



MARLÚCIA SOUZA PÁDUA

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E
TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA EM
DENDEZEIRO (*Elaeis guineensis* Jacq.)**

**LAVRAS - MG
2015**

MARLÚCIA SOUZA PÁDUA

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA EM
DENDEZEIRO (*Elaeis guineensis* Jacq.).**

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

Orientador

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva

Coorientadora

Profa. Dra. Vanessa Cristina Stein
Profa. Dra. Evânia Galvão Mendonça

LAVRAS – MG
2015

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Pádua, Marlúcia Souza.

Embriogênese somática e transformação genética em
dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) / Marlúcia Souza Pádua. –
Lavras : UFLA, 2015.

135 p. : il.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientador(a): Luciano Vilela Paiva.

Bibliografia.

1. Cultura de tecidos vegetais. 2. Dendê. 3. Transgenia. 4.
Biotecnologia. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

MARLÚCIA SOUZA PÁDUA

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA EM
DENDEZEIRO (*Elaeis guineensis* Jacq.)**

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

APROVADA em 27 de fevereiro de 2015.

Andrea Carneiro Embrapa

Leila PioUFLA

Evânia Galvão Mendonça UFRJ

Vanessa Cristina Stein UFSJ

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva
(Orientador)

**LAVRAS – MG
2015**

*A Deus,
por iluminar meus caminhos.*

OFEREÇO

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

DEDICO

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

AGRADEÇO

AGRADECIMENTOS

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

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

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), pela concessão da bolsa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela infraestrutura.

Ao meu orientador, Luciano Vilela Paiva, por participar da minha formação acadêmica e pela confiança no desenvolvimento do projeto.

À minhas coorientadoras, Vanessa Cristina Stein e Evânia Galvão Mendonça, pela atenção, ajuda e amizade.

À banca de avaliadores, Andrea Carneiro, Leila Pio, Vanessa Stein e Evânia Mendonça, pela colaboração na correção deste trabalho.

À professora Leila Pio, pela colaboração nos experimentos de citometria e disponibilidade na avaliação deste trabalho.

Ao professor Eduardo Alves, pelo auxílio nas análises de microscopia.

À Claudia Labory, pela atenção e ajuda nas análises de microscopia.

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

Às colegas e amigas Raíssa e Jéssica, pela ajuda com os experimentos e amizade.

Ao Guilherme, pela ajuda com os experimentos e paciência.

Aos colegas do Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM), Flávia, Luciene, Kalynka, Luana, Chaiane, Leo, Lara, Nathália e Douglas, pelo aprendizado e por tornarem os dias de trabalhos mais amenos e divertidos.

Às amigas de república, minha família em Lavras, Amanda, Thaís, Killy, Aline, Fran, Chris e Camila, pelas conversas, ensinamentos de vida, amizade e carinho.

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

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

Ao meu noivo, Diego, pela paciência, apoio, torcida e amor.

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

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

Muito Obrigada!

RESUMO

O dendezeiro é cultivado, principalmente, na região norte do país. Tem grande importância econômica, devido à alta produção de óleo, que é aplicado em várias áreas da indústria alimentícia, cosmética, farmacêutica e de biocombustíveis. Porém, a expansão do cultivo do dendezeiro é limitada pela característica morfoanatômica da espécie, que tem um meristema apical. As técnicas biotecnológicas, como a cultura de tecidos e a transformação genética, podem auxiliar no fornecimento de mudas e na expansão da cultura para outras regiões do Brasil. Este trabalho foi realizado com o objetivo de estudar a embriogênese somática e obter um protocolo de transformação genética via *Agrobacterium rhizogenes* para dendezeiro. O processo de embriogênese somática foi avaliado por parâmetros anatômicos e ultraestruturais. As plantas regeneradas foram testadas quanto ao enraizamento com os reguladores de crescimento AIA (ácido indol acético) e o AIB (ácido indol butírico). As plantas regeneradas *in vitro* via embriogênese somática foram analisadas quanto à estabilidade genética, por meio de citometria de fluxo. Para obter um protocolo de transformação genética, as plantas oriundas de germinação *in vitro* aos 120 dias foram colocadas em contato com a *Agrobacterium rhizogenes* cepa MSU440 contendo o plasmídeo pEZR (H)-LN, que tem o gene *gfp*. Foram avaliados dois métodos de infecção, corte na base e infiltração a vácuo. Os resultados do estudo da embriogênese somática demonstraram que os calos com coloração bege apresentaram características embriogênicas e foram multiplicados em meio de cultura MM até o oitavo mês, e mantiveram as características embriogênicas. Depois desse período, regiões não embriogênicas começaram a se desenvolver. Foi possível desenvolver embriões somáticos no meio de cultura MCB e no meio de cultivo MG foram observados os estádios embriogênicos, a germinação dos embriões somáticos e, posteriormente, as plantas enraizadas *in vitro*, no meio de cultura MG, foram aclimatizadas com sucesso. O regulador de crescimento AIB, na concentração de 15 µM, proporcionou maior porcentagem de enraizamento (87%). A análise da estabilidade genética das plantas de dendezeiro, via citometria de fluxo, demonstrou um aumento de 0,2 pg de DNA em 35 das 50 plantas obtidas *in vitro* via embriogênese somática. O método de infiltração a vácuo foi eficiente na transformação genética das raízes das plantas (41%), em relação ao método de infecção por corte na base.

Palavras-chave: Dendê. Cultura de Tecidos. Embriogênese somática. Enraizamento. Variação somaclonal. Gene *gfp*. *Agrobacterium rhizogenes*.

ABSTRACT

Oil palm is grown mainly in the Brazil northern region and has great economic importance due to high production of oil per fruit, which is applied in food industry, cosmetic, pharmaceutical and biofuels. However, oil palm cultivation expansion is limited by morphological and anatomical characteristic, has only an apical meristem. Biotechnological techniques, such as tissue culture and genetic transformation can provide seedlings and culture expansion to other regions of Brazil. The aim of this work was to study the somatic embryogenesis and develop a *Agrobacterium rhizogenes* genetic transformation protocol for oil palm. Somatic embryogenesis process was analyzed by anatomical and ultrastructural parameters. The regenerated plants were rooted with growth regulators IAA (indole acetic acid) and IBA (indole butyric acid). Plants regenerated via somatic embryogenesis *in vitro* were analyzed for genetic stability by flow cytometry. For genetic transformation protocol, plants germinated *in vitro*, 120 days old, were placed in contact with the *Agrobacterium rhizogenes* strain MSU440 containing pEZR (H)-LN plasmid with *gfp* gene. Two infection methods were evaluated, base cut and vacuum infiltration. Calluses with beige color showed embryogenic characteristics and were multiplied in MM culture medium until the eighth month and maintained the embryogenic characteristics. After this period calluses developed no embryogenic regions. In culture medium MCB was possible to develop somatic embryos and in culture medium MG was observed embryogenic stages, somatic embryos germination. Subsequently, seedlings were rooted *in vitro*, using MG culture medium and successfully acclimatized. Growth regulator IBA, at a concentration of 15 μ M, showed higher percentage of rooting (87%). Genetic stability analysis of oil palm plants by flow cytometry showed an increase of 0.2 pg of DNA in 35 of 50 plants grown *in vitro*. vacuum infiltration method was effective in plant roots genetic transformation (41%) compared with infection cutting method.

Palavras-chave: Oil palm. Tissue Culture. Somatic embryogenesis. Rooting. somaclonal variation. *gfp* gene. *Agrobacterium rhizogenes*.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE.....	8
1. INTRODUÇÃO GERAL	8
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	10
2.1 Aspectos gerais do dendezeiro.....	10
2.2.2 Embriogênese somática em dendezeiro.....	12
2.2.1 Análises citológicas e histológicas.....	13
2.2.2 Enraizamento <i>in vitro</i>	14
2.2.3 Variação somaclonal.....	15
2.3 Transformação genética	17
2.3.1 Transformação genética mediada por <i>Agrobacterium</i>	17
2.3.3 Fatores que influenciam a eficiência da transformação via <i>Agrobacterium</i>	18
2.3.4 Gene reporter.....	21
CONSIDERAÇÕES GERAIS	23
REFERÊNCIAS.....	24
SEGUNDA PARTE.....	36
ARTIGO 1.....	37
Caracterização morfo-anatômica da embriogênese somática em dendezeiro híbrido Tenera.....	37
RESUMO	37
1 INTRODUÇÃO.....	41
2 MATERIAIS E MÉTODOS	42
2.1 Material vegetal	42
2.2 Desinfestação do material.....	43
2.2.1 Indução e multiplicação de calos.....	43
2.2.2 Regeneração e germinação dos embriões.....	44
2.3 Aclimatização e aclimação	45
3 Análises microscópicas	46
3.1 Análises citoquímicas.....	46
3.2 Microscopia eletrônica de varredura.....	46
3.3 Microscopia eletrônica de transmissão	47
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
3.1 Calogênese e multiplicação dos calos	47
3.2 Regeneração e germinação dos embriões.....	53
CONCLUSÃO.....	62
REFERÊNCIAS.....	63
ARTIGO 2.....	67
Enraizamento <i>in vitro</i> de plantas de dendezeiro (<i>Elaeis guineenses</i> x <i>Elaeis oleifera</i>) híbrido tenera.....	68
RESUMO	68
1 INTRODUÇÃO.....	70

2 MATERIAL E MÉTODOS	71
2.1 Material vegetal	71
2.1 Enraizamento.....	72
2.2 Estatística.....	72
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
REFERÊNCIAS.....	84
ARTIGO 3.....	89
Estabilidade genética de plantas de dendezeiro (<i>Elaeis guinensis</i>	
Jacq.) obtidas por embriogênese somática	90
1 INTRODUÇÃO.....	92
2 MATERIAL E MÉTODOS	93
2.1 Material vegetal	93
2.2 Embriogênese somática indireta e regeneração das plantas	93
2.3 Análise em citometria de fluxo	94
2.4 Análises morfológicas	95
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	95
CONCLUSÃO.....	101
REFERÊNCIAS.....	102
ARTIGO 4.....	105
Transformação genética de dendezeiro via <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	
.....	106
1 INTRODUÇÃO.....	108
2 MATERIAIS E MÉTODOS	110
2.1 Local de realização dos experimentos	110
2.2 Material vegetal	110
2.3 Obtenção das plantas.....	110
2.4 Transformação genética	111
2.4.1 Plasmídeo	111
2.4.2 Preparo de células competentes de <i>E. coli</i> e <i>Agrobacterium</i>	
<i>rhizogenes</i>	111
2.4.3 Transformação da cepa de <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	112
2.4.5 Extração de DNA – Miniprep.....	113
2.4.6 Confirmação das bactérias transformadas	114
2.4.7 Parâmetros analisados na transformação genética com <i>A.</i>	
<i>rhizogenes</i>	115
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	118
CONCLUSÃO.....	125
REFERÊNCIAS.....	126

PRIMEIRA PARTE

Introdução Geral

1. INTRODUÇÃO

O dendezeiro é uma palmeira oleaginosa, monocotiledônea, perene e de longo ciclo de vida (MORCILLO et al., 2007). É de grande interesse econômico, devido à alta produção de óleo por seus frutos, em torno de 6.000 t/hectare (ANUÁRIO, 2014). O óleo do dendezeiro é utilizado na indústria alimentícia, de cosméticos, farmacêutica e na produção de biocombustíveis (BOARI, 2008).

O Brasil é um país potencial para o cultivo de dendezeiro, devido à sua grande extensão territorial, porém, a disponibilidade de mudas para os agricultores não atende a demanda em escala comercial. A propagação por métodos convencionais, como a estaquia, é impossibilitada pelo fato de possuir apenas um meristema e, dessa forma, é propagada exclusivamente por meio da germinação de sementes. A propagação seminal também é prejudicada devido ao longo tempo requerido para a germinação (aproximadamente três anos) e à baixa germinação, que é de apenas 30% dos lotes semeados (LUIS; BEZERRA; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2010; MANEHONON et al., 2009).

Além de todos os problemas enfrentados para a produção de mudas, o cultivo em todo país é prejudicado, pois as plantas não se adaptam bem às diferentes condições climáticas existentes nos bioma brasileiros. O cultivo do dendezeiro se concentra nos estados do Pará, Bahia e Amazonas, devido ao solo úmido e às altas temperaturas, favoráveis ao desenvolvimento desta espécie (CLEMENT et al., 2005). Quando cultivado em diferentes climas, o dendezeiro pode ter uma redução no rendimento e, conseqüentemente, aumento no custo de produção (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, 2013).

A fim de aumentar a produção de mudas, a embriogênese somática é uma opção para as palmáceas, por produzir clones em larga escala, em

condições assépticas e em espaço físico reduzido (GUERRA; TORRES; TEXEIRA, 1998).

A embriogênese somática é o processo pelo qual células haploides ou somáticas, que se desdiferenciam e se multiplicam, passando pelos estádios embriogênicos, globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar, originam uma planta sem que ocorra fusão de gametas. Existem duas vias para induzir a embriogênese somática, que são a direta e a indireta. A última diferencia-se pela fase intermediária de calos que, posteriormente, originam embriões somáticos (ZIMMERMANN, 2010).

Na embriogênese somática indireta, as análises microscópicas dos calos são de fundamental importância para verificar características que permitem a distinção entre os calos embriogênicos e os não embriogênicos (PÁDUA et al., 2013). A avaliação das células é importante também durante o desenvolvimento dos embriões, permitindo verificar a formação dos tecidos procâmbio, meristema fundamental e protoderme, e possíveis anormalidades nos embriões somáticos (FILLIPI; APPEZATO-DA-GLORIA; RODRIGUEZ, 2001; MOURA; MOTOIKE, 2009).

Após a obtenção e a regeneração dos embriões somáticos, outra etapa relevante para o cultivo *in vitro* das espécies lenhosas é o enraizamento, pois, devido à recalcitrância, estas espécies apresentam dificuldades no enraizamento *ex vitro*, prejudicando a taxa de sobrevivência das plantas durante a aclimatização (FORD et al., 2001; ONO; RODRIGUES, 1996; PÁDUA et al., 2014). Dessa forma, o desenvolvimento do sistema radicular em condições *in vitro* pode favorecer a sobrevivência e a aclimatização das plantas. Os principais fatores que influenciam a rizogênese são o genótipo e o uso de reguladores de crescimento, principalmente de auxinas (ROCHA et al., 2008).

Para garantir a segurança dos processos de propagação *in vitro*, as análises genéticas são importantes, pois, até a etapa de enraizamento, as plantas

obtidas *in vitro* passam por inúmeros subcultivos e meios de cultura com altas concentrações de reguladores de crescimento, que podem induzir alterações genéticas, ou seja, variações somaclonais (BAIRU; AREMU; STADEN, 2011; NOGUEIRA, 2014). As análises moleculares, como a citometria de fluxo e os marcadores moleculares, podem auxiliar nessa análise e seleção (SINGH et al., 2012; SRISAWATI; THIPNETR; MAKNOI, 2012).

Outra técnica biotecnológica que vem sendo amplamente estudada e pode ser combinada com os avanços das técnicas de propagação *in vitro* é a transformação genética de plantas que, no caso do dendezeiro, pode permitir a obtenção de plantas mais resistentes a fatores abióticos e cultiváveis em locais de clima atípico, favorecendo a ampliação das fronteiras agrícolas para a espécie.

A técnica de transformação genética tem como característica principal a inserção apenas do gene de interesse na planta (ISHIDA et al., 1996; ZHAO et al., 1998), mas, para o dendezeiro, provavelmente devido às dificuldades de regeneração *in vitro*, existem poucos relatos de plantas transformadas na literatura. Portanto, são necessários estudos que visem à otimização de protocolos de regeneração *in vitro* e de transformação genética.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de estudar a embriogênese somática do dendezeiro e obter um protocolo de transformação genética utilizando a *Agrobacterium rhizogenes*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos gerais do dendezeiro

O dendezeiro é uma palmeira monocotiledônea, monoica, oleaginosa e que tem longo ciclo de vida produtivo, de, aproximadamente, 25 anos (MORCILLO et al., 2007).

O grande interesse por esta espécie se deve à alta produção de óleo em seus frutos, em torno de 6.000 toneladas de óleo por hectare, enquanto as espécies mais cultivadas, como a soja, produzem 500 toneladas de óleo por hectare (ANUÁRIO..., 2014).

Dois tipos de óleo são produzidos pelo dendezeiro: o óleo da polpa, conhecido como azeite de dendê, extraído da polpa do fruto e o óleo de , extraído da amêndoa, com rendimentos de 22% e 3%, respectivamente (BOARI, 2008; KONAN et al., 2005). O óleo do dendezeiro é amplamente utilizado nas diferentes áreas da indústria alimentícia, cosméticos, farmacêutica e para a produção de biocombustíveis. O óleo da polpa é utilizado na fabricação de margarinas, biscoitos, massas, tortas e na produção de biocombustíveis. Já o óleo de palmiste é aplicado na indústria farmacêutica e na de cosméticos (BOARI, 2008; GHANSSAN et al., 2003; KONAN et al., 2005).

Atualmente, os maiores produtores de dendezeiro são Indonésia e Malásia. Enquanto o Brasil encontra-se na 15ª posição nesse “ranking” (EMBRAPA, 2013; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO, 2012; RAMALHO FILHO et al., 2010) e a sua produção restringe-se ao sul da Bahia, Amazônia Ocidental e Pará (BIONDI; MONTEIRO; GLASS, 2008).

O Brasil é um país potencial para o cultivo de dendezeiro, podendo subir de posição nessa escala por ter grande extensão territorial para plantio (EMBRAPA, 2013). Mas, os produtores de dendezeiro encontram dificuldades para ampliar o plantio, devido ao baixo fornecimento de mudas. O dendezeiro tem apenas um meristema apical, o que impede a sua propagação por meio de estacas, sendo a propagação realizada por meio da germinação de sementes, que é lenta, podendo levar até três anos e baixo, apenas 30% das sementes germinam (LUIS; BEZERRA; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2010; MARTINE et al., 2009).

Outro problema observado é que as cultivares comerciais não se adaptam às diferentes condições climáticas existentes nos biomas brasileiros e, em situações de estresse hídrico, pode haver uma redução de peso médio dos cachos, do tamanho e da emissão de novas folhas, além do aumento da razão sexual masculina, abortamento de inflorescências de 7 a 13 meses de idade e redução de produtividade de até 20% para cada 100 mm de ocorrência de déficit hídrico (EMBRAPA, 2013; GOMES JUNIOR; BARRA, 2010).

2.2.2 Embriogênese somática em dendezeiro

A embriogênese somática, também denominada de adventícia ou assexual, é o processo pelo qual células haploides ou somáticas desenvolvem-se sem a fusão de gametas, dando origem a uma planta (ZIMMERMANN, 2010).

Os embriões somáticos podem se originar por duas vias de regeneração, a direta e a indireta. A embriogênese somática direta consiste na formação dos embriões somáticos diretamente dos explantes, sem a formação de estágios intermediários de calos. Por outro lado, na embriogênese somática indireta ocorre a formação de calos (ZIMMERMANN, 2010).

Os calos são massas de células desorganizadas que se multiplicam desordenadamente, podendo se diferenciar em tecidos ou órgãos e que têm capacidade de responder ao estresse, que pode ser causado por substâncias químicas ou condições físicas (ZIMMERMANN, 2010). Diferentes tipos de calos podem ser induzidos no meio de cultivo, dentre eles o calo embriogênico, que origina, em sua superfície, pequenos embriões somáticos que se individualizam e são capazes de regenerar plantas completas (ÂNGELO et al., 2009).

Esses calos podem ser previamente identificados e definidos, por meio de análises microscópicas das características de suas células.

A embriogênese somática vem sendo amplamente estudada em dendezeiro, porém, os autores relatam o longo tempo de cultivo *in vitro* (11-13 meses), para obter plantas (CHEHMALEE; TE-CHATO, 2008; SILVA; LUIS; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2012). Durante a fase indução de calos embriogênicos, as auxinas picloram e 2,4-D são as mais citadas (BALZON; LUIS; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2013; SILVA; LUIS; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2012).

A identificação dos calos embriogênicos visualmente encontra algumas dificuldades, por eles serem característicos de cada espécie e apresentarem-se heterogêneos em algumas espécies como o dendezeiro. Como exemplo cita-se o calo embriogênico do cafeeiro, que é, geralmente, amarelo e friável, enquanto os calos embriogênicos de palmeiras são bege e nodulares (PADUA et al., 2013; SILVA; LUIS; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2012).

2.2.1 Análises citológicas e histológicas

As análises citológicas dos calos permitem inferir o potencial embriogênico, diferenciar os calos embriogênicos dos não embriogênicos e compreender o desenvolvimento e a morfogênese dos calos (FILLIPI; APPEZATO-DA-GLORIA; RODRIGUEZ, 2001; PÁDUA et al., 2013).

Por meio de testes citoquímicos, utilizando-se corantes, como, por exemplo, o azul de toluidina, é possível visualizar características embriogênicas nas células dos calos, como células pequenas, isodiamétricas, com núcleo grande e aglomerados celulares. Corantes como o lugol permitem observar a presença de grãos de amido, que fornecem energia para a formação e o desenvolvimento do embrião somático (MARTIN et al., 2000; MOURA et al., 2008).

Durante a indução do embrião somático é possível diferenciar, por meio das análises microscópicas, as estruturas formadas, o processo de regeneração,

(orgânogênese direta ou indireta, embriogênese direta ou indireta) e caracterizar os estádios embriogênicos globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar. Já no processo de regeneração *in vitro* pode-se observar a presença ou a ausência de sincronia dos embriões somáticos e a identificação de falhas na formação do embrião somático, a fim de prevenir a obtenção de plantas anormais (FILLIPI; APPEZATO-DA-GLORIA; RODRIGUEZ, 2001; NOGUEIRA et al., 2007).

2.2.2 Enraizamento *in vitro*

Após a regeneração completa do embrião, algumas espécies necessitam ser enraizadas *in vitro*, com a introdução de reguladores de crescimento no meio de cultivo. Essa necessidade é citada, principalmente, para espécies lenhosas, como o dendezeiro (ABUL-SOAD; JATOI, 2014; PÁDUA et al., 2014; THUZAR et al., 2011), sendo uma etapa importante para o sucesso durante a fase de aclimatização das plantas (PÁDUA et al., 2014).

A rizogênese de plantas micropropagadas é um processo de grande complexidade que envolve fatores endógenos e exógenos que ainda não estão completamente elucidados (SOUZA; PEREIRA, 2007).

As espécies lenhosas têm maiores dificuldades no desenvolvimento do sistema radicular em relação às plantas herbáceas. Este fato está relacionado ao fito-hormônio endógeno envolvido com a rizogênese, o AIA, que, nas espécies lenhosas, pode ser metabolizado rapidamente no ápice do caule, local onde é produzido, resultando em baixa concentração de AIA livre, capaz de ser transportado para a base da planta onde as raízes se desenvolvem. Ainda, as células da base das plantas lenhosas podem estar menos sensíveis às auxinas, ou menos competentes para essa rediferenciação (FORD et al., 2001; ONO; RODRIGUES, 1996).

Durante o cultivo *in vitro*, dentre os principais fatores que podem influenciar na rizogênese, estão as condições de luminosidade e substâncias presentes no meio de cultivo, como, por exemplo, carboidratos, sais minerais, carvão ativado, compostos fenólicos, poliaminas e reguladores de crescimento, que são utilizados para aumentar a formação de raízes (CURTI; REINIGER, 2014; SOUZA; PEREIRA, 2007) e, conseqüentemente, aumentar a taxa de sobrevivência das plantas durante a aclimatização (PÁDUA et al., 2014).

Os reguladores de crescimento sintéticos mais citados na literatura para o enraizamento *in vitro* de palmeiras pertencem à classe das auxinas. São eles o ácido indolacético (AIA) e o ácido indolbutírico (AIB) (RADMANN; FACHINELLO; PETERS, 2002).

Diversas palmeiras, como a tamareira (ABUL-SOAD; JATOI, 2014) garirobeira (MELO et al., 2001) e o dendezeiro (PÁDUA et al., 2014), foram estudadas, a fim de aumentar a taxa de sobrevivência na fase de aclimatização, induzindo a formação de raízes *in vitro* com a aplicação desses reguladores de crescimento. Esses autores constataram a necessidade de enraizamento prévio para o sucesso, durante a fase de aclimatização.

2.2.3 Variação somaclonal

A variação somaclonal é definida como qualquer alteração genética e epigenética detectada nas plantas obtidas por cultivo *in vitro*, independente da rota morfogénica ou do explante utilizado (LARKIN; SCOWCROFT, 1981).

A má formação dos embriões somáticos e das plantas obtidas *in vitro* pode ser decorrente das altas concentrações dos reguladores de crescimento e/ou do número e da duração dos subcultivos (BAIRU; AREMU; STADEN, 2011), mas também podendo ser causada por fatores intrínsecos e extrínsecos relacionados ao cultivo *in vitro* (SUPRASANNA et al., 2010).

Estas variações podem ocorrer em âmbito morfológico, fisiológico, bioquímico e genético. Dentre elas, a variação morfológica é a mais facilmente observada por meio de parâmetros como estatura, morfologia foliar, diâmetro e pigmentação, entre outros aspectos particulares da espécie (HUANG et al., 2012).

No entanto, esses parâmetros morfológicos não são eficientes na identificação intraespecífica, pois estas plantas apresentam características morfológicas semelhantes durante a fase vegetativa (SATHISH; MOHANKUMAR, 2007;SRISAWATI; THIPNETR; MAKNOI, 2012).As análises moleculares, como a técnica de citometria de fluxo, podem auxiliar na identificação precoce de alterações genéticas.

A citometria de fluxo tem sido amplamente utilizada, devido à sua alta precisão e rapidez de análise na estimativa da quantidade de DNA das plantas (BAIRU; AREMU;STADEN, 2011), também para o estudo de variações somaclonais em diferentes espécies, como milho (COUTO et al., 2013), cana-de-açúcar (NOGUEIRA et al., 2014) e dendezeiro (SRISAWAT; THIPNETR; MAKNOI, 2012).

Para o dendezeiro, a análise precoce do conteúdo de DNA é de grande importância, pois existe uma variação característica da espécie denominada “mantled”, que é caracterizada pela modificação das flores, causando esterilidade, o que prejudica a produção e só se manifesta visivelmente a partir dos seis anos de idade das plantas (RIVAL, 2000).

Em dendezeiro, a citometria de fluxo também foi utilizada para avaliar a quantidade de DNA em cultivo *in vitro* de calos, suspensões celulares e plântulas (MADON, 2012) e para a classificação de cultivares (SRISAWATI; THIPNETR; MAKNOI, 2012).

2.3 Transformação genética

A transformação genética se destaca dentre as técnicas de melhoramento genético por inserir apenas o gene de interesse, sem a necessidade de alterar ou interferir em vias metabólicas não alvo, além de reduzir o tempo de obtenção da planta com a característica de interesse (ISHIDA et al., 1996; ZHAO et al., 1998).

No caso do dendenheiro, por meio da transformação genética podem-se obter mudas com maior produtividade em óleo, resistência a pragas e doenças, redução de porte, adaptação aos ambientes de expansão da cultura e também para o desenvolvimento de cultivares com características de óleo diversificadas para atender a diferentes finalidades (relação entre ácidos graxos saturados e insaturados, conteúdo de carotenoides e menor acidez) (KRUG et al., 2013).

Dentre as técnicas de transformação genética destacam-se a via direta, em que o gene é inserido diretamente no explante e a via indireta, que necessita de um vetor, a bactéria *Agrobacterium*, para a inserção do gene de interesse.

2.3.1 Transformação genética mediada por *Agrobacterium*

A transformação genética por meio da *Agrobacterium* é um método indireto, por necessitar da bactéria para a transferência do gene de interesse para a planta. A *Agrobacterium* é encontrada naturalmente nos solos e causa patologias em plantas, devido aos seus mecanismos de ação em transferir parte do seu DNA para as plantas.

No processo de transformação indireto duas espécies de *Agrobacterium* são mais utilizadas: a *Agrobacterium tumefaciens*, que se caracteriza por formar a chamada galha da coroa nas plantas, geralmente utilizada na transformação de calos, suspensão celular e folhas e a *A. rhizogenes*, que proporciona uma raiz em forma de cabeleira, utilizada quando os objetivos são a transformação de raízes e

a obtenção de plantas quiméricas (BRASILEIRO; LACORTE, 2000; IZAWATI et al., 2012; MASLI et al., 2009).

Esta técnica se torna vantajosa na inserção de um menor número de cópias e uma maior estabilidade do genoma, e a integração em regiões ativas da transcrição do cromossoma, o que pode não ocorrer pelas vias diretas, como a biobalística (MARIASHIBU et al., 2013).

2.3.2 Transformação via *Agrobacterium rhizogenes*

A *Agrobacterium rhizogenes* é amplamente estudada quanto à sua virulência, ou seja, sua capacidade de infectar as plantas. Essa virulência pode variar de acordo com a introdução de compostos fenólicos no meio de cultivo, método de infecção da planta com a bactéria, espécie de planta em estudo e com a cepa utilizada. As cepas Arqua-1 e K599 são consideradas de baixa virulência e, conseqüentemente, geram um número reduzido de raízes transformadas, sendo classificadas de crescimento e morfologia comparáveis às das raízes normais. Já as cepas MSU440 e R1000 são, geralmente, consideradas de maior virulência e podem apresentar estrutura de raiz em cabeleira e crescimento anormal (COLLIER et al., 2005; QUANDT; PÜHLER; BROER, 1993).

Muitos autores utilizam a *A. rhizogenes* para otimizar protocolos de transformação devido ao menor tempo gasto e à simplicidade no processo de transformação e regeneração, em relação a *A. tumefaciens*, além de possibilitar verificar a inserção de genes, estudar a expressão do gene, técnicas baseadas em RNAi e para analisar a função e o potencial de promotores (BOISSON-DERNIER et al., 2001; RON et al., 2014).

2.3.3 Fatores que influenciam a eficiência da transformação via *Agrobacterium*

Existem vários fatores que podem afetar a eficiência da transformação genética via *Agrobacterium* (DUTT; GROSSER, 2009). Dentre eles podem-se citar a escolha da cepa bacteriana, o método de infecção da planta pela bactéria, o uso de compostos fenólicos, a idade do explante, as condições de cocultivo (tempo e temperatura) e a densidade óptica (OD) da bactéria (AKRAMIAN et al., 2008; MARIASHIBU et al., 2013; RIBAS et al., 2011).

A introdução de compostos fenólicos no meio de cultivo é vantajosa principalmente para as espécies de monocotiledôneas, como o dendezeiro. Alguns autores sugerem que os tecidos das monocotiledôneas são incapazes de produzir compostos fenólicos ou os produzem em níveis insuficientes para atrair a *Agrobacterium* (SMITH; HOOD, 1995). Nesse caso, a infecção pode ser induzida adicionando-se alguns compostos fenólicos no meio de cultivo.

As moléculas dos compostos fenólicos mais conhecidas são as acetoseringonas ou a hidroxi-acetoseringonas, chalconas e derivados do ácido cinâmico (STACHEL et al., 1985). Os compostos fenólicos, como acetoseringona e alfa-hidroxiacetoseringona, ativam os genes *vir*, responsáveis pela transferência do T-DNA da *A. rhizogenes* para as células feridas do hospedeiro (SMITH; HOOD, 1995).

O uso da acetoseringona no meio de cultivo de plantas de tabaco proporcionou um aumento de quatro vezes na eficiência da transformação utilizando *A. rhizogenes* (KUMAR et al., 2006). Em *Citrus*, notou-se que a introdução de 100 μ M de acetoseringona no meio de cultivo favoreceu a transformação utilizando *A. tumefaciens* (DUTT; GROSSER, 2009). Em sementes de “Hamlin” sweet Orange, 200 μ M de acetoseringona proporcionaram maior número de plantas transformadas (MENDES et al., 2002).

Além da acetoseringona, outros fatores associados ao meio de cultivo podem influenciar o processo de transformação genética; na transformação de suspensões celulares de dendezeiro, o meio de cultivo acrescido de 6% de

sacarose foi associado à biobalística para aumentar a eficiência da transformação via *A. tumefaciens*, em que se observou aumento de 0,7% de eficiência, associando-se todos esses parâmetros (MASLI et al., 2009). Esses métodos também foram utilizados para aumentar a virulência da *A. tumefaciens* na transformação de calos embriogênicos de dendezeiro (IZAWATI et al., 2012). Os trabalhos com dendezeiro estão em fase de otimização de protocolos, em que métodos de transformação e diferentes fontes de explantes estão sendo avaliados. Em embriões de *Elaeis oleifera* a transformação por meio da biobalística gerou uma eficiência de 9%, confirmada por PCR (BHORE; SHAH, 2012).

O método de infecção da *Agrobacterium* também é uma etapa de grande importância para a otimização do processo de transformação de plantas. Em soja, a eficiência da transformação foi aumentada utilizando-se a infiltração a vácuo (MARIASHIBU et al., 2013). O método a vácuo também favoreceu a transformação de embriões de cafeeiro (CANCHE-MOO et al., 2006) e a transformação de brotações (MENDONÇA, 2012) e calos de *Eucalyptus urophylla* (BALIEIRO, 2013).

Diferentes fontes de explantes de dendezeiro influenciaram a porcentagem de transformação, verificando-se que calos apresentaram uma maior taxa de eventos transgênicos (78%-100%) em relação às folhas (10%-32%) pela expressão do gene *gus* (ISMAIL et al., 2010).

Os trabalhos de transformação genética em dendezeiro visam diferentes objetivos. Podem-se citar como exemplos a introdução de genes que interferem na via metabólica, como o gene da proteína palmitoil-tioesterase, um dos principais genes envolvidos na biossíntese plastidial dos ácidos graxos por meio da biobalística (BHORE; SHAH, 2012), a produção de bioplásticos com a introdução do gene da biossíntese do poli-hidroxibutirato (ISMAIL et al., 2010) e o aumento do teor de oleato (YUNUS; KADIR, 2008).

Na literatura não foram encontrados relatos de trabalhos de transformação genética com a *A. rhizogenes* em dendezeiro.

2.3.4 Gene repórter

Os genes repórteres mais utilizados são o *gus* (B-glucoronidase) e *gfp* (*green fluorescent protein*). O gene *gus* foi isolado da *Escherichia coli*, identificado por métodos histoquímicos que destroem o tecido, sendo desvantajoso para o processo (TORRES et al., 1999).

A proteína *green fluorescent protein*, GFP, é uma macromolécula que, quando irradiada com luz azul ou UV, produz uma intensa fluorescência verde e tem a vantagem de não existir naturalmente em plantas, facilitando a identificação (CHALIFE et al., 1994). A maior vantagem da utilização do gene *gfp* sobre outros genes repórteres é que não precisa de cofatores para fluorescer, podendo, assim, ser visualizado em células vivas, sem destruir o material biológico (NIEDZ; SUSSMAN; SATERLEE, 1995).

A utilização da proteína GFP vem sendo amplamente aplicada nas técnicas biotecnológicas, podendo atuar como um gene repórter conveniente e sensível para a visualização da regulação gênica, a transdução de sinal e a localização subcelular das proteínas quiméricas em células vivas (CHIU et al., 1996; VIVIANI; BECHARA, 2008).

As proteínas fluorescentes, como a GFP, permitem acompanhar o deslocamento e a atividade destes nas células vivas, sendo marcadores efetivos nos processos de transformação genética (LIPPINCOTT-SCHWARTZ; PATTERSON, 2003; STEWART, 2005).

A introdução do gene *gfp* permitiu o monitoramento durante o desenvolvimento das plantas de pessegueiro. Os autores observaram elevados

níveis de expressão da proteína GFP, mantidos na segunda geração das plantas transgênicas (PADILLA et al., 2006).

Em calos embriogênicos obtidos de embriões zigóticos de plantas de álamo, transformados com o gene *gfp*, observaram-se pontos fluorescentes fortes com confirmação da transgenia posteriormente por PCR. Além disso, o uso do gene *gfp* permitiu acompanhar o desenvolvimento dos calos dois dias após o processo de transformação até a regeneração e o crescimento das plantas (LI; QU, 2010).

A possibilidade de facilitar o processo de triagem de plantas transgênicas com o uso de proteínas fluorescentes, como o GFP, é de grande valia, partindo-se do princípio de essa ser uma técnica fácil, rápida e de menor custo em relação à PCR. Essa técnica foi aplicada com sucesso em plantas transgênicas de tabaco, nas quais se visualizou a expressão da proteína GFP e, posteriormente, a confirmação por PCR das plantas transformadas (OVEN; LUTHAR, 2013).

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Devido à importância econômica do óleo de dendzeiro e ao fato de a produção comercial de mudas de dendzeiro não atender à demanda mundial, é necessária a busca por técnicas que maximizem essa produção e que ampliem os limites territoriais para o seu plantio.

Dessa forma, a aplicação de técnicas biotecnológicas é fundamental, devido aos fatores limitantes da propagação convencional do dendzeiro, como a dormência de suas sementes em campo e a porcentagem de germinação relativamente baixa e demorada, sendo necessários até três anos para que a germinação ocorra.

Neste contexto, o acompanhamento da embriogênese somática e a verificação das plantas obtidas por meio desse processo podem fornecer mudas com alto potencial para plantio e comercialização.

Outra técnica que pode favorecer a ampliação do cultivo do dendzeiro é a transformação genética, por meio da qual se podem obter plantas mais resistentes aos estresses bióticos e abióticos. Porém, primeiro, é necessário obter um protocolo eficiente para a transformação genética, pois os trabalhos com *Agrobacterium rhizogenes* são escassos e a obtenção de plantas de dendzeiro por meio de técnicas de cultura de tecidos, com a formação de calos, ainda necessita de estudos, a fim de se otimizar o processo.

REFERÊNCIAS

ABUL-SOAD, A. A.; JATOI, M. A. Factores affecting I vitro rooting date palm (*Phoenix dactylifera* L.). **Pakistan Journal of Agricultural Sciences**, Faisalabad, v. 51, n. 2, p. 477-484, 2014.

AKRAMIAN, M. et al. Virulence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on genetic transformation of four *Hyoscyamus species*. **American-Eurasien Journal Agricultural & Environmental Science**, Deira, v. 3, n. 5, p. 301-309, 2008.

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

ANUÁRIO da agricultura brasileira. São Paulo: FNP, 2014. 167p.

BAIRU, M. W.; AREMU, A. O.; STADEN, J. van. Somaclonal variation in plantas: causes and detection methods. **Plant Growth Regulation: An International Journal on Plant Growth and Development**, Dordrecht, v. 63, n. 2, p. 147-173, Mar. 2011.

BALIEIRO, F. P. **Transformação genética de híbridos de urograndis**. 2013. 86 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

BALZON, T. A.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. New approaches to improve the efficiency of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) from mature zygotic embryos. **In vitro Cellular & Developmental Biology- Plant**, Wallingford, v. 49, n. 1, p. 41-50, Feb. 2013.

BHORE, S. J.; SHAH, F. H. Genetic transformation of the American oil palm (*Elaeis oleifera*) immature zygotic embryos with antisense palmitoyl-acyl carrier protein thioesterase (PATE) gene. **World Applied Sciences Journal**, Deira, v. 16, n.3, p. 362-369, 2012.

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

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

BOISSON-DERNIER, A. et al. Agrobacterium rhizogenes-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v.14, n. 6, p.693-700, June 2001.

BRASILEIRO, A. C. M.; LACORTE, C. Agrobacterium: um sistema natural de transferência de genes para plantas. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 3, n. 15, p. 12-15, jul./ago. 2000.

CAHEHMALEE, S.; TE-CHATO, S. Induction of somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured zygotic embryo of oil palm. **Journal of Agricultural Technology**, v. 4, n. 2, p. 137-146, June 2008.

CANCHE-MOO, R. L. R. et al. Genetic transformation of *Coffea canephora* by vacuum infiltration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture: An International Journal on the Cell Biology of Higher Plants**, Dordrecht, v. 84, n. 3, p. 373-377, Mar. 2006.

CHALIFE, M. Y. et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science**, New York, v.263, n. 5148, p.802-805, Feb. 1994.

CHIU, W. L. et al. Engineered GFP as a vital reporter in plants. **Current Biology**, London, v. 6, n. 3, p. 325-330, 1996.

CLEMENT, C. R. et al. O potencial das palmeiras tropicais no Brasil: acertos e fracassos das últimas décadas. **Agrociências**, Montevideu, v.9, n. 1/2, p. 67-71, 2005.

COLLIER, R. *Ex vitro* composite plants: an inexpensive, rapid method for root biology. **Plant Journal**, Oxford, v. 43, n. 3, p. 449-457, Aug. 2005.

COUTO, E. G. de O. et al. Identification of haploid maize by flow cytometry, morphological and molecular markers. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 37, n. 1, p. 25-31, jan./fev. 2013.

CURTI, A. R.; REINIGER, L. R. S. In vitro rhizogenesis in *Peltophorum dubium*: the effect of different culture media. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 2, p. 314-320, 2014.

DUTT, M.; GROSSER, J.W. Evaluation of parameters affecting *Agrobacterium*-mediated transformation of *Citrus*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 98, n.3, p. 331-340, Sept. 2009.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA.
Embrapa Amazônia Ocidental para a cultura do dendezeiro. Brasília, 2013.
76 p. (Documentos, 102).

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

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/default.aspx?lang=em#ancor>>. Acesso em: 22 nov. 2012.

FORD, Y. Y. et al. Adventitious rooting: examining the role of auxin in easy and a difficult-to root plant. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v.10, n. 2, p.1-11, Feb. 2001.

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

GOMES JUNIOR, R. A.; BARRA, V. R. **Seleção de áreas aptas para o cultivo sustentável da palma de óleo**: bases técnicas para a cultura da Palma de óleo integrado na unidade produtiva da agricultura familiar. Belém: EMBRAPA Amazônia Oriental, 2010. 190 p.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1998. v.2,p.533-568.

HUANG, H. et al. Variations in leaf morphology and DNA methylation following *in vitro* culture of *Malus xiaojinensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 111, n. 2, p. 153-161, 2012.

ISHIDA, Y. et al. High efficiency transformation of maize (*Zea Mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature Biotechnology**, New York, v. 14, n. 6, p.745-750, 1996.

ISMAIL, I. et al. Genetic transformation and molecular analysis of polyhydroxybutyrate biosynthetic gene expression in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq. var Tenera) tissues. **Plant Omics Journal**, Melbourne, v. 3, n.1, p.18-27, 2010.

IZAWATI, A. M. et al. Transformation of oil palm using *Agrobacterium tumefaciens*. **Methods in Molecular Biology**, New York, v. 847, n. 6, p. 177-188, Jan. 2012.

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

KRUG, C. et al. **Plano estratégico da Embrapa Amazônia Ocidental para a cultura do dendezeiro**. Brasília, 2013. 76 p. (Documentos,102).

KUMAR, V. et al. *Agrobacterium rhizogenes* mediated genetic transformation resulting in hairy root formation is enhanced by ultrasonication and acetosyringone treatment. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 9, n. 4, July 2006. Disponível em: <<http://www.ejbiotechnology.info/content/vol9/issue4/full/4>>. Acesso em: 10 nov. 2014.

LARKIN, P. J.; SCOWCROFT, W. R. Somaclonal variation: a new source of variability from cell cultures for plant improvement. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 60, p. 197-214, 1981.

LI, R.; QU, R. High throughput *Agrobacterium*-mediated switchgrass transformation. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 35, n. 3, p. 1-9, Mar. 2010.

LIPPINCOTT-SCGWARTZ, J.; PATTERSON, G.H. Development and use of fluorescent protein markers in living cells. **Science**, New York, v. 5616, p.87-91, Apr. 2003.

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

MADON, M. Analysis of oil palm calli and regenerants using flow and image cytometry and 18S-25S ribosomal DNA fluorescence in situ hybridisation (Fish). **Journal of Oil Palm Research**, Benin City, v. 24, p. 1318-1329, Apr. 2012.

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

MARIASHIBU, T. S. et al. Vacuum infiltration enhances the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in Indian soybean cultivars. **Acta Physiologiae Plantarum**, Copenhagen, v. 35, n. 1, p. 41-54, Jan. 2013.

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

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

MASLI, D.I.A. et al. Transformation of oil palm using *Agrobacterium tumefaciens*. **Journal of Oil Palm Research**, Benin City, v. 21, p. 643-652, Dec. 2009.

MELO, de B. et al. Effects of NAA and AIB in vitro on the length and weights of the dry matters of the roots and aerial part of the guariribeira seedling [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.]. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 17, n. 1, p. 49-59, June 2001.

MENDES, B. M. J. et al. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of "Halmlin" sweet Orange. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 7, p. 955-961, jul. 2002.

MENDONÇA, E. G. **Transformação genética e rejuvenescimento *in vitro* de híbridos naturais de *Eucalyptus urophylla***. 2012. 71p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

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

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

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

NIEDZ, R.P.; SUSSMAN, M. R.; SATERLEE, J. S. Green fluorescent protein: an *in vivo* reporter of plant gene expression. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.14, n. 7, p.403-406, Apr. 1995.

NOGUEIRA, G. F. et al. An approach on the *in vitro* maintenance of sugarcane with views for conservation and monitoring of plant nuclear DNA contents via flow cytometry. **In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Wallingford, v. 50, p. 1-11, Dec. 2014.

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

ONO, E.O.; RODRIGUES, J.D. **Aspectos da fisiologia do enraizamento de estacas caulinares**. Jaboticabal: FUNEP, 1996. 83 p.

OVEN, K.; LUTHAR, Z. Expression and molecular analysis of DsRed and gfp Expression and molecular analysis of *DsRed* and *gfp* fluorescent genes in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). **Acta Agriculturae Slovenica**, Ljubljana, v. 101, n. 1, p.5-14, Jan. 2013.

PADILLA, I.M.G. et al. Evaluation of transformation in peach *Prunus persica* explants using green fluorescent protein (GFP) and beta-glucuronidase (GUS) reporter genes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.84, n. 3, p.309-314, Mar. 2006.

PÁDUA, M. S. et al. *In vitro* development and acclimatization of dendezeiro. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 38, n. 6, p. 1095-1102, nov./dez. 2014.

PÁDUA, M. S. et al. Induction and characterization of oil palm (*Elaeis guineensis*Jacq.) pro-embryogenic masses. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 85, n. 4, p. 1545-1556, 2013.

QUANDT, H. J.; PÜHLER, A.; BROER, I. Transgenic root nodules of *Vicia hirsuta*: a fast and efficient system for the study of gene expression in indeterminate-type nodules. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 6, n. 6, p. 699-706, Aug. 1993.

RADMANN, E.B.; FACHINELLO, J. C.; PETERS, J. A. Efeito de auxinas e condições de cultivo no enraizamento *in vitro* de porta-enxertos de macieira 'M-9'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n.3, p.624-628, dez. 2002.

RAMALHO FILHO, A. et al. (Org.). **Zoneamento agroecológico, produção e manejo para a cultura da palma de óleo na Amazônia**. Rio de Janeiro: EMBRAPA Solos, 2010. p. 205-215.

RIBAS, A. F. et al. Agrobacterium-mediated genetic transformation of *Coffea arabica* (L.) is greatly enhanced by using established embryogenic callus cultures. **BMC Plant Biology**, London, v. 11, n. 1, p. 92-107, May 2011.

RIVAL, A. Somatic embryogenesis in oil palm. In: JAIN, S. M.; GUPTA, P. K.; NEWTON, R. J. (Ed.). **Somatic embryogenesis in woody plants**. Dordrecht: Kluwer, 2000. p. 249-290.

ROCHA, M. A. C. da et al. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de genótipos de jenipapeiro (*Genipa americana* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n.3, p. 769-774, set. 2008.

RON, M. et al. Hairy root transformation using *Agrobacterium rhizogenes* as a tool for exploring cell type-specific gene expression and function using tomato as a model [W][OPEN]. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 166, p. 455-469, Oct. 2014.

SATHISH, D. K.; MOHANKUMAR, C. RAPD markers for identifying oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) parental varieties (Dura & Pisifera) and the hybrid Tenera. **Indian Journal of Biotechnology**, New Delhi, v.6, n. 4, p. 354-358, July 2007.

SILVA, R. de C.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Differential responses to somatic embryogenesis of different genotypes of Brazilian oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 111, n. 1, p. 59-67, May, 2012.

SINGH, C. et al. Utility of flow cytometry to classify abnormal plasma cell populations in marrow samples collected from patients with putative plasma cell. **Open Journal of Blood Diseases**, Nairobi, v. 2, n. 3, p. 39-45, 2012.

SMITH, R.H.; HOOD, E.E. *Agrobacterium tumefaciens* transformation of monocotyledons. **Crop science**, Madison, v. 35, n. 2, p. 301-309, Mar./Apr. 1995.

SOUZA, A.V.; PEREIRA, A.M.S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.9, n. 4, p.103-117, set. 2007.

SRISAWAT, T.; THIPNETR, S.; MAKNOI, C. A preliminary study of leaf morphology and flow cytometry in the *Vatica diospyroides* Symington, endangered medicinal plant of Peninsular. **Journal of Medicinal Plants Research**, Nsukka, v. 6, n. 20, p. 3681-3688, May 2012.

STACHEL, S.E. et al. identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature**, London, v. 316, p. 624-629, 1985.

STEWART, C.N. Monitoring the presence and expression of transgenes in living plants: trends in living plants. **Trends in Plant Science**, Oxford, v.10, n. 8, p.390-396, Aug. 2005.

SUPRASANNA, P. et al. Profiling of culture-induced variation in sugarcane plants regenerated via direct and indirect somatic embryogenesis by using transposon- insertion polymorphism. **Sugar Tech**, Oxford, v. 12, n. 1, p. 26-30, 2010.

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

TORRES, A. C. et al. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI; EMBRAPA-CNPH, 1999. 864 p.

VIVIANI, V. R.; BECHARA, E.J.H. Um prêmio nobel por uma proteína brilhante. **Química Nova na Escola**, São Paulo, n. 30, nov. 2008. Disponível em:
<http://www.ciencia.iao.usp.br/dados/qne/_atualidadesemquimicaumpr.artigocompleto.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2014.

YUNUS, A. M. M.; KADIR, A. P. G. Development of transformation vectors for the production of potentially high oleate transgenic oil palm. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 11, n. 3, July 2008. Disponível em:
<<http://www.scielo.cl/pdf/ejb/v11n3/a03.pdf>>. Acesso em: 10 nov. 2014.

ZHAO, Z.Y. et al. Molecular analysis of T0 plants transformed by *Agrobacterium* and comparison of *Agrobacterium*-mediated transformation with

bombardment transformation in maize. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Illinois, v. 72, n. 5, p. 34-37, 1998.

ZIMMERMANN, M. J. Embriogênese somática: definição, usos e limitações. In: BRASILEIRO, A. C. M. (Ed.). **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2010. p. 68-101.

SEGUNDA PARTE

Artigos

ARTIGO 1
NORMAS DA REVISTA CIENTÍFICA
PROTOPLASMA
(VERSÃO PRELIMINAR)

ARTIGO 1

CARACTERIZAÇÃO MORFO-ANATÔMICA DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM DENDEZEIRO HÍBRIDO TENERA

RESUMO

O dendezeiro é uma monocotiledônea, oleaginosa, perene, monoica e de longo ciclo de vida. Esta espécie encontra dificuldades na propagação em larga escala por ter um único meristema apical do caule e, dessa forma, sua propagação é realizada principalmente pela germinação de sementes, demandando longo tempo para a produção das mudas. Uma alternativa para a produção de mudas em larga escala é a embriogênese somática indireta. Com a finalidade de entender o processo embriogênico e desenvolver um protocolo eficiente de regeneração de plantas, análises citoquímicas e ultraestruturais são de grande importância. Este trabalho foi realizado com o objetivo de analisar o processo de embriogênese somática em dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) híbrido Tenera. Os calos foram induzidos em meio de cultura MS suplementado com a auxina picloram e multiplicados em meio de cultura MM composto de MS meia força, contendo os reguladores de crescimento 2,4-D, 2iP, AIB suplementado de ácido cítrico, malte e caseína. Para avaliar conversão dos calos em embriões, estes foram cultivados em dois meios de cultura, denominados MCA e MCB, ambos compostos de meio de cultura MS meia força, suplementado com os reguladores de crescimento BAP, ANA e suplementado com malte, caseína e inositol, sendo o meio de cultura MCB suplementado com as vitaminas tiamina, piridoxina, ácido nicotínico e glicina. A germinação das plantas foi conduzida em meio de cultura MG, composto de MS meia força AIA, BAP, inositol e as vitaminas tiamina, piridoxina, ácido nicotínico e glicina. Posteriormente, as plântulas foram transplantadas para tubos de polietileno contendo substrato de casca de pinus e aclimatizadas em casa de vegetação com umidade e temperatura controlada. Após a aclimatização, as plantas foram levadas para viveiro. Durante o desenvolvimento dos calos e dos embriões somáticos foram realizadas análises citoquímicas, histoquímicas e ultraestruturais. No meio de indução de calos obtiveram-se dois tipos de calos caracterizados pela coloração em bege e translúcida. Os calos translúcidos não apresentaram características embriogênicas. Os calos bege obtidos em meio suplementado com picloram 10 e 50 mg.L⁻¹ apresentaram

características embriogênicas e foram multiplicados com sucesso em meio de cultura MM. Porém, a partir do oitavo mês, regiões não embriogênicas começaram a se desenvolver. O meio de cultura MCB foi melhor para a conversão dos calos em embriões, observando-se o início da formação do embrião. No meio de cultivo MR foi possível observar os estádios embriogênicos e a posterior germinação dos embriões somáticos. A aclimatização das plantas que apresentavam raiz foi realizada com 97% de sobrevivência.

Palavras-chave: *Elaeis guineenses*. Cultura de Tecidos. Calos. Estádios embriogênicos. Análise anatômica e ultraestrutural.

ABSTRACT

Oil palm is a monocot, perennial, monoecious, oilseed, and of long life cycle. Large-scale propagation of this species is difficult due to a single stem apical meristem and thus their propagation is mainly by seed germination, demanding long time plant production. Indirect somatic embryogenesis is an alternative to seedlings large-scale production. Cytochemical and ultrastructural analysis are of great importance to understand the embryogenic process and develop an efficient protocol for plant regeneration. The aim of this study was to analyze the somatic embryogenesis process in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) Hybrid Tenera. Callus was induced on MS medium supplemented with auxin and picloram and multiplied in MM culture medium composed of 1/2 MS medium, growth regulators 2,4-D, 2iP, IBA and supplemented with citric acid, malt, casein. To evaluate callus embryos conversion were used two cultured media: MCA and MCB containing 1/2 MS medium, growth regulators BAP, NAA and supplemented with malt, casein and inositol. MCB culture medium supplemented with thiamine, pyridoxine, nicotinic acid and glycine. Plants germination were conducted in MG culture medium composed 1/2 MS, BAP, inositol and vitamins thiamine, pyridoxine, nicotinic acid and glycine. Seedlings were transplanted into polyethylene tubes containing pine bark substrate and acclimatized in a greenhouse with humidity and temperature control. After acclimatization plants were taken to the nursery. During callus development and somatic embryos were carried out cytochemical, histochemical and ultrastructural analysis. In callus culture medium induction was obtained two callus types characterized by beige and translucent color that showed no embryogenic characteristics. On the other hand, beige callus, obtained in culture medium supplemented with Picloram 10 and 50 mg.L⁻¹ showed embryogenic characteristics and were successfully grown in culture medium MM, but from the eighth month not embryogenic regions began to develop. MCB culture medium was better for embryos callus conversion, which was observed embryo formation. In MR culture medium was possible to observe embryogenic stages, and subsequent somatic embryos germination. All rooted plants were successfully acclimatized.

Keywords: *Elaeis Guineans*. Tissue Culture. Callus embryonic stage. Anatomical and ultrastructural analysis.

1 INTRODUÇÃO

Uma alternativa para produzir mudas de dendezeiro que atenda à demanda dos produtores é a embriogênese somática (Morcillo et al., 2007). Este processo ocorre sem a fusão de gametas, denominada assexual ou adventícia, em que se desenvolvem embriões somáticos a partir de células somáticas ou haploides, semelhantes aos embriões zigóticos. Ao final, forma-se uma planta completa. Esta técnica permite propagar clones em larga escala, em tempo e em espaço reduzidos e com boas condições fitossanitárias (Zimmermann, 2010).

Os embriões somáticos podem ser originados por duas vias de regeneração: a direta e a indireta. A embriogênese somática direta consiste na formação dos embriões somáticos diretamente dos explantes, sem a formação de estágios intermediários de calos. Por outro lado, na embriogênese somática indireta ocorre a formação de calos (Zimmermann, 2010).

Os calos formados, em geral, são heterogêneos e somente um limitado número de células exibe potencial embriogênico, característica relacionada ao genótipo e à origem do tecido inoculado (Ammirato, 1983; Brown e Atanassov, 1985).

A aplicação de análises microscópicas auxilia na distinção de calos embriogênicos e não embriogênicos. A aplicação de corantes, como lugol, que é utilizado para identificar amido, pode ser uma técnica rápida e simples que permite identificar a quantidade ou a presença de carboidratos que fornecem energia para as células em divisão e durante a formação dos embriões somáticos. O corante azul de toluidina evidencia paredes celulares primárias, permitindo visualizar o formato das células e o seu potencial de diferenciação, e células arredondadas, pequenas e com núcleo grande têm potencial embriogênico, ou seja, podem se diferenciar como células alongadas de formato irregular que se

dispõem dispersas e sem núcleo enãotêm potencial embriogênico (Aslam et al., 2011; Steinmacher et al., 2011).

A microscopia eletrônica de varredura permite a observação do formato externo das células e dos calos, possibilitando a visualização de aglomerados celulares característicos de células embriogênicas (Ribeiro et al., 2012; Pádua et al., 2014). A visualização de características das organelas intracelulares e do conteúdo das células pode ser obtida por meio de microscopia eletrônica de transmissão em que se podem observar, nas células, o tamanho do núcleo, a presença de nucléolo, as organelas citoplasmáticas, os compostos fenólicos eos vacúolos. Grande quantidade de organelas no citoplasma e um núcleo grande caracterizam um citoplasma denso, visualizado em células com alto potencial embriogênico. A presença de grande quantidade de mitocôndrias indica a alta taxa metabólica das células, sugerindo que estas se encontram em constante atividade de divisão celular (Aslam et al., 2011; Steinmacher et al., 2011). Já a ausência de organelas citoplasmáticas e a presença de vacúolos grandes indicam células em processo de morte celular (Filonova et al., 2000; Steiner et al., 2005; Pádua et al., 2014).

No desenvolvimento dos embriões, as análises microscópicas permitem identificar possíveis falhas na formação dos tecidos meristemáticos durante a formação do embrião somático e a ausência de sincronia na formação dos embriões (Benelli et al., 2010; Bar et al., 2014).

Este trabalho foi realizado com o objetivo de induzir e caracterizar, anatomica e ultrestruturalmente, o processo de embriogênese somática em dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) híbrido Tenera.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

O trabalho foi conduzido no Laboratório Central de Biologia Molecular, da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, Minas Gerais, Brasil. Foram utilizadas inflorescências de *Elaeis guineensis* Jacq. híbrido Tenera cedidas pela empresa DENPASA, no estado do Pará, Brasil.

2.2 Desinfestação do material

Inicialmente, as inflorescências foram lavadas em água corrente e tiveram as brácteas (folhas modificadas que protegem a inflorescência) retiradas. Logo depois, foram levadas para câmara de fluxo laminar e colocadas sob agitação constante em uma solução de hipoclorito de sódio a 1,25%, acrescida de 5 gotas de tween/litro, durante 20 minutos. Em seguida, as inflorescências foram lavadas, por três vezes, em água destilada autoclavada e, após a retirada da segunda bráctea, as inflorescências foram expostas.

2.2.1 Indução e multiplicação de calos

Para a indução de calos, os explantes foram inoculados em placas de Petri contendo meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) adicionado da auxina piclorame na ausência desta, como grupo controle. Todos os meios de cultura foram suplementados com 0,1% de carvão ativado, 3% de sacarose, 0,6% de ágar e tiveram o pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$.

Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento na ausência de luz, à temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$. Foram realizadas 8 repetições com 10 explantes em cada.

A avaliação microscópica teve início após o surgimento dos calos e foi monitorada a cada 30 dias.

Para a multiplicação dos calos que apresentaram características embriogênicas foi utilizado o meio de cultura de multiplicação (MM) composto

de MS com metade das concentrações de sais, 2,4-D, 2iP, AIB, ácido cítrico, malte e caseína. O meio de cultura foi suplementado com 3% de sacarose, solidificado com 0,6% de ágar e o pH foi ajustado para $5,7\pm 0,1$, antes da autoclavagem.

Foram inoculados, em frascos do tipo magenta, calos com, aproximadamente, 50 mg, totalizando 1.000 mg de calos em 20 frascos. O meio de cultura foi renovado a cada 30 dias. Os calos foram mantidos em sala de crescimento, na ausência de luz, à temperatura de $27\pm 2^\circ\text{C}$.

Após oito meses de cultivo, visualizou-se a formação de duas regiões com massas de colorações distintas, bege-claro e bege-escuro. Essas massas dos calos foram coletadas para análises citoquímicas (item 3.1).

Os resultados das medidas dos diâmetros das células foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa SISVAR (Ferreira, 2008).

2.2.2 Regeneração e germinação dos embriões

Os calos bege-claros foram transferidos para dois meios de cultura. O primeiro, denominado MCA, era composto de MS com metade das concentrações de sais acrescido dos reguladores de crescimento BAP, ANA e suplementado com malte, caseína e inositol. O segundo meio de cultura, denominado MCB, era composto por MS, com metade das concentrações de sais suplementado com BAP, ANA, inositol e vitaminas (tiamina, piridoxina, ácido nicotínico e glicina), malte e caseína. Os meios de cultura foram suplementados com 3% de sacarose, solidificados com 0,6% de ágar e o pH foi ajustado para $5,7\pm 0,1$, antes da autoclavagem.

Os calos foram mantidos em sala de crescimento, sob fotoperíodo de 16 horas, na intensidade luminosa de $45 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e temperatura de $26\pm 2^\circ\text{C}$.

Após três meses de cultivo, os calos inoculados apresentaram diferenças visuais em ambos os meios de conversão, MCA e MCB, e foram analisados por meio de testes citotóxicos e de microscopia eletrônica de varredura (itens 3.1 e 3.2).

Para a germinação dos embriões estes foram transferidos para meio denominado meio de germinação (MG), composto de MS com metade das concentrações dos sais, AIA, BAP, inositol e vitaminas (tiamina, piridoxina, ácido nicotínico e glicina). O meio de cultura foi suplementado com 3% de sacarose, solidificado com 0,6% de ágar e o pH foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$, antes da autoclavagem.

Os embriões foram mantidos em sala de crescimento na presença de luz, na temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$.

O meio de cultura foi renovado a cada 30 dias e, após 90 dias, o desenvolvimento dos embriões foi analisado por meio de testes citotóxicos (Item 3.1).

2.3 Aclimatização e aclimação

Para a aclimatização, foram utilizadas 50 plântulas com raiz e 50 sem raiz. As plantas com raízes foram lavadas em água corrente, para a retirada de resíduos do meio de cultivo, e as plântulas transplantadas para tubos de polietileno de 56 cm³, contendo substrato comercial de casca de pinus. Após o plantio, os tubetes foram transferidos para casa de vegetação com controle de temperatura e umidade.

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

Após 120 dias, as plantas aclimatizadas foram transportadas para a empresa Denpasa, no Pará, para serem aclimatadas no campo e foram

transplantadas para tubetes, adubadas com 4g de osmocote. Após 120 dias, foi avaliado o número de plantas aclimatadas.

3 Análises microscópicas

3.1 Análises citoquímicas

Os calos e os embriões foram fixados em FAA (formaldeído, ácido acético e álcool), durante 72 horas e transferidos para etanol a 70%. Após fixação, foram colocados em álcool e resina, solução a 50%, por 12 horas e, em seguida, transferidos para resina pura, por 48 horas. Posteriormente, foram embebidos em resina Leica, de acordo com o protocolo do fabricante. As amostras foram seccionadas com uma espessura de 5mm, utilizando um micrótomo rotativo e coradas com azul de solução 0,05% toluidina e lugol. Os cortes corados montados em lâminas foram observados com um microscópio fotônico Zeiss Scope A1 com câmera acoplada.

Os diâmetros das células e dos núcleos foram medidos utilizando-se o programa Axion Vision.

3.2 Microscopia eletrônica de varredura

As amostras de calos foram fixadas em solução de Karnovsky (glutaraldeído a 2,5% e 2,5% de paraformaldeído), em tampão de cacodilato 0,05 M, pH 7,0, durante 24 horas, a 4°C. Os calos foram colocados em 30% de glicerol, durante 30 minutos e, em seguida, lavados por três vezes (10 minutos) em tampão de cacodilato 0,05 M e pós-fixados em 1% de tetróxido de ósmio, durante duas horas. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em gradiente de acetona (25%, 50%, 75% e 90%), durante 10 minutos cada e 100% de acetona, duas vezes, durante 10 minutos. As amostras foram,

então, levadas para o aparelho de ponto crítico, usando CO₂ líquido para a secagem completa. Posteriormente, as amostras foram montadas em suportes de alumínio (topos), revestidas com ouro usando um evaporador de ouro SDC050 e observadas em microscópio eletrônico de varredura LEO EVO40XVP.

3.3 Microscopia eletrônica de transmissão

Para a análise em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss EM 109), as amostras dos calos e embriões somáticos foram imersas em fixador (Karnovsky modificada, 2,5% de glutaraldeído, 2,0% de paraformaldeído, tampão de cacodilato 0,05 M, pH 7,2), durante 24 horas preparados de acordo com o protocolo descrito por Bossolae Russel (1999).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Calogênese e multiplicação dos calos

A calogênese foi observada com, aproximadamente, 16 dias, após o início do experimento e, nesta fase, foi verificada a presença de calos translúcidos e alongados (Figura 1A). A avaliação por meio de testes citoquímicos demonstrou que as células apresentavam-se dispersas e tinham formato alongado (Figura 1B). A análise de microscopia eletrônica de transmissão permitiu a visualização de células vacuoladas, com poucas organelas citoplasmáticas e com a parede celular rompida, provavelmente em processo de apoptose (Figura 1C.).

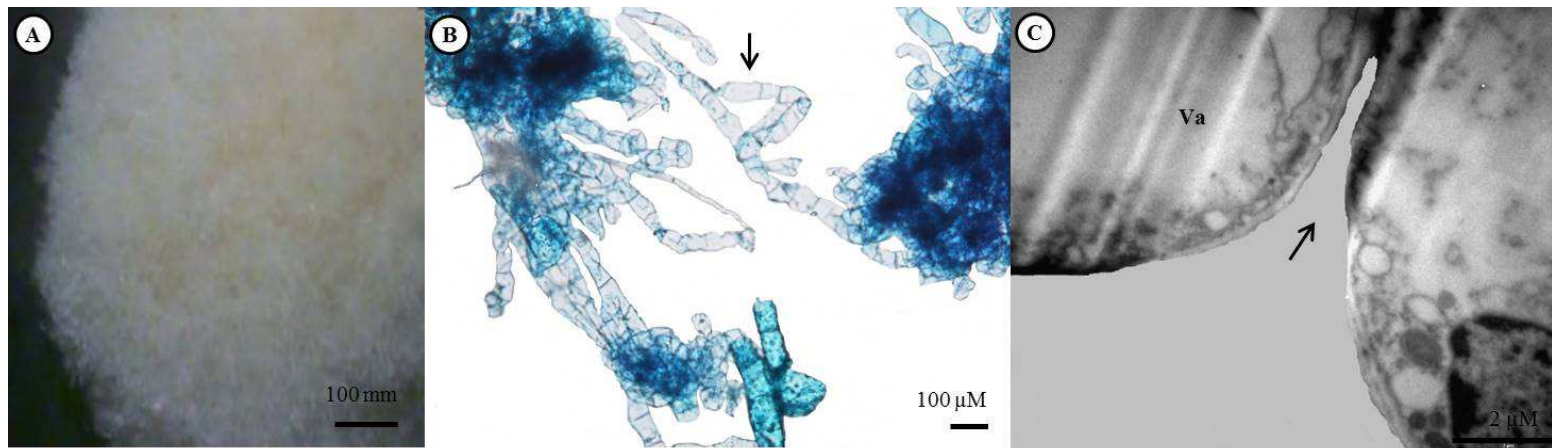


Figura 1 Indução de calos em dendezeiro. A) Calos translúcidos. B) Fotomicrografia de células dos calos translúcidos corados com azul de toluidina apresentando células alongadas (setas) e dispersas. C) Eletromicrografia de transmissão dos calos translúcidos, mostrando células com vacúolos grandes (Va) e grande espaço entre as células (setas pretas).

Diferentes tipos de calos de bananeira foram observados em um mesmo meio de cultivo contendo os reguladores de crescimento AIA, 2,4-D e BAP. Dois desses calos apresentavam características embriogênicas e o outro calo, aspecto translúcido e aquoso, contendo células alongadas semelhantes às deste trabalho (Ribeiro et al., 2012).

Segundo Figueiredo et al. (2007), calos translúcidos têm células de formato alongado, são pobres em organelas citoplasmáticas e não têm capacidade embriogênica. Essas características de células com formato alongado, dispersas e vacuoladas foram observadas em calos de dendezeiro originados a partir de explantes foliares na presença dos reguladores de crescimento 2,4-D e picloram (Pádua et al., 2013).

A presença de grandes vacúolos pode estar relacionada com a degradação do conteúdo celular, e o vacúolo desempenha papel essencial no processo de morte celular programada (Lam et al., 2000).

Após 10 meses no mesmo meio de cultivo, alguns explantes apresentaram outros calos com aspecto nodular com coloração bege (Figura 2A). As análises citoquímicas demonstraram que estes calos tinham células arredondadas, isodiamétricas, dispostas em aglomerados (Figura 2B). Por meio da microscopia eletrônica de transmissão foi possível visualizar o núcleo grande com nucléolo proeminente, grande quantidade de amiloplastídeos, mitocôndrias, complexo de golgi e retículo endoplasmático (Figura 2C).

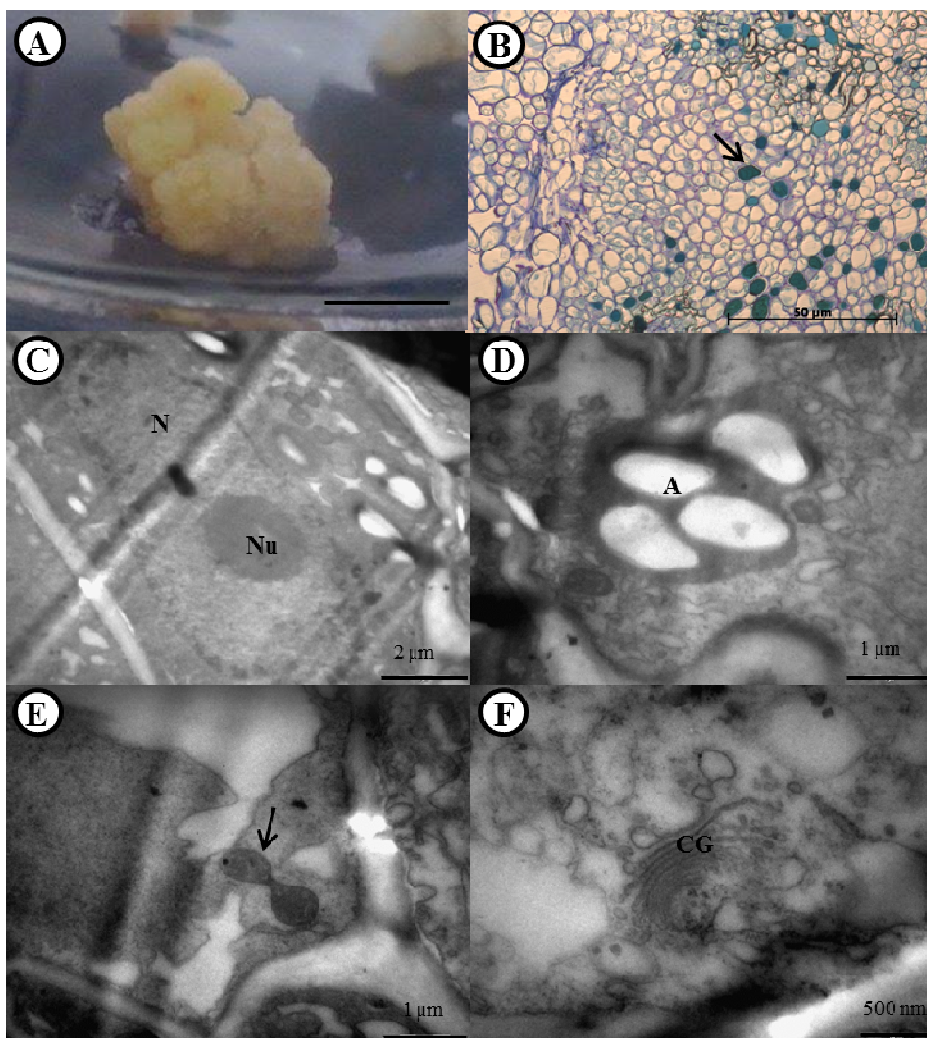


Figura 2 A) Calos com aspecto bege e nodular de dendezeiro híbrido Tenera. B) Fotomicrografia de células com características embriogênicas, coradas com azul de toluidina, visualizadas por microscópio óptico. C) Eletromicrografia de transmissão de calos demonstrando a presença de núcleo (N) com nucléolo proeminente (Nu). D) Presença de amiloplastídeos (A). E) Mitocôndrias em divisão (setas). F) Complexo Golgiense (GC).

Uma maior quantidade de amido presente nas células de calos embriogênicos está relacionada com um maior número de embriões somáticos formados (Cangahuala-Inocente et al., 2007). O amido fornece energia para a célula pela quebra deste em glicose (glicolítico intermediário), levando à formação de ATP, sendo este requerido para o processo de embriogênese somática (Martin et al., 2000).

Resultados semelhantes ao deste trabalho foram observados por Moura et al. (2009) em macaúba, utilizando o meio de cultivo suplementado com o regulador de crescimento picloram. Estes autores observaram a indução de dois tipos de calos, brancos e esponjosos, e nodulares e amarelos, tendo estes últimos apresentado características embriogênicas.

Em células de calos de dendezeiro induzidos em meio de cultura com o mesmo regulador de crescimento utilizado neste trabalho, picloram, porém, com embriões zigóticos como explantes iniciais para indução de calos, foi observada a presença de células pequenas, arredondadas, com citoplasma denso, núcleo e nucléolo aparente, caracterizando-as como meristemáticas que, posteriormente, regeneraram em plantas (Silva et al., 2014).

Após oito meses de cultivo, uma região dos calos começou a escurecer e a outra se manteve com a coloração bege, sendo possível diferenciar em região bege-clara e outra marrom, que foram analisadas por microscopia fotônica e apresentaram diferenças celulares.

Os calos de coloração marrom (Figura 3A) apresentaram células grandes e alongadas, medindo 55,0 μm x 43,0 μm , com formato irregular e não formaram aglomerados celulares, características de células não embriogênicas (Figura 3B). Os calos de coloração bege-clara (Figura 3A) apresentaram regiões com células pequenas, com diâmetros de 11,0 μm x 14,0 μm , isodiamétricas e com núcleos grandes, medindo 6,0 μm x

6,0 μm (Figura 3C). Essas células apresentaram-se dispostas em aglomerados, caracterizando células com potencial embriogênico.

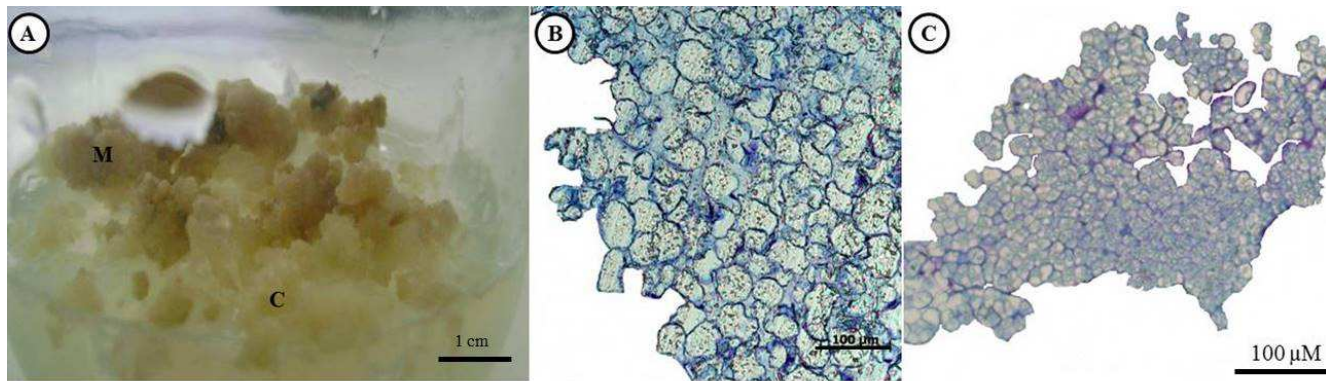


Figura 2 A) Calos de dendezeiro híbrido Tenera em meio de cultura MM, regiões caracterizadas como bege-claro (c) e marrom (m). B) Fotomicrografia de células da região marrom, coradas com azul de toluidina, mostrando células grandes e de formato irregular. C) Fotomicrografia de células da região bege-claro apresentando células pequenas, isodiamétricas com núcleo evidente, em divisão e coradas fortemente pelo azul de toluidina. m= marrom e c= bege-claro.

Nogueira et al. (2007) também observaram células com formato alongado, medindo 140 x 30 μ m, em calos não embriogênicos de murici-pequeno e também células de calos com características embriogênicas no segundo subcultivo, medindo 35 x 40 μ m, ambos provenientes de um mesmo meio de cultura inicial contendo o regulador de crescimento 2,4-D.

Em células de calos amarelos friáveis de cafeeiro foram observadas células arredondadas dispostas em aglomerados que mediam 24x21 μ m. As células dos calos transparentes e aquosos, caracterizados como não embriogênicos, mediam 268x36 μ m e se dispunham de forma dispersa (Pádua et al., 2014).

3.2 Regeneração e germinação dos embriões

Os calos com aspecto bege-claro foram transferidos para dois meios de cultura, para a conversão dos calos em embriões somáticos.

Nos meios de cultura MCA e MCB, as células dos calos foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura. Os calos cultivados no meio de regeneração MCA apresentaram células alongadas, plasmolisadas e dispersas, caracterizando células inviáveis, que não regeneraram plântulas.

Nos calos transferidos para o meio de cultivo MCB foram observadas células isodiamétricas e pequenas.

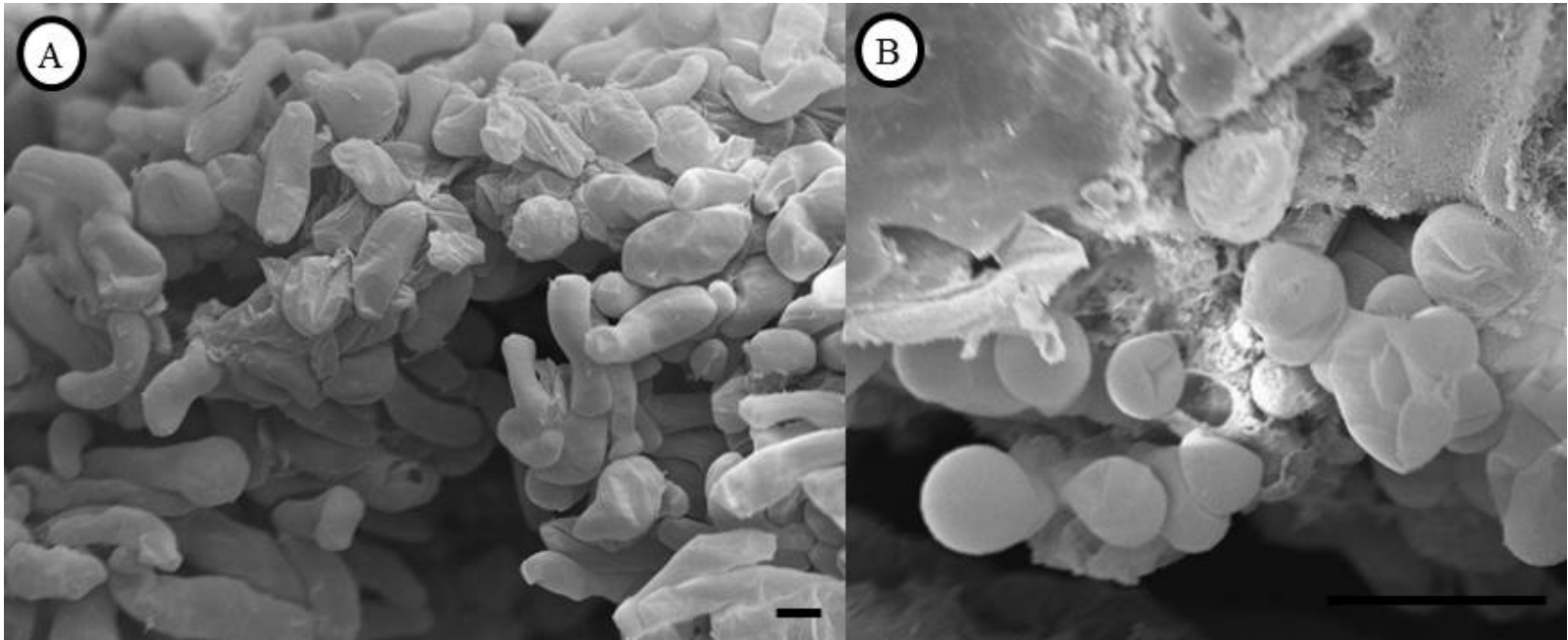


Figura 3 Calos de dendezeiro híbrido Tenera, cultivados em meio de cultura para conversão em embriões somáticos. A) Eletromicrografia dos calos em meio de cultura MCA, apresentando células alongadas e de formato irregular. Barras 20 μm . B) Eletromicrografia dos calos em meio de cultura MCB, mostrando células isodiamétricas. Barras 100 μm .

Os calos no meio de cultivo MCA perderam o potencial embriogênico, não desencadeando o processo de conversão em embriões somáticos; já os do meio de cultivo MCB apresentaram a formação de embriões somáticos.

O processo de conversão de células dos calos em embriões somáticos ocorre com a interrupção dos ciclos repetitivos da divisão celular, associada às condições fisiológicas e bioquímicas e aos estímulos ambientais necessários para a diferenciação celular e a consequente maturação dos embriões somáticos, e estes devem apresentar alta qualidade e capacidade para conversão em plantas (Guerra et al., 1999).

Dois ciclos ocorrem durante o processo de formação dos embriões somáticos. No primeiro ciclo ocorrem a indução e o desenvolvimento das células embriogênicas, em que altas concentrações de auxinas são requeridas e um segundo ciclo, em que diminui a concentração ou elimina as auxinas do meio de cultura para o desenvolvimento de pró-embriões e a subsequente formação de embriões somáticos (Fehér et al., 2003).

Durante a conversão de calos em embriões somáticos, alguns aminoácidos podem ser requeridos, por aumentarem a taxa de regeneração. Em estudos de conversão de calos em embriões somáticos de cana-de-açúcar, os aminoácidos glicina, arginina e cisteína demonstraram efeito significativo na embriogênese somática (94%), em que se destacou o efeito do aminoácido glicina (Asad et al., 2009).

Neste trabalho, a introdução dos aminoácidos tiamina, piridoxina, ácido nicotínico e glicina no meio de cultura teve efeito determinante na formação dos embriões somáticos.

Com a aplicação dos aminoácidos serina, prolina e glutamina no meio de cultivo, obteve-se sucesso na indução da embriogênese somática de *Paspalum scorbiculatum* posterior regeneração das plantas (Ceasar e Ignacimuthu, 2010).

Os embriões somáticos visualizados por microscopia eletrônica de varredura cultivados no meio de cultura MCB foram analisados histoquimicamente. Nesta análise observou-se o início da formação de embriões somáticos em centros meristemáticos presentes nos calos (Figura 5A). Os embriões somáticos apresentaram compostos fenólicos, evidenciados pela reação com toluidina, em que se visualizou uma coloração verde-azulada (Figura 5B).

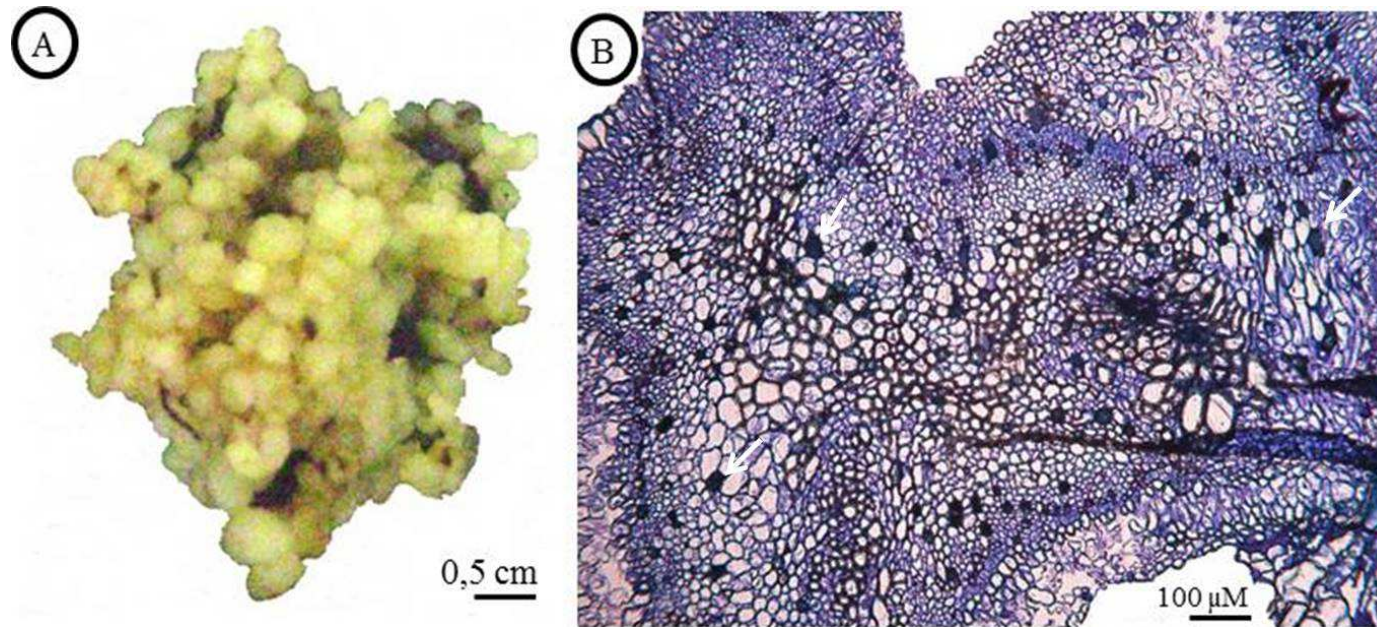


Figura 4A) Formação de embriões globulares de dendezeiro em meio de cultura MCB; B) fotomicrografia da análise histoquímica do embrião somático de dendezeiro híbrido Tenera. Presença de compostos fenólicos (setas).

A presença de compostos fenólicos foi verificada em calos de *E. guineensis* x *E. oleifera* obtidos de embriões zigóticos em meio de cultura suplementado com 2,4-D (Angelo et al., 2013). Em calos embriogênicos de dendezeiro obtidos de explantes foliares também foi observada a presença de compostos fenólicos (Pádua et al., 2013).

Os compostos fenólicos estão presentes, geralmente, nos vacúolos das células e têm função de proteção contra irradiação elevada, manutenção da estrutura e integridade de células e tecidos em situações de estresse hídrico (Larcher, 2000).

Em calos de dendezeiro obtidos por meio de explantes semelhantes aos utilizados neste trabalho e em meio de cultivo adicionado do regulador de crescimento picloram, observou-se a formação de embriões somáticos a partir de regiões com células meristemáticas que apresentaram grande proliferação (Scherwinski-Pereira et al., 2010), como foi observado neste trabalho.

Esses setores embriogênicos também foram observados em calos de dendezeiro com aspecto nodular, obtidos de embriões zigóticos, induzidos em meio de cultura suplementado como regulador de crescimento 2,4-D, que se desenvolveram em pró-embriões e, posteriormente, em embriões globulares (Ângelo et al., 2009).

Características presentes nos pró-embriões observados neste trabalho foram visualizados em pró-embriões de açaí cultivados em meio de cultura contendo o regulador de crescimento ANA e 2iP, como células com núcleo proeminente e citoplasma denso (Scherwinski-Pereira et al., 2012).

Os embriões somáticos obtidos no meio de cultura MC2 foram transferidos para meio de cultura MG, em que se desenvolveram passando pelos estádios embriogênicos, globular, codiforme e torpedo (Figura 6).

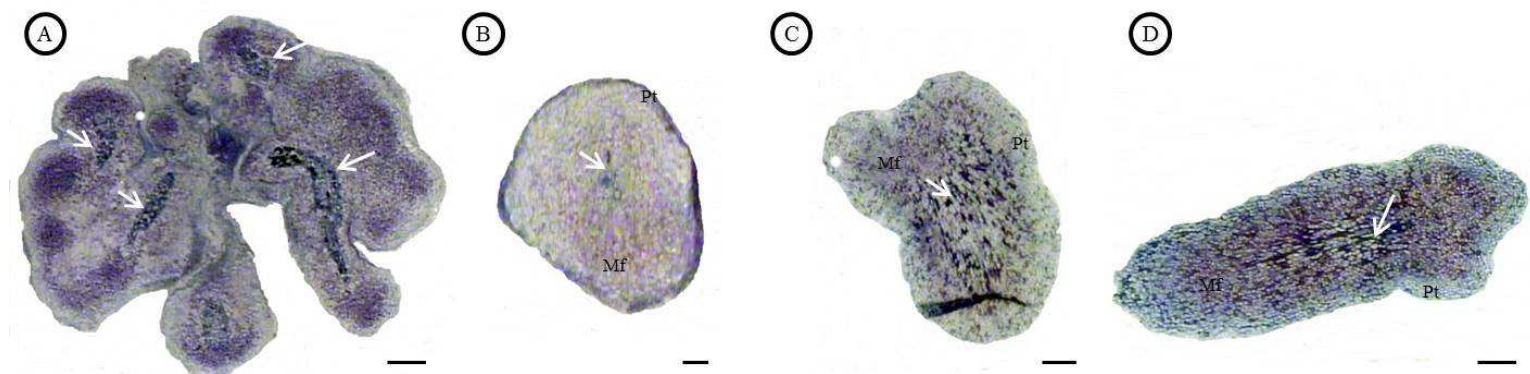


Figura 5 Fotomicrografia dos estádios embriogênicos de embriões somáticos de dendezeiro híbrido Tenera corados com azul de toluidina A) Massa de calos com o início de formação de vários embriões somáticos. B) Embrião somático individualizado no estágio globular. C) Embrião somático no estágio cordiforme. D) Embrião somático no estágio torpedo. Procâmbio (setas). Pt = Protoderme. Mf = Meristema fundamental. Barras = 100 μ M.

O procâmbio foi observado no início de formação dos embriões somáticos, anterior à individualização da massa celular (Figura 6A setas pretas). A partir do estágio globular foi possível observar, por meio de análises histoquímicas, a formação dos três tecidos meristemáticos: protoderme, meristema fundamental e procâmbio com sistema vascular fechado, inferindo o desenvolvimento normal desses embriões.

Neste trabalho foi observada assincronia no desenvolvimento dos embriões, ou seja, em um mesmo tempo de cultivo foram observados diferentes estádios embriogênicos e contínua multiplicação dos calos neste meio de cultura MG. A assincronia durante a formação dos embriões somáticos pode limitar sua produção em escala comercial, por obter plantas em diferentes tempos de cultivo (Pedrosoe Pais, 1995).

A assincronia dos estádios embriogênicos também foi verificada na embriogênese somática de cassava, em meio de cultura suplementado com o regulador de crescimento BAP (Vidal et al., 2014).

Uma das hipóteses sobre a assincronia na formação dos embriões somáticos está relacionada ao cultivo em meio sólido (Sumaryono et al., 2008). Este fato pode ser devido à menor renovação de nutrientes em relação ao meio líquido e ao maior contato com os nutrientes. No processo de embriogênese somática de dendezeiro também foi verificada a formação assincrônica de embriões somáticos (Bar et al., 2014).

A ausência de sincronia dos embriões somáticos pode gerar dificuldades durante o processo de cultivo *in vitro*, como, por exemplo, a eficiência durante a transferência para as etapas subsequentes de regeneração, enraizamento e aclimatização, como na obtenção de plantas em uma mesma época.

Após oito meses de cultivo no meio MG, foi verificada a conversão dos embriões em plantas. Para cada 100 mg de calos inoculados no meio de cultura MG obtiveram-se, em média, 13 plantas (Figura 7).

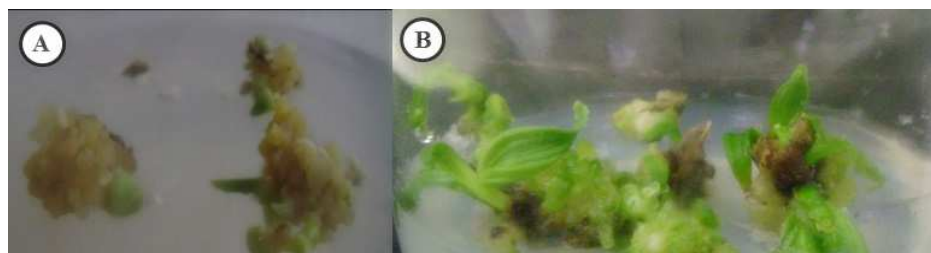


Figura 6 Regeneração dos embriões somáticos de dendezeiro híbrido Tenebra em meio de cultura MG, em plântulas.

Neste mesmo meio de cultura MG ocorreu a formação de raízes nas plantas, porém, em um número reduzido, em torno de 13%.

3.5 Aclimatização das plantas

Todas as plantas obtidas *in vitro* passaram pelo processo de aclimatização por, aproximadamente, 150 dias. As plantas sem raízes não sobreviveram ao processo de aclimatização e todas as plantas previamente enraizadas *in vitro*, com raízes acima de 1 cm de comprimento, foram aclimatizadas com sucesso. As plantas aclimatizadas foram levadas para viveiro, obtendo-se 97% de sobrevivência (Figura 8).



Figura 7 Plantas de dendezeiro híbrido Tenera aclimatizadas em viveiro no estado do Pará, na empresa Denpasa.

O dendezeiro, por ser uma espécie lenhosa, tem dificuldades para enraizar devido à produção de AIA endógeno ser metabolizada rapidamente e, por estarazão, não estar disponível na base do explante em concentrações suficientes para o enraizamento (Ono e Rodrigues, 1996; Ford et al., 2001). A necessidade prévia de enraizamento *in vitro* para se obter maiores porcentagens de plantas aclimatizadas já foi verificada, por outros autores, em dendezeiro (Thuzar et al., 2012; Pádua, 2014) *Prunus salicina* (Bandeira et al., 2012).

Para o sucesso durante a aclimatização de algumas espécies, é importante a permanência das plantas *in vitro* até o enraizamento, devido ao maior acúmulo de nutrientes nos tecidos, conferindo maior resistência às folhas (Bosa et al., 2003).

Plantas de dendezeiro germinadas e enraizadas *in vitro* apresentaram 85% de sobrevivência, durante a fase de aclimatização; no caso das plantas não enraizadas *in vitro*, apenas 40% sobreviveram durante a aclimatização (Pádua et al., 2014).

Há a necessidade da realização de mais estudos para reduzir o tempo na obtenção de clones de dendezeiro híbrido Tenera.

CONCLUSÃO

A embriogênese somática indireta em dendezeiro híbrido Tenera foi obtida a partir de calos com características anatômicas e ultraestruturais embriogênicas, confirmada com sucesso pela regeneração das plantas.

As análises citoquímicas, histoquímicas e ultraestruturais foram importantes para o estudo detalhado do processo de embriogênese somática indireta.

O processo completo de embriogênese somática em dendezeiro dura 23 meses.

REFERÊNCIAS

Ammirato PV (1983) Embryogenesis. In: Evans DA, Sharp WR, Ammirato PV, Yamada Y (Ed.) Handbook of plant cell culture. New York: Mac Millan: 82-123

Ângelo C da S, Steinmacher DA, Lopes R, Cunha RNV da, Guerra MP (2013) Histological analysis and transcription profiles somatic embryogenesis in interspecific hybrids of *Elaeis guineenses* x *Elaeis oleifera*. Agricultural Sciences 4:1-11

Ângelo PC da S, Lopes R, Moraes LAC, Cunha RNV da (2009) Embryogenic calli induced in interspecific (*Elaeis guineensis* x *E. oleifera*) hybrid zygotic embryos. Crop Breeding and Applied Biotechnology 9:274-277

Asad S, Arshad M, Mansoor S, Zafar Y (2009) Effect of various amino acids on shoot regeneration of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). African Journal of Biotechnology 8:1214-1218

Aslam J, Khan SA, Cheruth AJ, Mujiba, Sharma MP, Srivastava PS (2011) Somatic embryogenesis, scanning electron microscopy, histology and biochemical analysis at different developing stages of embryogenesis in six date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars. Saudi Journal of Biological Sciences 18:369-380

Bandeira J de M (2012) Rooting and acclimatization of the Japanese Tree, CV. América. Rev. Bras. Frutic. 34:597-603

Bar OAE, Dawayat MME (2014) Histological changes on regeneration *in vitro* culture of date palm (*Phoenix dactylifera*) leaf explants. Australian Journal of Crop Science 8:848-855

Benelli C., Germana MA, Camino T, Beghe D, Fabbri A (2010) Morphological and anatomical observations of abnormal somatic embryos from anther cultures of *Citrus reticulata*. Biologia Plantarum 54:224-230

Bosa B, Calvete EO, Nienow AA, Suzin M (2003) Enraizamento e aclimatização de plantas micropropagadas de gipsófila. Horticultura Brasileira 21:207-210

Bossola JJ, Russell LD (1998) Electron microscopy. 2nd. Ed. Boston: Jones and Bartlett 670 p.

- Brown DCW, Atanassov A (1985) Role of genetic background in somatic embryogenesis in *Medicago*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 4:111-122
- Cangahuala-Inocente GC, Steiner N, Maldonado SB, Guerra MP (2010) Patterns of protein and carbohydrate accumulation during somatic embryogenesis of *Acca sellowiana*. *Pesq. agropec. Bras* 44:217-224
- Cesar SA, Ignacimythu S (2010) Effects of cytokinins, carbohydrates and amino acids on induction and maturation of somatic embryos in kodo millet (*Paspalum scorbiculatum* Linn.). *Plant Cell Tiss Organ Cult* 80:496-498
- Féher A (2008) The initiation phase of somatic embryogenesis: what we know and what we don't. *Acta Biologica Szegediensis* 52:53-56
- Ferreira DF, (2008) SISVAR: um programa para análise e ensino de estatística. *Revista Symposium* 6:36-40
- Figueiredo MA, Paiva R, Souza AC de, Porto JMP, Nogueira GF, Soares FP (2007) Indução *in vitro* de calos em duas espécies de maracujazeiro nativo. *Revista Brasileira de Biociências* 5:288-290
- Filonova LH, Bozhkov PV, Brukhin VB, Daniel G, Zhivotovsky B, Von Arnold S (2000) Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm Norway spruce. *Journal of Cell Science* 113:4399-4411
- Ford YY, Bonham EC, Cameron RWF, Blake PS, Judd HL, Harrison-Murray (2001) Adventitious rooting: examining the role of auxin in easy and a difficult-to root plant. *Plant Growth Regulation* 10:1-11
- Guerra PG, Torres AC, Teixeira JB (1999) Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: Torres AC, Caldas LS, Buso IA (Ed.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: EMBRAPA-CNPQ 2:533-568.
- Lam E, Fukuda H, Greenberg J (2000) Programmed cell death of tracheary elements as a paradigm in plants. *Plant Molecular Biology* 44:245-253
- Larcher W (2000) *Ecofisiologia vegetal*. RiMa, São Carlos.
- Martin AB, Cuadrado Y, Gallego P, Hita O, Martin L, Dorado A, Villalobos N (2000) Differences in the contents of total sugars, starch and sucrose in

embryogenic and non-embryogenic calli from *Medicago arborea* L. 154:143-151

Morcillo F, Gallard A, Pilot M, Jouannic S, Aberlenc-Bertossi F, Collin M, Verdeil JL, Tregear JW (2007) EgAP2-1, an AINTEGUMENTA-like (AIL) gene expressed in meristematic and proliferating tissues of embryos in oil palm. *Planta* 226:1353-1362

Moura EF, Motoike SY (2009) Induction of somatic embryogenesis in immature seeds of guava tree cv. Paluma. *Revista Brasileira de Fruticultura* 31:507-511

Murashige T, Skoog FA (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497

Nogueira RC, Paiva R, Porto JMP, Nicioli PM, Stein VC, Deuner S, Alves E. Análise ultraestrutural de calos embriogênicos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). *Revista Brasileira de Biociências* 5:48-50

Ono EO, Rodrigues JD (1996) Aspectos da fisiologia do enraizamento de estacas caulinares. Jaboticabal, FUNEP.

Pádua MS, Paiva LV, Labory CRG, Alves E, Stein VC (2013) Induction and characterization of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) pro-embryogenic masses. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 85:1545-1556

Pádua MS, Paiva LV, Silva LC da, Livramento KG do, Alves E, Castro AHF (2014) Morphological characteristics and cell viability of coffee plant calli, *Ciência Rural* 44:660-665

Pádua MS, Paiva LV, Silva LGT da, Silva LC, Stein VC (2014) *In vitro* development and acclimatization of dendezeiro (*Elaeis guineensis*) *Revista Árvore* 38:1095-1102

Pedroso CM, Pais MS (1995) Factors controlling somatic embryogenesis. *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.* 43:147-154

Ribeiro L de O, Paiva LV, Pádua MS, Santos BR, Alves E, Stein VC (2012) Morphological and ultrastructural analysis of various types of banana callus, cv. Prata anã. *Acta Scientiarum Agronomy* 34:423-429

Scherwinski-Pereira JE, Guedes RS da, Fermino Jr. PCP, Silva TL, Costa FHS (2010) Somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm using the thin cell layer technique. *In Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant* 46:378–385

Scherwinski-Pereira JE, Guedes, R da S, Silva RA da, Fermino Jr. PCP, Luis ZG, Freitas E de O (2012) Somatic embryogenesis and plant regeneration in açai palm (*Euterpe oleracea*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 109:501-508

Silva R de C, Carmo LS, Luis ZG, Silva LP, Scherwinski-Pereira JE, Mehta A (2014) Proteomic identification of differentially expressed proteins during the acquisition of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Journal of Proteomics* 104:112-127

Steiner N, Vieira F do N, Maldonado S, Guerra MP (2005) Effect of carbon source on morphology and histodifferentiation of *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. *Brazilian Archives Biology and Technology* 48:895-903

Steinmacher DA, Guerra MP, Sauresurminsk K, Lieberei RA (2011) A temporary immersion system improves *in vitro* regeneration of peach palm through secondary somatic embryogenesis. *Annals of Botany* 108:1463-1475

Sumaryono RI, Kasi PD, Ginting G (2008) Growth and differentiation of embryogenic callus and somatic embryos of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) In Temporary Immersion System. *Indonesian Journal of Agriculture* 1:109-114

Thuzar M, Vanavichit A, Tragoonrung S, Jantasurivarat C (2011) Efficient and rapid plant regeneration of oil palm zygotic embryos cv. 'Tenera' through somatic embryogenesis. *Acta Physiologiae Plantarum* 33:123-128

Vidal AM, Costa MAP de C, Souza A da S, Almeida WAB de, Souza FVD (2014) *In vitro* regeneration and morphogenesis of somatic embryos of cassava. *Revista Ciência Agronômica* 45:558-565

Zimmermann MJ (2010) Embriogênese somática: definição, usos e limitações. In: Brasileiro ACM (Ed.). *Cultivo in vitro de plantas*. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica 68-101.

ARTIGO 2
NORMAS DA REVISTA CIENTÍFICA
ÁRVORE
(VERSÃO PRELIMINAR)

ARTIGO 2

ENRAIZAMENTO *IN VITRO* DE PLANTAS DE DENDEZEIRO (*Elaeis guineenses* X *Elaeis oleifera*) HÍBRIDO TENERA

RESUMO

O dendezeiro é uma monocotiledônea, lenhosa e oleaginosa de elevada importância econômica, devido à alta produção de óleo por seus frutos. A germinação das sementes é, atualmente, o método convencional mais utilizado para a propagação do dendezeiro, porém, o sucesso por meio dessa via é limitado pela demora e a baixa porcentagem de germinação. Uma alternativa para a propagação em larga escala do dendezeiro é a técnica biotecnológica de embriogênese somática, mas o enraizamento das plantas germinadas a partir dos embriões somáticos é uma etapa difícil e de grande importância para posterior aclimatização e sucesso na propagação. Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito das auxinas ácido indol acético (AIA) e ácido indol-butírico (AIB) no enraizamento de embriões somáticos de dendezeiro híbrido Tenera. Plantas obtidas via embriogênese somática foram inoculadas em meio MS modificado, com 10% de sacarose e 0,6% de ágar e suplementado com AIA ou AIB, nas concentrações 5 μ M, 10 μ M, 15 μ M e na ausência de regulador de crescimento. Depois de 120 dias foram analisados os parâmetros presença de raiz, tipo de raiz, comprimento da maior raiz, número de folhas e comprimento da parte aérea. A presença de reguladores de crescimento foi favorável ao enraizamento, tendo as plantas cultivadas com o regulador de crescimento AIB na concentração de 15 μ M apresentado maior porcentagem de enraizamento (87%) e melhores resultados para os parâmetros número de raízes (1,33) e comprimento da parte aérea (9,83).

Palavras-chave: *Elaeis guineenses*. Lenhosa. Cultura de Tecidos. Auxinas. Ácido indol butírico.

ABSTRACT

Oil palm is a woody monocot with high economic importance due to oil production by its fruits. Currently the most conventional method used to produce oil palm seedlings is seed germination, but the success is limited by delay and low germination percentage. An alternative to oil palm large-scale propagation is biotechnological technique of somatic embryogenesis, but the rooting of somatic germinated plants is a difficult step and of great importance for successful propagation and acclimatization. The aim of this study was to evaluate the effect of auxin IAA (indole acetic acid) and IBA (indole-butyric acid) on rooting of oil palm hybrid Tenera somatic embryos. Plants obtained by somatic embryogenesis were inoculated into modified MS medium with 10% sucrose and 0.6% agar and supplemented with NAA or IBA in concentrations of 5 uM, 10 uM, 15 uM in growth regulators absence. After 120 days were analyzed: root presence, root type, longest root length, leaf number and shoot length. Growth regulators were favorable to rooting, so that plants grown with IBA growth regulator at 15 uM showed higher rooting percentage (87%) and better results for roots number (1.33) and shoot length (9.83).

Keywords: *Elaeis guineensis*. Woody. Tissue Culture. Auxins. indole butyric acid.

1 INTRODUÇÃO

O dendezeiro possui um único meristema apical caulinar e essa característica biológica impossibilita a propagação vegetativa da espécie por meio do plantio convencional de estacas, fato que limita a produção de mudas em escala comercial (MANEHONON et al., 2009). Assim, torna-se necessária a busca por técnicas alternativas, como a cultura de tecidos de plantas, por meio da embriogênese somática (MORCILLO et al., 2007), que possibilita a obtenção de clones em escala comercial. Essa técnica também favorece a produção em larga escala de genótipos elites obtidos por meio de programas de melhoramento convencional (ROOWI et al., 2010; XAVIER et al., 2009).

Os embriões somáticos são formados sem qualquer evento de fertilização e são geneticamente idênticos aos tecidos originais, podendo ser utilizados em estudo de transformação genética, de eventos moleculares, reguladores e morfogenéticos, além de permitir a produção em larga escala de plantas e de sementes sintéticas, que tem como vantagens a facilidade de manuseio e de transporte, o potencial de armazenamento a longo prazo, a uniformidade da produção e o potencial de automatização de todo o processo de produção (PATHI et al. 2013).

Durante o cultivo *in vitro* e a germinação dos embriões somáticos, uma etapa crucial para as espécies lenhosas é o enraizamento. Esta etapa se faz necessária para o dendezeiro, pois estudos confirmam a necessidade do enraizamento *in vitro* para o sucesso da fase posterior de aclimatização. As plantas de dendezeiro enraizadas *in vitro* apresentaram 85% de sobrevivência durante a fase de aclimatização, em contraste com apenas 40% daquelas não enraizadas *in vitro* (PÁDUA et al, 2014).

A utilização de diferentes classes de fitorreguladores e as alterações na composição de outros componentes dos meios nutritivos podem auxiliar na obtenção de resultados mais promissores, especialmente na formação de raízes,

que é uma das fases limitantes do cultivo *in vitro* de espécies florestais (CURTI e REINIGER, 2014).

O enraizamento de plantas *in vitro* pode ser induzido por fitorreguladores da classe das auxinas, sendo os mais citados o ácido indolacético (AIA) e o ácido indolbutírico (AIB). A presença da auxina AIA no meio de cultivo pode favorecer o sistema radicular, a maior presença de raízes secundárias, menor formação de calos e um bom desenvolvimento da parte aérea (RADMANN, 2002). Entretanto, para as espécies lenhosas de difícil enraizamento, a auxina AIB tem sido empregada com sucesso na maioria dos trabalhos, como, por exemplo, em tamareira (QADDOURY e AMSSA, 2003), pinhão-manso (TOPPO e SING, 2012), eucalipto (ALMEIDA et al. 2007, BRONDANI et al., 2014) e canafístula (CURTI e REINIGER, 2014).

Neste contexto, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito dos reguladores de crescimento AIA e AIB na rizogênese *in vitro* de plantas provenientes de embriões somáticos de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

O experimento foi conduzido no Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG.

Foram utilizadas plantas de *Elaeis guineensis* híbrido Tenera, obtidas via embriogênese somática com, aproximadamente, 4 cm de altura, mantidas em meio de cultura MG constituído com a metade das concentrações dos sais do meio de cultura MS (MURASHIGE E SKOOG, 1962), AIA, BAP, inositol e vitaminas (tiamina, piridoxina, ácido nicotínico e glicina), em sala de crescimento, a $26 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas.

2.1 Enraizamento

Para o enraizamento, as plantas foram inoculadas em meio de cultura MS modificado, acrescido de 10 g.L^{-1} de sacarose, 0,6% de ágar, suplementado com AIA ou AIB, nas concentrações de 5, 10 e 15 μM , e o tratamento controle foi composto pelo meio base, sem adição de regulador de crescimento. Todos os meios de cultura tiveram o pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$, antes da esterilização a $121 \text{ }^\circ\text{C}$, por 20 minutos. O regulador de crescimento AIA foi filtroesterilizado e adicionado no meio de cultura após autoclavagem e o regulador de crescimento AIB foi introduzido no meio antes da autoclavagem.

As plantas foram subcultivadas a cada 30 dias, durante 120 dias, e mantidas em sala de crescimento, à temperatura de $26 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 16 horas.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2×4 , sendo o primeiro fator composto pelos dois reguladores de crescimento (AIB e AIA) e o segundo, pelas diferentes concentrações (0; 5; 10 e 15 μM). O experimento foi composto por três repetições, sendo cada uma constituída por cinco explantes. A avaliação foi realizada após 120 dias, considerando-se os parâmetros presença de raiz, tipo de raiz (grossa ou fina), número de raízes, comprimento da maior raiz, número de folhas e comprimento da parte aérea.

2.2 Estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste Tukey e por regressão polinomial, ambos a 5% de probabilidade. As análises foram realizadas pelo programa computacional SISVAR (FERREIRA, 2011).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os tratamentos apresentaram formação de raízes, entretanto, as auxinas AIA e AIB proporcionaram porcentagens de enraizamento significativamente superiores, quando comparadas ao tratamento controle. A auxina AIB na maior concentração testada, 15 μM , apresentou maior porcentagem de enraizamento, 87%, diferindo dos tratamentos com concentrações mais baixas (5 e 10 μM), que apresentaram 27% e 20% de enraizamento, respectivamente. O tratamento com 15 μM de AIB também apresentou resultado superior, quando comparado com a auxina AIA nas concentrações 5, 10 e 15 μM , tendo sido observadas porcentagens de 47%, 53% e 53%, respectivamente. No tratamento controle, ou seja, meio de cultura sem a adição de reguladores de crescimento, houve baixa porcentagem (13%) de raízes (Figura 1A).

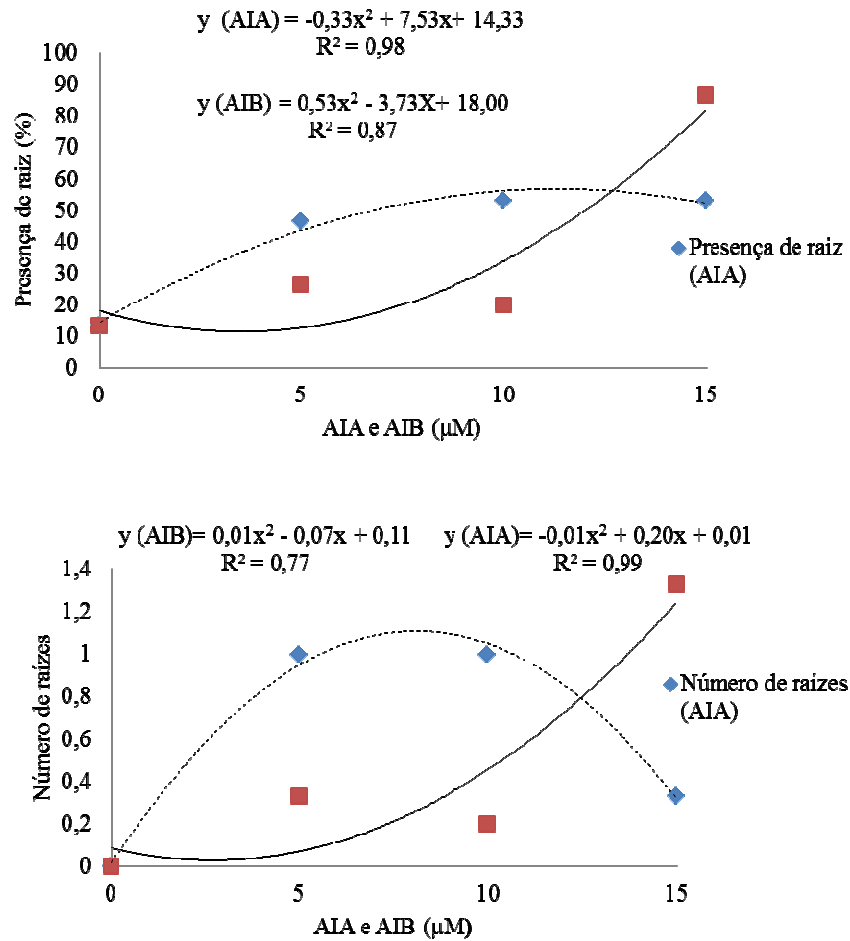


Figura 1 Porcentagem de raízes (A) e número de raízes (B) de plântulas de *Elaeis guineensis* híbrido Tenera, cultivadas em diferentes concentrações de AIA e AIB.

Em plantas que regeneram raízes espontaneamente, como o dendezeiro, que apresentou 13% no meio de cultura sem AIA e AIB, as auxinas endógenas produzidas no ápice caulinar são transportadas de forma polar basípeta e atuam como um gatilho para acionar o enraizamento.

Portanto, nessas plantas, a aplicação de auxina exógena aumenta fortemente o número de raízes regeneradas (KLERK et al., 1999), como foi observado no tratamento com a maior concentração de AIB, que apresentou 87% de enraizamento. *Cedrela odorata* L. exibe boa capacidade de enraizamento *in vitro*, mesmo na ausência de auxina, mas a presença de AIB no meio de cultura aumenta significativamente a porcentagem de enraizamento, o número e o comprimento das raízes formadas (MILLÁN-OROZCO et al., 2011).

Maior porcentagem de plantas enraizadas em meio de cultura com 5 μ M de AIB também foi observada em estudos com cultivares de *Olea europaea* L., com 75% de enraizamento (RADMANN et al., 2002).

A auxina AIB é um das mais utilizadas para o enraizamento de espécies lenhosas, provavelmente devido à estabilidade química, ao maior espectro de ação e à menor fitotoxicidade causada ao explante, comparada a outros reguladores de crescimento (GEORGE et al., 2008; LATSAGUE et al., 2009; URIBE et al., 2012).

O regulador de crescimento AIA, por outro lado, apresenta menor estabilidade e, conseqüentemente, maior degradação e menor taxa de absorção em relação ao AIB (ERIG et al. 2004). Este fato pode explicar a menor taxa de enraizamento (53%) das plantas de dendezeiro neste trabalho, quando submetidas à menor concentração testada de AIA.

A menor estabilidade e, conseqüentemente, a maior degradação estão relacionadas à capacidade do AIA em se ligar a outras moléculas na planta, produzindo conjugados e perdendo sua atividade, e também podendo ser degradada pela enzima AIA oxidase (ROSS, 1992; TAIZ e ZEIGER, 2013).

Além disso, a foto-oxidação do AIA em meio de cultivo é mais rápida que a do AIB, pois aproximadamente 50% são degradados nas primeiras 24 horas e o AIB é foto-oxidado em apenas 10%, no mesmo período (NISSEN e SUTTER, 1990).

Resultados contrários ao deste trabalho foram observados na indução de raízes em *Croton sonderianus*, em queo regulador de crescimento AIB, na concentração de 5 μM , foi mais eficiente, quando comparado com a concentração de 5 μM de AIA (ERIG e SCHUCH, 2004). Nesta mesma concentração, induziu altas porcentagens de enraizamento (85%) em *Jatropha curcas* L. (TOPPO e SING, 2012).

Com relação ao número de raízes em explantes de dendezeiro, o melhor tratamento também foi com a auxina AIB na maior concentração (15 μM), tendo sido observadas 1,3 raízes por plântula. Por outro lado, o AIA, nas concentrações de 5 e 10 μM , apresentou média de enraizamento de 1,0 e, na concentração de 15 μM , média de 0,33 por plântula (Figura 1B).

Esse decréscimo de enraizamento pode estar relacionado com o aumento da concentração AIA, o que reforça a afirmativa de que a concentração de auxina para promover o enraizamento tem um ponto ótimo e, quando se eleva essa concentração, ela pode não ser significativa para o aumento da porcentagem de enraizamento ou pode comprometer a rizogênese (UGRAIAH et al., 2013), sendo importante estabelecer, para cada espécie, uma concentração ideal para a indução de raízes (FACHINELLO et al., 1995; MANSSERI-LAMRIOUI et al., 2013). Em plantas de *Ficus carica* L., o regulador de crescimento AIB, na concentração de 25 μM , também favoreceu a melhor porcentagem de enraizamento e o maior número de raízes (BARBOSA et al., 2008).

As plântulas cultivadas em auxina AIA, na concentração de 10 μM , apresentaram os melhores resultados para a variável comprimento da raiz, com média 2,3 cm e a concentração de 15 μM proporcionou média de 1,9 cm (Figura

2A). Com relação ao AIB, a maior concentração testada (15 μM) correspondeu à indução do maior comprimento da raiz (1,7 cm) (Figura 2A).

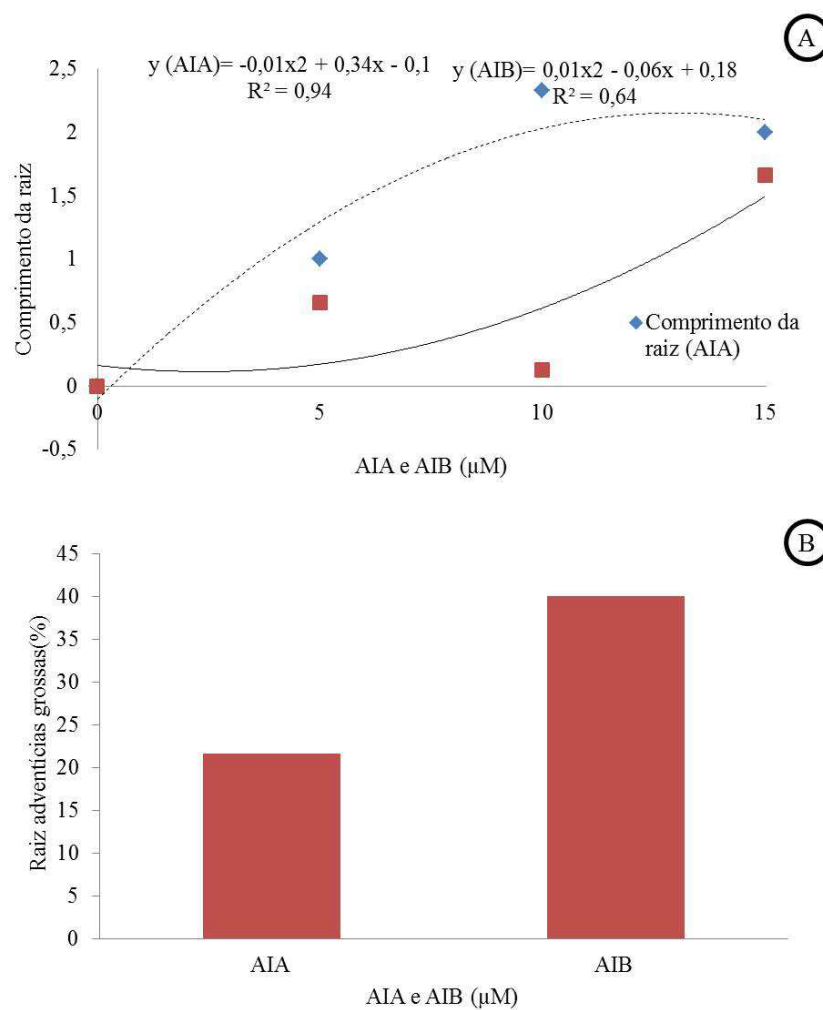


Figura 2 Comprimento da raiz (A) e morfologia da raiz (B) de plântulas de *Elaeis guineensis* híbrido Tenera, cultivadas em diferentes concentrações de AIA e AIB.

O processo de enraizamento *in vitro* constitui-se de três fases: indução, iniciação e alongamento (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1990; WOODHEAD e BIRD, 1998). Após a fase de indução dos primórdios radiculares, não há mais emissão de raízes, apenas o crescimento/alongamento (COSTA et al., 2008) e, para essas fases, as auxinas podem ser inibitórias (MCGWIRE et a. 1969).

Thuzar et al. (2011) verificaram que plantas de dendezeiro híbrido Tenera, cultivadas em meio de cultura MS sem reguladores de crescimento, apresentaram maior comprimento de raízes (1,2 cm) do que as cultivadas em meio de cultura suplementado com os reguladores de crescimento ANA e BAP (0,8 cm). Estudos de enraizamento com *Cydonia oblonga* apresentaram melhores resultados para o número de raízes com a aplicação 20 μM de AIB e para o comprimento médio das raízes utilizando 10 μM desse mesmo regulador (ERIG e SCHUCH, 2004). Em *Malus sylvestris*, comparando os reguladores de crescimento AIA e AIB, Radmann et al. (2002) observaram que o número de raízes foi maior na presença de 20 μM de AIA, entretanto, o comprimento da raiz não diferiu estatisticamente nas concentrações de 0,5 μM de AIB e 1 μM de AIA. Para *Genipa americana*, concentrações acima de 9,8 μM de AIB reduziram o número e o comprimento das raízes adventícias (ROCHA et al., 2008).

Os reguladores de crescimento AIA e AIB promoveram maior porcentagem de formação de raízes adventícias grossas e ramificadas (Figura 3), tendo as concentrações 10 μM e 15 μM de AIB (Figura G e H) propiciado maior formação de raízes laterais.

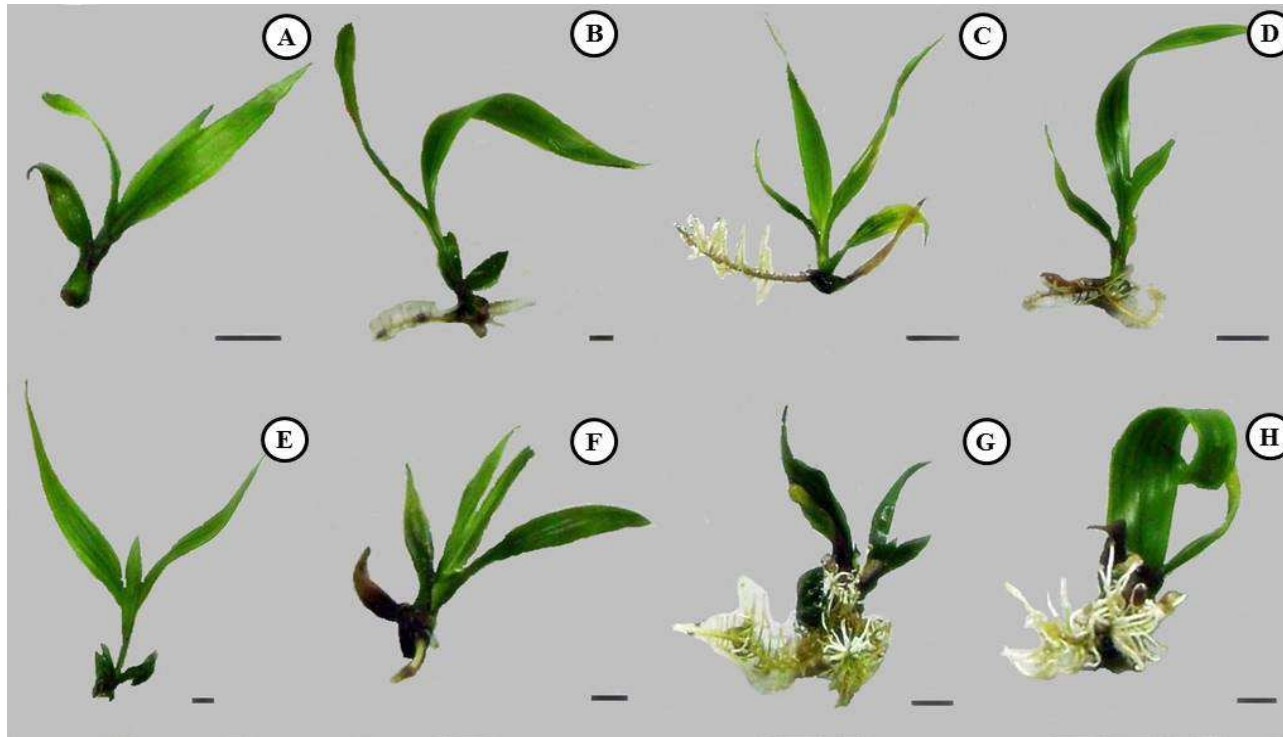


Figura 3 AIB e AIA durante o enraizamento *in vitro* de plantas de dendezeiro *Elaeis guineensis* híbrido Tenera. Controle (A), 5 μ M de AIA (B), 10 μ M de AIA (C), 15 μ M de AIA (D), controle (E), 5 μ M de AIB (F), 10 μ M de AIB (G), 15 μ M de AIB (H).

As raízes têm muitas funções nas plantas, incluindo absorção de água e nutrientes, estoque de reserva, síntese de compostos específicos, fixação no solo e estabelecimento de interação bióticas com a rizosfera (LÓPEZ-BUCIO et al., 2003). O tamanho e a arquitetura do sistema radicular determinam a habilidade da planta em acessar a água e os nutrientes, e esses são fatores que limitam o crescimento e, assim, a produção em muitos ecossistemas agrícolas (PRICE et al., 1997).

Plantas com raízes maiores e mais ramificadas, como as observadas no tratamento com 10 μM e 15 μM de AIB, têm maior habilidade para competir por nutrientes e sobreviver em condições de deficiência nutricional no solo (COQUE e GALLAIS, 2006). Raízes adventícias grossas e ramificadas têm maior capacidade de absorver nutrientes e podem ser favoráveis para o sucesso da ampliação da fronteira do cultivo do dendezeiro, principalmente para o cerrado, pois, atualmente, ele é plantado no norte e no nordeste do país, nos estados do Pará, da Bahia e do Amazonas, devido à alta umidade do solo nestes locais (BIONDI et al. 2008; CLEMENT et al., 2005).

Corroborando esses dados, para o comprimento da parte aérea, o tratamento com AIA não apresentou diferença significativa e o tratamento com AIB apresentou resultados lineares positivos de aumento da concentração. As plântulas cultivadas 15 μM de AIB apresentaram 10 cm de comprimento de parte aérea, demonstrando que raízes maiores e mais ramificadas, observadas com tratamento com 10 μM e 15 μM de AIB, têm maior habilidade para absorver nutrientes que são transcolados via xilema para a parte aérea, resultando em maior crescimento.

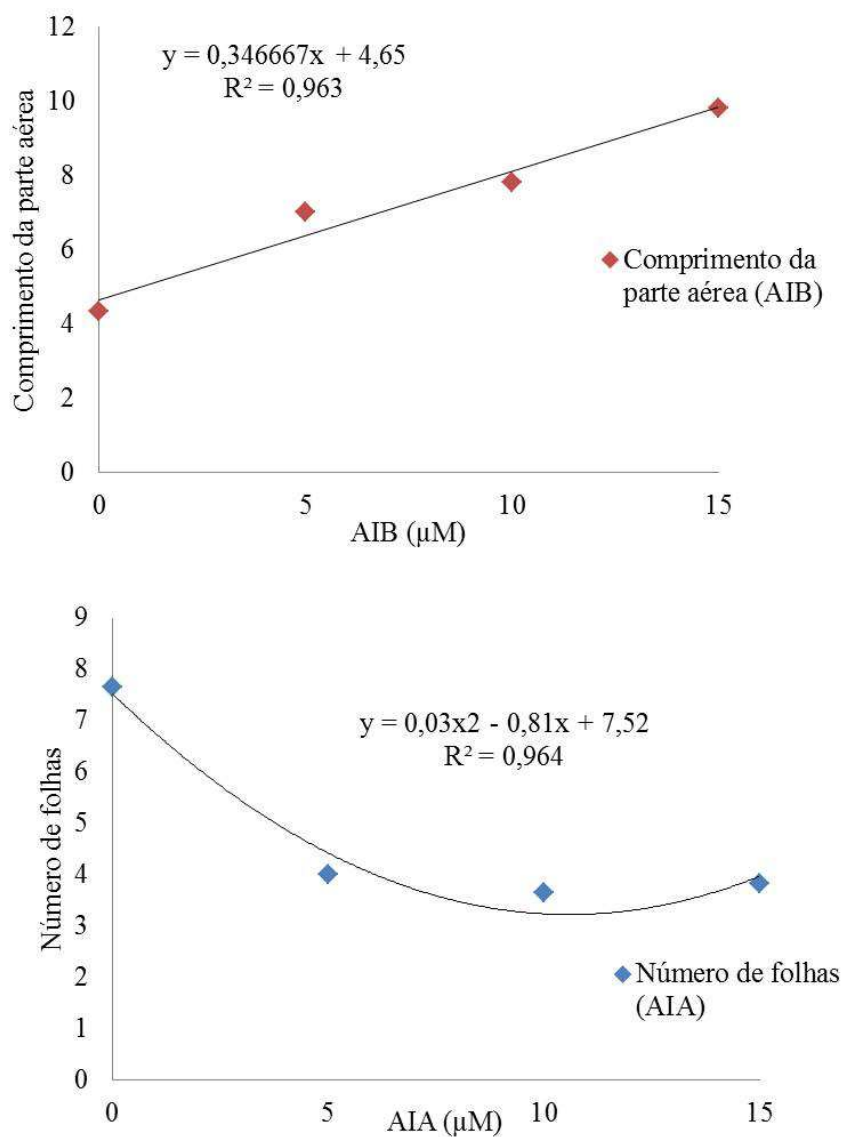


Figura 4 Efeito do AIB e AIA, durante o enraizamento *in vitro* de plantas de dendezeiro *Elaeis guineensis* híbrido Tenera, com relação ao comprimento da parte aérea (A) e ao número de folhas por explante (B).

O crescimento das plantas é altamente regulado ao longo do desenvolvimento e o tamanho final das plantas é determinado por coordenação

do crescimento global dos órgãos distintos. Isso indica que, para um crescimento ótimo, a produção de energia nas folhas fotossintéticas tem que ser muito bem afinada com a disponibilidade da água e dos nutrientes fornecidos pelas raízes, inevitavelmente ligando crescimento aéreo e radicular (PAUL e FOYER, 2001).

Estudos de enraizamento em *Carica papaya* L. também sugerem que 5,92 μM do AIB beneficiam tanto a porcentagem de enraizamento quanto o crescimento da parte aérea (SCHMILDT et al., 2010). Em *Eucalyptus cloeziana*, a concentração de AIB no cultivo *in vitro* influenciou a aclimatização das plantas e a melhor concentração para indução de raízes correspondeu à melhor concentração durante a aclimatização das plantas (ALMEIDA et al., 2007).

Quanto ao número de folhas, não houve diferenças entre as fontes de auxina. A ausência de auxina no meio de cultivo promoveu o maior número de folhas (7,7) e foi observado um decréscimo do número de folhas com o aumento da concentração de AIA ou AIB (Figura 4B). A iniciação foliar no meristema apical do caule é dependente do movimento dinâmico de auxina ao redor do meristema, culminando com o seu transporte da folha recém-formada para o caule em conexão e acompanhado pela diferenciação da nervura central da folha e sua conexão vascular com o caule (MÜLLER e LEYSER, 2011). Ápices caulinares têm competência e determinação para crescimento, desde que sejam fornecidas as condições necessárias de nutrição e luminosidade.

As auxinas e as citocininas endógenas são sintetizadas pelos primórdios foliares dos ápices caulinares e podem suprir a demanda para crescimento da parte aérea. No enraizamento de microestacas de *Morus* sp. utilizando o AIB no meio de cultivo, não foram observadas diferenças estatísticas na emissão de folhas para o grupo controle (sem a auxina), como visto neste trabalho (AUGUSTO et al., 2006).

CONCLUSÃO

Os reguladores de crescimento são efetivos na indução de raízes, nas diferentes concentrações testadas. A auxina AIB apresentou maiores taxas de enraizamento (87%), sendo a mais indicada a partir dos resultados deste trabalho para a indução de raízes em dendezeiro híbrido Tenera.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, F. D.; XAVIER, A.; DIAS, J. M. M.; PAIVA, H. N. Eficiência das auxinas (AIB e ANA) no enraizamento de miniestacas de clones de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell. **Revista Árvore**, v.31, n.3, p.455-4463, 2007.
- AUGUSTO, C. S. S.; BIASI, L. A.; TELLES, C. A. Enraizamento e aclimatização de plantas micropropagadas de amoreira-preta CV. Brazos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.28, n.3, p.473-476, 2006.
- BARBOSA, W.; PIO, R.; FELDBERG, N. P.; CHAGAS, E. A.; FERRAZ, R.; VEIGA, F. A. Enraizamento de estacas lenhosas de pereira tratadas com AIB e mantidas em ambiente de estufa tipo B.O.D e de telado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.29, n.3, p.589-594, 2007.
- BIONDI, A.; MONTEIRO, M.; GLASS, V. **O Brasil dos agrocombustíveis: palmáceas, algodão, milho e pinhão-manso: impacto das lavouras sobre a terra, o meio e a sociedade**. Brasília: ONG Repórter Brasil, 2008, 48 p.
- BRONDANI, G. E.; BACCARIN, F. J. B.; BERGONCI, T.; GONÇALVES, A. N.; ALMEIDA, M. Miniestaquia de *Eucalyptus benthamii*: Efeito do genótipo, AIB, zinco, boro e coletas de brotações. **Revista Cerne**, v.20, n.1, p.147-156, 2014.
- CLEMENT, C. R.; PÉREZ, E.; VAN-LEEUWEN, J. O potencial das palmeiras tropicais no Brasil: acertos e fracassos das últimas décadas. **Agrociências**, v.9, n.1/2, p.67-71, 2005.
- COQUE, M.; GALLAIS, A. Genomic regions involved in response to grain yield selection at high and low nitrogen fertilization in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, v.112, n.7, p.1205-1220, 2006.
- COSTA, F. H. S.; PASQUAL, M.; PEREIRA, J. E. S.; RODRIGUES, F. A.; MIYATA, L. Y. Relação entre o tempo de enraizamento *in vitro* e o crescimento de plantas de bananeira na aclimatização. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30, n.1, p.31-37, 2008.

CURTI, A. R.; REINIGER, L. R. S. *In vitro* rhizogenes in *Peltophorum dubium*: the effect of different culture media. **Ciência Rural**, v.44, n.2, p.314-320, 2014.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. *In vitro* rooting of quince cv. MC as rootstock for pear and acclimatization of the rooted microcuttings. **Ciência Rural**, v.34, n.5, p.1443-1449, 2004.

FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C.; KERSTEN, E.; FORTES, G. R.L. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. 2.ed. Pelotas: UFPel, 179p, 1995.

FERREIRA, D.F. SISVAR: um programa para análise e ensino de estatística. *Revista Symposium*, v. 6, n.6, p.36-40, 2008.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**: volume 1. the background. 3 rd ed. Dordrecht: Springer, 2008.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/Embrapa CNPH, 1990. p. 99-169.

KLERK, G. J.; KRIEKEN, W. V. D.; JONG, J. C. The formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities. **In Vitro Cellular & Developmental BiologyPlant**, v.35, n.3, p.189-199, 1999.

LATSAGUE, M.; SÁEZ, P.; YÁÑEZ, J. Efecto del ácido indolbutírico en la capacidad rizogénica de estacas de *Eucryphia glutinosa*. *Bosque*, v. 30, n.2, p. 102-105, 2009.

LÓPEZ-BUCIO, J.; CRUZ-RAMÍREZ, A.; HERERA-ESTRELLA. L. The role of nutrient availability in regulating root architecture. **Current Opinion Plant Biology**, v.6, n.3, p.280-287, 2003.

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

MANSSERI-LAMRIOUI, A.; BONALY, J.; YAKOUB-BOUGDAL, S.; ALLILI, N.; GANA-KEBBOUCHE, S. Proliferation and rooting of wild cherry: The influence of cytokinin and auxin types and their concentration. **African Journal of Biotechnology**, v.10, n.43, p.8613-8624, 2014.

MCGWIRE, J.; ALBERT, L.; SHUTAK, V. Effect of foliar application of 3-indole butyric acid on rooting of cutting of ornamental plants. *American Society Agricultural Science, Alexandria*. v. 93, p 699-704, 1969.

MILLÁN-OROZCO, L.; CORREDOIRA, E.; SAN-JOSÉ, M. D. C. In vitro rhizogenesis: histoanatomy of *Cedrela odorata* (Meliaceae) microcuttings. **Revista Biología Tropical**, v.59, n.1, p.447-453, 2011.

MORCILLO, F.; GALLARD, A.; PILLOT, M.; JOUANNIC, S.; ABERLENC-BERTOSSI, F.; COLLIN, M.; VERDEIL J. L.; TREGEAR, J.W. EgAP2-1, an AINTEGUMENTA-like (AIL) gene expressed in meristematic and proliferating tissues of embryos in oil palm. **Planta**, v.226, n.6, p.1353-1362, 2007.

MÜLLER, D.; LEYSER, O. Auxin cytokinin and the control of shoot branching. **Annals of Botany**, v.107, n.7, p.1203-1212, 2011.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. 1962. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Plant Physiol**, v.15, p. 473-479, 1962.

NISSEN, J.S; SUTTER, E.G. Stability of AIA and AIB in nutrient medium of several tissue culture procedures. **HortScience**, v.25, n. 3, p.800-802, 1990.

PÁDUA, M.S.; PAIVA, L.V.; SILVA, L.G.T. da; SILVA, L.C.; STEIN, V.C. *In vitro* development and acclimatization of dendezeiro (*Elaeis guineensis*). **Revista Árvore**, v.38, n.6, p.1095-1102, 2014.

PATHI, K. M.; TULA, S.; TUTEJA, N. High frequency regeneration via direct somatic embryogenesis and efficient *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of tobacco. **Plant signaling & Behavior**, v.8, n.6, p.24354, 2013.

PAUL, M. J.; FOYER, C. H. Sink regulation of photosynthesis. **Journal Experimental Botany**, v.52, n.360, p.1383-1400, 2001.

PRICE, A. H.; TOMOS, A. D.; VIRK, D. S. Genetic dissection of root growth in rice (*Oryza sativa* L.) I: A hydroponic screen. **Theoretical Applied Genetics**, v. 95, n.1/2, p.132-142, 1997.

QADDOURY, A.; AMSSA, M. Action de l'acide indole butyrique sur l'enracinement des jeunes rejets de Palmier dattier. *Acta Botanica Gallica: Botany Letters*, v. 150, n.2, p. 213-222, 2003.

RADMANN, E.B.; FACHINELLO, J. C.; PETERS, J. A. Efeito de auxinas e condições de cultivo no enraizamento *in vitro* de porta-enxertos de macieira 'M-9'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, n.3, p.624-628, 2002.

ROCHA, M. A. C.; COSTA, M. A. P. C.; SILVA, S. A.; LEDO, C. A. S.; MOREIRA, M. J. S.; BASTOS, L. P. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de genótipos de jenipapeiro (*Genipa americana* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30, n.3, p.769-774, 2008.

ROOWI, S. H.; HO, C. L.; ALWEE, S. S.; ABDULLAH, M. O.; NAPIS, S. Isolation and characterization of differentially expressed transcripts from the suspension cells of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in response to different concentration of auxins. **Molecular Biotechnology**, v.46, n.1, p.1-19, 2010.

ROSS, C.W. Hormones and growth regulators: auxins and gibberellins. In: SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. (Eds.) **Plant Physiology**. 4.ed. Belmont, Wadsworth, 1992. p.357-377.

SCHMILDT, ER, AMARAL, JAT do, SCHMILDT, O, COELHO, RI, RABELLO, WS, MARTINS FILHO, S. Níveis de ácido indol butírico (AIB) no enraizamento *in vitro* de microestacas de mamoeiro ‘Tainung 01’. *Maringá*, v. 32, n. 1, p. 125-129, 2010.

SCHMILDT, E. R.; AMARAL, J. A. T.; SCHMILDT, O.; COELHO, R. I.; RABELLO, W. S.; FILHO, S. M. I. Níveis de ácido indol butírico (AIB) no enraizamento *in vitro* de microestacas de mamoeiro ‘Tainung 01’. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v.32, n.1, p.125-129, 2010

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 820 p. 2013.

TOPPO, D. D.; SINGH, G.; PURSHOTTAM, D. K.; MISRA, P. Improved *in vitro* rooting and acclimatization of *Jatropha curcas* plantlets. **Biomass and bioenergy**, v.4, n.4, p. 42-46, 2012.

THUZAR, M.; VANAVICHIT, A. Efficient and rapid plant regeneration of oil palm zygotic embryos cv. ‘Tenera’ through somatic embryogenesis. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.33, n.1, p.123-128, 2011.

UGRAIAH, A.; SREELATHA, R.; REDDY, K.; RAJASEKHAR, K.; RANI, S. S.; KARUPPUSAMY, S.; PULLAIAH, T. *In vitro* shoot multiplication and conservation of *Caralluma bhupenderiana* Sarkaria – an endangered medicinal plant from South India. **African Journal of Biotechnology**, v.10, n.46, p.9328-9336, 2014.

URIBE, K. M. E.; ULLOA, J.; DELAVEAU, C.; SÁEZ, K.; MUNOZ, F.; CARTES, P. Influencia de las auxinas sobre el enraizamiento *in vitro* de microtallos de *Nothofagus glauca* (Phil.) Krasser. **Gayana Botânica**, v.69, n.1, p.105-112, 2012.

WOODHEAD, J. L.; BIRD, K. T. Efficient rooting and acclimation of micropropagated *Ruppia maritima* Loisel. **Journal of Marine Biotechnology**, v.6, n.3, p.152-156, 1998.

XAVIER, A.; WENDLING, L.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2009. 272 p.

ARTIGO 3
NORMAS DA REVISTA CIENTÍFICA
IN VITRO CELLULAR & DEVELOPMENTAL BIOLOGY—PLANT
(VERSÃO PRELIMINAR)

ARTIGO 3

ESTABILIDADE GENÉTICA DE PLANTAS DE DENDEZEIRO (*Elaeis guineensis*JACQ.) OBTIDAS POR EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

RESUMO

O cultivo *in vitro* de plantas por longo tempo e na presença de altas concentrações de reguladores de crescimento pode gerar variação somaclonal que, no caso do dendezeiro, será visualizada morfológicamente somente aos seis anos de idade. A citometria de fluxo pode auxiliar na detecção precoce de alterações genéticas nas plantas micropropagadas. Este trabalho foi realizado com o objetivo de analisar o conteúdo de DNA das plantas de dendezeiro (*Elaeis guineensis*) híbrido Tenera cultivadas *in vitro*, para a verificação da estabilidade genética por meio de citometria de fluxo. Foram utilizadas 50 plantas, obtidas via embriogênese somática indireta, após 12 meses de cultivo e subcultivadas a cada 30 dias. O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, com 50 repetições. Para a determinação do conteúdo de DNA foram utilizadas folhas das plantas *in vitro*. Como padrão interno de referência, foram utilizadas folhas jovens de tomate (*Solanum lycopersicum*). As amostras foram trituradas em uma placa de Petri contendo 1 mL de tampão de extração Marie gelado, para a obtenção da suspensão nuclear. A suspensão de núcleos foi filtrada através de uma malha de 50 µm. Os núcleos foram corados com 25 µL de uma solução de 1mg/1mL de iodeto de propídeo e colocados no citômetro FacsCalibur. Os histogramas foram obtidos com o software Cell Quest e os coeficientes de variação (CV) foram analisados no software WinMDI 2.8. Para cada amostra foram analisados 10.000 núcleos. Os resultados foram submetidos à análise de variância pelo teste F, com médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Verificou-se que as plantas apresentaram variações no conteúdo de DNA, sendo divididas estatisticamente em dois grupos, em que 34 plantas tiveram o conteúdo de DNA significativamente aumentado. Pode-se concluir, por meio da análise de citometria de fluxo, que o tempo de cultivo *in vitro* e as altas concentrações de auxina podem ter afetado a estabilidade genética das plantas.

Palavras-chave: *Elaeis guineenses*. Cultivo *in vitro*. Reguladores de crescimento. Variação somaclonal. Citometria de fluxo.

ABSTRACT

Plants *in vitro* cultivation in high concentrations of growth regulators and for a long time and can lead to somaclonal variation. In oil palm, this variation will be observed morphologically only after to six years old. Flow cytometry can improve the early genetic alterations detection of *in vitro* plants. The aim of this study was to analyze, by flow cytometry, DNA content of plant oil palm (*Elaeis guineensis*) Tenera hybrid grown *in vitro* to verify the genetic stability. For the experiment were used 50 plants, germinated from indirect somatic embryos, with 12 months old and subcultured every 30 days. The statistical design was completely randomized with 50 repetitions. To determine DNA content were used leaves of plants *in vitro*. As internal reference standard was used of tomato (*Solanum lycopersicum*) young leaves. To obtaining nuclear suspension samples were crushed in petri dish containing 1 ml of ice Marie extraction buffer. Nuclei suspension was filtered through a 50µm mesh. Nuclei were stained with 25 uL of a solution of propidium iodide (1mg/1ml) and placed on the flow cytometer. FACSCalibur. With Cell Quest software were obtained histograms and coefficients of variation (CV) were analyzed in WinMDI 2.8 software. For each sample were analyzed 10,000 nuclei. The results were submitted to variance analysis by F test with means were compared by Tukey test at 5% probability. Plants showed DNA content variations and were statistically divided into two groups. 34 plants had significantly increased DNA content. *In vitro* cultivation in high concentrations of auxin and long time may have affected genetic stability of the plants.

Keywords: *Elaeis guineensis*. *In vitro* culture. Growth regulators. Somaclonal variation. Flow cytometry.

1 INTRODUÇÃO

Dentre as técnicas da cultura de tecidos e órgãos vegetais, a embriogênese somática se destaca, pois se caracteriza por formar um embrião somático sem a fusão dos gametas femininos e masculinos. Esse embrião somático se desenvolve de forma semelhante ao embrião zigótico, mas, por ter células somáticas de apenas um indivíduo, as plantas geradas são clones (Zimmermann, 2010). Por meio da embriogênese somática é possível fornecer um maior número de mudas, em menores espaço e tempo, comparada aos métodos tradicionais utilizados na propagação do dendezeiro em campo (Guerra et al., 1999).

Porém, essa técnica requer o uso de altas concentrações de reguladores de crescimento que, associados aos inúmeros subcultivos, podem gerar plantas variantes somaclonais (Bairu et al., 2011).

A variação somaclonal pode decorrer de uma alteração genética e epigenética (Larkin, 1981). Em dendezeiro, a variação somaclonal pode aparecer de forma heterogênea e em intensidade variável entre os clones, e também entre as flores de uma mesma palmeira, que resulta em parcial ou completa esterilidade da flor, dependendo da severidade da anormalidade (Jaligot et al., 2000).

Essa variação somaclonal característica do dendezeiro é denominada “mantled”, em que só é possível visualizar morfologicamente após os cinco a seis anos de idade da planta. A estrutura floral dessas plantas apresenta-se aberrante, com as partes masculinas modificadas em flores de ambos os sexos, formando pseudocarpelos que se desenvolvem em estruturas carnudas do fruto verdadeiro. Por isso denomina-se de “manto”, ou “mantled”, esse fenótipo. A esterilidade da flor aumenta em decorrência do agravamento da anormalidade e a consequência é a diminuição da frutificação e da produção de óleo (Rival, 2000).

Segundo Rival (2000), a embriogênese somática em dendezeiro causa em torno de 5% de plantas com variações somaclonais. O estudo das plantas

obtidas *in vitro*, em relação às possíveis alterações genéticas geradas, é importante para reduzir o tempo e os gastos investidos durante o seu desenvolvimento (Singh et al., 2012).

A citometria de fluxo vem sendo amplamente utilizada no intuito de estimar o conteúdo de DNA das plantas e, assim, inferir se ocorreu alteração no genoma das plantas. É uma técnica vantajosa, por ser rápida e precisa (Bairu et al., 2011), já tendo sido utilizada em dendezeiro para estimar o conteúdo de DNA em calos, células em suspensão e plântulas (Madon et al., 2012) e para classificar cultivares (Srisawat et al., 2012).

Este estudo foi realizado com o objetivo de verificar variações somaclonais em plantas de dendezeiro híbrido Tenera provenientes de longo cultivo *in vitro*, por meio de análises morfológicas e de citometria de fluxo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

O material vegetal foi fornecido pela empresa Denpasa, Pará. O experimento foi conduzido no Laboratório Central de Biologia Molecular e no Laboratório de Cultura de Tecidos, no Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG.

2.2 Embriogênese somática indireta e regeneração das plantas

Explantos de inflorescências imaturas de dendezeiro foram inoculados em meio de cultivo MS suplementado com altas concentrações do regulador de crescimento piclorame 1gL^{-1} de carvão ativado suplementado com 3% de sacarose, solidificado com 0,6% de ágar e pH ajustado para $5,7\pm 0,1$, antes da autoclavagem. Os explantes foram mantidos, por 10 meses, sem a renovação do meio de cultivo para a indução de calos embriogênicos. Para o desenvolvimento dos embriões somáticos, foi utilizado o mesmo meio de cultura citado, no qual foram mantidos durante quatro meses, com

renovação do meio de cultura a cada 60 dias. Em ambas as etapas citadas os explantes foram mantidos em sala de crescimento, na ausência de luz e à temperatura de $27\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Posteriormente, os embriões somáticos foram transferidos para meio de cultura constituído de MS (Murashige e Skoog, 1962), com metade da concentração dos sais suplementada com $2,57\ \mu\text{M}$ AIA e $1,11\ \mu\text{M}$ BA, 3% de sacarose e 0,6% de ágar, para germinação dos embriões somáticos, em que permaneceram durante 3 meses, subcultivados a cada 30 dias. Os embriões somáticos foram mantidos em sala de crescimento, na presença de luz e à temperatura de $27\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Após quatro meses de cultivo, as plantas germinadas foram isoladas e subcultivadas no mesmo meio de cultura, com renovação do meio a cada 30 dias, durante 12 meses. Logo após esse período, uma amostra foi coletada para análise. As demais plântulas foram mantidas em sala de crescimento, na presença de luz e à temperatura de $27\pm 2^{\circ}\text{C}$.

2.3 Análise em citometria de fluxo

O preparo das amostras e as análises por citometria de fluxo foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos, no Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG.

Com objetivo de estimar o conteúdo de DNA, foram avaliadas 50 amostras de folhas de plantas, com três repetições e três fragmentos foliares de uma planta do campo, da qual foram retirados os explantes utilizados na indução da embriogênese somática, como controle (delineamento inteiramente casualizado).

Para a determinação do conteúdo de DNA, aproximadamente 20-30 mg de folhas jovens das plantas, juntamente com o padrão de referência interno (tomate – *Solanum lycopersicum* – 1,96 pg), foram triturados em placa de Petri contendo 1mL de tampão de extração Marie, para a liberação dos núcleos (Dolezel et al., 1989). Após o processo de extração, a suspensão

de núcleos foi aspirada com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e filtrada através de uma malha de 50 μm . Os núcleos foram corados pela adição de 25 μL de uma solução de 1mg/1mL de iodeto de propídeo. Os histogramas foram obtidos com o software Cell Quest e os dados analisados no programa WiMDI. O teste de médias foi feito pelo Sisvar (Ferreira, 2008).

2.4 Análises morfológicas

As 50 plantas regeneradas via embriogênese somática foram analisadas quanto ao aspecto visual das folhas, ao formato e à textura.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As plantas analisadas por citometria de fluxo foram separadas em três grupos, sendo o grupo controle, com o DNA estimado em 3,36 pg; um grupo com 16 plantas, que apresentaram média do conteúdo de DNA estimado de 3,7 pg e o outro grupo de 34 plantas, com o conteúdo de DNA estimado em 3,9 pg (Tabela 1).

Tabela 1 – Conteúdo médio de DNA relativo (pg) das plantas obtidas *in vitro* de *Elaeis guineensis* Jacq. Híbrido Tenera, verificado após 12 meses de cultivo.

Amostra	Conteúdo de DNA (pg)
Grupo 1 (controle)	3,36 a
Grupo 2	3,7 a
Grupo 3	3,9 b

Médias seguidas pela mesma letra pertencem a um mesmo grupo, pelo teste Scott Knott, a 5% de probabilidade.

Foram observadas variações no conteúdo de DNA em alta porcentagem das plantas analisadas (68%), com um aumento no conteúdo de DNA de 0,5 pg (Tabela 2).

Tabela 2 – Conteúdo médio de DNA relativo (pg) das plantas obtidas de *Elaeis guineenses* Jacq. Híbrido Tenera, verificado após 24 meses de cultivo *in vitro*.

Planta	Índice de DNA	Planta	Índice de DNA
1	3,96 b	26	3,86 b
2	4,09 b	27	3,73 a
3	3,80 a	28	3,73 b
4	3,04 a	29	3,89 b
5	3,57 a	30	4,11 b
6	3,98 b	31	4,13 b
7	3,77 a	32	4,03 b
8	3,97 b	33	3,91 b
9	4,06 b	34	3,96 b
10	4,22 b	35	4,16 b
11	3,94 b	36	3,92 b
12	3,89 b	37	3,79 a
13	4,01 b	38	3,64 a
14	3,55 a2	39	3,97 b
15	3,88 b	40	4,13 b
16	3,88 b	41	3,79 a
17	3,47 a	42	3,89 b
18	3,72 a	43	3,75 a
19	4,15 b	44	3,99 b
20	3,52 a	45	3,62 a
21	3,82 b	46	3,91 b
22	3,73 a	47	3,74 a
23	3,89 b	48	3,98 b
24	3,96 b	49	3,89 b
25	4,8 b	50	4,21 b
26	3,86 b	Controle	3,36 b
27	3,73 a	CV	5,59

Médias seguidas pela mesma letra pertencem a um mesmo grupo, pelo teste Scott Knott, a 5% de probabilidade.

Resultados semelhantes em trabalhos utilizando a citometria de fluxo para estimar o conteúdo de DNA foram encontrados para plantas de dendezeiro *in vitro*. Rival et al.(1997) e Srisawat et al.(2005) obtiveram valores iguais ao deste estudo (3,7 pg) e Madon et al.(2008) e Srisawat et al. (2012) obtiveram valores muito próximos(3,8 pg).

Em estudos com dendezeiro, a citometria de fluxo permitiu distinguir a quantidade de DNA entre as espécies Dura e Psífera, que são os pais de Tenera. A estimativa do DNA de Dura foi de 6,3 a 7,6 pg e a de Psífera foi próxima de 5,3 a 6,1 pg (Srisawat et al., 2012). Esses dados do conteúdo de DNA são importantes para diferir os híbridos em estudo e o cruzamento realizado entre eles. Em maracujazeiro foi possível distinguir as espécies por meio das análises de citometria de fluxo (Souza et al., 2004).

A análise dos histogramas confirmou a diferença na estimativa do conteúdo de DNA entre as amostras, por meio da medida do diâmetro do segundo pico formado, em que o primeiro corresponde à amostra controle, o segundo, à fase G1 da mitose e o terceiro pico, à fase G2 da mitose (Figura 3

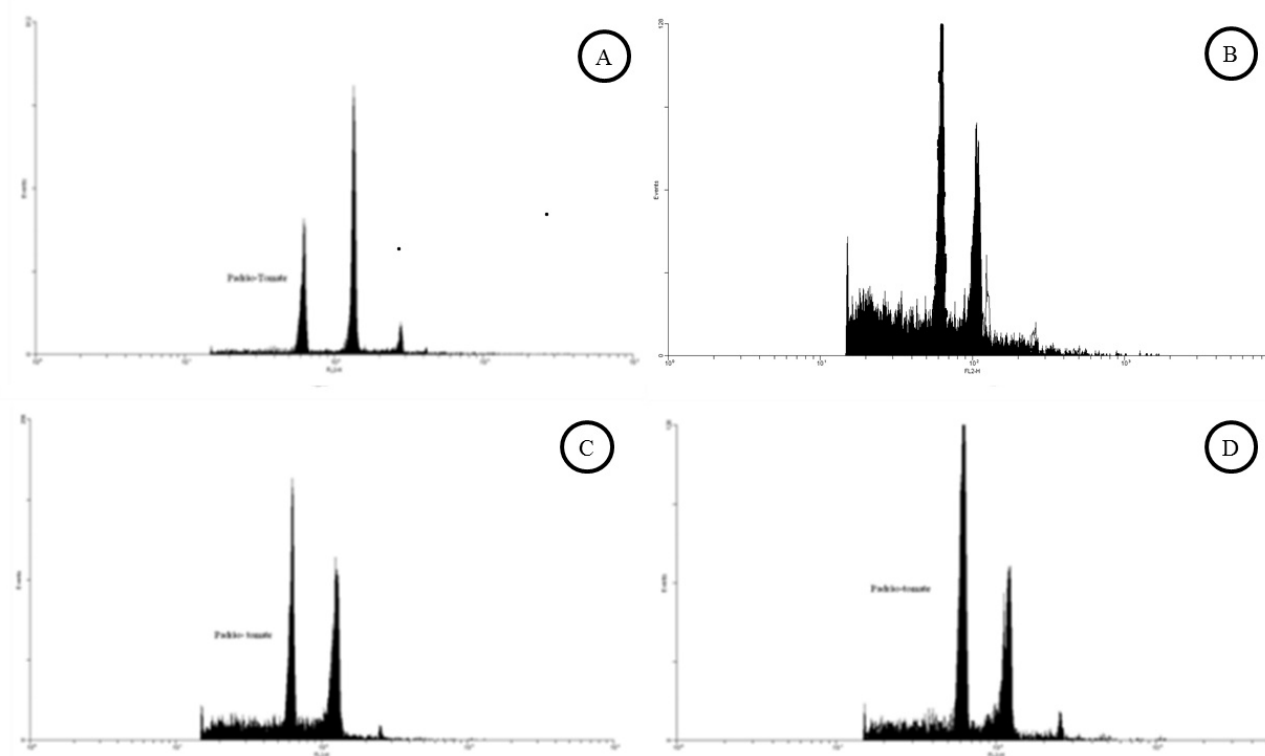


Figura 3 Histogramas obtidos por análise de citometria de fluxo da quantidade de DNA de dendezeiro (híbrido Tenera), usando o tampão Marie. O primeiro pico corresponde ao padrão *Solanum lycopersicum* e o segundo pico corresponde ao dendezeiro. A: Tomate (controle); B: Planta dendezeiro do campo (Grupo 1 - controle); C: Planta dendezeiro (Grupo 2), D: Planta dendezeiro (Grupo 3).

No cultivo *in vitro* de diferentes variedades de cana-de-açúcar foi observado aumento no conteúdo de DNA das plantas de até 0,96 pg, com 12 meses de subcultivos (Nogueira et al., 2014). Este fato também foi observado neste trabalho, pois as plantas avaliadas vieram de um longo cultivo *in vitro* dos calos e, posteriormente, de muitos subcultivos das plantas regeneradas.

Em suspensões celulares de *Coffea arabica* mantido por longo tempo *in vitro*, foram observadas variações na ploidia das células. Após quatro meses de cultivo, observaram-se células tetraploides, octaploides e aneuploides, indicando este ser o tempo máximo para conservar a ploidia das células (Clarindo et al., 2012).

Em bananeira, a micropropagação também ocasionou a formação de somaclones com conteúdo de DNA significativamente menor (1,72 pg), comparados à planta normal (1,82) avaliada em campo (Msogoya et al., 2011).

Resultados semelhantes foram observados em plantas de *Asparagus officinalis* regeneradas *in vitro* via organogênese indireta, como altas porcentagens de plantas com alterações no conteúdo de DNA, 38% das 37 plantas regeneradas e diferenças morfológicas (Pontaroli e Camadro, 2005).

Já em plantas de *Smallanthus sonchifolius* obtidas por meio da embriogênese somática, foi analisada a manutenção da estabilidade genética por meio de análises de citometria de fluxo (Viehmann et al., 2014).

As variações somaclonais, com conseqüente variação fenotípica, observadas nas plantas cultivadas *in vitro*, surgem devido às mutações na seqüência de DNA que podem ser causados por fatores epigenéticos. A metilação do DNA é um dos mecanismos principais de alterações epigenéticas e, normalmente, está relacionada ao silenciamento de genes em resposta ao ambiente em que estão (Miguel e Marum, 2011). Neste caso, ocorrem em resposta ao estresse induzido pelas próprias condições do meio *in vitro*, como, por exemplo, o meio de cultura, os inúmeros subcultivos

consecutivos e os reguladores de crescimento. Neste contexto, muitos estudos estão sendo realizados com plantas de dendezeiro obtidas *in vitro*, levando-se em consideração os fatores epigenéticos envolvendo a metilação do DNA (Jaligotet al., 2000; Rival et al., 2013).

Em plantas de dendezeiro, a variação somaclonal pode ser reduzida de acordo com o regulador de crescimento utilizado no cultivo *in vitro* (Thawaro e Te-Chato 2009). Em plantas de dendezeiro foi verificado que a presença de auxinas no meio de cultura leva à expressão de genes relacionados com a variação somaclonal “mantled” (Morcillo et al., 2006).

Neste trabalho foram utilizadas altas concentrações da auxinapicloram, durante a indução dos calos, fato que pode ter proporcionado o grande número de plantas com conteúdo de DNA aumentado, 36 das 50 plantas analisadas.

Das 50 plantas avaliadas quanto ao aspecto visual, quatro plantas apresentaram folhas com partes enrugadas (Figura 1).



Figura 1 Plantas de dendezeiro híbrido Tenera obtidas por embriogênese somática. A) Planta de dendezeiro com folhas aparentemente normais. B) Planta de dendezeiro com folha com aspecto rugoso.

Essas plantas, que apresentaram folhas com aspecto rugoso, sofreram um aumento no conteúdo do DNA (Tabela 1), o que pode indicar uma possível característica para se identificar com facilidade e rapidez plantas variantes somaclonais.

Em plantas de milho também foram observadas alterações morfológicas, folhas quebradiças e porte reduzido, correspondendo ao aumento no conteúdo do DNA (Couto et al., 2013).

Em cana-de-açúcar ocorreram variações morfológicas a partir do quarto mês de cultivo, correspondendo a reduções no conteúdo de DNA dessas plantas (Nogueira et al., 2014). Portanto, são necessários testes para reduzir o número de subcultivos, o tempo de cultivo e a concentração da auxina.

Futuros estudos com relação à metilação do DNA em plantas de dendezeiro podem trazer benefícios na prévia detecção de plantas com variação somaclonal.

CONCLUSÃO

Plantas de dendezeiro obtidas por meio de embriogênese somática sofrem alteração do conteúdo de DNA.

As avaliações morfológicas demonstraram modificações no aspecto das folhas em 8% das plantas analisadas, o que pode ser devido ao aumento no conteúdo de DNA observado, sendo este um aspecto importante a ser observado nas plantas, podendo servir como um marcador de plantas variantes somaclonais.

REFERÊNCIAS

Bairu MW, Aremu AO, Van Staden J (2011) Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regulation* 63:147-173

Clarindo WR, Carvalho, CR de, Araújo FS, Abreu IS de, Otoni WC (2008) Recovering polyploid papaya *in vitro* regenerants as screened by flow cytometry. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 92:207-214

Clarindo WR, Carvalho, CR, Mendonça, MAC (2012) Ploidy instability in long-term *in vitro* cultures of *Coffea arabica* L. monitored by flow cytometry *Plant Growth Regulation* 68:p.533-538

Couto EG de O, Davide LCM, Bustamante F de O, Pinho RGV, Silva TN (2013) Identification of haploid maize by flow cytometry, morphological and molecular markers. *Ciência e Agrotecnologia* 37:25-31

Dolezel J, Binarová P, Lucretti S (1989) Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. *Biologia Plantarum* 31:113–120

Ferreira DF (2008) SISVAR: Um programa para análise e ensino de estatística. *Revista Symposium* 6:36-41

Guerra MP, Torres AC, Teixeira JB (1999) Embriogênese Somática e Sementes Sintéticas. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S.; Buso, J.A. (eds.). *Culturas de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Brasília, Embrapa-CBAB 2:533-568.

Jaligot E, Rival A, Beulé T, Dussert S, Verdeil JL (2000) Somaclonal variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Plant Cell Reports* 19: 684-690

Larkin PJ, Scowcroft WR (1981) Somaclonal variation – a novel source of variability from cellcultures for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics* 60:197-214

Madon M (2012) Analysis of oil palm calli and regenerants using flow and image cytometry and 18S-25S ribosomal DNA fluorescence in situ hybridisation (Fish). *Journal of Oil Palm Research* 24:1318-1329

Miguel C, Marum L (2011) Na epigenetic view of plant cells cultured *in vitro*: somaclonal variation and beyond. *Journal of Experimental Botany* 62:3713-3725

Morcillo F, Gallard A, Pillot M, Jouannic S, Aberlenc-Bertossi F, Collin M, Verdeil JL, Tregear JW (2007) EgAP2-1, an AINTEGUMENTA-like (AIL) gene expressed in meristematic and proliferating tissues of embryos in oil palm. *Planta* 226:1353-1362

Msogoya TJ, Grout BW, Roberts A (2011) Reduction in genome size and DNA methylation alters plant and fruit development in tissue culture induced off-type banana (*Musa* spp.) *Journal of Animal & Plant Science* 11:1450-1456

Murashige T, Skoog FA (1962) A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. *Plant Physiol* 15:473-479

Nogueira GF, Pio LAS, Pasqual M, Amaral A, Scherwinski-Pereira JE (2014) An approach on the *in vitro* maintenance of sugarcane with views for conservation and monitoring of plant nuclear DNA contents via flow cytometry. *In Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant* 50:1-11

Pontaroli AC, Camadro EL (2005) Somaclonal variation in *Asparagus officinalis* plants regenerated by organogenesis from long-term callus cultures. *Genetics and Molecular Biology* 28:423-430

Rival A (2000) Somatic embryogenesis in oil palm. In: Jain SM, Gupta PK, Newton RJ (eds) *Somatic embryogenesis in woody plants*. Kluwer, Dordrecht 249–290

Rival A, Beule T, Barre P, Hamon S, Duval Y, Noirot M (1997) Comparative flow cytometric estimation of nuclear DNA content in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) tissue cultures and seed-derived plants. *Plant Cell Reports* 16:884-887

RIVAL A, Llibert P, Labeyrie A, Torres E, Doubeau S, Personne A, Dussert S, Beulé T, Durand-Gasselin T, Tregear JW, Jaligot E (2013) Variations in genomic DNA methylation during the long-term in vitro proliferation of oil palm embryogenic suspension cultures. *Plant Cell Reports* 32:359-368

Singh C, Yohe S, Baughn L B, Linden M A (2012) Utility of Flow Cytometry to Classify Abnormal Plasma Cell Populations in Marrow Samples Collected from Patients with Putative Plasma Cell Neoplasms. *Open Journal of Blood Diseases* 2:39-45

Souza MM, Palomino G, Pereira TNS, Pereira MG, Viana AP (2004) Flow cytometry analysis of genome size variation in some *Passiflora* species. *Hereditas* 141:31-38

Srisawat 2005

Srisawat T, Kanchanapoom k, Pattanapanyasat k, Srikul S, Chuthammathat W (2012) Flow cytometric classification of oil palm cultivars. *African Journal of Biotechnology* 11: 3714-3724

Thawaro S, Te-Chato (2009) Application of molecular markers in the hybrid verification and assessment of somaclonal variation from oil palm propagated *in vitro*. *ScienceAsia* 35:142-149

Viehmanna I, Bortlova Z, Vitamvas J, Cepkova P H, Eliasova K, Svobodova E, Travnickova M (2014) Assessment of somaclonal variation in somatic embryo-derived plants of yacon [*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. and Endl.) H. Robinson] using inter simple sequence repeat analysis and flow cytometry. *Electronic Journal of Biotechnology* 17:102-106

Zimmermann, M. J (2010) Embriogênese somática: Definição, usos e limitações. In: Brasileiro, A. C. M. Cultivo *in vitro* de plantas. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica 68-101

ARTIGO 4
NORMAS DA REVISTA CIENTÍFICA
PLANT CELL REPORTS
(VERSÃO PRELIMINAR)

ARTIGO 4

TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE DENDEZEIRO VIA *Agrobacterium Rhizogenes*

RESUMO

O dendezeiro é uma monocotiledônea oleaginosa que se destaca pela alta produção de óleo por seus frutos. Esse óleo é amplamente utilizado nas indústrias alimentícia, farmacêutica, cosmética e para a produção de biocombustíveis. No entanto, o dendezeiro encontra dificuldades na expansão de sua cultura, devido à sua dificuldade de adaptação em diferentes condições climáticas. A técnica de transformação genética pode permitir, por meio da inserção de genes, como, por exemplo, aqueles envolvidos com a tolerância ao estresse hídrico, uma melhor adaptação do dendezeiro em outras regiões agrícolas. A transformação genética de monocotiledoneas utilizando a *Agrobacterium* encontra algumas limitações em relação à infecção e à transferência do DNA de interesse para as plantas. O objetivo, neste trabalho, foi estabelecer um protocolo de transformação genética para o dendezeiro, utilizando a *Agrobacterium rhizogenes* cepa MSU440, contendo o plasmídeo pEZR (H)-LN com o gene *gfp*. Para a otimização do protocolo foram testados dois métodos de infecção, corte na base e infiltração a vácuo e, posteriormente, as plantas foram cocultivadas em BOD, com fotoperíodo de 16 horas, à temperatura de 19 °C, durante cinco dias. Após o cocultivo, as plantas foram transferidas para meio de cultivo ER suplementado com 500 mg.L⁻¹ de tioxina (Tioxin®), para eliminar as bactérias e foram mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, à temperatura de 26±2 °C, até o enraizamento. As raízes transformadas foram analisadas quanto à expressão do gene *gfp* em microscópio de fluorescência, confirmando-se por meio de PCR. Com o método de infiltração a vácuo obtiveram-se 41% de raízes transformadas, enquanto o método de corte na base não proporcionou nenhum evento transgênico.

Palavras-chave: *Elaeis guineenses*. Cultura de Tecidos Vegetais. Transgênia. *gfp*. Otimização de parâmetros.

ABSTRACT

Oil palm is a monocotyledon, oilseed that stands out for high production of oil by its fruits. Oil is widely used in the food, pharmaceutical, cosmetics and biofuels industry. However, oil palm expanding culture is difficult due its difficulty to adapt in different environmental conditions. Genetic transformation techniques can, through the genes insertion mainly those involved in drought stress tolerance, allow better adaptation of oil palm plant in other agricultural regions. Genetic transformation of monocotyledons using *Agrobacterium* has some limitations relative to infection and DNA transfer to plants. The aim of this study was to establish genetic transformation protocol for oil palm using *Agrobacterium rhizogenes* strain MSU440 containing the plasmid pEZR (H). For protocol optimization two infection methods were tested, base cut and vacuum infiltration, and then plants were co-cultivated in growth chamber under 16 hours photoperiod and temperature of 19°C for five days. After co-cultivation, plants were transferred to ER culture medium supplemented with 500 mg L⁻¹ tioxina (Tioxin®) to eliminate bacteria and were maintained in a growth chamber with 16 hours photoperiod of and temperature of 26 ± 2°C until rooting. Transformed roots were analyzed as GFP gene expression in fluorescence microscopy and confirmed by PCR. 41% of plantas were transformed by vacuum infiltration method and base cut method did not provide any transgenic event.

Keywords: *Elaeis guineensis*. Plants Tissue Culture. Transgenics. *Gfp* gene. Parameter optimization.

1 INTRODUÇÃO

O dendzeiro é cultivado, principalmente, nos estados do Amazonas, Pará e Bahia, onde a ocorrência de chuvas é bem distribuída, com índices pluviométricos entre 2.000 mm/ano e 2.500 mm/ano (Silva et. al., 2011).Atualmente, existe a preocupação com escassez das chuvas, devido às mudanças climáticas e aos prejuízos causados ao meio ambiente pelo homem, o que está trazendo dificuldades para a agricultura e, conseqüentemente, para o dendzeiro.As previsões para o cultivo do dendzeiro são alarmantes,pois sua produção é sensível ao clima mais seco (Sung, 2012).

O Brasil encontra-se na 15ª posição no que se refere à produção de óleo de dendê e, por ser um país com alto potencial para o cultivo de dendzeiro, pode subir de posição, principalmente por ter grande extensão territorial. Porém, a ampliação do cultivo do dendzeiro é limitada porque as plantas não se adaptam bem às diferentes condições climáticas existentes nos biomas brasileiros. Em diferentes condições climáticas, o dendzeiro pode ter uma redução no rendimento e, conseqüentemente, aumento no custo da produção (Krug, 2013).

Neste contexto, a aplicação do melhoramento genético, por meio da transformação genética, pode gerar características que favoreçam a adaptação das plantas de dendzeiro em diferentes climas, além da obtenção de plantas com maior produtividade em óleo, resistência a pragas e doenças, redução de porte, adaptação aos ambientes de expansão da cultura e também para o desenvolvimento de cultivares com características de óleo diversificadas para atender a diferentes finalidades (relação entre ácidos graxos saturados e insaturados, conteúdo de carotenoides e menor acidez) (Krug et al., 2013).

A transformação genética pode ocorrer por duas vias, a direta, por meio da biobalística e a indireta, via bactéria do gênero *Agrobacterium*. A transformação indireta utiliza a *Agrobacterium* para transferir o gene de

interesse para planta. A infecção por meio da *A. rhizogenes* é utilizada quando se objetiva a transformação de raízes, formando raízes em cabeleira (Brasileiro e Lacorte, 2000; Masli et al., 2009; Izawatiet al., 2012).

Alguns estudos relatam a limitação da *Agrobacterium* em infectar monocotiledôneas, afirmando que, quando exposta à infecção pela *Agrobacterium*, não formava galhas ou raízes, sendo, portanto, considerada hospedeira não natural (Torreset al., 1999). No entanto, este fato não descarta a possibilidade de *Agrobacterium* transferir o T-DNA para estas espécies. À medida que os processos foram aprimorados, já foi obtido sucesso na transformação de monocotiledôneas utilizando a *Agrobacteriumtumefaciens* em espécies de arroz (Ahmad et al., 2002), sorgo (Elkonin et al., 2012), trigo (Li et al., 2012) e dendezeiro (Izawati et al., 2012).

Existem vários fatores que podem aumentar a eficiência da transformação genética via *Agrobacterium*, sendo necessário otimizar parâmetros para cada espécie, visando aumentar a eficiência (Dutt e Grosser 2009). Dentre estes parâmetros podem-se citar a cepa bacteriana, o método de infecção da bactéria, o uso de compostos fenólicos, a idade do explante, as condições de cocultivo (tempo e temperatura) e a densidade óptica (OD) da bactéria, entre outros (Akramian et al., 2008; Ribas et al., 2011; Mariashibu et al. 2013).

Muitos autores citam o método de infiltração a vácuo para aumentar eficiência de transformação genética em diferentes espécies, como algodão (Wang et al., 2004), feijão (Liu et al., 2005), cafeeiro (Canche-Moo, 2006), bananeira (Subramanyam et al., 2011) e soja (Mariashibu et al., 2013).

O contato da *Agrobacterium* por meio de corte na base para algumas espécies obteve melhores resultados do que por infiltração a vácuo, como, por exemplo, em eucalipto (Mendonça et al., 2012) e em cafeeiro (Carvalho, 2013).

Apesar de não existirem, na literatura, trabalhos com *Agrobacterium rhizogenes* em dendezeiro, a sua utilização na transformação das plantas de

dendezeiro é de grande importância, a fim de testar e estudar genes de interesse a serem inseridos na planta.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de testar a eficiência de dois métodos de infecção para a transformação genética de plantas de dendezeiro híbrido Manicoré, utilizando o gene repórter *gfp* via *Agrobacterium rhizogenes*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Local de realização dos experimentos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório Central de Biologia Molecular, na Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG.

2.2 Material vegetal

Frutos imaturos de *Elaeis guineensis* Jacq. híbrido Manicoré, coletados de populações naturais com, aproximadamente, 100 dias após a polinização, foram cedidos pela empresa Denpasa, Pará .

2.3 Obtenção das plantas

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

As amêndoas foram lavadas em água corrente e levadas para câmara de fluxo laminar, onde foram imersas em álcool 70%, durante 30 segundos e, em seguida, transferidas para uma solução de hipoclorito de sódio (1,25%), adicionando-se três gotas de tween 20 a cada 100 mL de solução. Em seguida, foram lavadas, por três vezes, em água destilada autoclavada, sob agitação contínua.

Após a desinfestação, os embriões foram isolados das amêndoas, inoculados em meio de cultivo MS (Murashige e Skoog, 1962) suplementado com 45 g.L⁻¹ de sacarose. Anteriormente, durante o preparo do meio de cultura, o pH foi ajustado para 5,7±0,1, o meio solidificado com ágar 0,6% (p/v), autoclavado e vertido em placas de Petri, em câmara de fluxo laminar.

Após a inoculação, os embriões foram mantidos, por 30 dias, em fotoperíodo de 16 horas, à temperatura de 26±2 °C, para germinação. Após a obtenção das plântulas, estas foram transferidas para frascos magenta, contendo o meio de cultura ER (anexo) suplementado com 5 mg.L⁻¹ de AIB para o enraizamento das plântulas, onde permaneceram, por 90 dias, sob as mesmas condições citadas anteriormente.

2.4 Transformação genética

2.4.1 Plasmídeo

O processo de transformação das plântulas foi realizado utilizando-se o plasmídeo pEZR (H)-LN, que contém o gene repórter *gfp*, o gene higromicina fosfotransferase para selecionar as plantas transformadas e o gene da canamicina para a seleção das bactérias transformadas (Figura 1).

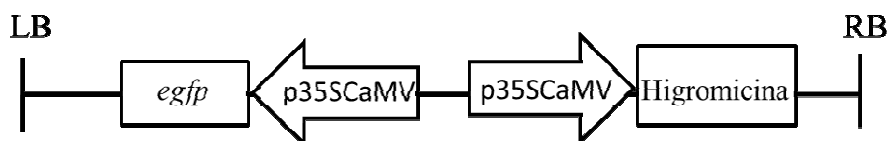


Figura 1 - Vetor pEZR (H)-LN contém o promotor p35SCaMV, o gene repórter *gfp* e o gene de seleção *hptII* para conferir resistência à higromicina.

2.4.2 Preparo de células competentes de *E. coli* e *Agrobacterium rhizogenes*

A cultura bacteriana para o preparo de células competentes de cepas de *E. coli* e MSU440 de *A. rhizogenes* foi iniciada utilizando-se uma colônia de cada estirpe. As bactérias foram inoculadas em 2 mL de meio de cultura LB sem NaCl, para evitar o rompimento da membrana plasmática, e mantidas, a 28°C, por 24 horas, a 200 rpm. Em seguida, foram transferidas para 1 litro de meio de cultura LB sem NaCl e incubadas nas mesmas condições de temperatura e agitação, até alcançar a OD 600 máxima de 0,8. Posteriormente, as células foram mantidas em gelo, por 30 minutos e, nas próximas etapas de centrifugação, as condições foram de 3.000 rpm, por 15 minutos, a 4°C. Posteriormente, a suspensão das células foi subdividida em 20 tubos falcon, contendo 50 mL de suspensão celular em cada uma. A suspensão de células foi centrifugada, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 50 mL de água ultrapura gelada. Na etapa seguinte, o pellet foi ressuspensado em 25 mL de água ultrapura gelada e centrifugado. Por duas vezes foi repetido esse processo. Após esta fase, o precipitado foi eluído em 20 mL de glicerol 10% gelado, centrifugado e ressuspensado em 3 mL de glicerol 10% gelado. As células eletrocompetentes foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer, a -80°C, em alíquotas de 100 µL.

2.4.3 Transformação da cepa de *Agrobacterium rhizogenes*

Para a introdução do plasmídeo na cepa MSU440 da *Agrobacterium rhizogenes* foi utilizado o método de eletroporação (Sambrook et al., 1989).

Para a seleção das cepas de *A. rhizogenes* transformadas com o plasmídeo pEZR (H)-LN, coletaram-se, com a alça de platina, as células da *A. rhizogenes* armazenadas em glicerol 10%. Em seguida, foram estriadas em meio de cultura LB sólido contendo 50 mg.L⁻¹ canamicina emantidas, à temperatura de 28°C, por 48 horas. Das colônias que cresceram neste meio de cultura foi retirada uma, que foi novamente inoculada em um meio de cultura

com a mesma constituição, porém, líquida, à temperatura de 28°C, durante 48 horas, a 200 rpm.

Após esse período, o DNA plasmidial das células bacterianas foi extraído conforme o item 2.4.5 e, posteriormente, a transformação foi confirmada via PCR e as células bacterianas foram estocadas em glicerol 60%, na proporção de 1:1 e armazenadas em freezer, a -80 °C.

2.4.5 Extração de DNA – Miniprep

A extração do DNA plasmidial foi realizada por lise alcalina. A cultura bacteriana foi incubada, por 16 horas, em meio de cultura LB líquido suplementado com antibiótico canamicina (50 mg.L⁻¹).

Após esse período, as células bacterianas foram transferidas para microtubos e submetidas à centrifugação por dois minutos, a 16.000 g, para sedimentação. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 200 µL de solução (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; EDTA 10 mM pH 8,0; RNase A 0,1 g.L⁻¹) e homogeneizado no vórtex. Depois, foram adicionados 200 µL de solução (SDS 1%, NaOH 200 mM) e homogeneizados, em seguida incubados à temperatura ambiente, durante cinco minutos, para que ocorra a lise celular.

Para a precipitação do DNA plasmidial foram adicionados 200 µL de solução (acetato de potássio 3M, pH 5,5, com ácido acético glacial); o volume foi homogeneizado e incubado em gelo, por 10 minutos. Após a incubação, os tubos foram submetidos à centrifugação, a 16.000 g, por 10 minutos, à temperatura ambiente. O sobrenadante contendo o DNA plasmidial foi transferido para um novo tubo, ao qual foram adicionados 450 µL de isopropanol. O volume dos tubos foi homogeneizado e centrifugado, a 16.000 g, por 10 minutos, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e adicionado 1 mL de etanol 75%, para lavagem do precipitado.

O precipitado foi novamente centrifugado a 16.000 g, por cinco minutos e o sobrenadante descartado. O precipitado foi submetido à centrifuga a vácuo (Eppendorf Concentrator 5301) para secagem, por cinco minutos e ressuspenso, em 40 µL de água ultrapura. A quantificação do DNA plasmidial foi realizada em espectrofotômetro (Nanodrop® Spectrophotometer ND-1000), a 260 nm e, ao final da extração, armazenado a -20 °C.

2.4.6 Confirmação das bactérias transformadas

A confirmação das bactérias transformadas foi realizada com o DNA plasmidial, extraído por meio da miniprep (item 2.4.5). O DNA plasmidial foi digerido utilizando-se enzimas de restrição e os fragmentos obtidos foram comparados com o plasmídeo de origem.

A PCR foi realizada utilizando-se 1 unidade de Taq DNA polimerase (Sigma®), 1 µL tampão 10 X, 0,5 µL dNTP mix (10 mMol.L⁻¹), 0,6 µL de cada *primer* '5AAGGGCGAGGAGCTGTTCAC3', '5TGTTGCCGTCCTCCTTGAAGTC3' e 1 µL do DNA plasmidial (0,5 µg).

A reação foi submetida ao termociclador *Eppendorf Mastercycler*, programado com temperatura de desnaturação inicial de 95 °C, por 5 minutos, seguidos de 30 ciclos de amplificação compostos de 3 etapas: 95 °C, por 30 segundos; 63 °C, por 30 segundos e 72 °C, por 2 minutos. Após os 30 ciclos, as amostras foram submetidas a uma etapa final de 3 minutos, a 72 °C.

Os produtos amplificados e digeridos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8% (m.v⁻¹) corados com 2 µL de brometo de etídio (0,5 µg.mL⁻¹), sob corrente elétrica de 110 V em tampão TAE (0,001 M EDTA pH 8,0; 0,04 M TRIS pH 8,0; 0,02 M ácido acético), por um período de, aproximadamente, 90 minutos. O gel foi visualizado sob luz ultravioleta e a imagem captada pelo fotodocumentador EDAS 290 (Kodak®).

2.4.7 Parâmetros analisados na transformação genética com *A. rhizogenes*

2.4.7.1 Teste dos métodos de infecção da *A. rhizogenes*

Para a otimização do processo de transformação das plântulas com o plasmídeo pEZR (H)-LN contendo o gene *gfp*, foram testados dois métodos de infecção (corte na base e infiltração a vácuo), utilizando a *A. rhizogenes* cepa MSU. Os experimentos foram realizados em três blocos com 70 plantas em cada e com 20 plantas como controle negativo para cada tratamento.

Para o método de infecção por corte na base, uma alíquota de 200 μL da cultura bacteriana foi plaqueada em meio de cultura LB, contendo 50 mg.L^{-1} de canamicina e incubada, durante 48 horas, a 28°C. As plantas foram infectadas por meio do corte com lâmina de bisturi contendo a bactéria *A. rhizogenes* com o plasmídeo pEZR (H)-LN. As plantas do grupo controle foram cortadas com lâmina livre de bactérias, cocultivadas em meio de cultivo ER suplementado com 100 μM de acetoseringona e mantidas em BOD com fotoperíodo de 16 horas, durante 5 dias, à temperatura de 19 °C (Stein, 2009).

O outro método de infecção avaliado foi por meio da infiltração a vácuo, utilizando pressão de 380 mmHg, durante quatro minutos.

Para a obtenção da cultura de células bacterianas, uma colônia foi inoculada em meio de cultura LB líquido contendo 50 mg.L^{-1} de canamicina e 100 μM de acetoseringona, mantidas sob agitação de 200 rpm, à temperatura de 28 °C, até atingir a OD de 0,7. Posteriormente, a cultura de células bacterianas foi centrifugada, a 5.000 g, por 10 minutos e o precipitado ressuspendido em meio de cultura ER líquido suplementado com 100 μM de acetoseringona, até atingir a OD de 0,7. As raízes das plantas foram cortadas e as plantas transferidas para erlemeyer de 10 mL contendo 500 μL da cultura bacteriana. Posteriormente, foram conduzidas à câmara de vácuo e submetidas a um vácuo de 380 mmHg, por quatro minutos (Canche-

Moo et al., 2006, Mendonça, 2012). Para o controle negativo, as plantas foram colocadas em meio de cultura sem a cultura de células bacterianas, nas mesmas condições citadas anteriormente. Depois, as plantas foram cocultivadas do mesmo modo que no método de corte na base.

Após o período de cocultivo, as plantas foram transferidas para meio de cultivo ER suplementado com 500 mg.L⁻¹ de tioxina (Tioxin®) para eliminar as bactérias e mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 26±2 °C, até o enraizamento.

2.4.8.1 Análise da expressão do gene *gfp*

Para as análises da expressão do gene *gfp*, as plantas que emitiram raízes foram visualizadas em microscópio de fluorescência AxioScope da Zeiss, a um espectro de 470±20 nm.

As raízes das plantas que apresentarem expressão do gene *gfp* foram coletadas para análise em PCR.

2.4.8.2 Identificação das plantas transformadas por PCR

A PCR foi realizada para identificação do gene *gfp*. A extração do DNA genômico foi realizada de acordo com o protocolo *Cationic Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide* (CTAB) (Doyle e Doyle, 1990), com modificações. Aproximadamente 200 mg de tecido vegetal foram macerados em nitrogênio líquido e transferidos para tubo Eppendorf de 2 mL contendo 1 mL de tampão de extração (2% p.v⁻¹ de PVP-40; 2M NaCl; 100 mM tris-HCl pH 8,0; 25 mM EDTA pH 8,0) pré-aquecido a 65 °C, centrifugando-se a 11.000 rpm, durante 10 minutos.

O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, adicionando-se o mesmo volume de clorofórmio: álcool isoamílico 24:1 (v.v⁻¹) e, em seguida homogeneizado e centrifugado, a 11.000 rpm, por 10 minutos. A fase aquosa foi transferida para um tubo novo e adicionados 4 µL de Rnase A, na

concentração estoque de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e incubada, a 37°C , por 30 minutos. Para a precipitação foram adicionados $240 \mu\text{L}$ de álcool isopropílico PA gelado e incubados, a -20°C , por, no mínimo, 1 hora e, no máximo, 4 horas. Após a precipitação, o material foi centrifugado durante 20 minutos (11.000 rpm). Posteriormente, o sobrenadante foi descartado, o precipitado foi lavado em $400 \mu\text{L}$ de etanol absoluto e ressuspendido em $30 \mu\text{L}$ de água Milli-Q autoclavada. As amostras foram armazenadas a -20°C . A integridade do DNA foi verificada em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. O DNA genômico foi quantificado em espectrofotômetro (Nanodrop® Spectrophotometer ND-1000), a 260 nm .

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dois métodos de infecção testados durante o processo de transformação de raízes de plantas de dendezeiro, híbrido Manicoré, induziram raízes. No entanto, não foi observado, em nenhum dos métodos avaliados, o fenótipo típico de raiz em cabeleira. Em algumas plantas formou-se mais de uma raiz, porém, apenas a maior raiz foi coletada para PCR.

A obtenção de raízes, após o processo de transformação genético, foi lenta, aproximadamente dois meses para iniciar o crescimento. A porcentagem de enraizamento das plantas que passaram pelo processo de transformação por corte na base foi de 10%, enquanto no processo de transformação por infiltração a vácuo obtiveram-se 27% de plantas enraizadas.

A baixa porcentagem de formação de raízes pode estar relacionada ao fato de a espécie em estudo ser uma lenhosa, a qual estudos indicaram ter dificuldades para enraizar (Ono E Rodrigues, 1996; Ford et al., 2001). E, também, ao fato de esta ser uma espécie monocotiledônea, que é relatada por não ser suscetível à infecção pela *Agrobacterium*.

Neste trabalho foi utilizada a *A. rhizogenes* MSU440. As cepas de *A. rhizogenes*, MSU440 e R100, são citadas por terem uma maior virulência e, como consequência, podem expressar, no fenótipo das plantas hospedeiras, numerosas raízes com aspecto de cabeleira (Chabaud et al., 2006). Porém, neste trabalho, apesar de ter sido utilizada a cepa MSU 440, não foi observada grande proliferação de raízes. Sugere-se que cada cepa tenha maior atração por determinadas espécies.

Para a transformação por corte na base, das 140 plantas inoculadas com a *A. rhizogenes*, 29% sobreviveram e, na transformação por infiltração a vácuo, das 140 plantas inoculadas com a *A. rhizogenes*, 46% sobreviveram. O reduzido

número de plantas sobreviventes deve-se à alta contaminação das plantas, após o processo de transformação genética.

Foi possível verificar a expressão do gene *gfp* por meio da emissão de fluorescência verde, visualizada por meio do microscópio de fluorescência nas plantas transformadas (Figura 1). Porém, as plantas controle também emitiram uma pequena fluorescência amarelada e, por isso, todas as plantas enraizadas foram submetidas à extração do DNA e PCR, para confirmação da transformação.

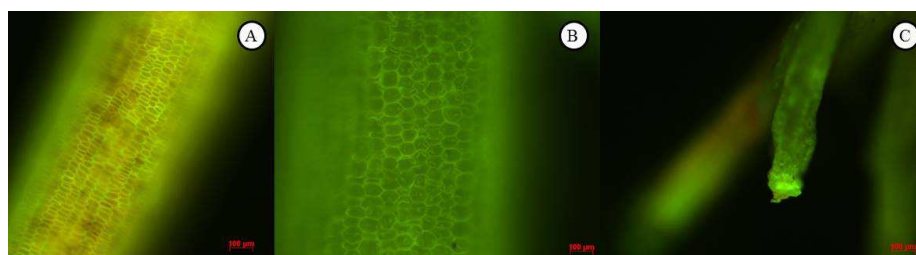


Figura 1 Raízes de dendezeiro híbrido Manicoré, visualizadas em microscópio de fluorescência Zeiss HBO 100, com filtro *egfp* (A) Controle (objetiva 40x) B) e C) Raízes transformadas com *Agrobacterium rhizogenes* contendo o plasmídeo pEZR (H)-LN, pelo método de infiltração a vácuo, 120 dias após a transformação. Objetiva 50x e 20x, respectivamente.

Existem sete variações do gene *gfp* conhecidas, em relação ao componente dos cromóforos e à posição dos aminoácidos, e cada uma dessas classes tem um conjunto distinto de excitação e comprimento de onda de emissão. Por isso, para cada variação existe um tipo específico de filtro para detectá-la (Tsien, 1998). Supõe-se que o filtro utilizado neste trabalho, *oegfp*, não tenha sido eficiente para a distinção entre as plantas transformadas e as não transformadas.

A expressão da proteína GFP também foi observada em outros trabalhos de transformação. Em calos embriogênicos obtidos de embriões zigóticos de plantas de álamo, transformados com o gene *gfp*, observaram-se pontos fluorescentes fortes, confirmando a transgenia destas pela PCR. Os

autoresacompanharam a expressão do gene durante o desenvolvimento dos calos, após dois dias do processo de transformação, até a regeneração e o crescimento das plantas (Li e Qu, 2010).

A possibilidade de facilitar o processo de triagem de plantas transgênicas com o uso de proteínas fluorescentes, como o GFP, é de grande valia, partindo do princípio de essa ser uma técnica fácil, rápida e de menor custo em relação à PCR. Essa técnica foi aplicada com sucesso em plantas transgênicas de tabaco, nas quais se visualizou a expressão da proteína GFP e, posteriormente, confirmação por PCR das plantas transformadas (Oven e Luthar, 2013).

Para transformação por corte na base, das plantas que emitiram raízes, em nenhuma foi identificada a inserção do gene *gfp* por meio de PCR. Na transformação por infiltração a vácuo, em 41% das plantas enraizadas foi confirmada a transgenia por meio da PCR.

No método de infecção por corte na base com a *A. rhizogenes* contendo o plasmídeo pEZR (H)-LN, indentificou-se, por meio da PCR, que, das quatro raízes analisadas, nenhuma das plantas apresentava raiz transformada (Figura 2).

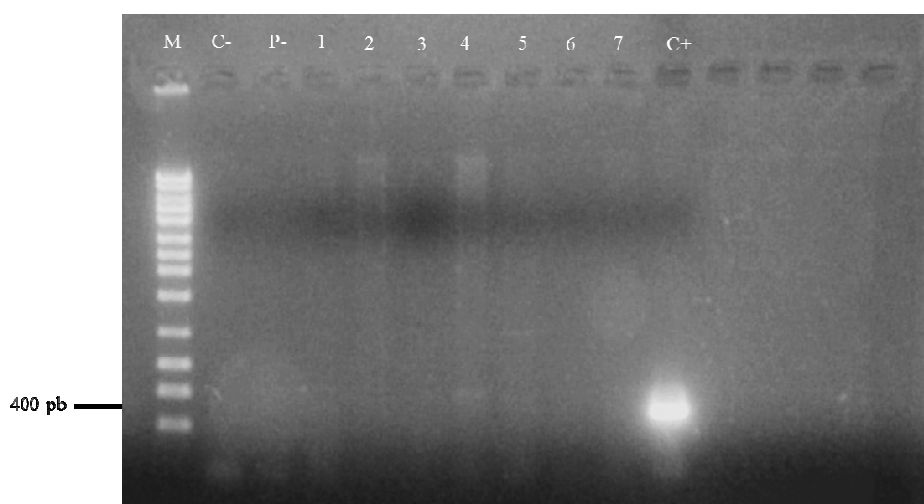


Figura 2 Análise da PCR do DNA isolado de raízes de dendezeiro híbrido Manicoré transformado com pEZR (H)-LN, pelo método de infecção de corte na base e infiltração a vácuo. C- (controle negativo da reação). P- (raiz de plantas controle negativo). C+ (controle positivo - plasmídeo pEZR (H)-LN). Colunas 1,2 e3 correspondem ao tratamento corte e colunas 4, 5, 6 e 7 correspondem ao tratamento infiltração a vácuo, indicando raízes não transformadas. Marcador 100 pb.

A partir da PCR foi possível observar a amplificação de um fragmento de 400 pb (Figura 3, colunas 6), correspondente ao gene *gfp* para o tratamento de infiltração a vácuo com *A. rhizogenes* contendo o plasmídeo pEZR (H)-LN.

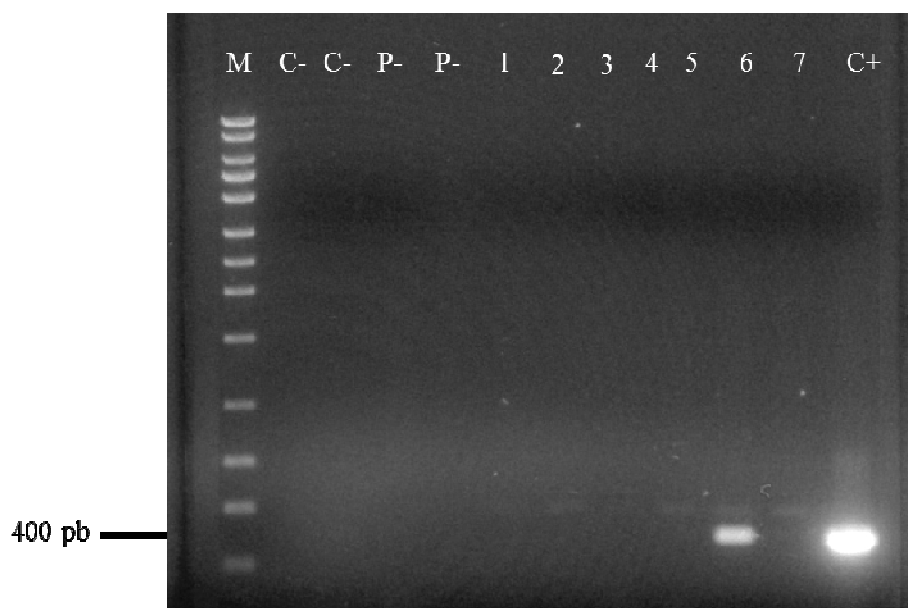


Figura 3 Análise da PCR do DNA isolado de raízes de dendezeiro híbrido Manicoré transformado com pEZR (H)-LN, pelo método de infecção corte na base e infiltração a vácuo. C- (controle negativo da reação). P- (raiz de plantas controle negativo). C+ (controle positivo - plasmídeo pEZR (H)-LN). Fragmentos amplificados do gene *gfp* (colunas 6) indicando raízes positivamente transformadas com fragmento de 400 pb. Colunas 1, 2, 3, 4, 5 e 7 indicando raízes não transformadas. Coluna 1, planta que passou pelo tratamento de corte na base e colunas 2, 3, 4, 5, 6 e 7 correspondem ao DNA das plantas que passaram pelo método de infiltração a vácuo. Marcador 100 pb.

Por meio da PCR foi possível observar a amplificação de um fragmento de 400 pb (Figura 4, colunas 2,3,4,5,7 e 9) correspondente ao gene *gfp* para o tratamento de infiltração a vácuo com *A. rhizogenes* contendo o plasmídeo pEZR (H)-LN.

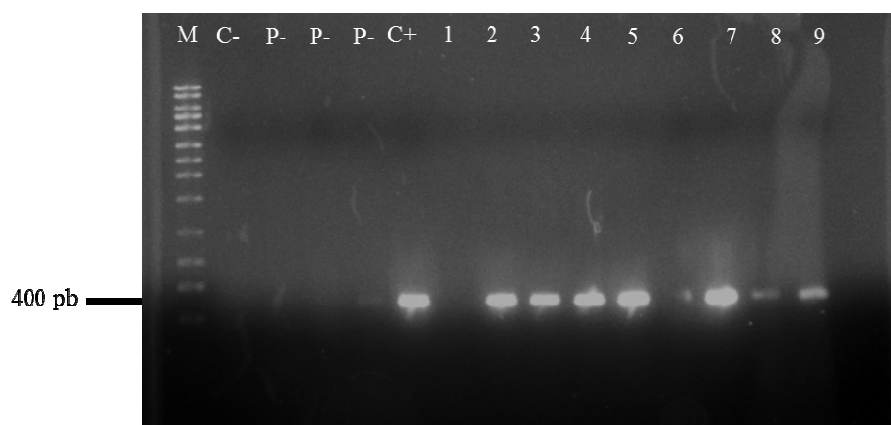


Figura 4 Análise da PCR do DNA isolado de raízes de dendezeiro híbrido Manicoré transformado com pEZR (H)-LN, pelo método de infiltração a vácuo. C- (controle negativo da reação). P- (raiz de plantas controle negativo). C+ (controle positivo - plasmídeo pEZR (H)-LN). Fragmentos amplificados do gene *gfp* (colunas 2, 3, 4, 5, 7, 8 e 9) indicando raízes positivamente transformadas com fragmento de 400 pb. Coluna 9 foi utilizada a planta confirmada na Figura 4 coluna 5. Colunas 1 e 6 indicando raízes não transformadas. Todos os DNAs utilizados nesse gel de plantas que passaram pelo processo de transformação genética foram aplicados pelo método de infiltração a vácuo. Marcador 100 pb.

Em plantas de eucalipto também foram avaliados ambos os métodos, corte na base e infiltração a vácuo, obtendo-se, com o método corte na base, maior porcentagem de plantas transformadas (50%) e infiltração a vácuo (44%). Porém, observou-se maior mortalidade das plantas pelo método corte na base (Mendonça, 2012), também encontrado no presente trabalho.

O vácuo gera uma pressão negativa que causa espaços entre as células dos tecidos das plantas, permitindo a introdução das células da agrobactérias nos espaços intercelulares. Esse processo pode favorecer a eficiência da

transformação por expor a *Agrobacterium* a células de plantas mais susceptíveis à transformação do que as células presentes na epiderme do explante (Subramanyam et al., 2011; Riviera et al., 2012).

Neste trabalho, o método de infiltração a vácuo foi realizado, durante quatro minutos, a 380 mm. Em soja, a eficiência da transformação foi aumentada utilizando-se a infiltração a vácuo por dois minutos, a 750 mm de Hg, obtendo-se 9,45% de plantas transformadas (Mariashibu et al., 2013). O método a vácuo também favoreceu a transformação de embriões de cafeeiro (Canche-Moo et al., 2006). Em plantas de feijão-caupi, a infiltração a vácuo associada ao ultrassom resultou em 93% de eventos transgênicos (Bakshiet al., 2011).

Maior eficiência de transformação com a *Agrobacterium rhizogenes* foi descrita para espécies dicotiledôneas, como, por exemplo, eucalipto (70%) (Balieiro, 2013), cafeeiro (70%) (Alpizar et al. 2006) e feijoeiro (93%) (Bakshi et al. 2011), devido ao fato de *Agrobacterium* ter uma maior atração por estas espécies e, conseqüentemente, maior poder de infecção nessas plantas.

A eficiência de transformação relatada para o dendezeiro, utilizando embriões de *Elaeis oleifera* transformados por meio da biobalística, foi de 9%, confirmada por PCR (Bhore e Shah, 2012). Diferentes fontes de explantes de dendezeiro influenciaram a porcentagem de transformação via *Agrobacterium tumefaciens*, verificando-se que os calos apresentaram uma maior taxa de eventos transgênicos (78%-100%) em relação às folhas (10%-32%), pela expressão do gene GUS (Ismail et al., 2010).

Na literatura não foram encontrados relatos de trabalhos de transformação genética com a *A. rhizogenes* em dendezeiro.

Neste trabalho foram introduzidos, no meio de cultivo, 100 µM de acetoseringona. O uso da acetoseringona no meio de cultivo foi favorável na

transformação de plantas de tabaco utilizando *A. rhizogenes*, proporcionando um aumento de quatro vezes na eficiência de transformação (Kumar et al., 2006).

Na transformação de células em suspensão de dendezeiro com *Agrobacterium tumefaciens*, foi relatado que a presença de acetoseringona no meio de cultura aumentou a porcentagem de eventos transformantes, obtendo-se 0,7% de eficiência (Masli et al., 2009). Em calos embriogênicos de dendezeiro, a aplicação de acetoseringona no meio de cultura aumentou a virulência da *Agrobacterium* (Izawati et al., 2012).

Neste trabalho, a introdução da acetoseringona no meio de cultivo, associada ao método de corte na base, não apresentou eventos transgênicos, enquanto o tratamento de infiltração a vácuo, associado à introdução de acetoseringona no meio de cultivo, proporcionou a obtenção de plantas transgênicas.

Fazem-se necessários testes com variações na pressão de vácuo, a fim de verificar qual a melhor pressão para uma maior eficiência do processo de transformação genética.

CONCLUSÃO

O método de infiltração foi eficiente na transformação das raízes de plantas de dendezeiro (41%).

O método de corte na base não proporcionou raízes transformadas em plantas de dendezeiro híbrido Manicoré.

REFERÊNCIAS

Ahmad A, Maqbool, SB, Riazuddin S, Sticklen, MB (2002) Expression of synthetic cryIab and cryIac genes in basmat rice (*Oryza sativa* L.) variety 370 via *Agrobacterium*-mediated transformation for the control of the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*). In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant 38:213-220

Akramian M, Tabatabaei SMF, Mirmasouni M (2008) Virulence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on genetic transformation of four *Hyoscyamus species*. American-Eurasien Journal Agricultural & Environmental Science 3:301-309

Alpizar EE, Dechamp S, Espeout M, Royer M, Lecouls AC, Nicole M, Bertrand B, Lashermes P, Etienne H (2006) Efficient production of *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots and composite plants for studying gene expression in coffee roots. Plant Cell Rep 25: 959-967

Assis TF, Teixeira SL (1998) Enraizamento de plantas lenhosas. In: Torres AC, Caldas LS, Buso JA (eds). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq 1:261-296.

Bakshi S, Saha B, Roy NK, Mishra I S, Panda SK, Hoo SA (2012) Successful recovery of transgenic cowpea (*Vigna unguiculata*) using the 6-phosphomannose isomerase gene as the selectable marker. Plant Cell Reports 31:1093-1103

Balieiro, F. P. **Transformação genética de híbridos de urograndis**. 2013. 86 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

Bhore SJ, Shah FH (2012) Genetic transformation of the American oil palm (*Elaeis oleifera*) immature zygotic embryos with antisense palmitoyl-Acyl Carrier protein thioesterase (PATE) gene. World Applied Sciences Journal 16:362-369

Brasileiro ACM, Lacorte C (2000) *Agrobacterium*: um sistema natural de transferencia de genes para plantas. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento* 3:12-15

Canche-Moo RLR, Ku-Gonzalez A, Burgeff C, Loyola-Vargas VM, Rodríguez-Zapata LC, Castaño E (2006) Genetic transformation of *Coffea canephora* by vacuum infiltration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 84:373-377

Carvalho M de H (2013) Estratégias para obtenção de avaliação de plantas de *Coffea arabica* tolerante ao alumínio. Dissertação (Biotecnologia Vegetal. 2013. 102p.

Chaubaud M, Boisson-Dernier A, Zhang J, Taylor CG, Yu O, Barker DG (2006) *Agrobacterium rhizogenes*-mediated root transformation. *Medicago truncatula* handbook 8p

Doyle J, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15

Dutt M, Grosser JW (2009) Evaluation of parameters affecting *Agrobacterium*-mediated transformation of *Citrus*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 98:331-340

Elkonin LA, Nosova ON, Italienskaya JV (2012) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of sorghum using tissue culture-based and pollenmediated approaches. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry* 8:144-159

Ford YY, Bonham EC, Cameron RWF, Blake PS, Judd HL, Harrison-Murray RS (2001) Adventitious rooting: examining the role of auxin in easy and a difficult-to root plant. *Plant Growth Regulation* 10:1-11

Ismail I, Iskandar NF, Chee GM, Abdullah R (2010) Genetic transformation and molecular analysis of polyhydroxybutyrate biosynthetic gene expression in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq. var Tenera) tissues. *Plant Omics Journal* 3:18-27

Izawati AM, Parveez GK, Masani MY (2012) Transformation of oil palm using *Agrobacterium tumefaciens*. *Methods Molecular Biology* 847:177-188

Krug C, Bittencourt DM de C, Barcelos E, Rodrigues M de RL, Angelo PC da S, Rocha RNC da, Cunha RNV da, Quisen RC, Lopes R, Rios S de A, Lima WAA de. (2013) Plano Estratégico da Embrapa Amazônia Ocidental para a Cultura do Dendezeiro. Embrapa Documentos 102. 76 p.

Kumar V, Sharma A, Prasad BCN, Gurujah HB, Ravishanka GA (2006) *Agrobacterium rhizogenes* mediated genetic transformation resulting in hairy root formation is enhanced by ultrasonication and acetosyringone treatment. *Electronic Journal of Biotechnology* 9

Li J, Ye X, An B, Du L, Xu H (2012) Genetic transformation of wheat: current status and future prospects. *Plant Biotechnol Report* 6:183-193

Li R, Qu R (2010) High throughput *Agrobacterium*-mediated switchgrass transformation. *Biomass and Bioenergy* 1-9

Liu Z, Park BJ, Kanno A, Kameya T (2005) The novel use of a combination of sonication and vacuum infiltration in *Agrobacterium*-mediated transformation of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with lea gene. *Mol Breed* 16:189-197

Mariashibu TS, Subramanyam K, Arun M, Mayavan S, Rajesh M, Theboral J, Manickavasagam M, Ganapathi A (2013) Vacuum infiltration enhances the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in Indian soybean cultivars. *Acta Physiol Plant* 35:41-54

Masli DIA, Kadir APG, Yunus AMM (2009) Transformation of oil palm using *Agrobacterium tumefaciens*. Journal of Oil Palm Research 21:643-652

Mendonça EG (2012) Transformação genética e rejuvenescimento *in vitro* de híbridos naturais de *Eucalyptus urophylla*. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 71 p.

Murashige T, Skoog FA (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15:473-497

Ono EO, Rodrigues JD (1996) Aspectos da fisiologia do enraizamento de estacas caulinares. Jaboticabal: FUNEP, 83 p.

Oven K, Luthar Z (2013) Expression and molecular analysis of DsRed and GFP fluorescent genes in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) Acta agriculturae Slovenica 101:5 – 14

Ribas AF, Dechamp E, Champion A, Bertrand B, Combes M-C, Verdeil J-L, Lapeyre F, Lashermes P, Etienne H (2011) Agrobacterium-mediated genetic transformation of *Coffea arabica* (L.) is greatly enhanced by using established embryogenic callus cultures. BMC Plant Biology 11:92

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular Cloning: a laboratory manual. 2. Ed. N. Y., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Silva FL da, Homma AKO, Pena HWA (2011) O cultivo do dendezeiro na Amazônia: promessa de um novo ciclo econômico na região", en Observatorio de la Economía Latinoamericana, Número 158, 2011.
<http://www.eumed.net/cursecon/ecolat/br/>

Stein VC (2009) Biotechnological approaches to improve drought tolerance of *Coffea arabica* Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) Universidade Federal Federal, Lavras, MG 89 p.

Subramanyam K, Subramanyam K, Sailaja KV, Srinivasulu M, Lakshmidivi K (2011) Highly efficient *Agrobacterium* – mediated transformation of banana cv. Rasthali (AAB) via sonication and vacuum infiltration. *Plant Cell Reports* 30:425-436

Sung, C. T. B (2012) Effect of climate change on oil palm yield in Malaysia: Some simulations.

Torres A. C. et al. (1999) *Cultivade tecidos e transformação genética de plantas*. 864 p. 1999.

Tsien RY (1998) The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem*67:509-544

Wang S, Wang J-W, Yu N, Li C-H, Luo B, Gou J-Y, Wang L-J, Chen X-Y (2004) Control of plant trichome development by a cotton fiber MYB gene. *The Plant Cell* 16:2323–2334