroquímicos, pois apresenta resistência à maioria das doenças que afeta a palma de óleo africana.

O estabelecimento de uma rede de pesquisa com países que produzem óleo da palma de óleo e com dados moleculares que estão em análise chega-se a uma nova era na busca pela planta livre do amarelecimento fatal e com alta produtividade, gerando materiais de alta *performance* para empresas produtoras de biocombustíveis.