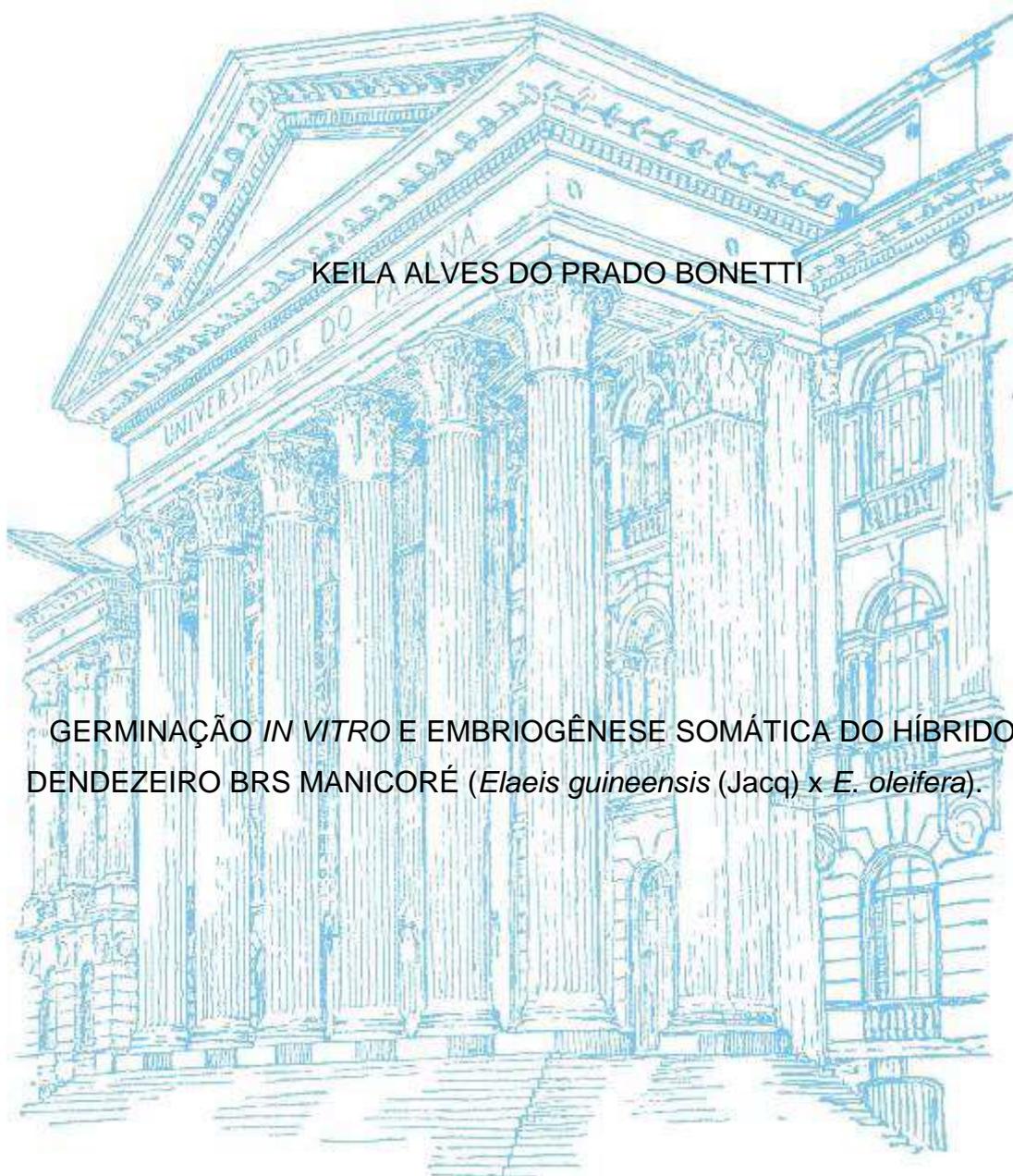


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ



KEILA ALVES DO PRADO BONETTI

GERMINAÇÃO *IN VITRO* E EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DO HÍBRIDO DE DENZEIRO BRS MANICORÉ (*Elaeis guineensis* (Jacq) x *E. oleifera*).

CURITIBA

2015

KEILA ALVES DO PRADO BONETTI

GERMINAÇÃO *IN VITRO* E EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DO HÍBRIDO DE  
DENDEZEIRO BRS MANICORÉ (*Elaeis guineensis* (Jacq) x *E. oleifera*).

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de mestre em Botânica, no curso de Pós-Graduação em Botânica. Área de Concentração em Estrutura e Fisiologia do Desenvolvimento Vegetal, Departamento de Botânica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profª Drª. Marguerite Quoirin,  
Co-orientador: Henrique Soares Koehler.

CURITIBA

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em  
Botânica



**“Germinação in vitro e embriogênese somática do híbrido de  
dendezeiro BRS Manicoré (Elaeis guineensis (Jacq) x E.  
oleifera)”**

por

Keila Alves do Prado Bonetti

Dissertação aprovada como requisito parcial  
para obtenção do grau de Mestre no Programa  
de Pós-Graduação em Botânica, pela Comissão  
formada pelos doutores

Dra. Marguerite G. Ghislaine Quoirin (UFPR) - PRESIDENTE

Dra. Neusa Steiner (UFSC)

Dra. Luciana Fortes Ribas (UFPR)

Curitiba, 13 de Março de 2015.

Àquele que é capaz de fazer  
infinitamente mais do que tudo  
o que pedimos ou pensamos.

Efésios 3:20

DEDICO

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por direcionar minha vida. Aos meus pais Ademir e Lúcia, por apoiarem minhas escolhas. Ao meu marido Eliseu pelo apoio e auxílio nos textos em inglês. Aos meus irmãos Samuel, Josué, Emanuely e especialmente à minha irmã Sheila pelas conversas de incentivo.

À professora Marguerite Quoirin, por aceitar me orientar, ainda que não tivesse experiência nenhuma com micropropagação.

À CAPES pelo apoio financeiro. À Embrapa-Amazônia Ocidental pelo fornecimento de sementes, especialmente aos pesquisadores, Regina Quisen, Pamela Harada, Suellen Lima e Wanderlei de Lima pelo auxílio nos testes de viabilidade das sementes.

Agradeço aos colegas do Laboratório de Micropropagação, que de uma maneira ou de outra me auxiliaram durante esses dois anos: Juliane Nesi, Lucas Gomes, Rodrigo Cordeiro, Sirlene Maria Vudala, Sheila Susy.

Agradeço a todos meus colegas da turma de 2013, pelo apoio, conversas e pela companhia.

Aos meus tios Orlando e Nedi, por carinhosamente me hospedarem em sua casa quando eu precisei.

Aos meus primos e amigos, Alex, Calita, Rosana, Silvana, Simone, Luciana B, Thayana, Chaiane, Michele e Luciana G.

A todos vocês, meu muito obrigado!

## RESUMO

A propagação natural do híbrido BRS Manicoré (*E. guineensis* x *E. oleífera*), é limitada, porque as sementes apresentam um endocarpo duro, demoram até um ano para germinar e tem baixas taxas de germinação (30%). Os objetivos desta pesquisa foram otimizar a germinação *in vitro* de embriões zigóticos (EZ) e obter embriões somáticos a partir de EZ e pela técnica de “*thin cell layer*” (TCL). Para a germinação, EZ foram inoculados nos meios de cultura MS (sais e vitaminas) com e sem  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  e MS ½, N6 e Y3 (sais e vitaminas), este último adicionado ou não de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ . No meio MS contendo  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , a taxa de germinação foi aumentada de 40 a 68% em comparação com o meio sem fosfato. Na comparação entre os meios de cultura MS, MS ½, N6 e Y3, foram observados que 75% dos EZ cultivados no meio Y3 formaram plantas (raiz e parte aérea), diferindo estatisticamente dos outros meios de cultura (46; 35 e 17%). Para a embriogênese somática, foram utilizados EZ e TCLs da parte aérea de plântulas cultivadas *in vitro*. EZ foram cultivados em meios Y3 e MS suplementados com picloram ou 2,4-D (500  $\mu\text{M}$ ) e, em outro experimento em meio Y3 adicionado ou não de 2,4-D (250, 500, 750  $\mu\text{M}$ ) no escuro. Os calos formados foram transferidos para meio de multiplicação, contendo sais e vitaminas do meio Y3 100  $\mu\text{M}$  de 2,4-D ou picloram, e 7,9  $\mu\text{M}$  de BAP ou 2iP. Para a formação de calos embriogênicos e embriões somáticos (ES), os calos foram transferidos para meio Y3 suplementado ou não de 2,4-D (9 ou 27  $\mu\text{M}$ ), 1000  $\mu\text{M}$  de putrescina e 0,5 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado (CA). ES foram obtidos no meio Y3 acrescido ou não de 2,4-D (9  $\mu\text{M}$ ) + 1000  $\mu\text{M}$  de putrescina (em 37,16 e 43,3% dos calos, respectivamente) e 40% foram convertidos em plântulas no meio Y3 sem reguladores contendo 3% de sacarose, 2 g.L<sup>-1</sup> de CA e 6 g.L<sup>-1</sup> de ágar em condições de luz. Os TCLs basais da parte aérea foram cultivados primeiro no meio Y3 suplementado de 2,4-D (500 ou 800  $\mu\text{M}$ ) e, em um segundo experimento, no meio Y3 com ou sem 2,4-D (250, 500, 800 ou 1000  $\mu\text{M}$ ), no escuro. Nos dois experimentos, os meios foram adicionados de 2 g.L<sup>-1</sup> de CA, 3% de sacarose e 2,5 g.L<sup>-1</sup> de Gelzan. Para a formação de calos embriogênicos e ES, os calos foram cultivados no meio com 2,4-D (50 ou 100  $\mu\text{M}$ ) ou sem acrescido de 100  $\mu\text{M}$  de putrescina e 0,5 g.L<sup>-1</sup> de CA. ES foram obtidos nestes meios, em 49 a 53% dos calos e 50% foram convertidos em plântulas no meio Y3 sem reguladores, com 2 g.L<sup>-1</sup> de CA em condições de luz. Conclui-se que EZ germinam melhor no meio de cultura Y3, desenvolvendo plantas com raiz e parte aérea. Para a embriogênese somática a partir de EZ, o 2,4-D é eficiente para a formação de calos, já para a formação de ES não é necessária à adição do mesmo, quando o meio é acrescido de putrescina. A técnica do TCL basal é eficiente para a formação de calos e obtenção de ES no meio de cultura Y3.

Palavras-chave: híbrido interespecífico, fosfato de sódio, putrescina, *thin cell layer*.

## ABSTRACT

The natural propagation of the interspecific hybrid of oil palm BRS Manicoré (*E. guineensis* x *E. oleifera*) is limited because the seeds have a hard core, take up to one year to germinate and have low germination rates (30%). The objectives of this study were to optimize the *in vitro* germination of zygotic embryos (EZ) and obtain somatic embryos from EZ and by the technique of *Thin Cell Layer* (TCL). For germination, EZ were inoculated in MS medium (salts and vitamins) with and without NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MS ½, N6 and Y3 (salts and vitamins) with or without added phosphate. In MS medium containing NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, germination rate was increased from 40 to 68% in comparison with the medium without phosphate. Comparing the MS, MS ½, N6 and Y3 culture media, it was observed that 75% of zygotic embryos cultured in Y3 medium formed whole plants (roots and shoots), differing from the MS culture media, MS ½ and N6 (46, 35, and 17%). For somatic embryogenesis EZ and TCLs of shoots of *in vitro* plantlets were used. EZ were cultured in the dark on MS medium supplemented with Y3 and picloram or 2,4-D (500 µM) and Y3 medium supplemented with 2,4-D (250, 500, 750 µM) or without. The calluses were transferred to Y3 multiplication medium with 100 µM auxin plus 7.9 µM BAP or 2iP. In order to obtain embryogenic calluses and somatic embryos (ES), the calluses were transferred to Y3 medium supplemented or not with 9 or 27 µM 2,4-D, 1000 µM putrescine and 0.5 g.L<sup>-1</sup> activated charcoal (AC). ES were obtained in Y3 medium with or without 2,4-D (9 µM) + 1000µM putrescine (in 37.16 and 43.3% of these calluses, respectively) and 40% were converted into plantlets in the Y3 culture medium without regulators, containing 3% sucrose, 2g.L<sup>-1</sup> AC and 6 g.L<sup>-1</sup> agar in the presence of light. TCLs of the shoot base were cultured in the dark, first in Y3 medium supplemented with 2,4-D (500 or 800 µM) and, in another experiment, in Y3 medium with or without 2,4-D (250, 500, 800 or 1000 µM). In both experiments, the media were supplemented with 2 g.L<sup>-1</sup> AC, 3% sucrose, 2,5 g.L<sup>-1</sup> Gelzan. For the formation of embryogenic calluses and ES, the calluses were transferred to the same medium with or without 2,4-D (50 or 100 µM) plus 100 µM of putrescine and 0.5 g.L<sup>-1</sup> AC. ES were obtained in these media in 49-53% of the calluses, and 50% were converted into seedlings in Y3 medium without regulators, supplemented with 2 g.L<sup>-1</sup> AC in the presence of light. It is concluded that the germination of EZ is better (with development of shoot and primary root) on Y3 medium. For somatic embryogenesis from EZ, the 2,4-D is effective for inducing the formation of callus, but it is not necessary for the formation of somatic embryos when the medium contains putrescine. The TCL technique is effective for callus formation and formation of somatic embryos in Y3 medium.

Keywords: interspecific hybrid, sodium phosphate, *thin cell layer*, putrescine.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AF – amarelecimento fatal

BAP – 6-benzilaminopurina

CA – carvão ativado

DMS – Diferença mínima significativa

ES – Embriogenêse somática

EZ - Embriões zigóticos

MS - Meio de cultura de Murashige e Skoog (1962)

NaOCl – hipoclorito de sódio

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – Fosfato diácido de sódio

N6 – Meio de cultura N6 (Chu *et al.* 1978)

SH – Meio de cultura SH (Schenk e Hildebrandt, 1972)

TCL – “Thin Cell Layer” ou camada fina de células

TCC - trifenil cloreto de tetrazólio

Y3 - Meio de cultura Y3 (Eeuwens, 1976)

2,4-D – ácido diclorofenoxiacético

2 iP - isopentenil adenina

mM - milimol

μM – micromolar

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

TABELA 1 – CLASSIFICAÇÃO DOS EMBRIÕES DE DENDEZEIRO PELO TESTE DE VIABILIDADE DE TETRAZÓLIO DE ACORDO COM CLASSES DE COLORAÇÃO MÉDIA DE CADA LOTE E MÉDIA GERAL DE TODOS OS LOTES.....	46
TABELA 2 - RELAÇÃO ENTRE O VIGOR, VIABILIDADE E GERMINAÇÃO DOS EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE DENDEZEIRO DE DOIS LOTES DE SEMENTES.....	46
TABELA 3 – RELAÇÃO ENTRE O VIGOR E VIABILIDADE DOS EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE DENDEZEIRO E GERMINAÇÃO A PARTIR DE QUATRO LOTES DE SEMENTES.....	47
TABELA 4 – GERMINAÇÃO E COMPORTAMENTO DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE DENDEZEIRO (BRS MANICORÉ) (MÉDIA DOS LOTES CS 428 e CS 1139) CULTIVADOS <i>IN VITRO</i> EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA E AVALIADOS AOS 15 E 30 DIAS.....	48
TABELA 5 - COMPRIMENTO DA PARTE AÉREA DE PLÂNTULAS DESENVOLVIDAS A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE DENDEZEIRO (BRS MANICORÉ) CULTIVADOS <i>IN VITRO</i> EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA E OBSERVADAS AOS 45 DIAS.....	50
TABELA 6 – EFEITO DA ADIÇÃO DE FOSFATO DE SÓDIO AO MEIO DE CULTURA MS NO COMPORTAMENTO DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE DENDEZEIRO BRS MANICORÉ (MÉDIA DOS LOTES CS 428, CS 1139).....	50
TABELA 7 - EFEITO DA ADIÇÃO DE FOSFATO DE SÓDIO AO MEIO DE CULTURA Y3 NO COMPORTAMENTO DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE DENDEZEIRO BRS MANICORÉ (MÉDIA DOS LOTES CS 735, CS 1477, CS 1681 e CS 1951).....	51

### CAPÍTULO 2

TABELA 1 – FORMAÇÃO DE CALOS A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE DENDEZEIRO HÍBRIDO BRS MANICORÉ APÓS 30 DIAS EM DOIS MEIOS DE CULTURA ADICIONADOS DE 500 $\mu$ M DE AUXINA. CONSISTÊNCIA DOS CALOS APÓS 90 DIAS. MÉDIAS DOS LOTES CS 428, CS 736, CS 1477 e CS 1681.....	66
TABELA 2 – FORMAÇÃO DE CALOS A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE DENDEZEIRO HÍBRIDO BRS MANICORÉ NO MEIO DE CULTURA Y3 ADICIONADO DE TRÊS CONCENTRAÇÕES DE 2,4-D APÓS 30 DIAS (MÉDIA DOS LOTES CS 47 e CS 1951).....	67
TABELA 3 –MULTIPLICAÇÃO DE CALOS FORMADOS A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE DENDEZEIRO HÍBRIDO BRS MANICORÉ EM MEIO DE CULTURA Y3 ADICIONADO DE 100 $\mu$ M DE AUXINA E 7,9 $\mu$ M DE CITOCININA APÓS 60 DIAS.....	68
TABELA 4 – FORMAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE DENDEZEIRO HÍBRIDO BRS MANICORÉ EM MEIO DE CULTURA Y3 ADICIONADO DE 2,4-D E DE 1000 $\mu$ M DE PUTRESCINA APÓS 60 DIAS.....	69
TABELA 5 – DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS NO MEIO DE CULTURA Y3 SEM REGULADORES NA PRESENÇA DE LUZ, OBTIDOS A	

PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE DENDEZEIRO HÍBRIDO BRS MANICORÉ OBSERVADOS DE UMA A TRÊS SEMANAS.....	70
TABELA 6 – FORMAÇÃO DE CALOS A PARTIR DE TCLs BASAIS DA PARTE AÉREA DE PLANTAS DE DENDEZEIRO HÍBRIDO BRS MANICORÉ CULTIVADOS NO MEIO DE CULTURA Y3 ADICIONADO DE DUAS CONCENTRAÇÕES DE AUXINA APÓS 60 DIAS.....	72
TABELA 7 – FORMAÇÃO DE CALOS A PARTIR DE TCLs BASAIS DA PARTE AÉREA DE DENDEZEIRO HÍBRIDO BRS MANICORÉ MEIO Y3 ADICIONADO DE 2,4-D.....	73
TABELA 8 – FORMAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS A PARTIR DE TCLs BASAIS DA PARTE AÉREA DE DENDEZEIRO HÍBRIDO BRS MANICORÉ CULTIVADOS POR QUATRO MESES NO MEIO Y3 COM 100 µM DE PUTRESCINA.....	74
TABELA 9 – EMBRIÕES SOMÁTICOS EM DESENVOLVIMENTO NO MEIO DE CULTURA Y3 SEM REGULADORES EM CONDIÇÕES DE LUZ A PARTIR DE TCLs DE DENDEZEIRO HÍBRIDO BRS MANICORÉ.....	75
TABELA 10 – FORMAÇÃO DE CALOS A PARTIR DE TCLs CENTRAIS DA PARTE AÉREA DE DENDEZEIRO HÍBRIDO BRS MANICORÉ CULTIVADOS NO MEIO SH ADICIONADOS DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PICLORAM APÓS 60 DIAS.....	76
TABELA 11 – FORMAÇÃO DE CALOS A PARTIR TCLs CENTRAIS DA PARTE AÉREA DE DENDEZEIRO HÍBRIDO BRS MANICORÉ CULTIVADOS NOS MEIOS Y3 E SH ADICIONADOS DE 500 µM de 2,4-D APÓS 60 DIAS.....	76

## LISTAS DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

FIGURA 1 – SEMENTES E EMBRIÕES DO HÍBRIDO BRS MANICORÉ.....	42
FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO DAS CLASSES DE COLORAÇÃO.....	45
FIGURA 3 – GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DO HÍBRIDO BRS MANICORÉ NO MEIO DE CULTURA Y3 E MS.....	49

### CAPÍTULO 2

FIGURA 1 – POSIÇÃO DOS CORTES NA PARTE AÉREA DE PLÂNTULAS DO HÍBRIDO BRS MANICORÉ.....	64
FIGURA 2 - ETAPAS DA EMBRIOGENÊSE SOMÁTICA A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DO HÍBRIDO BRS MANICORÉ ( <i>Elaeis guineensis</i> x <i>E. oleifera</i> ).....	70
FIGURA 3 - ETAPAS DA EMBRIOGENÊSE SOMÁTICA A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DO HÍBRIDO DE DENDEZEIRO BRS MANICORÉ.....	71
FIGURA 4 - INDUÇÃO DE CALOS EM TCLs BASAIS DA PARTE AÉREA DE DENDEZEIRO HÍBRIDO BRS MANICORÉ EM MEIO Y3.....	74

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	04
RESUMO.....	05
ABSTRACT.....	06
LISTA DE ABREVIATURAS.....	07
LISTA DE TABELAS.....	08
LISTA DE FIGURAS.....	11
SUMÁRIO.....	12
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	15
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1 ASPECTOS GERAIS DO DENDEZEIRO.....	18
2.2 GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS.....	19
2.3 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA.....	21
2.4 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM PALMEIRAS.....	24
2.5 TÉCNICA DO “ <i>THIN CELL LAYER</i> ” (TCL).....	27
REFERÊNCIAS.....	29
CAPÍTULO 1.....	38
GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO HÍBRIDO BRS MANICORÉ ( <i>E. guineensis</i> x <i>E. oleifera</i> ).....	38
RESUMO.....	38
ABSTRACT.....	39
1 INTRODUÇÃO.....	40
2 MATERIAIS E METÓDOS.....	41
2.1 LOCAL DE ESTUDO E MATERIAL VEGETAL.....	41
2.2 TESTE DE VIABILIDADE COM TETRAZÓLIO.....	41
2.3 GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> DOS EMBRIÕES ZIGÓTICOS.....	42
2.4 CONDIÇÕES DE CULTURA.....	43
2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
3 RESULTADOS.....	44
3.1 CLASSIFICAÇÃO EM CLASSES DE VIGOR E VIABILIDADE EM EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE DENDEZEIRO HÍBRIDO BRS MANICORÉ.....	44

<b>3.2 INFLUÊNCIA DO MEIO DE CULTURA NA GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS</b> .....	47
<b>3.3 INFLUÊNCIA DA PRESENÇA DO FOSFATO DE SÓDIO NOS MEIOS DE CULTURA MS E Y3</b> .....	49
<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	51
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	54
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	55
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	58
<b>RESUMO</b> .....	58
<b>ABSTRACT</b> .....	59
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	60
<b>2 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	63
<b>2.1 LOCAL DE ESTUDO E MATERIAL VEGETAL</b> .....	63
<b>2.2 DESINFESTAÇÃO DAS SEMENTES E DOS EMBRIÕES PARA INTRODUÇÃO <i>IN VITRO</i></b> .....	63
<b>2.3 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA</b> .....	64
<b>2.3.1 EFEITO DO MEIO DE CULTURA E DE CONCENTRAÇÕES DE PICLORAM OU 2,4-D NA INDUÇÃO DE CALOS EM EMBRIÕES ZIGÓTICOS</b> .....	64
<b>2.3.2 FORMAÇÃO DE CALOS EMBRIOGÊNICOS EMBRIÕES SOMÁTICOS E CONVERSÃO EM PLANTAS</b> .....	64
<b>2.3.3 EFEITO DO MEIO DE CULTURA E DE CONCENTRAÇÕES DE PICLORAM OU 2,4-D NA INDUÇÃO DE CALOS A PARTIR DE TCLs (<i>THIN CELL LAYER</i>)</b> ..	65
<b>2.3.4 FORMAÇÃO DE CALOS EMBRIOGÊNICOS E DE EMBRIÕES SOMÁTICOS A PARTIR DE TCLs</b> .....	66
<b>2.4 CONDIÇÕES DE CULTURA E ACLIMATIZAÇÃO DAS PLANTAS</b> .....	67
<b>2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	67
<b>3 RESULTADOS</b> .....	68
<b>3.1 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA A PARTIR DE EZ</b> .....	68
3.1.1 Influência do meio de cultura do tipo e das concentrações de auxina na indução de calos a partir de embriões zigóticos.....	68
3.1.2 Efeito de BAP ou 2iP combinado com 2,4-D ou picloram na etapa de multiplicação de calos.....	70
3.1.3 Efeito de duas concentrações de 2,4-D na formação de embriões somáticos em culturas embriogênicas.....	70

<b>3.2 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA A PARTIR DE TCL DA PARTE AÉREA.....</b>	<b>73</b>
3.2.1 Influência de diferentes tipos e concentrações de auxina no meio de cultura Y3 na formação de calos a partir de TCLs.....	73
3.2.2 Efeito de duas concentrações de 2,4-D acrescidos de 100 µM de putrescina em culturas embriogenicas.....	75
3.2.3 Efeito de duas auxinas e dois meios de cultura na formação de calos em TCLs centrais.....	77
<b>4 DISCUSSÃO.....</b>	<b>79</b>
<b>4.1 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA A PARTIR DE EZ.....</b>	<b>79</b>
<b>4.2 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA A PARTIR DE TCL.....</b>	<b>81</b>
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>83</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>84</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>88</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>89</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq) é uma monocotiledônea da família *Arecaceae*, originária da África. Possui grande importância econômica para a produção de óleo, utilizado tanto na indústria alimentícia como farmacêutica (FERWERDA, 1975). O óleo também tem se destacado como uma fonte alternativa renovável de biocombustível (COLLARES, 2011). Entretanto, a maioria das espécies de palmeiras não possui mecanismos naturais de propagação vegetativa, sendo que sua multiplicação é principalmente via sementes (KIEM, 1958) e a germinação tem sido considerada lenta, irregular e frequentemente baixa (MEEROW, 1991). Na natureza, a germinação das sementes ocorre após três a doze meses, devido a ter um endocarpo duro (KOEBERNIK, 1971).

Com a demanda de sementes aumentada, foi desenvolvido o híbrido BRS Manicoré, cultivar de alta capacidade produtiva (COLLARES, 2011). Manicoré é resultado do cruzamento entre o dendezeiro africano (Costa Ocidental) (*Elaeis guineensis*) e o dendezeiro americano, também denominado caiaué ou palmeira da amazônia (*E. oleifera* (Kunth) Cortés). Possui características de resistência a pragas e doenças, principalmente ao amarelecimento-fatal (doença de etiologia desconhecida) e menor crescimento vertical do estipe (CONCEIÇÃO *et al*, 2000; CUNHA *et al.*, 2010). É capaz de viabilizar um ciclo de colheita mais longo e menos suscetível ao ataque de insetos (EMBRAPA, 2010). Os frutos têm alto teor de óleos e elevado teor de ácido graxo insaturado, o que o coloca em condições de produzir biodiesel de alta qualidade (COLLARES, 2011). Entretanto, possui dificuldade no desenvolvimento dos embriões, sendo que estes abortam dentro da semente, impedindo a germinação (ALVES *et al.*, 2011) reduzindo a taxa de germinação (30%) (ANGELO, 2007). Mediante o resgate de embriões a germinação *in vitro* pode superar este problema.

A germinação *in vitro* constitui uma ferramenta de grande importância para plantas com dificuldade de serem multiplicadas vegetativamente. Para a otimização da germinação de *Elaeis guineensis*, a cultura de embriões *in vitro* pode ser utilizada (PÁDUA, 2012, não publicado). Assim, plântulas podem ser obtidas em menor espaço de tempo, quando em condições apropriadas. Além disso, estudos de

avaliação da qualidade das sementes podem contribuir para o conhecimento da fisiologia da germinação (PÁDUA, 2012, não publicado).

A aplicação de métodos para o aumento do potencial de germinação é uma ferramenta útil em programas de produção de sementes. No entanto, existem fatores inibidores que promovem a dormência e impedem o processo germinativo, surgindo à necessidade de submetê-las a condições ideais de temperatura, umidade e oxigenação (LIMA, 2013). O teste do tetrazólio é utilizado para verificar a qualidade fisiológica, onde os tecidos vivos ficam corados, já os tecidos que não respiram estão mortos e não são corados pelo sal. Tem sido utilizado em sementes que apresentam dormência ou germinação lenta, em razão de sua rapidez, precisão, baixo custo e possibilidade de estimativa de viabilidade (GREEN, 2012).

A embriogênese somática (ES) é uma técnica promissora para a produção de mudas em grande escala (MORCILLO *et al*, 2007). É um tipo de propagação vegetativa assexuada onde células haplóides ou somáticas diferenciam-se e multiplicam-se, originando embriões somáticos sem que ocorra a fusão de gametas (WILLIAMS e MAHESWARAN, 1986). Uma das dificuldades da cultura das palmeiras é a disponibilidade de mudas e a propagação por métodos convencionais não é possível devido a que estas plantas apresentam um único meristema, sendo produzidas exclusivamente por sementes (KIEM, 1958). A técnica de ES pode então ser aplicada para a propagação da espécie.

A embriogênese somática pode ser obtida a partir de vários tipos de tecidos, tais como meristemas, brotos e embriões. Um procedimento eficiente é a técnica do *thin cell layer* (TCL) ou camada fina de célula (SCHERWINSKI *et al.*, 2010), que consiste de explantes pequenos com cerca de 1 mm de espessura, excisados a partir de diferentes partes da planta, tais como: caule, folhas, inflorescências, botão floral, cotilédones, epicótilos e embriões (TRAN THANH VAN, 1980). Botões florais se originam da epiderme dos TCL, mostrando a eficiência da técnica na regeneração de órgãos de uma maneira rápida, a partir de diferentes regiões da planta e com uma pequena quantidade de material vegetal inicial (SILVA, 2003). Porém, não existem na literatura trabalhos que utilizam essa técnica visando à indução da embriogênese somática no híbrido de dendê BRS Manicoré. Guedes (2008) desenvolveu uma pesquisa utilizando TCLs de segmentos caulinares e foliares de dendê para a indução da embriogênese somática. Scherwinski *et al.* (2010) também utilizaram a técnica para a embriogênese somática e regeneração de plantas de

dendê, obtendo 41,5% de calos embriogênicos. Steinmacher *et al.* (2007) utilizaram TCLs foliares de pupunheira e obtiveram 43% de calos embriogênicos e 80% foram convertidos em plantas.

Devido à necessidade de multiplicação e produção de mudas do híbrido BRS Manicoré, visando à produção em menor tempo e em grande escala que atenda à demanda nacional, novas pesquisas devem ser realizadas para otimização do processo de embriogênese somática. Assim o objetivo geral desta pesquisa é otimizar a germinação *in vitro* de embriões zigóticos e estabelecer um protocolo de embriogênese somática para a produção de mudas de dendezeiro híbrido Manicoré.

#### OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Avaliar a viabilidade de embriões zigóticos pelo teste de tetrazólio;
2. Selecionar o melhor meio de cultura para obtenção de plântulas a partir de embriões zigóticos cultivados *in vitro*;
3. Observar a influência do fosfato ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) no desenvolvimento da parte aérea e da raiz primária em plântulas cultivadas *in vitro*;
4. Selecionar o meio de cultura, a auxina e a concentração adequada para a formação de calos a partir de embriões zigóticos (EZ) e TCLs basais da parte aérea;
5. Identificar a citocinina e a auxina mais adequada para a multiplicação de calos a partir de EZ;
6. Verificar a concentração ideal de auxina para a formação dos embriões somáticos obtidos a partir de EZ e TCLs;
7. Determinar um meio adequado para conversão dos embriões somáticos em plântulas;
8. Aclimatizar plântulas do meio *in vitro* para meio *ex vitro*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 ASPECTOS GERAIS DO DENDEZEIRO

Dendezeiro ou dendê é o nome popular dado a *Elaeis guineensis* Jacq, palmeira originária da Costa Ocidental da África. Pertence à família Arecaceae, introduzida no Brasil na região sul da Bahia no século XVI (CARVALHO, 2009). É uma monocotiledônea perene, monoica, oleaginosa com ciclo de vida longo (MORCILLO *et al.*, 2007). Dos frutos desta planta oleaginosa pode ser extraída a matéria prima do biodiesel (COLLARES, 2011). O principal produto extraído industrialmente é o óleo da polpa do fruto, conhecido como óleo de palma que tem uso alimentício por ser o melhor substituto para gordura *trans*, sendo rico em vitamina A e E; também está presente em produtos de higiene e limpeza (BERTONE, 2011).

A alta produção de óleos é obtida com os híbridos melhorados (Tenera e BRS Manicoré) por possuírem grande quantidade de óleo por cacho. A variedade Tenera provém do cruzamento entre duas variedades da mesma espécie *Elaeis guineensis* Dura x *Pisifera*, híbrido intraespecífico que produz 25 toneladas de óleo/cacho/hectare (BIONDI; MONTEIRO; GLASS, 2008).

BRS Manicoré, cultivar lançada em 2010 pela Embrapa, é um híbrido interespecífico, resultado do cruzamento entre o caiaué, espécie americana (*Elaeis oleifera*), e o dendezeiro africano (*E. guineensis*) (COLLARES, 2011). Inicialmente foram instalados experimentos pela Embrapa para avaliar a capacidade de combinação entre diferentes origens de caiaué e dendezeiro africano e o crescimento dessas plantas. O híbrido BRS Manicoré foi testado durante 20 anos em áreas com incidência de doenças como o AF e a fusariose, e não apresentou sintomas dessas anomalias (BARCELOS *et al.*, 2000; CUNHA *et al.*, 2005). O híbrido Manicoré também apresenta alta produção de óleo, em torno de 30 toneladas/cacho/hectare. Produz progênies férteis com características muito desejáveis: alto teor de óleo insaturado em relação ao do dendê, crescimento em altura baixo e resistência a algumas doenças (BARCELOS *et al.*, 2000).

Dado esta importância, pesquisas com o caiaué tem continuidade e a espécie está sendo usada para produção de sementes híbridas (ANGELO, 2007). Contudo, para que o híbrido seja efetivamente utilizado na cultura de dendezeiro, é necessário que seja adequadamente mantido, caracterizado e avaliado e, por meio da hibridação interespecífica com dendezeiro, poderão ser desenvolvidas variedades mais adaptadas ao meio ambiente de maneira segura e sustentável (ANGELO, 2007).

## 2.2 GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS

A germinação de sementes de dendê de forma natural é lenta e esporádica (CARDOSO, *et al.*, 2010) e para obter uma germinação uniforme, recomenda-se a estocagem das sementes em temperatura de 39 a 40 °C por 80 dias, com teor de umidade baixo, mas não inferior a 14,5%. O conteúdo ótimo de umidade para germinação de sementes da var. Dura é de 21 a 22%, e para Tenera 28 a 30% (PURSEGLOVE, 1972).

A germinação *in vitro* é um método alternativo por permitir o desenvolvimento normal dos embriões (PÁDUA, 2012, não publicado). Também torna possível o resgate de embriões, fazendo com que plantas germinem em um período de tempo menor e com maior produtividade que em condições naturais. Também torna possível a criopreservação de embriões zigóticos e posterior resgate como uma alternativa para manter a ampla variabilidade genética de espécies. Permite o controle da embriogênese, a produção de haplóides, a superação da dormência de sementes, a produção de plântulas assépticas, além de elucidar problemas relacionados à nutrição do embrião no óvulo (COLLINS e GROSSER, 1984; HU e FERREIRA, 1999).

A cultura de embriões consiste em separar as estruturas embrionárias da semente e do fruto em diferentes estádios de maturação, inoculá-las em um meio nutritivo e regenerar plantas. Dessa maneira, a cultura de embriões pode ser usada para recuperar híbridos raros, testar viabilidade de sementes ou como fonte de explantes (GIACOMETTI, 1990; VILLALOBOS e THORPE 1991; HU e FERREIRA, 1999).

Em palmeiras, um dos primeiros trabalhos em cultura de tecidos envolveu o crescimento de embriões zigóticos de *Cocos nucifera in vitro* (EEUWENS, 1976). Após este trabalho inicial, a germinação *in vitro* de embriões zigóticos de *Cocos nucifera* também foi relatada por Silva (2002) e a de EZ de pupunheira por Steinmacher (2005) que obteve de 90 e 96% de germinação nos meios de cultura MS e Y3 respectivamente.

Cardoso (2010) verificou que o meio de cultura mais adequado para a germinação de embriões zigóticos de híbridos de dendezeiro é o MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) adicionado de  $0,17 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  e de  $2 \text{ g.L}^{-1}$  de CA (carvão ativado). Isso pode ser devido ao papel fundamental exercido pelo  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  no desenvolvimento de folhas e raízes, pois o fósforo atua no metabolismo energético e no processo de regulação enzimática (ALVES, 2007). Segundo Santiago *et al.* (2001), a perfeita diferenciação da parte aérea é uma das consequências da adição do fósforo ao meio de cultura. Além disso, o fósforo faz parte da constituição dos nucleotídeos, unidades formadoras do ácido nucléico como o DNA e RNA, sendo esses ácidos diretamente envolvidos no processo de síntese de proteínas, que irão constituir as estruturas morfológicas das plantas.

Alves *et al.* (2011) desenvolveram uma pesquisa para otimizar o protocolo de cultivo *in vitro* de embriões de híbridos interespecíficos de dendezeiro (*Elaeis oleifera* (HBK) Cortés x *E. guineensis* Jacq), variedades SJ 165, CI 2061, CJ 2141, CJ 502 e CJ 492. A concentração de  $2,5 \text{ g.L}^{-1}$  de CA foi mais eficiente para evitar a oxidação *in vitro* na variedade SJ 165 e houve grande influência do genótipo na germinação *in vitro*. A variedade CI 2061 apresentou melhores respostas de germinação (37,6%), sendo o meio MS  $\frac{1}{2}$  +  $2,5 \text{ g.L}^{-1}$  de CA +  $0,17 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  o mais eficaz para a formação de plântulas. Pádua (2012, não publicado) observou que os embriões do híbrido Manicoré com 100 dias após antese tiveram 88% de germinação no meio MS ou Y3 com 3% de sacarose. Pesquisas ainda devem ser realizadas para proporcionar um desenvolvimento ótimo e rápido de plântulas de dendê, devido ao aumento da demanda por sementes, sendo que somente a EMBRAPA abastece o mercado de sementes dessa espécie no Brasil (LIMA, 2013).

O teste de tetrazólio é um método rápido utilizado para avaliar a viabilidade das sementes, com base na alteração da coloração de tecidos vivos, em presença de uma solução de cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio (MARCOS FILHO, 2005). Este teste baseia-se na atividade das enzimas, particularmente a desidrogenase do ácido

málico (AOSA, 1983), as quais catalisam as reações respiratórias nas mitocôndrias, durante a glicólise e o ciclo de Krebs, reduzindo o tetrazólio a um “formazan” insolúvel e colorido (vermelho). Como o pigmento não é difusível há uma diferença bastante nítida entre o tecido que respira (viável) e o tecido que não respira (não viável) (AOSA, 1983). O primeiro adquire cor vermelha característica, enquanto o último mantém a sua cor natural. Durante os processos respiratórios, substâncias intermediárias são produzidas, que servem de substrato para as desidrogenases. Íons de hidrogênio são transferidos (em diversas etapas) para o tetrazólio, que atua como um receptor de hidrogênio (DELOUCHE *et al.*, 1976).

Em dendê (*Elaeis guineensis*), o teste de tetrazólio foi realizado para avaliar a qualidade fisiológica dos embriões por: Mok (1972), que encontrou 98,6% de viabilidade dos embriões, por Murugesan *et al.* (2002), que obtiveram 88 a 92%. Green (2012) obteve 98% de viabilidade e 93% de germinação. Para o híbrido interespecífico (*Elaeis guineensis* x *E. oleifera*), Maquiné *et al.* (2014) obtiveram de 64 a 84% de viabilidade dos embriões.

### 2.3 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

A embriogênese somática é um método de propagação vegetativa pelo qual células háploides ou somáticas desenvolvem-se por meio de diferentes estádios embriogênicos, dando origem a uma planta sem que ocorra a fusão de gametas (WILLIAMS e MAHESWARAN, 1986). A propagação vegetativa refere-se a qualquer método utilizado para clonar plantas individuais, diferentemente do que ocorre na propagação sexuada, ou propagação por sementes (GUERRA *et al.*, 1999).

Segundo Spiegel Roy e Vardi (1984), a embriogênese somática pode ser natural ou induzida *in vitro*. Na embriogênese somática natural, células dos tecidos embrionários podem ser direcionadas para uma rota de desenvolvimento, onde os embriões originam-se por propagação assexuada. Esses embriões tem o genoma da planta-mãe e, como consequência, pela embriogênese somática natural, populações clonais podem ser mantidas por meio das sementes.

Na embriogênese somática *in vitro* ou induzida, células em diferentes estádios de diferenciação podem ser induzidas por estímulos ambientais ou

químicos e adquirem novas competências morfogenéticas (DUBLIN, 1981). Segundo Sharp *et al.* (1980) e Evans *et al.* (1981), nesse tipo de desenvolvimento existem dois padrões básicos de expressão da embriogênese. O primeiro corresponde ao modelo direto, no qual os embriões somáticos originam-se dos tecidos matrizes sem a formação de calo, e são provenientes de células embriogênicas pré-determinadas que são moduladas por meios ricos em citocininas e desprovidos de auxinas.

O segundo corresponde ao modelo indireto no qual os embriões somáticos se formam a partir de um calo, onde as células apresentam-se em diferentes estádios de diferenciação e podem adquirir novas competências. Em ambos os casos, o embrião somático segue a mesma sequência de desenvolvimento do embrião zigótico (TORRES *et al.*, 1999).

Os calos são massas de células desorganizadas, que se multiplicam desordenadamente podendo se diferenciar em tecidos ou órgãos e que possuem a capacidade de responder às injúrias químicas ou físicas (TORRES *et al.*, 1999). Em monocotiledôneas, os estádios são: globular, escutelar, coleoptilar e torpedo. Porém, os embriões somáticos diferem dos embriões zigóticos por possuírem sistema vascular fechado, sem conexão vascular com os tecidos do explante inicial (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999; ZIMMERMAN, 1993).

A embriogênese somática consiste de dois ciclos repetitivos característicos: no primeiro ciclo, um explante da planta matriz é inoculado em meios de cultura contendo auxina, sendo o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) a mais utilizada. Estas culturas geram complexos ou massas celulares pró-embriônicas, que por processos de embriogênese repetitiva, resultam em um ciclo repetitivo de divisões celulares, formando embriões somáticos globulares. No segundo ciclo, chamado de ciclo de maturação, esses pró-embriões são estimulados a prosseguir o seu desenvolvimento pela retirada da auxina do meio de cultura, ou pela inclusão de ácido abscísico (ABA), de citocininas e de agentes que promovam estresse osmótico. Nesta fase, as culturas são mantidas em condições de luminosidade. Esse ciclo de maturação forma embriões somáticos que podem ser convertidos em plantas (GUERRA *et al.*, 1999). Este modelo resulta de calos e suspensões celulares depois que o explante é submetido a tratamentos que induzem competência embriogênica. Segundo Christianson e Warnick (1983) e Sugiyama (1999), isto significa que é necessário que ocorra a desdiferenciação e posterior rediferenciação celular por meio de uma reprogramação genética (epigênese – ativação seletiva e

diferencial de genes) cujos determinantes básicos são o estágio fisiológico do explante e o tipo e concentração do regulador de crescimento que atuará como sinal químico para a ativação gênica diferencial. Modelos como estes foram obtidos para palmeiras por Tisserat (1979), para gramíneas por Vasil e Fujiwara (1982), para soja por Christianson (1983) e para cenoura por Litz (1993).

Os reguladores de crescimento são substâncias que influenciam processos fisiológicos das plantas quando em concentrações apropriadas, na maioria dos casos, com concentrações baixas (FRANKENBERGER, JR.; ARSHAD, 1995). Para a indução da embriogênese somática, geralmente é necessária a adição de auxinas ao meio de cultura, sendo as mais utilizadas: 2,4-D, ANA, dicamba e picloram (GUEDES, 2008). Os reguladores de crescimento também atuam na expansão, alongamento e divisão celular, beneficiando os processos de calogênese, embriogênese e organogênese, além de influenciarem o enraizamento das plantas (KRIKORIAN, 1991). As auxinas mais usadas na embriogênese somática são: 2,4-D (49%), seguido pelo ANA (27%), AIA (6%), AIB (6%), Picloram (5%) e Dicamba (5%) (JIMENEZ, 2005).

As auxinas são consideradas importantes na regulação da embriogênese somática (COOKE *et al.*, 1993; FEHÉR *et al.*, 2003; GAJ, 2004). Esta sensibilidade pode ser evidenciada pelo fato que, somente tecidos responsivos reagem à presença das auxinas (BELL *et al.*, 1993; SOMLEVA *et al.*, 1995). No entanto, diferenças nas respostas podem ocorrer dependendo da espécie, genótipo ou do tecido de explantes com diferentes origens em uma mesma planta (DUDITS *et al.*, 1995).

As citocininas geralmente são utilizadas em conjunto com as auxinas, sendo a BAP mais empregada (57%), seguido pela cinetina (37%), zeatina (3%) e thidiazuron (3%) (RAEMAKERS *et al.*, 1995). Na embriogênese somática, as citocininas estimulam a multiplicação ou divisão de massas celulares. No entanto, a maneira complexa com que os reguladores de crescimento e as células interagem, indica que, se o tecido não está em um estágio responsivo, ele não irá responder adequadamente aos reguladores de crescimento exógenos, não importando em quais concentrações e combinações forem utilizadas (CARDIM, 2006).

Poliaminas como a putrescina têm sido usadas para substituir as citocininas na embriogênese somática (RAJESH *et al.*, 2003) e seu uso é similar ao de reguladores de crescimento, quando utilizado em concentrações elevadas. As

poliaminas promovem o crescimento celular e a estabilidade do DNA (GALSTON E KAUR-SAWHNEY, 1990). Estão envolvidas na nutrição das plantas e na cultura de tecidos e são vistas como reguladores de crescimento ou hormônios mensageiros secundários (BAIS e RAVISHANKAR, 2002; KAKKAR *et al.*, 2000).

Apesar dos reguladores de crescimento apresentar um papel predominante na morfogênese *in vitro*, o processo também é influenciado por fatores ambientais, como temperatura e luminosidade (LERCARI *et al.*, 1999). Além disso, os meios de cultura são essenciais no desenvolvimento *in vitro* e, por isso, constantemente sofrem modificações na composição salina e nas vitaminas, de acordo com a especificidade, necessidade e o objetivo da micropropagação (CORREIA *et al.*, 1995). Na literatura, existem vários meios de cultura, porém, as formulações mais utilizadas em palmeiras são as do meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e do Y3 (EEUWENS, 1976). Essas formulações diferem essencialmente na concentração dos macro e micronutrientes, vitaminas, compostos orgânicos, fonte de carbono e outras substâncias complexas, normalmente específicas para uma espécie ou etapa da micropropagação (GUEDES, 2008).

Os carboidratos são adicionados aos meios de cultura, devido à baixa capacidade fotossintética das plantas cultivadas *in vitro*. Estes suprem as necessidades metabólicas, participando na geração de energia ou como fontes de esqueletos carbônicos para os vários processos biossintéticos implicados na diferenciação e crescimento celular (LEIFERT *et al.*, 1995). Os carboidratos também desempenham papel importante dentro da embriogênese somática na manutenção da osmolaridade adequada do meio de cultura e promoção do crescimento embrionário (HU; FERREIRA, 1999).

## 2.4 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM PALMEIRAS

Em palmeiras, a embriogênese somática tem sido utilizada para a propagação de culturas e como auxílio nos estudos morfogenéticos. Apresenta vantagens sobre as demais técnicas de micropropagação como na produção de vários embriões em um espaço limitado e o desenvolvimento direto de plantas a partir de embriões individualizados (GUERRA *et al.*, 1999). Segundo Steinmacher *et*

*al.* (2007), a embriogênese somática é preferida na rota regenerativa *in vitro* das palmeiras, porque pode aumentar o número de plantas regeneradas quando comparada à organogênese.

A propagação vegetativa *in vitro* de dendezeiro por embriogênese somática a partir de diferentes tipos de explantes obteve sucesso partindo de calos induzidos em meio de cultura com 2,4-D (JONES, 1974; RABECHAUULT; MARTIN, 1976; PARANJOTHY; OTHMAN, 1982; NWANKWO; KRIKORIAN, 1983; BLAKE, 1983; DUVAL *et al.*, 1988; PARANJOTHY *et al.*, 1989). Uma das explicações da influência do 2,4-D na embriogênese somática de alguns genótipos é que as auxinas promovem a desdiferenciação celular, com reativação de divisões celulares (DUDITS *et al.*, 1995), e essas respostas podem depender da fonte de explante usado no experimento (ZIMMERMAN, 1993).

Em palmeiras, Teixeira (1989) trabalhou com *Elaeis guineensis* e propôs a utilização de embriões zigóticos, maduros ou imaturos, como fonte de explantes, com possível utilização em larga escala. Em 1993, Teixeira *et al.* induziram calos em 55% a 88% dos embriões imaturos. A formação de calos a partir de embriões maduros foi de 93% e após aproximadamente nove meses de cultivo, alguns setores de tais calos primários formaram calos embriogênicos friáveis.

No protocolo desenvolvido por De Touchet *et al.* (1991) foram utilizadas suspensões celulares de calos embriogênicos obtidos a partir de segmentos de folhas imaturas de dendezeiro. O meio de cultura para indução da embriogênese somática foi o MS adicionado de 96,97  $\mu\text{M}$  de BAP, 0,1  $\text{g.L}^{-1}$  de CA e três concentrações de 2,4-D (362, 452,5, 678,7  $\mu\text{M}$ ). As concentrações de 362 e 452,5  $\mu\text{M}$  de 2,4-D foram consideradas as mais efetivas para produção de células embriogênicas com características pró-embrionárias. Para a proliferação, os meios de cultura continham 2,4-D nas concentrações de 113,1; 226,2 e 362,0  $\mu\text{M}$ , sendo que a concentração de 362  $\mu\text{M}$  manteve o potencial embriogênico dos calos após 18 semanas de cultivo. O meio de cultura empregado na regeneração foi o MS sem reguladores de crescimento, dando origem a plantas, que depois de enraizadas, foram transferidas para casa de vegetação.

Sogeke *et al.* (1996) induziram a ES em explantes de folhas imaturas de dendezeiro em meio de cultura Y3 modificado (Y3a) contendo 80,55  $\mu\text{M}$  de ANA. Crescimento rápido dos calos foi alcançado quando se diminuiu a concentração de ANA para 26,85  $\mu\text{M}$ . Após esta etapa, a ES foi induzida em meio Y3 básico

suplementado com 2,68  $\mu\text{M}$  de ANA e 9,3  $\mu\text{M}$  de KIN (DM1). Sub cultivos sucessivos em meio de cultura (DM1) resultaram na formação de mais embriões verdes, primórdios foliares, com folhas e raízes bem desenvolvidas.

Kanchanapoom e Domyoas (1999) cultivaram embriões zigóticos de frutos maduros de dendê var. Tenera em meio de cultura Y3 com 9,0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D. A calogênese foi iniciada a partir de dois meses e, para a diferenciação dos embriões e regeneração das plantas, dois meios sucessivos foram empregados. O primeiro meio foi o MS sem a presença de auxinas, mas com 0,5  $\text{g.L}^{-1}$  de CA. O segundo meio foi MS adicionado de 0,33  $\mu\text{M}$  de BAP e 11,25  $\mu\text{M}$  de 2,4-D. Os embriões somáticos foram examinados microscopicamente em tempos distintos, observando-se que a origem dos calos foi unicelular a partir da subepiderme dos explantes.

Karun *et al.* (2004) estabeleceram um protocolo para a embriogênese somática e regeneração de diferentes variedades de *Areca catechu* utilizando explantes de folhas e inflorescências imaturas. O meio utilizado foi o MS, inicialmente cinco tratamentos com as auxinas 2,4-D (68  $\mu\text{M}$ ), Dicamba (25 e 50  $\mu\text{M}$ ) e Picloram (100 e 200  $\mu\text{M}$ ) foram aplicadas para o desenvolvimento de calos. Após quatro meses de cultivo, o picloram (200  $\mu\text{M}$ ) foi considerado a melhor auxina na indução de calos para ambos os explantes, bem como para as variedades testadas.

Carvalho (2009) desenvolveu um protocolo de embriogênese somática a partir de folhas e flores imaturas de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq) cultivadas *in vitro*. Balzon *et al.* (2013) realizaram novas pesquisas para melhorar a eficiência da embriogênese somática no dendezeiro (*E. guineensis*) a partir de embriões zigóticos maduros. Pádua (2013) induziu massas pró-embriogênicas em explantes foliares de *Elaeis guineensis* híbrido Tenera e caracterizou essas massas de forma citoquímica e ultraestrutural quanto às características embriogênicas, comparando duas auxinas: 2,4-D e picloram, ambas sendo eficientes na indução de massas embriogênicas, resultando em quatro tipos de massas embriogênicas assim classificadas: 1- translúcida e alongada, 2- desuniforme e alongada, 3- bege e globular, 4- branco e globular, sendo adequados os tipos 2, 3 e 4 por possuírem características anatômicas e ultraestruturais de células embriogênicas.

Folhas imaturas também são consideradas excelentes fontes de explantes no cultivo *in vitro* de palmeiras. Besse *et al.* (1992), utilizando como explantes folhas imaturas de quatro clones de dendezeiro (*E. guineensis*) denominados C1, C2, C3 e C4, obtiveram dois tipos de calos sub cultivados no mesmo meio de cultura MS,

suplementado com 2,4-D: calos nodulares compactos e calos friáveis. De acordo com os dados, os calos apresentavam aspectos diferentes na morfologia e fisiologia, mas com potencialidades para a indução da embriogênese. Estudos realizados por Koornneef *et al.* (1993) e Smith *et al.* (1995), indicaram que a competência e a determinação dos explantes resultam da ação diferencial de genes que regulam as diversas etapas do desenvolvimento. Em dendezeiro var. Tenera, os resultados das pesquisas desenvolvidas por Morcillo *et al.* (2007) utilizando explantes foliares demonstraram a expressão do gene *EgAP2-1*, que codifica a proteína *AINTEGUMENTA-like (AIL)* em tecidos meristemáticos de embriões zigóticos. Estes estudos revelaram que a transcrição do gene *EgAP2-1* foi mais proeminente em embriões zigóticos. Porém, um teste padrão da expressão foi investigado mais detalhadamente pela hibridização *in situ* e revelou que tanto em embriões zigóticos quanto somáticos, a expressão do gene *EgAP2-1* está concentrada nos tecidos em proliferação, associados com o desenvolvimento dos primórdios foliares e no início da rizogênese.

## 2.5 TÉCNICA “THIN CELL LAYER” (TCL)

Os TCLs, ou camadas finas de células, consistem de explantes pequenos com cerca de 1 mm de espessura, que são excisados a partir de diferentes partes da planta, tais como: caule, folhas, inflorescências, botão floral, cotilédones, epicótilos e embriões (TRAN THANH VAN, 1980). Os explantes podem ser cortados longitudinalmente (TCLl), podendo conter apenas um tipo de tecido, tal como uma monocamada da epiderme, ou transversalmente (TCLt) que inclui células de diferentes tecidos em um mesmo corte. Essa técnica tem sido muito utilizada como um sistema modelo para analisar a bioquímica das células e marcadores moleculares de diferenciação (BIONDI *et al.*, 2001).

Essa técnica foi desenvolvida em 1974 por TRAN THANH VAN em tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) que cultivou cortes transversais de caule de diferentes partes da planta. Botões florais se originaram da epiderme dos TCL, mostrando a eficiência da técnica na regeneração de órgãos de uma maneira rápida, a partir de diferentes regiões da planta e com uma pequena quantidade de material vegetal inicial (SILVA,

2003). Desde então, o TCL tem sido utilizado com sucesso na micropropagação de muitas espécies de plantas ornamentais para os quais métodos convencionais não foram bem sucedidos (SILVA, 2003). Foi aplicada em *E. guineensis* por (TEIXEIRA *et al.*, 1994) e *Cocos nucifera* (SAMOSIR *et al.*, 1998).

Também em dendezeiro, Scherwinski *et al.* (2010) utilizaram TCLs da parte aérea e as cultivaram em meio MS com diferentes concentrações de picloram. A melhor concentração foi a de 450  $\mu\text{M}$ , com formação de 41,5% de calos embriogênicos. Em outras palmeiras como, por exemplo, a pupunheira, Steinmacher *et al.* (2007) utilizaram TCLs de explantes da parte aérea, observando 43% de formação de calos primários. Já Padilha (2013) obteve 82% de formação de calos em meio MS com 300  $\mu\text{M}$  de picloram em *Acrocomia aculeata* a partir de folhas de plântulas produzidas *in vitro*.

## REFERÊNCIAS

AOSA - Association of Official Seed Analysts. **The Seed Vigor Test Committee.** Seed Vigor Testing Handbook (S.1.). The Handbook on Seed Testing, Contribution, 88p. 1983.

ALVES, S. A. O.; LEMOS, O. F. de.; FILHO, B. G. S. dos.; SILVA, A.L. *In vitro* protocol optimization for development of interspecific hybrids of oil palm (*Elaeis oleifera* (H.B.K) Cortés x *E. guineensis* Jacq). **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v.2, n.3, 2011.

ANGELO, P. C. S. da.; MORAES, L. A. C.; SOUSA, N. R.; LOPES, R.; CUNHA, R. N. V. da. Resgate de embriões híbridos de dendezeiro x caiaué. **Comunicado Técnico nº 265** – Embrapa, Manaus, AM, 2007.

BAIS, H.P; RAVISHANKAR, G.A. Role of polyamines in the ontogeny of plants and their biotechnological applications. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 69, p.1–34, 2002.

BALZON, T. A.; LUIZ, 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 and Developmental Biology-Plant**, DOI 10.1007/s1, p.1627-012-9479-3, 2013.

BARCELOS, E.; NUNES, C. D. M.; CUNHA, R. N. V. da. **Melhoramento genético e produção de sementes comerciais de dendezeiro.** In: VIÉGAS, I. J; MÜLLER, A. A. A cultura do dendezeiro na Amazônia brasileira. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental; Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2000.

BELL, L. M.; TRIGIANO, R. N.; CONGER, B. V. Relationship of abscisic acid to somatic embryogenesis in *Dactylis glomerata*. **Environmental Experimental Botany**. v.33, p.495–499, 1993.

BESSE, I.; VERDEIL, J. L.; DUVAL, Y.; SOTTA, B.; MALDINEY, R.; MIGINIAC, E. Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) Clonal Fidelity: Endogenous Cytokinins and Indoleacetic Acid in Embryogenic Callus Cultures. **Journal of Experimental Botany**, v.43, n.252, p.983-989, 1992.

BERTONE, V. M. A importância do Programa de Produção Sustentável de Palma de óleo: Produtividade e Sustentabilidade. **Agroenergia em Revista**, v. 2, p. 6-7, 2011.

BIONDI S.; SCARAMAGLI S.; CAPITANI F.; ALTAMURA MM.; TORRIGIANI P. Methyl jasmonate upregulates biosynthetic gene expression, oxidation and

conjugation of polyamines and inhibits shoot formation in tobacco *thin cell layers*. **Journal Experimental of Botany**, v.52, p. 231-242, 2001.

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

BLAKE, J. Tissue culture propagation of coconut, date and oil palm. In: DODDS, J.H. (ed.), **Tissue culture of trees**. p. 29-50, 1983.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: Mapa/ACS, p.395. 2009.

CARVALHO, M. **Embriogênese Somática a partir de folhas imaturas e flores desenvolvidas *in vitro* de dendezeiro Jacq.** 86p. Tese (Doutorado em Ciências) Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais, 2009.

CARDIM, D. C. **Crescimento e desenvolvimento de brotações de progênies de *Eucalyptus grandis in vitro***. Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais com opção em Silvicultura e Manejo Florestal). PIRACICABA. 2006.

CARDOSO, J. de N. O. **Conversão *in vitro* de embriões zigóticos de híbridos de dendezeiro (*Elaeis guineensis* x *E. oleifera*) em plântulas**. 52p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Universidade Federal Rural da Amazônia. Belém, PA. 2010.

CARDOSO, J. de N.; MIRANDA, S. V.; LEMOS, O. F de.; COELHO, L. I. Obtenção de plântulas de híbridos de dendezeiro por cultivo *in vitro*. **Revista Ciências Agrárias**, Piracicaba, v.53, n.2, p.177-181, 2010.

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

COLLINS, G. B; GROSSER, J. W. Culture of embryos. In: VASIL, I. K. (Ed.) Cell culture and somatic cell genetics of plants. **Academic Press**. v.1, p.241-257,1984.

COOKE, T. J.; RACUSEN, R. H. e COHEN, J. D. The role of auxin in plant embryogenesis. **Plant Cell**. v.5, p.1494–1495, 1993.

CORREIA, D.; GONÇALVES, A. N.; COUTO, H. T. Z.; RIBEIRO, M. C. Efeito do meio de cultura líquido e sólido no crescimento e desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* na multiplicação *in vitro*. **IPEF**, Piracicaba,v.48/49, p.107-116, 1995.

CHRISTIANSON, M. L.; WARNICK, D. A.; CARLSON, P. S. A morphogenetically competent soybean suspension culture. **Science**, v. 222, p.632-634, 1983.

CUNHA, R. N. V. da.; LOPES, R.; BARCELOS, E.; RODRIGUES, M. R. L.; TEIXEIRA, P. C.; ROCHA, R. N. C. Produção de híbridos interespecíficos dendê (*Elaeis guineensis*) x caiaué (*Elaeis oleifera*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTODE PLANTAS, 3, Gramado, RS. **Anais digitais**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2005.

CONCEIÇÃO, E.O.; MULLER, A.A. Botânica e morfologia do dendezeiro. In: VIEGAS, I. de J.M.; MULLER, A.A. (Ed.). **A cultura do dendezeiro na Amazônia brasileira**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental; Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2000.

CUNHA, R. N. V.; LOPES, R.; ROCHA, R. N. C.; LIMA, W. A. A; TEIXEIRA, P. C.; BARCELOS, E; RODRIGUES, M. R. Domesticação e melhoramento do caiaué. In: BORÉM, A; LOPES, M. T. G; CLEMENT, C. R. (Ed.). **Domesticação e melhoramento: espécies amazônicas**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. p. 275-296, 2009.

CUNHA, R.N.V. da; LOPES, R. BRS Manicoré: híbrido interespecífico entre o caiaué e o dendezeiro africano recomendado para áreas de incidência de amarelecimento-fatal. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental. (Embrapa Amazônia Ocidental. **Comunicado técnico, 85**). 4p, 2010.

DELOUCHE, J.C.; STILL, T.W.; Raspet, M.; LIENHARD, M. **O teste de tetrazólio para viabilidade da semente**. Tradução de Flávio F. Rocha. Brasília, Agiplan: Ministério da Agricultura. 102p. 1976.

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

DUDITS, D.; GYORGYEY, J.; BOGRE, L. e BAKO, L. Molecular biology of somatic embryogenesis. In: THORPE T. A. (ed.), **In Vitro Embryogenesis in Plants**. p.276–308, 1995.

DUVAL, Y.; DURAND-GASSELIN, T.; KONAN, K.; PANNETIER, C. *In vitro* vegetative propagation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Oléagineux**, v.43, n.2,45-47, 1988.

EEUWENS, C.J. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera* L.) and culture *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, v. 36. p. 23-28, 1976.

EEUWENS, C. J.; LORD, S.; DONOUGH, C. R.; RAO, V.; VALLEJO, G. e NELSON, S. Effects of tissue culture conditions during embryoid multiplication on the incidence of “mantled” flowering in clonally propagated oil palm. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v.70, p. 311–323. 2002.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T. P. e DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v.74, p.201–228, 2003.

FRANKENBERGER JR.; W. T.; ARSHAD, M. **Phytohormones in soils**: microbial production and function. Marcel Dekker, Inc. New York. 1995.

GAJ, M. D. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Growth Regulator**. v.43, p.27–47, 2004.

GIACOMETTI, D.C. **Impacto atual da cultura de tecidos em plantas**. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília: Ministério da Agricultura, p.19-25, 1990.

GALSTON, A.W.; KAUR-SAWHNEY, R. Polyamines in plant physiology. **Plant Physiology**, v.94, p.406–410, 1990.

GÓMEZ, M. A. **Biología aplicada a mejora de pelargonium**. Tese (Doutorado em Biotecnologia Vegetal), Madrid, Universidad Complutense de Madrid, 2002.

GREEN, M. **Avaliação da qualidade de sementes de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) produzidas pela Embrapa Amazônia Ocidental**. 79p. Tese (Doutorado em Agronomia Tropical) Universidade Federal do Amazonas – UFAM, 2012.

GUEDES, R. S da. **Embriogênese Somática e regeneração de plantas de dendezeiro**. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal do Acre, Rio Branco, 2008.

GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, IB. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: Torres, A.c.; Caldas, L.S.; Buso, IA. **Cultura de Tecidos e Transformação genética de Plantas**. Brasília, SPI/Embrapa, v.2, p. 533-568, 1999.

HU C.Y.; FERREIRA, A.G. Cultura de embriões. In: TORRES,C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.M; ed. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SpII Embrapa-CNPH, v.1, p.371-393, 1999.

HYNDMAN, S. E.; HASEGAWA, P. M. e BRESSAN, R. A. The role of sucrose and nitrogen in adventitious root formation on cultured rose shoots. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**.v.1, n.4, p.229-238, 1982.

JIMÉNEZ V. M., GUEVARA E., HERRERA J. e BANGERTH F. Evolution of endogenous hormone concentration in embryogenic cultures of carrot during early expression of somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**. v.23, p.567–572, 2005.

JONES, L. H. Propagation of clonal palms by tissue culture. **Oil Palm News**, v. 17,p. 1-8. 1974.

KAKKAR, R.K.; NAGAR, P.K.; AHUJA P.S.; RAI, V.K. Polyamines and plant morphogenesis. **Biologia Plantarum**, v.43, p.1–11, 2000.

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

KARUN, A.; SIRIL, E. A.; RADHA, E. e PARTHASARATHY, V. A. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from leaf and inflorescence explants of arecanut (*Areca catechu* L.). **Current Science**, v. 86, n.12, 2004.

KIEM, S. C. Propagation of palms. **Principes**, v.2, p.133-138, 1958.

KOEBERNIK, J. Germination of palm seed. **Principes**, v.15, p.134-137, 1971.

KOORNNEEF, M.; BADE, J.; HANHART, C.; HORSMAN, K.; SCHEL, J.; SOPPE, W.; VEKERK, R. e ZABEL, P. Characterization and mapping of a gene controlling shoot regeneration in tomato. **Plant Journal**, v.3, p.131-141, 1993.

KRIKORIAN, A. D. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. In: ROCA, W. M. e MROGINSKY, L. A. (Eds.). **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali: CIAT, p. 41-77. 1991.

LEIFERT, C. et al. Mineral and carbohydrate nutrition of plant cell and tissue culture. **Critical Reviews in Plant Sciences**. Boca Raton, v.14, n.2, p.83-109, 1995.

LERCARI B.; MOSCATELLI, H. A.; GHIRARDI, E; NICEFORO, R. e BERTRAM, L. Photomorphogenic control of shoot regeneration from etiolated and lightgrown hypocotyls of tomato. **Plant Science**. v.140, p.53-64, 1999.

LIMA, S. C. S de. Teste de germinação *in vitro* e de viabilidade em embriões zigóticos de dendê (*Elaeis guineensis*). Relatório (Bolsista na Embrapa) –

**Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.** Manaus, AM, 2013.

LITZ, R. E. Organogenesis and somatic embryogenesis. **Acta Horticulturae**, v. 336, p.199-205, 1993.

MAQUINÉ, T. M.; CYSNE, A. Q.; LIMA, W. A. A de.; ABREU, S. C.; GREEN, M.; RIOS, S. de A. Germination of seeds of interspecific hybrid caiaué x oil palm submitted to the mechanical depulping. **American Journal of Plant Sciences**, v. 5, p. 2965-2972, 2014.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas.** Piracicaba: Fealq, 495p. 2005.

MEEROW, A. W. **Palm seed germination.** Florida: Cooperative Extension Service, 1991.

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.1352-1362, Nov. 2007.

MOK, K.C. The tetrazolium test for evaluating the viability of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) seed. **Proceedings of the International Seed Testing Association**, v. 37, n. 3, p.771-77, 1972.

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

MURUGESAN, P.; VANANGAMUDI, K.; UMARANI, R. Evaluation of viability of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) seeds by tetrazolium test and comparison with germination and in vitro culture results. **Proceedings of the 15th Plantation Crops Symposium Placrosym XV**. p. 246-250, 2002.

NHUT, T. D; LE, B.V; VAN, K. T. T. Somatic embryogenesis and direct shoot regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) using thin cell layer culture apical meristematic tissue. **Journal of Plant Physiology**, v.157, p.559-565, 2000.

NWANKWO, B. A. e KRIKORIAN, A. D. Morphogenetic potential of embryo and seedling-derived callus of *Elaeis guineensis* Jacq. var. Pisifera Becc. **Annual Botany**. v.51, p.65-76,1983.

PADILHA, J. H. D. **Embriogênese somática em *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. Ex Mart. utilizando a técnica do TCL (“thin cell layer”)**. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. 2013.

PÁDUA, S. M. **Germinação *in vitro*, indução e caracterização de massas pró-embriogênicas de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.)**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, MG, 2012.

PÁDUA, M. S, PAIVA, L. V; LABORY, C. R. G; ALVES, E; STEIN, V. C. Induction and characterization of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) pro-embryogenic. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**. v.85, n,4,p.1545-1556. 2013.

PARANJOTHY, K. e OTHMAN, R. “*In vitro*” propagation of oil palm. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT TISSUE CULTURE, 5., 1982, Tokio. Proceedings. Tokio: **Japanese Association for Plant Tissue Culture**, p.747-748.1982.

PARANJOTHY, K. Research strategies and advances in oil palm cell and tissue culture. **Elaeis**. v.1, n.2, p.119-125, 1989.

PURSEGLOVE, J. W. **Tropical crops**. (Chapter 1 – Monocotyledons). London: Longman Group, 1972.

RAEMAKERS, C. J. J. M.; JACOBSEN, E. e VISSER, R. G. F. Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. *Euphytica*. v.81, p.93–107, 1995.

RABÉCHAULT, H. e MARTIN, J. P. Multiplication végétative du palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) l’áide de cultures de tissus foliaires. **Comptes Rendus des Sceances de l’Academie das Sciences. Série D: Sciences Naturelles**. v.283, p. 1735-1737, 1976.

SANTIAGO, E. J. A.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O.; SANTANA, J. R. F.; GOMES, G. A. C.; **Meios de cultura: Cultura de tecidos**. Paiva e Paiva, UFLA, Lavras, M.G. v.3, p.22-35, 2001.

SAMOSIR, Y. M. S; GODWIN, I. D; ADKINS, S. W. An improved protocol for somatic embryogenesis in coconut (*Cocos nucifera* L.). **Acta Horticulturae**, v.461, p.467-474, 1998.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E; GUEDES, R. S; FERMINO, P. C.; DILVA, T. L; COSTA, F. H. Somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm using the thin cell layer technique. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 46, p. 378-385, 2010.

SHARP, W.R., SONDAHL, M., CALDAS, L.S., MARAFFA, S.B. The physiology of in vitro asexual embryogenesis. **Horticultural Reviews**.v.2, p.268-310, 1980.

SHARP, W. R., EVANS, D.A., SONDAHL, M.R. Application of somatic embryogenesis to crop improvement. In: FUJIWARA, A. (Ed.). **Plant Tissue Culture**. p. 759-762, 1982.

SILVA, S. V; **Regeneração *in vitro* de embriões de *Cocos nucifera* L.** Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Universidade de São Paulo, Piracicaba - SP, 2002.

SILVA, J. A. T. da. Thin Cell Layer technology in ornamental plant micropropagation and biotechnology. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, n.12, p. 683-691, 2003.

SILVA, T.L da; GUEDES, R. da S; FERMINO-Jr, P. C P; PEREIRA, J. E. S. Indução da Embriogênese Somática em dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq) a partir de embriões zigóticos imaturos: Alternativa para a Propagação Clonal de Genótipos elite. (Resumo, Seminário de Iniciação Científica, **Annais**) Embrapa, Acre, Rio Branco, 2007.

SMITH, L. G.; JACKSON, D. e HAKE, S. Expression of knotted1 marks shoot meristema formation during maize embryogenesis. **Developmental Genetics**. v.16, p.344-348, 1995.

SOGEKE, A. K. Rapid callus proliferation of somatic embryogenesis and organogenesis of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Elaeis**. v.8, n.2. p. 92-103, 1996.

SOUZA, N. F de. **Germinação *in vitro* e teste de tetrazólio em embriões zigóticos maduros de dendê (*Elaeis guineensis*. Jacq).** Monografia (Ciências Biológicas) Universidade Federal do Amazonas. Manaus, AM. 2012.

SOMLEVA, M. M.; KAPCHINA, V.; ALEXIEVA, V. e GOLOVINSKY, E. Anticytokinin effects on in vitro response of embryogenic and nonembryogenic genotypes of *Dactylis glomerata* L. **Plant Growth Regulator**. v.16, p.109–112, 1995.

STEINMACHER, D. A. **Germinação *in vitro*, criopreservação e embriogênese somática em pupunha.** 124p. Dissertação (Mestrado em Botânica) Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2005.

STEINMACHER, D. A; CANGAHUALA-INOCENTE, G.C.; CLEMENT, C.R.; GUERRA, M.P. Somatic embryogenesis from peach palm zygotic embryos. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v.43, p.124-132, 2007.

SUGIYAMA, M. Organogenesis *in vitro*. **Current Opinion in Plant Biology**. v.2, p.61–64, 1999.

TEIXEIRA, J. B. **Development of *in vitro* techniques of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.)**. Tese (Doutorado em Fisiologia). Graduate Program in Plant Biology. New Brunswick, New Jersey. U.S.A. 1989.

TEIXEIRA, J.B.; SÖNDAHL, M.R.; KIRBY, E.G. **Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of oil palm**. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v.34, p.227-233,1993.

TEIXEIRA, J. B.; SÖNDAHL, M. R.; KIRBY, E. G. Somatic embryogenesis from immature inflorescence of oil palm. **Plant Cell Reports**, v. 13, n.5, p.247-250, 1994.

TISSERAT, B. Propagation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) in vitro. **Journal of Experimental Botany**, v.30, p.1275–1283, 1979.

TORRES, A. C; CALDAS, L. S; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**, Brasília: EMBRAPA, 1999.

TRAN THANH VAN, K. M. Direct Flower Neoformation from Superficial Tissue of Small Explants of *Nicotiana tabacum* L. **Planta**, v.115, p.87-92, 1973.

TRAN THANH VAN, K. M. Direct Flower Neoformation from Superficial Tissue of Small Explants of *Nicotiana tabacum* L. **Planta**, v. 115, p. 87-92, 1974.

TRAN THANH VAN, K. M. Control of morphogenesis by inherent and exogenously applied factors in thin cell layers. **International Review of Cytology**, v.32, p.291-311, 1980.

VASIL, I.K. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cereals and grasses. In: FUJIWARA, A. **Plant Tissue Culture**, p.101-103, 1982.

VAN LE, B; THAO, D. M. N; GENDY, C; VIDAL, J; TRAN THAHN VAN. Somatic embryogenesis on Thin Cell Layers of a C<sub>4</sub> species, *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 49, p. 201-208, 1997.

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

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

## CAPÍTULO 1

### GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DO HÍBRIDO DE DENDEZEIRO BRS MANICORÉ (*E. guineensis* X *E. oleifera*)

#### RESUMO

O híbrido interespecífico BRS Manicoré (*E. guineensis* x *E. oleifera*) tem características agronômicas superiores às do dendezeiro. Porém, a taxa de germinação de sementes é baixa (30%) e o processo demorado quando são semeadas de forma convencional. O objetivo do presente trabalho foi otimizar a germinação *in vitro* de embriões zigóticos (EZ) desse híbrido, comparando lotes de sementes. A viabilidade dos EZ foi avaliada pelo teste de tetrazólio, concentração de 0,075%, durante 4 horas. Os EZ foram germinados nos meios MS e Y3, com e sem a adição de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , e nos meios MS com metade da concentração de sais ( $\text{MS}_{1/2}$ ) e N6. No meio MS contendo  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , a taxa de germinação foi maior (68%) que no meio sem fosfato (40%). Embriões zigóticos cultivados no meio Y3 formaram plantas (raiz e parte aérea) em 75% dos explantes, porcentagem maior do que aquela obtida nos meios MS,  $\text{MS}_{1/2}$  e N6 (46; 35 e 17% respectivamente). Nesse mesmo meio Y3, as plântulas apresentaram tamanho maior (36%  $\geq$  2 cm e 30%  $\geq$  5 cm) que nos outros meios. Os resultados obtidos pelo teste de tetrazólio foram semelhantes aos de germinação em alguns lotes de sementes, mostrando a diferença de viabilidade para cada lote e a diferença de vigor entre os lotes. Para a germinação e o desenvolvimentos das plântulas, é essencial adicionar  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  nos meios de cultura que não contém fosfato ou contém em baixas concentrações como o MS. Para a germinação deste híbrido o meio de cultura adequado é o Y3.

Palavras-chave: fosfato de sódio, híbrido interespecífico, tetrazólio.

## ABSTRACT

The interspecific hybrid of oil palm BRS Manicoré (*E. guineensis* x *E. oleifera*) has superior agronomic characteristics of oil palm. However, the germination rate is low (30%) and the process is slow when the seeds are sown in a conventional form. The purpose of this study was to optimize the *in vitro* germination of zygotic embryos of this hybrid comparing seed lots. The viability of zygotic embryos was evaluated by the tetrazolium test (0.075%) for 4 h. The embryos were cultured on MS and Y3 culture media, with and without the addition of  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , as well as on  $\text{MS}\frac{1}{2}$  and N6 media. In MS medium containing  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , the germination rate was increased from 40 to 68% in comparison with the medium without sodium phosphate. The comparison between MS,  $\text{MS}\frac{1}{2}$ , N6 and Y3 culture media showed that 75% of zygotic embryos cultured in the Y3 medium formed whole plants (with roots and shoots defined), a higher percentage than for embryos cultured on MS,  $\text{MS}\frac{1}{2}$  and N6 media (46, 35 and 17% respectively). In the same Y3 culture medium, the plantlets were larger (36%  $\geq$  2 cm and 30%  $\geq$  5 cm) than in the other media. Results obtained by the tetrazolium test were similar to those of germination in some seed lots, showing the difference of vigour of each seed lot. For the germination and development of plantlets it is essential to add  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  to a culture medium containing no phosphate or with a low phosphate concentration. For seed germination Y3 is a suitable culture medium.

Keywords: interspecific hybrid, sodium phosphate, tetrazolium, Y3.

## 1 INTRODUÇÃO

A palmeira híbrida BRS Manicoré é resultante do cruzamento entre duas espécies de dendezeiro, o africano (*Elaeis guineensis*) e o caiaué (*Elaeis oleifera*) palmeira que ocorre na Amazônia Tropical Úmida (COLLARES, 2011). Este híbrido interespecífico se destaca em relação às demais cultivares, produzindo em torno de 30 ton/cachos/há, é imune ao amarelecimento-fatal (CUNHA *et al.*, 2009) e possui tamanho inferior ao do dendezeiro africano, o que facilita o manejo. Além disso, possui óleo mais insaturado, o que o torna desejável por ser mais claro uniforme e com menor produção de ácidos graxos saturados (RAMOS *et al.*, 2006). Entretanto, uma das dificuldades da cultura é a disponibilidade de mudas em escala comercial, pelo fato das palmeiras apresentarem um único meristema e a propagação vegetativa por métodos convencionais não ser possível, sendo produzidas exclusivamente por sementes (KIEM, 1958), as quais apresentam germinação lenta, irregular e frequentemente baixa (MEEROW, 1991). Em alguns casos, os embriões abortam dentro da semente, impedindo seu desenvolvimento (ALVES *et al.*, 2011). Assim, apenas 30% das sementes germinam o que dificulta a propagação convencional de palmeiras de interesse econômico (ANGELO, 2007; COSTA *et al.*, 2006).

O cultivo *in vitro* de embriões zigóticos pode ser uma ferramenta útil para reduzir o tempo de germinação e proporcionar maiores taxas de embriões germinados em plantas com dificuldade de serem multiplicadas vegetativamente (LIMA, 2013), pois permite a retirada de barreiras físicas como o endocarpo duro e o fornecimento de nutrientes necessários para o desenvolvimento do embrião (PÁDUA, 2012, não publicado). Nesse contexto, a germinação *in vitro* pode superar este problema pelo resgate de embriões. O objetivo deste trabalho foi otimizar a germinação *in vitro* de embriões zigóticos do híbrido de dendezeiro BRS Manicoré comparando vários meios de cultura e vários lotes de sementes.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 LOCAL DE ESTUDO E MATERIAL VEGETAL

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Micropropagação do Departamento de Botânica – UFPR, Curitiba, Brasil. As sementes foram obtidas a partir de plantas matrizes provenientes do cruzamento controlado de plantas selecionadas do híbrido de dendezeiro BRS Manicoré (*E. guineensis* x *E. oleifera*), fornecidas pela EMBRAPA - Amazônia Ocidental. O endocarpo das sementes (coletadas 150 dias após a polinização) foi removido e as amêndoas foram lavadas com sabão neutro e água corrente. Em seguida foram imersas em álcool etílico 70% por cinco minutos e hipoclorito de sódio (NaClO) comercial com 10% de cloro ativo e 1% de Tween 20 por 20 minutos, seguido de lavagens com água destilada estéril (quatro vezes). Os embriões foram isolados em câmara de fluxo laminar e desinfestados com NaClO comercial (10% de cloro ativo) a 2% por 5 minutos e, em seguida, lavados em água destilada estéril (quatro vezes).

### 2.2 TESTE DE VIABILIDADE COM TETRAZÓLIO

Os embriões zigóticos foram isolados e colocados em papel Germitest umedecido com água, acondicionados em sacos plásticos (FIGURA 1 C) e levados à câmara B.O.D a temperatura de 30°C por 16 horas (FIGURA 1 A,B). Foram colocados em recipientes plásticos (4 repetições de 25 embriões para cada lote de sementes), embebidos em 10 mL de tetrazólio na concentração de 0,075% (p/v), pH  $6,5 \pm 0,1$ , e colocados em câmara B.O.D. a uma temperatura de 40°C por 4h em ambiente escuro. Após este período, os embriões foram lavados em água corrente sobre uma peneira para a retirada do excesso de sal (GREEN, 2012, não publicado).

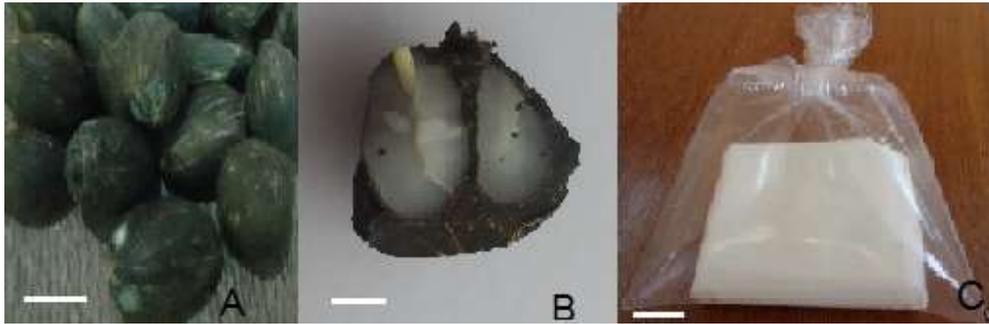


FIGURA 1 – SEMENTES E EMBRIÕES DO HÍBRIDO DE DENDEZEIRO BRS MANICORÉ; A) SEMENTES COM ENDOCARPO; B) EMBRIÃO ZIGÓTICO RETIRADO MANUALMENTE DA SEMENTE; C) EMBRIÕES ACONDICIONADOS EM PAPEL GERMITEST UMEDECIDO ANTES DO TESTE DO TETRAZÓLIO. BARRAS= A) 1 cm, B) 0,5 cm, C) 1 cm. FONTE: a autora, (2014).

A avaliação foi feita com auxílio de microscópio estereoscópico observando o grau de coloração das partes principais: tigelo e haustório e os embriões foram classificados em viáveis (tecido vivo) e inviáveis. Essa classificação seguiu padrões de coloração de sementes de dendê baseados nas classes adotadas por Green (2012, não publicado) e modificadas por Lima (2013, não publicado). Classe 1: Viáveis com alto vigor, tigelo e haustório com coloração vermelha ou rósea homogênea (FIGURAS 2B e C); Classe 2: Viáveis com médio vigor, tigelo com coloração homogênea e haustório com falta de coloração (FIGURA 2D); Classe 3: Viáveis com baixo vigor, tigelo e haustório sem áreas de coloração (FIGURA 2E); Classe 4: Inviáveis e mortas, tigelo e haustório sem coloração (FIGURAS 2F, G e H). A viabilidade dos embriões foi calculada como média das classes I e II.

### 2.3 GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS

Os embriões dos lotes CS 428, CS 736, CS 736, CS 1139, CS 1477, CS 1681 foram inoculados em tubos de ensaio de 15 cm de altura e 2 cm de diâmetro, contendo 15 ml de meio de cultura. Num primeiro experimento foram utilizados quatro meios de cultura: 1) sais e vitaminas de Murashige e Skoog (1962) na formulação completa (MS), acrescido de  $500 \text{ mg.L}^{-1}$  de cisteína 2) MS com metade da concentração original de sais (MS 1/2), acrescido de  $500 \text{ mg.L}^{-1}$  de cisteína, 3) meio Y3 (EEUWENS, 1976), 4) meio N6 (CHU *et al.* 1978), acrescidos de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  de mio inositol (APÊNDICE 23). No segundo experimento foram comparados o meio

MS acrescido de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ( $0,17 \text{ g.L}^{-1}$ ) e o mesmo meio sem  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ . No terceiro experimento, o fosfato também foi adicionado ao meio de cultura Y3 e comparado com o mesmo meio sem fosfato. Todos os meios foram suplementados com  $2 \text{ g.L}^{-1}$  de carvão ativado (CA),  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose e solidificados com  $6 \text{ g.L}^{-1}$  de ágar (Vetec). O pH dos meios de cultura foi ajustado para 5,8 com NaOH ou HCl  $0,1 \text{ N}$  e os meios foram autoclavados a  $120 \text{ }^\circ\text{C}$  por 20 minutos. O CA foi adicionado juntamente com o ágar, após o ajuste do pH.

Após 30 dias foram avaliadas as seguintes variáveis: porcentagem de germinação dos embriões viáveis, embriões sem resposta e embriões anormais. Os embriões curvados e intumescidos com presença da lígula e raiz primária foram considerados germinados. Os embriões atrofiados, sem raiz e sem parte aérea foram avaliados como anormais. Após 45 dias foi avaliado o comprimento da parte aérea.

## 2.4 CONDIÇÕES DE CULTURA

As culturas foram mantidas em ambiente escuro de sala de crescimento a uma temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  durante o dia e  $21 \pm 2^\circ\text{C}$  a noite, sendo transferidas sob luz fluorescente (luz branca), com irradiância de  $40 \mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 horas por quatro semanas. As porcentagens de embriões viáveis, de embriões sem resposta e de embriões anormais foram avaliadas após 30 dias. Embriões curvados mostrando raiz primária e lígula foram considerados germinados. Embriões atrofiados sem raízes e parte aérea foram considerados anormais. Após 45 dias, o comprimento da parte aérea foi medido. As plântulas que apresentavam parte aérea e raízes foram transferidas para tubos de polietileno de  $56 \text{ cm}^3$  contendo vermiculita como substrato. Após o plantio, permaneceram em casa de vegetação com iluminação artificial (intensidade luminosa de  $13 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , fotoperíodo de 12 horas e temperatura de  $24 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$  durante o dia e  $20 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$  durante a noite), irrigadas automaticamente por cinco minutos a cada seis horas. O restante das plantas foi utilizado em experimentos de micropropagação.

## 2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com um embrião por tubo e 50 repetições (tubos) por tratamento. O experimento comparando quatro meios de cultura (MS, MS ½, N6, Y3 e MS com e sem fosfato de sódio) foi realizado com dois lotes de sementes, já a comparação entre o meio Y3 com e sem fosfato, foi com três lotes.

Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA pelo teste de Bartlett e comparação das médias pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

## 3 RESULTADOS

### 3.1 RELAÇÃO ENTRE VIGOR, VIABILIDADE E TAXA DE GERMINAÇÃO DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE DENDEZEIRO HÍBRIDO BRS MANICORÉ.

Os embriões zigóticos de dendzeiro híbrido Manicoré foram classificados de acordo com quatro classes de viabilidade, baseando-se na intensidade, uniformidade e localização dos padrões de coloração nas duas partes que constituem o embrião (tigelo e haustório) (FIGURA 2 A). As classes 1 e 2 (FIGURA 2 C, D, E e F) correspondem aos embriões viáveis que possuem capacidade de originar plântulas com raízes e bainhas foliares desenvolvidas. A classe 3 (FIGURA 2 G e H) engloba os embriões viáveis mas com baixo vigor, que encontram-se vivos e com poucas condições de originar uma planta. A classe 4 (FIGURA 2 I e J) corresponde aos embriões que não são viáveis, que podem estar mortos ou incapazes de originar plântulas com raiz, por não possuírem atividade metabólica na porção do tigelo, porção na qual está localizado o eixo embrionário.

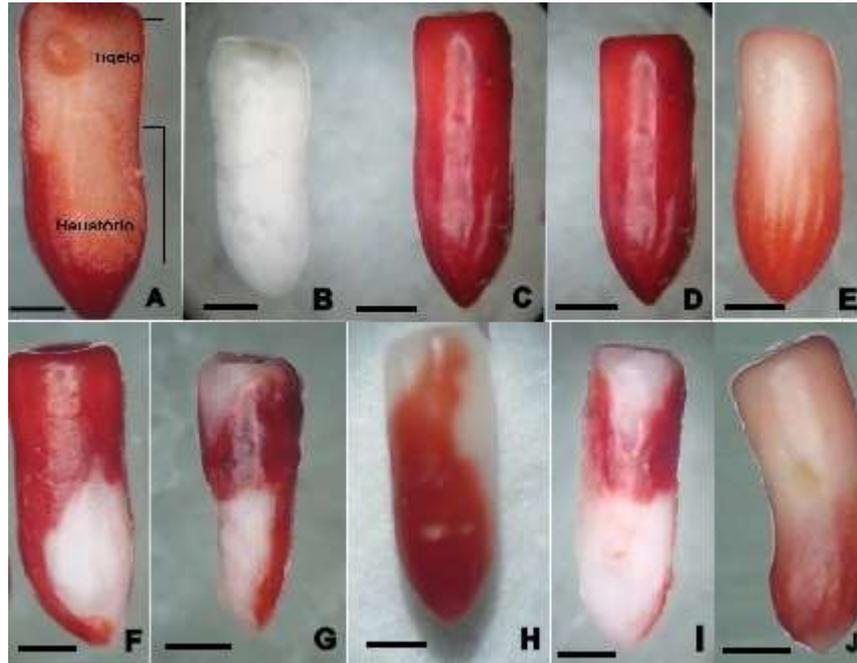


FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO DAS CLASSES DE COLORAÇÃO: A: SECÇÃO LONGITUDINAL DO EMBRIÃO DESTACANDO A LOCALIZAÇÃO DO TIGELO E HAUSTÓRIO. B) EZ NATURAL C) EZ COM COLORAÇÃO DE TETRAZÓLIO; C) e D) CLASSE 1: EMBRIÕES VIÁVEIS; E) e F) CLASSE 2: EZ VIÁVEIS COM MÉDIO VIGOR; G) e H) CLASSE 3: EZ VIÁVEIS COM BAIXO VIGOR; I) e J) CLASSE 4: INVIÁVEIS. BARRA= 1 cm, PARA TODAS AS FIGURAS. FONTE: a autora (2014).

A partir do teste de tetrazólio foi possível verificar a viabilidade dos embriões zigóticos. Conforme apresentado na Tabela 1, a viabilidade varia de acordo com o lote de sementes, o que indica que ela pode ser influenciada pelo genótipo. De seis lotes, somente quatro (CS 428, 1139, 1477 e 1681) tinham a maioria dos embriões na classe 1 pelo teste do tetrazólio, ou seja embriões viáveis que têm a capacidade de originar plântulas bem desenvolvidas.

O lote CS 736 apresenta a maioria dos embriões na classe 2 (TABELA 1). São embriões viáveis, mas com médio vigor, o que indica que ainda tem a capacidade de originar plântulas bem desenvolvidas. A viabilidade dos embriões está relacionada com a germinação e desenvolvimento de plântulas normais (raiz e parte aérea). Pois, esses embriões apresentavam-se viáveis e tinham vigor para germinar, quando cultivados em meios de cultura adequados.

TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO DOS EMBRIÕES DE DENDEZEIRO HÍBRIDO BRS MANICORÉ PELO TESTE DE VIABILIDADE DE TETRAZÓLIO DE ACORDO COM CLASSES DE COLORAÇÃO MÉDIA DE CADA LOTE E MÉDIA GERAL DE TODOS OS LOTES

LOTES							
	CS 428 (%)	CS 735 (%)	CS 736 (%)	CS 1477 (%)	CS 1681 (%)	CS 1139 (%)	Média geral (%)
EZ viáveis com alto vigor	92,0 a	25,0 ab	6,00 b	55,0 a	72,50 a	43,00 a	48,91 a
EZ viáveis com médio vigor	4,0 b	21,0 ab	30,0 a	21,25 b	20,00 b	30,0 ab	21,00 ab
EZ viáveis com baixo vigor	4,0 b	15,00 b	27,0 ab	10,25 b	6,25 bc	20,0 bc	13,75 b
EZ Inviáveis	1,0 b	39,0 a	37,0 a	14,00 b	1,25 c	7,50 c	16,62 b
DMS	8,57	22,35	23,65	29,67	13,93	18,27	30,70
CV%	16,17	42,58	45,05	56,23	26,55	34,64	75,73

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Comparando dois lotes de sementes, CS 428 e 1139, observou-se que 96 e 73% dos embriões eram viáveis pelo teste de tetrazólio (TABELA 2). Entretanto, quando estes foram colocados no meio de cultura Y3 para germinar, apresentaram porcentagens diferentes de germinação (TABELA 2). Pois, apesar do lote CS 428 apresentar uma média superior de viabilidade, nem todos os embriões tinham vigor para se desenvolver já os embriões do lote CS 1139 apresentaram 90% de germinação. Assim, apesar dos embriões estarem viáveis estes devem ter vigor para se desenvolver em plantas.

TABELA 2 - RELAÇÃO ENTRE VIGOR, VIABILIDADE E TAXA DE GERMINAÇÃO DOS EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE DÊNDEZEIRO HÍBRIDO BRS MANICORÉ PARA DOIS LOTES DE SEMENTES

Lotes	Viabilidade (TTC)* (Média da classe I e II) (%)	Germinação em meio Y3 (%)
CS428	96,0	59,0
CS1139	73,0	90,0

\*Tetrazólio

Relacionando a viabilidade média dos embriões de três lotes de sementes (CS 735, CS 1477 e CS 1681) com a germinação no meio Y3, observa-se que os embriões apresentavam viabilidade de 46 a 92,5% respectivamente, e uma média de germinação de 38 a 88% (TABELA 3). Verificamos que os três lotes apresentava-se viáveis e destes todos os embriões tinham vigor para germinar (TABELA 3).

TABELA 3 - COMPARAÇÃO ENTRE A VIABILIDADE E A GERMINAÇÃO DOS EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE DÊNDEZEIRO PARA TRÊS LOTES DE SEMENTES.

Lotes	Viabilidade (TTC)* (Médias de alto e médio vigor) (%)	Germinação no meio Y3 (%)
CS 735	46,0	38,4
CS 1477	76,2	79,0
CS 1681	92,5	88,8

\*Teste de tetrazólio.

### 3.2 INFLUÊNCIA DO MEIO DE CULTURA NA GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS.

Comparando a influência dos meios de cultura MS, MS ½, N6 e Y3 na germinação dos embriões zigóticos do híbrido de dendezeiro BRS Manicoré, lotes CS 428 e 1139, verificamos que o meio de cultura Y3 apresentou 74,5% dos embriões germinados, diferindo estatisticamente do meio N6 que se mostrou inferior aos outros meios de cultura, com apenas 17% de embriões germinados (TABELA 4).

Na primeira semana de cultivo observou-se apenas aumento de volume e intumescimento (FIGURA 3A). Os embriões cultivados por 10 dias apresentaram-se curvados (FIGURA 3B) e após 15 dias continuaram curvados e com formação do gancho plumular com lígula e primórdio radicular (FIGURA 3C). No vigésimo dia foi possível observar o aparecimento dos primórdios foliares e radiculares e a diminuição do tamanho do haustório, isto devido à complementação nutricional fornecida pelo meio de cultura, não havendo mais a necessidade da presença do haustório para suprir nutrientes ao embrião (FIGURA 3D). Após 30 dias, as plântulas já apresentavam parte aérea e raiz primária (FIGURAS 3E e F) e aos 50 dias foram aclimatizadas em casa de vegetação no substrato vermiculita. Embriões cultivados no meio de cultura N6 tiveram alta porcentagem de explantes sem resposta (TABELA 4 e APÊNDICE 1 e 2).

Os embriões zigóticos germinaram em todos os meios de cultura, mas no meio de cultura Y3 o processo de germinação foi melhor com 75% de embriões apresentando primórdio foliar e raiz primária após 30 dias. Os embriões se desenvolveram em plantas completas, ou seja, com raiz e parte aérea definida, diferentemente dos embriões cultivados nos outros meios de cultura (FIGURA 3 I e TABELA 4).

TABELA 4 – GERMINAÇÃO E COMPORTAMENTO DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE DENDEZEIRO (BRS MANICORÉ) (MÉDIA DOS LOTES CS 428 e CS 1139) CULTIVADOS *IN VITRO* EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA APÓS 15 E 30 DIAS

	15 dias	30 dias	30 dias	30 dias	30 dias
Meio de cultura	Curvados com haustório (%)	Germinados (%)	Primórdio foliar e raiz 1ª (%)	Explantes sem resposta (%)	Explantes anormais (%)
MS	33,5 a	46,0 ab	46,0 ab	20,0 ab	1,0 a
MS1/2	30,0 a	35,0 ab	35,0 ab	30,5 ab	5,5 a
N6	13,5 a	17,0 b	17,0 b	65,0 a	5,5 a
Y3	19,5 a	74,5 a	75,0 a	5,0 b	1,5 a
DMS	75,74	46,99	45,00	49,42	18,38
CV%	77,09	25,90	25,90	40,11	133,74

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Embriões não germinados: dados não mostrados.

Após 45 dias de cultivo, o comprimento das plantas variou entre os meios de cultura MS, MS $\frac{1}{2}$ , N6 e Y3 (FIGURA 3 I). Embriões cultivados no meio Y3 tinham 36% de plântulas com 1 a 2 cm de altura e 30% delas tinham de 2 a 6 cm (TABELA 5 e APÊNDICE 3). Já os meios MS, MS  $\frac{1}{2}$  e N6 apresentavam porcentagens de plântulas com tamanho de 1 a 2 cm inferiores a 28%, enquanto que o valor para o tamanho de 2 a 6 cm foi inferior a 4% (TABELA 5, FIGURA 3 I e APÊNDICE 4).

TABELA 5 – EFEITO DO MEIO DE CULTURA NO DESENVOLVIMENTO DA PARTE AÉREA DE PLÂNTULAS DERIVADAS DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE DENDEZEIRO (BRS MANICORÉ) CULTIVADOS *IN VITRO* E OBSERVADOS AOS 45 DIAS

Meios de cultura	Plântulas com 1-2 cm (%)	Plântulas com 2-6 cm (%)	Explantes sem resposta (%)	Explantes anormais (%)
MS	20,0 a	0,5 b	45,0 a	15,0 ab
MS 1/2	27,4 a	3,2 b	41,9 a	24,1 ab
N6	17,7 a	0,5 b	44,0 a	35,2 a
Y3	36,0 a	30,0 a	2,0 b	7,0 b
DMS	38,59	9,43	24,88	24,69
CV%	37,51	27,10	18,38	29,81

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Valores menores que 1 cm não mostrados.

### 3.3 INFLUÊNCIA DA PRESENÇA DO FOSFATO DE SÓDIO NOS MEIOS DE CULTURA MS E Y3 NO DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES.

O desenvolvimento dos embriões foi melhor no meio MS acrescido de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, com 67,5% dos embriões curvados (fase inicial da germinação), enquanto o meio MS sem NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> mostrou uma alta porcentagem de explantes sem resposta (TABELA 6, Figura 3 H e APÊNDICE 5). No trigésimo dia, 50% dos embriões germinaram no meio MS acrescido de fosfato, e neste mesmo meio o desenvolvimento das plântulas continuou melhor com primórdio foliar e raiz primária (49,2%) (TABELA 6 e APÊNDICE 6). No experimento comparando o meio de cultura

MS ou Y3 com ou sem fosfato, não houve diferenças estatísticas entre os resultados (TABELAS 6 e 7).

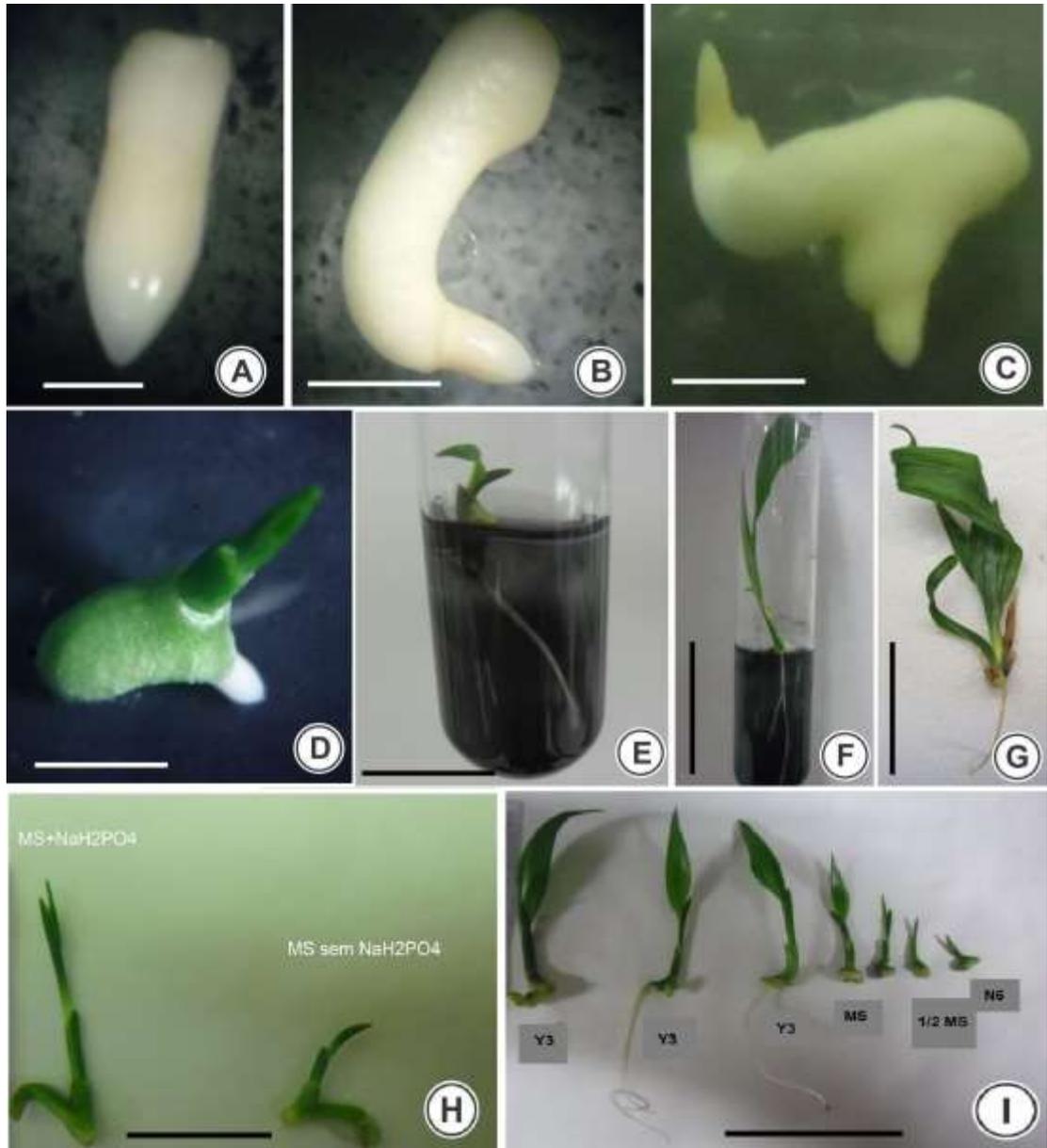


FIGURA 3 – GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES ZIGÓTIÇOS DO HÍBRIDO DE DENDEZEIRO BRS MANICORÉ NO MEIO DE CULTURA Y3 E MS. A) EMBRIÃO INTUMESCIDO COM 5 DIAS. B) PROCESSO DE CURVATURA AOS 10 DIAS. C) EMBRIÃO COM LÍGULA, PLÚMULA E HAUSTÓRIO AOS 15 DIAS. D) PLÂNTULA COM PRIMÓRDIO FOLIAR E RADICULAR COM 20 DIAS. E) RAIZ E FOLHA AOS 30 DIAS. F) 45 DIAS DE CULTIVO. G) RAIZ E FOLHA AOS 50 DIAS. H) COMPARAÇÃO DAS PLÂNTULAS EM MEIO MS COM OU SEM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , AOS 40 DIAS DE CULTIVO. I) INFLUÊNCIA DOS MEIOS DE CULTURA NO DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS AOS 35 DIAS. BARRAS: A= 1,5 cm, B a I= 2 cm. FONTE: a autora (2014).

TABELA 6 – EFEITO DA ADIÇÃO DE FOSFATO DE SÓDIO AO MEIO DE CULTURA MS NO COMPORTAMENTO DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DO HÍBRIDO DE DENDEZEIRO BRS MANICORÉ (MÉDIA DOS LOTES CS 428, CS 1139)

Meios de cultura	15 dias		30 dias		
	Curvados com haustório (%)	Explantos sem resposta (%)	Germinados (%)	Primórdio foliar e radicular (%)	Explantos sem resposta (%)
MS	40,0 b	41,5 a	41,0 a	40,3 a	20,0 a
MS + NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	67,5 a	6,5 b	50,0 a	49,2 a	27,9 b
DMS	24,07	12,55	59,60	59,58	114
CV%	10,40	11,50	31,00	30,90	110,0

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Explantos anormais: dados não mostrados.

No meio de cultura Y3, uma porcentagem maior de embriões se desenvolveu em plântulas completas (raiz e parte aérea) do que no meio MS (TABELA 4) e, portanto, esse meio foi testado novamente, acrescido ou não de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (TABELA 7). No entanto, não houve diferenças estatísticas entre as médias de germinação e desenvolvimento dos embriões (TABELA 7). Em ambos os tratamentos os embriões germinaram e desenvolveram-se após 15 e 30 dias de cultivo (TABELA 7 e APÊNDICE 7 e 8).

TABELA 7 – EFEITO DA ADIÇÃO DE FOSFATO DE SÓDIO AO MEIO DE CULTURA Y3 NO COMPORTAMENTO DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DO HÍBRIDO DE DENDEZEIRO BRS MANICORÉ (MÉDIA DOS LOTES CS 735, CS 1477, CS 1681 e CS 1951)

Meios de cultura	15 dias		Germinados (%)	30 dias		Anormais (%)
	Curvados com haustório	Explantos sem resposta		Explantos com primórdio foliar e radicular	Explantos sem resposta	
Y3	53,05 a	39,15 a	60,00 a	59,14 a	21,20 a	11,32 a
Y3+NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	55,77 a	37,40 a	58,00 a	58,64 a	14,55 a	21,56 a
DMS	55,29	69,41	48,00	48,55	27,29	17,16
CV%	58,75	104,84	47,70	47,66	88,26	60,37

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Explantos anormais com 15 dias: dados não mostrados.

#### 4 DISCUSSÃO

O teste de TTC pode ser utilizado para avaliar a viabilidade dos embriões zigóticos do híbrido de dendê BRS Manicoré. Esse teste baseia-se na atividade das enzimas desidrogenases que atuam nos processos respiratórios dos tecidos, onde ocorre a liberação de íons hidrogênio, com os quais o 2, 3, 5 trifenil cloreto de tetrazólio reage, formando uma substância de cor vermelha e insolúvel, denominada de formazan, nos tecidos da semente (DELOUCHE *et al.*, 1976).

No presente estudo, lotes submetidos ao teste do TTC apresentaram diferentes taxas de viabilidade e, dos seis lotes, somente quatro (CS 428, CS 1139, CS 1477 e CS 1681) tinham capacidade de originar plântulas bem desenvolvidas. O lote CS 428 apresentou resultados similares (92%) aos obtidos por Lima (2013) para dendezeiro (*Elaeis guineensis*): 93% das sementes eram viáveis pelo teste de tetrazólio.

A taxa de germinação das sementes nem sempre está relacionada com a viabilidade de cada lote, pois embriões zigóticos do lote CS 1681, quando cultivados no meio de cultura Y3 com e sem fosfato, apresentaram 92% de viabilidade e germinação de 88,8%. Isto mostra que apesar de 92% estarem viáveis somente 88,8% tinham vigor para germinar. EZ dos lotes CS 428 e 1139 tinham 96 e 73% de viabilidade pelo TTC e, destes 59 e 90% germinaram no meio de cultura Y3, isto pode ser devido a que os lotes eram viáveis, mas os EZ do lote 1139 tinham mais vigor para se desenvolver do que os do lote 428. Outros autores também consideram que o teste do TTC pode ser utilizado para avaliar a viabilidade das sementes de dendê. Por exemplo, Mok (1972) relatou valores médios de viabilidade dos embriões de 98,6% e taxa de germinação *ex vitro* de 95%. Murugesan *et al.* (2002) também encontraram relação entre a viabilidade e a germinação de sementes de dendezeiro, cultivadas em meio de cultura MS suplementado de AIA e cinetina. Esses autores relataram que a porcentagem de germinação foi de 93 e a de viabilidade desses embriões variou entre 88 e 92%, utilizando o TTC nas concentrações de 0,5% e 0,75% respectivamente.

A adição de fosfato de sódio no meio de cultura MS é fundamental para a germinação *in vitro* de dendezeiro híbrido Manicoré. Pois, quando o meio de cultura continha  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 50% dos embriões germinaram após 30 dias de cultivo, enquanto que no meio MS sem  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  houve uma porcentagem inferior de explantes germinados (41%). Em outro estudo (CARDOSO *et al.*, 2010) também adicionaram  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  aos meios MS e  $\frac{1}{2}$  MS e obtiveram 85% de germinação, sendo a adição do fosfato fundamental na conversão de embriões zigóticos em plântulas de dendê híbrido CN 470.

O fosfato é a forma como o fósforo é absorvido pelas células vegetais e essa absorção é mais rápida que a de outros íons. O meio MS possui uma concentração de fosfato insuficiente para algumas plantas e essa concentração é reduzida a zero em poucas semanas (GEORGE *et al.*, 2008). Apesar do meio de cultura MS conter  $170 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , a presença de uma maior quantidade de fosfato é fundamental na maioria das culturas *in vitro*, devido ao papel do fósforo no metabolismo energético e no processo de regulação enzimática, sendo a diferenciação da parte aérea uma das consequências da adição do fósforo ao meio de cultura (SANTIAGO *et al.*, 2001), além de influenciar o desenvolvimento da parte aérea em altura, espessura e da raiz (BARCELOS *et al.*, 2001). Além disso, o

fósforo faz parte dos nucleotídeos, unidades formadoras dos ácidos nucléicos como DNA e RNA, sendo esses ácidos diretamente envolvidos no processo de síntese de proteínas, que irão constituir as estruturas morfológicas das plantas (GEORGE *et al.*, 2008).

O meio de cultura Y3 foi melhor para o desenvolvimento da raiz primária e parte aérea das plântulas do híbrido Manicoré. Quanto à otimização da germinação *in vitro*, no meio Y3 a taxa de germinação foi mais elevada (75%), pelo fato que este meio apresenta os nutrientes próximos do que a planta necessita de forma natural, incluindo o fosfato de sódio ( $320 \text{ mg.L}^{-1}$ ) que não está presente no meio MS, tendo apenas fosfato de potássio ( $170 \text{ mg.L}^{-1}$ ), também apresenta vitaminas diferentes dos outros meios. Segundo Barcelos *et al.* (2001), a mistura de nutrientes como ureia, superfosfato triplo, cloreto de potássio e sulfato de magnésio utilizados na germinação natural, evita que as plantas tenham seu desenvolvimento limitado pela falta de um determinado nutriente. Em outras pesquisas desenvolvidas com dendê ou com seus híbridos, os meios MS, MS  $\frac{1}{2}$  e Y3 também foram adequados, como relatado por Chourykaew *et al.* (1996) que não tiveram diferenças entre esses meios de cultura utilizados na germinação *in vitro* de embriões zigóticos de dendê. Eles obtiveram 90% de germinação nos meios MS  $\frac{1}{2}$  e Y3, já no meio MS foram 85%. Nesta pesquisa, os resultados de germinação dos lotes CS 428 e CS 1139 mostraram que o meio de cultura MS apresentou menores taxas de germinação (42 e 50%) comparadas ao Y3 (59 e 90% respectivamente). Entretanto, Pádua (2012, não publicado) observou que os embriões zigóticos do híbrido de dendezeiro BRS Manicoré com 100 dias após antese tiveram 88% de germinação no meio MS ou Y3.

O presente trabalho mostrou que o meio de cultura indicado para germinação pode variar de acordo com o genótipo de cada lote de sementes de dendezeiro híbrido BRS Manicoré. O desenvolvimento das plantas também varia com o genótipo, pois embriões do lote CJ 2141, cultivados no meio de cultura MS suplementado com fosfato, tinham 37,93% de desenvolvimento da parte aérea e radicular em oito semanas de cultura, já no caso de CJ 502 não houve nenhum desenvolvimento embrionário (ALVES *et al.*, 2011).

## 5 CONCLUSÕES

O teste do TTC pode ser utilizado para verificar a viabilidade dos embriões. A taxa de germinação das sementes esta relacionada com o vigor dos embriões de cada lote. Embriões zigóticos do híbrido de dendezeiro BRS Manicoré apresentaram de 30 a 98% de viabilidade em função do lote, e destes uma média de 70% tinham vigor para se desenvolver em plantas.

A adição de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  no meio de cultura MS é fundamental para a germinação do híbrido de dendezeiro, especialmente quando o meio não contém fosfato de sódio ou contém em baixas concentrações.

O meio de cultura Y3 não necessita da adição de fosfato, pois já contém a concentração adequada para a germinação e desenvolvimento das plantas. Sendo considerado o melhor meio de cultura para o desenvolvimento de plântulas com parte aérea e raiz no híbrido de dendezeiro.

## REFERÊNCIAS

- ALVES, S. A. O. **Resgate *in vitro* de híbridos interespecíficos de dendezeiro *Elaeis guineensis* Jacq.** 63p. Dissertação. (Mestrado em Botânica). Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, PA, 2007.
- ALVES, S. A. O.; LEMOS, O. F. de.; FILHO, B. G. S. dos.; SILVA, A.L. In vitro protocol optimization for development of interspecific hybrids of oil palm (*Elaeis oleifera* (H.B.K) Cortés x *E. guineensis* Jacq). **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v.2, n. 3, p.1-6, 2011.
- ANGELO, P. C. S. da.; MORAES, L. A. C.; SOUSA, N. R.; LOPES, R.; CUNHA, R. N. V. da. Resgate de embriões híbridos de dendezeiro x caiaué. **Comunicado Técnico nº 265** – Embrapa, Manaus, AM, 2007.
- BARROS, D. I.; DIAS, D. C. F. S.; BHERING, M. C.; DIAS, L. A. S.; A, E.F. Uso do teste de tetrazólio para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de abobrinha. **Revista Brasileira de Sementes**, v.27, nº2, p.165-171, 2005.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: Mapa/ACS, 395p. 2009.
- CARDOSO, J. de N. O. **Conversão *in vitro* de embriões zigóticos de híbridos de dendezeiro (*Elaeis guineensis* x *E. oleifera*) em plântulas**. 52p. Dissertação (Mestrado Agronomia) Universidade Federal Rural da Amazônia. Belém, PA. 2010.
- COSTA, N. M. de S. e ALOUFA, M. A. I. Organogênese direta de *Phoenix dactylifera* L. via pecíolo cotiledonar. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.36, n.3, p.195-198, 2006.
- CUNHA, R. N. V.; LOPES, R.; ROCHA, R. N. C.; LIMA, W. A. A; TEIXEIRA, P. C.; BARCELOS, E.; RODRIGUES, M. R. **Domesticação e melhoramento do caiaué**. In: BORÉM, A; LOPES, M. T. G; CLEMENT, C. R. (Ed.). Domesticação e melhoramento: espécies amazônicas. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. p.275-296, 2009.
- CHOURYKAEW, B.; KANCHANAPOOM, K. *In vitro* culture of embryos and callus of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Journal of the Science Society of Thailand**, v.22, p.1-12. 1996.
- CHU, C. C.; WANG, C. C.; SUN, C. C.; HSU, C.; YIN, K. C.; CHU, C. Y.; BI, F. Y. Establishment Of An Efficient Medium For Anther Culture Of Rice Through Comparative Experiments On The Nitrogen Sources. **Science Sinica**. v.18, p. 659, 1975.

DELOUCHE, J. C.; STILL, T. W.; RASPET, M.; LIENHARD; M. O teste de tetrazólio para viabilidade da semente. Brasília: **AGIPLAN**, 1976.

EEUWENS, C.J. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera* L.) and culture *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, v. 36. p. 23-28, 1976.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. Part 1: The technology. Second edition. Exegetics Ltd. England. 570 p. 1993.

GREEN, M. **Avaliação da qualidade de sementes de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) produzidas pela Embrapa Amazônia Ocidental**. 79p. Tese (Doutorado em Agronomia Tropical) Universidade Federal do Amazonas – UFAM, 2012.

KIEM, S. C. Propagation of palms. **Principes**, v.2, p. 133-138, 1958.

KOEBERNIK, J. Germination of palm seed. **Principes**, v.15, p. 134-137, 1971.

LEMOS, O. F.P. **Mutagênese e tecnologia *in vitro* no melhoramento genético de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.)**. Tese (Doutorado em Genética). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2003.

LIMA, S. C. S de. **Teste de germinação *in vitro* e de viabilidade em embriões zigóticos de dendê (*Elaeis guineensis*)**. Relatório (Bolsista na Embrapa) Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq. Manaus, AM, 2013.

MEEROW, A. W. **Palm seed germination**. Florida: Cooperative Extension Service, 9p. 1991.

MOK, K.C. The tetrazolium test for evaluating the viability of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) seed. **Proceedings of the International Seed Testing Association**, v. 37, n. 3, p.771-77, 1972.

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

MURUGESAN, P.; VANANGAMUDI, K.; UMARANI, R. Evaluation of viability of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) seeds by tetrazolium test and comparison with germination and in vitro culture results. **Proceedings of the 15th Plantation Crops Symposium Placrosym XV**. p. 246-250, 2002.

NERY, M.C; CARVALHO, M.L.M. de; OLIVEIRA, L.M. de. Teste de tetrazólio para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de melancia. **Semina: Ciências Agrárias**, v.28, p.365-372, 2007.

PÁDUA, M. S. **Germinação *in vitro*, indução e caracterização de massas pró-embriogênicas de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.)**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, MG, 2012.

SANTIAGO, E. J. A.; PAIVA, R; PAIVA, P. D. O.; SANTANA, J. R. F.; GOMES, G. A. C. **Meios de cultura: Cultura de tecidos**. Paiva e Paiva, UFLA, Lavras, M.G. v.3, p 22-35, 2001.

SILVA, V.S. **Regeneração *in vitro* de embriões de *Cocos nucifera* L.** Dissertação (Mestrado em Ciências) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2002.

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**. DOI.10.1007/s11240-012-0170-5, 2012.

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

THAVARUNGKUL, P.; KANCHANAPOOM, K. Effect of applied currents to growth in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) tissue cultures. **Journal of Science, Technology and Society**, v.24, n.2, p.283-291, 2002.

## CAPÍTULO 2

### EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS E TCLs DE DENDEZEIRO HÍBRIDO BRS MANICORÉ (*Elaeis guineensis* x *E. oleifera*)

#### RESUMO

A embriogênese somática é um método de propagação vegetativa pelo qual células somáticas dão origem a uma planta sem que ocorra a fusão de gametas. Para espécies de palmeiras, técnicas de propagação vegetativa não estão disponíveis, porque as plantas apresentam um único meristema. Para iniciar o processo de embriogênese somática, foram utilizados embriões zigóticos (EZ) e “thin cell layer” (TCL) da parte aérea de plântulas germinadas *in vitro*. Os EZ foram inoculados em meios de cultura Y3 e MS suplementados com picloram ou 2,4-D (500 µM) e Y3 com ou sem 2,4-D (250, 500, 750 µM), todos adicionados de 3% de sacarose, 2 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado (CA) e 6 g.L<sup>-1</sup> de ágar. Os calos formados foram transferidos para meio Y3 com 100 µM de picloram ou 2,4-D e 7,9 µM de BAP ou 2iP. Para a etapa de formação de calos embriogênicos e de embriões somáticos (ES), os calos foram transferidos para meio Y3 suplementado ou não de 9 ou 27 µM de 2,4-D, 1000 µM de putrescina e 0,5 g.L<sup>-1</sup> de CA. ES foram obtidos no meio Y3 acrescido ou não de 2,4-D (9 µM) + 1000 µM de putrescina (37,16 e 43,3% respectivamente) e 40% foram convertidos em plântulas no meio Y3 sem reguladores contendo 3% de sacarose, 2 g.L<sup>-1</sup> de CA e 6 g.L<sup>-1</sup> de ágar, em condições de luz. Os TCLs basais da parte aérea foram inoculados primeiro no meio Y3 suplementado de 2,4-D (500 ou 800 µM) e, em outro experimento, foi testado o meio Y3 com 2,4-D (250, 500, 800 ou 1000 µM). Nos dois experimentos, os meios foram adicionados de 2 g.L<sup>-1</sup> de CA, 3% de sacarose e 2,5 g.L<sup>-1</sup> de Gelzan. Para a formação de calos embriogênicos e ES, os calos foram transferidos para meio Y3 com ou sem 2,4-D (50 ou 100 µM) acrescido de 100 µM de putrescina e 0,5 g.L<sup>-1</sup> de CA. ES foram obtidos nestes meios em 49 a 53% dos calos e 50% foram convertidos em plântulas no meio Y3 sem reguladores, com 2 g.L<sup>-1</sup> de CA em condições de luz. 50 plantas foram aclimatizadas em casa de vegetação.

Palavras-chave: meio de cultura Y3, propagação *in vitro*, putrescina, *thin cell layer*.

## ABSTRACT

Somatic embryogenesis is an efficient method for large-scale production of oil palm plants. Other vegetative propagation techniques are not available due to the biological characteristics of the plant. To begin the process of somatic embryogenesis, zygotic embryos (EZ) and TCL (Thin Cell Layer) of shoots of seedlings grown *in vitro* were used. EZ were inoculated in Y3 and MS media supplemented with 2,4-D or picloram (500  $\mu\text{M}$ ), Y3 with or without 2,4-D (250, 500, 750  $\mu\text{M}$ ), 3% sucrose, 2  $\text{g.L}^{-1}$  activated charcoal (AC) and 6  $\text{g.L}^{-1}$  agar. The calluses were transferred to a Y3 medium with 100  $\mu\text{M}$  auxin and 7.9  $\mu\text{M}$  BAP or 2iP, so as to obtain embryogenic masses. For maturation of embryogenic masses and formation of somatic embryos (ES), they were transferred to Y3 medium supplemented or not with 9 or 27  $\mu\text{M}$  2,4-D, 1000  $\mu\text{M}$  putrescine and 0,5  $\text{g.L}^{-1}$  AC. ES were obtained in Y3 medium with or without 2,4-D (9  $\mu\text{M}$ ) + 1000  $\mu\text{M}$  putrescine (37.16 and 43.3%, respectively) and were converted to seedlings in the Y3 medium without regulators containing 3% sucrose, 2  $\text{g.L}^{-1}$  of AC and 6  $\text{g.L}^{-1}$  agar in the presence of light. TCLs of shoots bases were first inoculated in Y3 medium supplemented with 2,4-D (500 or 800  $\mu\text{M}$ ) and in another experiment, Y3 medium with or without 2,4-D (250, 500, 800 or 1000  $\mu\text{M}$ ) was tested. In all cases, 2  $\text{g.L}^{-1}$  AC, 3% sucrose and 2,5  $\text{g.L}^{-1}$  Gelzan were added to the media. For differentiation into ES and maturation, the calli were transferred to the same medium with or without 2,4-D (50 or 100  $\mu\text{M}$ ) plus 100  $\mu\text{M}$  putrescine and 0.5  $\text{g.L}^{-1}$  AC. ES were obtained in the media of differentiation and maturation in 49 to 53% of the explants and were converted into seedlings in Y3 medium without regulators, with 2  $\text{g.L}^{-1}$  AC in the presence of light.

Keywords: Y3 culture medium, *in vitro* propagation, putrescine, *thin cell layer*.

## 1 INTRODUÇÃO

O dendezeiro (*Elaeis guineensis*) está, entre as oleaginosas cultivadas, a mais produtiva, com rendimentos superiores a 25 toneladas de cachos por ha/ano (FURLAN, 2003). Do ponto de vista econômico, possui vida útil de 25 anos. Dos frutos são extraídos dois tipos de óleos: óleo de palma retirado da polpa ou mesocarpo e palmiste obtido da amêndoa ou endosperma (ALVES, 2007). Os óleos são utilizados na fabricação de cosméticos, na indústria oleoquímica, alimentícia e na alimentação animal no preparo das rações balanceadas obtidas por uma mesclagem com a torta de palmiste (FURLAN, 2003). O óleo também é rico em vitaminas A e E, tocoferol e tocotrianol, poderosos antioxidantes, ajudando a combater os radicais livres do organismo e o colesterol e atuando também como anticoagulante (KALINKA, 2002).

A cultura de dendezeiro sofre com pragas e doenças, como o amarelecimento fatal, e possui germinação lenta pelos métodos convencionais (PÁDUA *et al.*, 2013). No entanto, para solucionar algumas limitações como a resistência a doenças, foi desenvolvido o híbrido interespecífico BRS Manicoré, resultante do cruzamento entre *Elaeis guineensis* (africano) e *E. oleifera* (amazônico). Possui características de resistência a pragas e doenças, principalmente ao amarelecimento fatal, e menor crescimento vertical do estipe (CONCEIÇÃO *et al.*, 2000; CUNHA *et al.*, 2010). Os frutos têm alto teor de óleos e elevado teor de ácido graxo insaturado, o que coloca o óleo produzido por este híbrido em condições de produzir biodiesel de alta qualidade (COLLARES, 2011).

A germinação do híbrido é baixa (30%) por métodos convencionais devido ao aborto dos embriões dentro da semente (ALVES *et al.*, 2011). Diante do exposto, a embriogênese somática é uma alternativa promissora para a multiplicação e produção de mudas desta espécie em grande escala. Essa técnica vem se destacando como método de multiplicação, por permitir a obtenção de plantas a partir de células haplóides ou somáticas sem que ocorra a fusão de gametas (GUERRA *et al.*, 1999).

Em palmeiras, a embriogênese somática apresenta vantagens sobre as demais técnicas de micropropagação, como na produção de vários embriões em um espaço limitado e o desenvolvimento direto de plantas a partir de embriões

individualizados (GUERRA *et al.*, 1999). Vários autores tiveram sucesso na formação de calos e obtenção de embriões somáticos em meio de cultura com 2,4-D (JONES, 1974; RABECHAUULT; MARTIN, 1976; PARANJOTHY; OTHMAN, 1982; NWANKWO; KRIKORIAN, 1983; BLAKE, 1983; DUVAL *et al.*, 1988; PARANJOTHY *et al.*, 1989). Para *Elaeis guineensis*, Teixeira (1989) propôs a utilização de embriões zigóticos, maduros ou imaturos, como fonte de explantes, com possível utilização em larga escala. Em 1993, Teixeira *et al.* induziram calos em 55% a 88% dos embriões imaturos. A formação de calos a partir de embriões maduros foi de 93% e, após aproximadamente nove meses de cultivo, alguns setores desses calos primários formaram calos embriogênicos friáveis. De Touchet *et al.* (1991) desenvolveram um protocolo utilizando suspensões celulares de calos embriogênicos obtidos a partir de segmentos de folhas imaturas de dendezeiro. Sogeke *et al.* (1996) induziram a ES em explantes de folhas imaturas de dendezeiro. Kanchanapoom e Domyoas (1999) cultivaram embriões zigóticos de frutos maduros de dendê var. Tenera. Carvalho (2009) desenvolveu um protocolo de embriogênese somática a partir de folhas e flores imaturas de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq). Balzon *et al.* (2013) realizaram novas pesquisas para melhorar a eficiência da embriogênese somática no dendezeiro a partir de embriões zigóticos maduros. Pádua (2013) induziu massas pró-embriogênicas em explantes foliares de *Elaeis guineensis* híbrido Tenera e caracterizou essas massas de forma citoquímica e ultraestrutural quanto às características embriogênicas.

Dentro das técnicas de micropropagação, a do “*thin cell layer*” (TCL) tem como vantagem o uso de explante de tamanho reduzido com maior contato com o meio de cultura (TRAN THANH VAN, 1980). Em palmeiras, a técnica foi utilizada com sucesso para pupunha (*Bactris gasipaes*) (STEINMACHER *et al.*, 2007), *Acrocomia aculeata*, (PADILHA, 2013) e, para o dendezeiro (*Elaeis guineensis*), (SCHERWINSKI-PEREIRA *et al.*, 2010).

Essa pesquisa foi desenvolvida para atender à necessidade de multiplicação e produção de mudas do híbrido de dendezeiro BRS Manicoré, visando à produção em menor tempo e em escala que atenda a demanda nacional. O objetivo foi obter um protocolo de embriogênese somática a partir de embriões zigóticos e pela técnica do “*thin cell layer*” (TCL), utilizando a parte aérea de plântulas cultivadas *in vitro*.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Selecionar o meio de cultura, a auxina e a concentração adequada para a formação de calos em embriões zigóticos (EZ) e TCLs basais da parte aérea;
2. Identificar a citocinina e as auxinas mais adequadas para a multiplicação de calos a partir de EZ;
3. Verificar a concentração ideal de auxina para a formação e maturação dos embriões somáticos obtidos a partir de EZ e TCLs;
4. Determinar um meio adequado para conversão dos embriões somáticos em plântulas;
5. Aclimatizar plântulas do meio *in vitro* para meio *ex vitro*.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAL VEGETAL

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Micropropagação do Departamento de Botânica – UFPR, Curitiba, Brasil.

Foram utilizados embriões zigóticos de frutos maduros coletados após 150 dias da polinização obtidos de plantas matrizes provenientes do cruzamento controlado de plantas selecionadas do híbrido BRS Manicoré (*E. guineensis* x *E. oleifera*), fornecidas pela EMBRAPA - Amazônia Ocidental.

### 2.2 DESINFESTAÇÃO DAS SEMENTES E DOS EMBRIÕES PARA INTRODUÇÃO *IN VITRO*

Inicialmente, o endocarpo foi removido para a obtenção das amêndoas; em seguida foram lavadas com sabão neutro e água corrente e imersas em álcool etílico 70% por cinco minutos e em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 10% por 20 minutos adicionado de Tween 20 a 1% e enxaguadas quatro vezes com água

destilada estéril. Os embriões zigóticos foram isolados e em seguida desinfestados com NaClO comercial (10% de cloro ativo) a 2% por 5 minutos, lavados em água destilada estéril e inoculados em placas de Petri com meios de cultura.

## 2.3 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

### 2.3.1 EFEITO DO MEIO DE CULTURA E DE CONCENTRAÇÕES DE PICLORAM OU 2,4-D NA FORMAÇÃO DE CALOS A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS

Os embriões foram introduzidos em placas de Petri de 9 cm de diâmetro e 2 cm de altura contendo 15 ml de meio de cultura, com cinco embriões por placa e 10 repetições (por tratamento). Num primeiro experimento foram utilizados os meios MS e Y3 suplementados ou não com 500  $\mu\text{M}$  de 2,4-D ou picloram e, no segundo experimento, em meio Y3 suplementado ou não de 2,4-D (250, 500 ou 750  $\mu\text{M}$ ). Todos os meios foram acrescidos de 2  $\text{g.L}^{-1}$  de CA, 30  $\text{g.L}^{-1}$  de sacarose e 6  $\text{g.L}^{-1}$  de ágar (Vetec) e o meio MS também foi acrescido de 500  $\text{mg.L}^{-1}$  de cisteína. Após 30 dias foram avaliadas as porcentagens de embriões zigóticos formando calos a cada mês.

Após três meses foi avaliada a consistência dos calos (friável ou compacto) e os calos foram sub cultivados no meio MS e Y3 diminuindo a concentração das auxinas (2,4-D ou picloram) para 100  $\mu\text{M}$ , acrescidos de 7,9  $\mu\text{M}$  de 2-iP ou BAP.

### 2.3.2 FORMAÇÃO DE CALOS EMBRIOGÊNICOS E EMBRIÕES SOMÁTICOS E CONVERSÃO EM PLÂNTULAS

Os calos friáveis ou compactos obtidos no meio de cultura Y3 com 2,4-D ou picloram combinado com BAP ou 2iP, foram transferidos de forma aleatória para meio Y3 suplementado ou não com 9 ou 27  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, acrescidos de 1000  $\mu\text{M}$  de putrescina e 0,5  $\text{g.L}^{-1}$  de CA. O desenvolvimento dos calos foi observado a cada 30

dias e as variáveis, calos embriogênicos e não embriogênicos foram avaliadas aos 150 dias.

Após dois meses no meio Y3 com 9 ou 27  $\mu\text{M}$  de 2,4D, acrescidos de 1000  $\mu\text{M}$  de putrescina, os calos que não formaram embriões, foram sub cultivados em meio Y3 acrescido de 9  $\mu\text{M}$  de 2,4D e 1000  $\mu\text{M}$  de putrescina. Após 30 dias foram avaliadas as variáveis calos com embriões globulares e calos não embriogênicos.

Os calos com embriões globulares e torpedo foram transferidos para meio Y3 sem reguladores para maturação e conversão em plântulas. Após uma a três semanas as variáveis formações de raiz e folha foram avaliadas.

### 2.3.3 EFEITO DO MEIO DE CULTURA E DE CONCENTRAÇÕES DE PICLORAM OU 2,4-D NA INDUÇÃO DE CALOS A PARTIR DE TCLs

Plântulas germinadas *in vitro* de 2-6 cm de altura com 30 a 50 dias de cultivo foram utilizadas como fonte de explantes. Tiveram primórdio radicular e pecíolo cotiledonar removidos, restando o primórdio foliar. Este foi seccionado transversalmente a partir da base até o ápice em segmentos de aproximadamente 1 mm de espessura (TCLs) que foram utilizados como explantes. A partir de TCLs basais (TCL-b) (FIGURA 1), dois experimentos foram realizados: 1) cultivo no meio Y3 adicionado ou não de 2,4-D (500 ou 800  $\mu\text{M}$ ), 2) Y3 adicionado ou não de outras concentrações de 2,4-D (250, 500, 800 e 1000  $\mu\text{M}$ ). Todos os meios foram suplementados com 2  $\text{g.L}^{-1}$  de CA, 3% de sacarose e 2,5  $\text{g.L}^{-1}$  de Gelzan (Sigma-Aldrich).

Para a indução de calos em TCLs da porção central da parte aérea (FIGURA 1), foram realizados dois experimentos: 1) em meios de cultura Y3 ou SH (SCHENK e HILDEBRANDT, 1972) suplementados com 500  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, 2) em meio SH adicionado ou não de picloram em diferentes concentrações (225, 445, 675  $\mu\text{M}$ ). Ambos os meios foram acrescidos de 2  $\text{g.L}^{-1}$  de CA, 2,5  $\text{g.L}^{-1}$  de Gelzan e o meio SH também foi acrescido de 100  $\text{mg.L}^{-1}$  de glutamina. O desenvolvimento dos explantes foi avaliado aos 60 dias com avaliação da porcentagem de explantes formando calos.

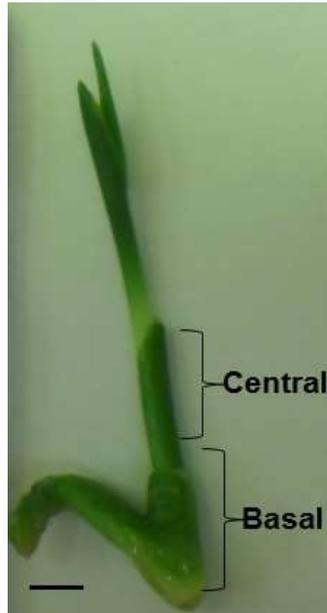


FIGURA 1 – POSIÇÃO DOS CORTES NA PARTE AÉREA DE PLÂNTULAS DO HÍBRIDO BRS MANICORÉ. BARRA: 1 cm.

#### 2.3.4 FORMAÇÃO DE CALOS EMBRIOGÊNICOS E DE EMBRIÕES SOMÁTICOS A PARTIR DE TCLs BASAIS

Após 90 dias, os calos obtidos nos meios de formação de calos em TCL basais foram sub-cultivados no meio Y3 acrescido de 100  $\mu\text{M}$  de putrescina e de duas concentrações de 2,4-D (50 e 100  $\mu\text{M}$ ). Os calos com embriões somáticos imaturos foram transferidas para meio de cultura Y3 sem reguladores para maturação e conversão.

Os meios de formação de calos embriogênicos tiveram a concentração de CA diminuída para 0,5  $\text{g.L}^{-1}$  e, para as etapas de maturação e conversão, foi adicionado 2  $\text{g.L}^{-1}$  de CA, 30  $\text{g.L}^{-1}$  de sacarose e 2,5  $\text{g.L}^{-1}$  de Gelzan.

Após quatro meses foi avaliada a porcentagem de calos friáveis ou compactos e, após seis meses, a porcentagem de calos embriogênicos ou não embriogênicos. Foi considerado calo não embriogênico o calo friável (Figura 2 D) e embriogênico o calo onde embriões globulares apareceram (Figura 2 E).

## 2.4 CONDIÇÕES DE CULTURA E ACLIMATIZAÇÃO DAS PLANTAS

O pH de todos os meios de cultura foi ajustado para 5,8 com NaOH ou HCl 0,1 N e os meios foram autoclavados a 120 °C por 20 minutos. O carvão ativado foi adicionado juntamente com o agente gelificante, Gelzan, após o ajuste do pH.

As culturas foram mantidas em ambiente escuro de sala de crescimento a uma temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  durante o dia e  $21 \pm 2^\circ\text{C}$  a noite, sendo transferidas sob luz fluorescente (luz branca), com irradiância de  $40 \mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 horas após quatro semanas.

As plântulas que apresentavam parte aérea e raízes foram transferidas para tubos de polietileno de  $56 \text{ cm}^3$  contendo vermiculita como substrato. Após o plantio, permaneceram em casa de vegetação com iluminação artificial (intensidade luminosa de  $13 \mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , fotoperíodo de 12 horas e temperatura de  $24 \pm 5^\circ\text{C}$  durante o dia e  $20 \pm 5^\circ\text{C}$  durante a noite), irrigadas automaticamente por 5 minutos a cada seis horas.

## 2.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com 10 repetições (placas de Petri) e cinco embriões/placa para experimentos a partir de embriões zigóticos e seis explantes/placa para os de TCLs.

Os experimentos de indução de calos a partir de embriões zigóticos foram repetidos duas vezes, os de TCLs basais quatro vezes e TCLs centrais duas vezes. Os de formação de calos embriogênicos a partir de embriões zigóticos foram repetidos duas vezes e de maturação e conversão dos ES quatro vezes. Já experimentos de formação de calos embriogênicos a partir de TCL-b foram repetidos três vezes.

Para a conversão de embriões somáticos a partir de embriões zigóticos e TCLs, foram utilizados 616 e 250 repetições (tubos) respectivamente, com um embrião/tubo. As variáveis avaliadas foram: porcentagem de formação e consistência dos calos, formação de calos embriogênicos e embriões somáticos.

Os dados foram submetidos à análise de homogeneidade de variâncias ANOVA pelo teste de Bartlett e comparação das médias pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

### **3 RESULTADOS**

#### **3.1 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA A PARTIR DE EZ**

##### **3.1.1 INFLUÊNCIA DO MEIO DE CULTURA, DO TIPO E DAS CONCENTRAÇÕES DE AUXINA NA INDUÇÃO DE CALOS A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS.**

Aos 15 e 30 dias após a inoculação dos embriões zigóticos em meios de cultura MS e Y3 foi possível visualizar a formação de calos nos embriões cultivados nos meios que continham as auxinas 2,4-D ou Picloram (FIGURA 2 A e B). Aos 30 dias de cultivo, 76% dos explantes formaram calos em meio Y3 suplementado de 2,4-D (TABELA 1 e APÊNDICE 9), enquanto que, nos meios sem auxina, os EZ germinaram e não formaram calos (dados não mostrados). Após 90 dias, a formação de calos ocorreu nos explantes que estavam sem resposta (dados não mostrados). Todos os meios apresentavam calos com consistência friável capazes de se transformar em calos embriogênicos (TABELA 1, FIGURA 2 C, D, E e F e APÊNDICE 10). Os meios MS com 2,4-D e Y3 com picloram foram os mais indicados para a formação de calos friáveis, sendo observados em 62,11 e 59,29% dos explantes respectivamente, após 90 dias, diferindo estatisticamente dos outros meios (TABELA 1).

TABELA 1 – FORMAÇÃO DE CALOS A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE DENDEZEIRO HÍBRIDO BRS MANICORÉ APÓS 30 DIAS EM DOIS MEIOS DE CULTURA ADICIONADOS DE 500  $\mu\text{M}$  DE AUXINA. CONSISTÊNCIA DOS CALOS APÓS 90 DIAS. MÉDIAS DOS LOTES CS 428, CS 736, CS 1477 e CS 1681

Meio e auxina (500 $\mu\text{M}$ )	30 dias		90 dias	
	Formação de calos (% dos explantes)	Sem resposta (%)	Calos friáveis (%)	Calos compactos (%)
MS+2,4-D	52,83 a	47,17 a	62,11 a	15,80 b
MS+Picloram	65,65 a	34,35 a	43,00 b	39,00 a
Y3+2,4-D	76,32 a	23,68 a	44,59 b	36,40 a
Y3+Picloram	60,90 a	39,10 a	59,29 a	36,00 a
DMS	32,6	38,62	7,66	6,82
CV%	28,1	42,0	3,60	5,26

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Formação de calos após 90 dias: dados não mostrados.

Comparando diferentes concentrações de 2,4-D no meio de cultura Y3 observou-se que nas concentrações de 250 e 500  $\mu\text{M}$ , houve uma melhor porcentagem (49 e 62) de explantes formando calos, respectivamente (TABELA 2 e APÊNDICE 12) aos 30 dias de cultura. Enquanto que, nos meios sem 2,4-D ou contendo 750  $\mu\text{M}$ , a taxa de formação de calos foi menor (0,25 e 31,3%) (TABELA 2). Após 90 dias, os meios contendo 250 e 500  $\mu\text{M}$  apresentaram 58,7 e 72,1% de calos friáveis diferindo estatisticamente da concentração de 750  $\mu\text{M}$  (TABELA 2 e APÊNDICE 13).

TABELA 2 – FORMAÇÃO DE CALOS A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE DENDEZEIRO HÍBRIDO BRS MANICORÉ NO MEIO DE CULTURA Y3 ADICIONADO DE TRÊS CONCENTRAÇÕES DE 2,4-D APÓS 30 DIAS (MÉDIA DOS LOTES CS 47 e CS 1951).

Concentrações de 2,4-D ( $\mu\text{M}$ )	30 dias	90 dias	
	Formação de calos (% dos explantes)	Calos friáveis (%)	Calos compactos (%)
controle	0,25 b	----	----
250	49,10 a	58,7 a	41,4 b
500	62,27 a	72,1 a	27,8 b
750	31,30 ab	23,7 b	76,2 a
DMS	47,22	34,23	33,89
CV%	32,45	15,98	16,81

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

### 3.1.2 EFEITO DE BAP OU 2iP COMBINADO COM 2,4-D OU PICLORAM NA ETAPA DE MULTIPLICAÇÃO DE CALOS.

Explantes com calos cultivados por 150 dias em meios MS ou Y3 acrescidos de 2,4-D ou picloram (Tabela 1), transferidos no meio de cultura Y3 contendo somente auxina ou auxina e citocinina, apresentaram calos embriogênicos (FIGURA 2 G, H e I) independentemente do tipo de regulador vegetal; no entanto, em meios sem citocinina ou com 2iP combinado ao picloram, a formação desses calos foi menor (38,70, 15,62 e 39,06%) (TABELA 3 e APÊNDICE 15). A combinação de qualquer auxina (picloram ou 2,4-D) com BAP proporcionou maior formação de calos embriogênicos (50 e 54% respectivamente), assim como a combinação de 2,4-D e 2iP (51,65%) (TABELA 3).

TABELA 3 –MULTIPLICAÇÃO DE CALOS FORMADOS A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE DENDEZEIRO HÍBRIDO BRS MANICORÉ EM MEIO DE CULTURA Y3 ADICIONADO DE 100 µM DE AUXINA E 7,9 µM DE CITOCININA APÓS 60 DIAS.

Reguladores vegetais	Calos embriogênicos		Calos não-embriogênicos	
	(n/N)*	(%)	(n/N)*	(%)
2,4 -D	12/31	38,75 b	19/31	59,87 bc
PICLORAM	5/31	16,12 c	26/31	83,875 a
2,4 -D+ 2iP	15/29	51,65 a	14/29	48,30 d
PICLORAM + 2iP	25/64	39,06 b	39/64	60,93 b
2,4 -D+BAP	20/37	54,06 a	17/37	45,88 d
PICLORAM+ BAP	28/56	50,00 a	28/56	50,00 cd
DMS		9,89		10,44
CV%		5,99		4,55

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Calos sem desenvolvimento, dados não mostrados. Médias de duas repetições.\*n= número de calos embriogênicos ou não. N= número total de calos.

### 3.1.3 EFEITO DE DUAS CONCENTRAÇÕES DE 2,4-D NA FORMAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS.

Calos cultivados dois meses nos meios de multiplicação (Y3 com picloram, 2,4-D+BAP ou 2iP) (Tabela 3), transferidos no meio Y3 com ou sem 2,4-D (9 ou 27

$\mu\text{M}$ ), acrescido de 1000  $\mu\text{M}$  de putrescina, apresentaram pré-embriões somáticos ou embriões somáticos globulares (FIGURA 2 G e H e APÊNDICE 16). Em todos os meios de cultura ocorreu formação de embriões somáticos, independentemente da presença de auxina e da concentração (FIGURA 2 G, H e I), mas no meio sem 2,4-D ou com 9  $\mu\text{M}$  houve maior formação de embriões somáticos, em 37 e 43% dos explantes, respectivamente (TABELA 4 e APÊNDICE 17). Cada calo formou uma média de 25 a 30 embriões após 60 dias.

TABELA 4 – FORMAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE DENDEZEIRO HÍBRIDO BRS MANICORÉ EM MEIO DE CULTURA Y3 ADICIONADO DE 2,4-D E DE 1000  $\mu\text{M}$  DE PUTRESCINA APÓS 60 DIAS.

2,4-D ( $\mu\text{M}$ )	Calos com embriões*		Calos embriogênicos***		Calos friáveis	
	(n/N)**	(%)	(n/N)*	(%)	(n/N)*	(%)
0	34/91	37,36 a	53/91	58,24 a	4/91	4,39 a
9	53/121	43,80 a	56/121	46,28 a	14/121	11,57 a
27	19/101	18,81 b	58/101	57,48 a	24/101	23,76 a
CV%		119,76		65,56		149,71
DMS		79,74		69,59		39,33

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Médias de quatro repetições. \* nos estádios escutelar e torpedo. \*\*n= número de calos com embriões, calos embriogênicos e friáveis. N= número total de calos. \*\*\* com embriões globulares.

Os embriões somáticos no estágio de torpedo (FIGURA 2 J), transferidos para o meio de conversão (Y3 sem reguladores) em condições de luz apresentaram coloração branca após uma a duas semanas (FIGURA 2 J e TABELA 5). Após duas semanas apresentavam coloração verde e iniciou-se o alongamento do pecíolo cotiledonar, a emissão da radícula e plúmula (FIGURA 2 K e TABELA 5). Alguns dos embriões foram considerados anormais, pois ficavam verdes, mas não emitiam raiz nem pecíolo cotiledonar e outros apresentavam somente raiz (TABELA 5). 40% dos embriões somáticos foram convertidos em plantas, e após 45 dias, 50 plantas continham parte aérea e radicular e foram aclimatizadas em casa de vegetação. As que não apresentavam essas características ficaram mais tempo *in vitro*. Após 15 dias, 5% das plantas aclimatizadas sobreviveram (dados não mostrados).



FIGURA 2 - ETAPAS DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DO HÍBRIDO DE DENDEZEIRO BRS MANICORÉ (*Elaeis guineensis* x *E. oleifera*). A) CALO EM MEIO Y3 COM 500  $\mu$ M 2,4-D APÓS UM MÊS. B) CALO EM MEIO Y3 COM PICLORAM 500  $\mu$ M APÓS UM MÊS. C) CALO FRIÁVEL EM MEIO Y3 + 2,4-D (100  $\mu$ M) + BAP (7,9  $\mu$ M). D) CALO FRIÁVEL EM MEIO Y3 + 2,4-D (100  $\mu$ M) + 2iP (7,9  $\mu$ M). E) CALO EMBRIOGÊNICO NO MEIO Y3 + 2,4-D (100  $\mu$ M) + BAP (7,9  $\mu$ M). F) CALO EMBRIOGÊNICO NO MEIO Y3 + 2,4-D (100  $\mu$ M) + 2iP (7,9  $\mu$ M). G) CALO EMBRIOGÊNICO COM EMBRIÕES NOS ESTÁDIOS GLOBULAR E TORPEDO EM MEIO Y3 COM 9  $\mu$ M DE 2,4-D +1000  $\mu$ M DE PUTRESCINA - 7 MESES. H) EMBRIÕES NOS ESTÁDIOS GLOBULAR E ESCUTELAR EM MEIO Y3 COM 1000  $\mu$ M DE PUTRESCINA. I) EMBRIÕES SOMÁTICOS EM MEIO Y3 SEM REGULADORES - 8 MESES. J) EMBRIÕES SOMÁTICOS NO ESTADIO TORPEDO NO MEIO Y3 SEM REGULADORES - 9 MESES. K) EMBRIÕES CONVERTIDOS COM DUAS SEMANAS EM MEIO Y3 SEM REGULADORES NA LUZ. L) EMBRIÕES CONVERTIDOS COM TRÊS SEMANAS EM MEIO Y3 SEM REGULADORES NA LUZ. BARRAS: A, C, F, H, I, J e K = 2 cm. B= 1 cm. D, E, G e L= 3 cm. Fonte: a autora (2014).

TABELA 5 – CLASSIFICAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS NO MEIO DE CULTURA Y3 SEM REGULADORES NA PRESENÇA DE LUZ, OBTIDOS A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE DENDEZEIRO HÍBRIDO BRS MANICORÉ OBSERVADOS DURANTE TRÊS SEMANAS

Classificação dos embriões somáticos	Nº de ES*/total (soma de 3 repetições)
Cor branca (1-2 semanas na luz)	109/616=17,8%
Cor verde (2 semanas)	158/616=25,7%
Com raiz (2-3 semanas)	99/616= 16,0%
Cor verde com raiz e folha (3 semanas)	250/616= 40,5%

\*embriões somáticos.

O processo de embriogênese somática a partir de embriões zigóticos ficou dividido em quatro etapas até a conversão dos embriões somáticos em plantas (FIGURA 3).

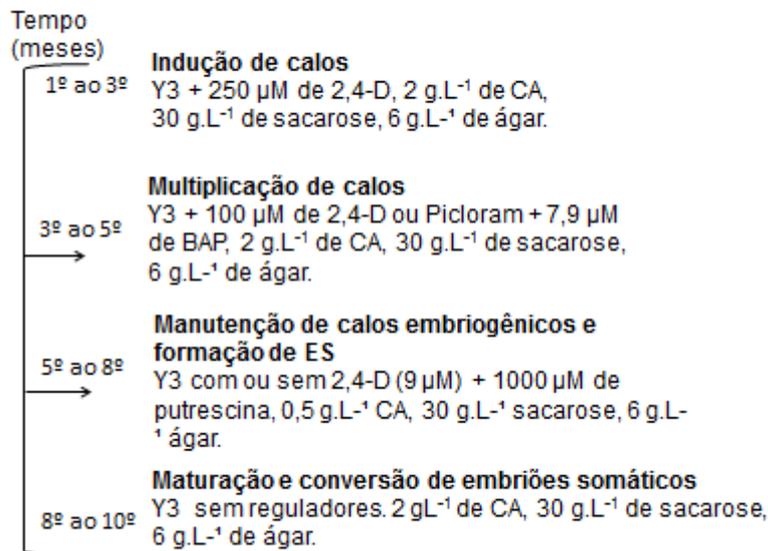


FIGURA 3 – ETAPAS DA EMBRIOGENÊSE SOMÁTICA A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DO HÍBRIDO DE DENDEZEIRO BRS MANICORÉ

## 3.2 EMBRIOGENÊSE SOMÁTICA A PARTIR DE TCL DA PARTE AÉREA

### 3.2.1 INFLUÊNCIA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE 2,4-D NO MEIO DE CULTURA Y3 NA FORMAÇÃO DE CALOS A PARTIR DE TCLs.

Os TCLs basais da parte aérea de dendezeiro híbrido Manicoré, inoculados no meio de cultura Y3 com 500  $\mu$ M de 2,4-D, aos 30 dias apresentaram formação de calos friáveis ao redor do explante (FIGURAS 4 A). Já os explantes cultivados no meio contendo 800  $\mu$ M de 2,4-D apresentavam desenvolvimento lento e com uma massa gelatinosa transparente (FIGURAS 4 B e C). A auxina utilizada na concentração de 500  $\mu$ M mostrou-se eficiente na formação de calos em TCLs basais

de dendê (39,45%), enquanto que na concentração de 800  $\mu\text{M}$  houve 17,7% de explantes com calos (TABELA 6).

Aos 60 dias de cultivo, os calos apresentavam-se friáveis (FIGURA 4 D). O meio de cultura Y3 suplementado com 500  $\mu\text{M}$  de 2,4-D proporcionou a maior porcentagem de calos amarelos e translúcidos (47,7 e 32,7) diferindo do meio suplementado de 800  $\mu\text{M}$ , com 12,2 e 14,7% respectivamente (TABELA 6).

TABELA 6 – FORMAÇÃO DE CALOS A PARTIR DE TCLs BASAIS DA PARTE AÉREA DE PLANTAS DE DENDEZEIRO HÍBRIDO BRS MANICORÉ CULTIVADOS NO MEIO DE CULTURA Y3 ADICIONADO DE DUAS CONCENTRAÇÕES DE AUXINA POR 60 e 90 DIAS

	60 dias		90 dias			
	Meio Y3 com 2,4-D ( $\mu\text{M}$ )	Formação de calos (%)	Explantes sem resposta (%)	Calos amarelos (%)	Calos translúcidos (%)	Explantes sem respostas (%)
500		39,45 a	59,65 a	47,73 a	32,76 a	19,50 b
800		17,70 a	82,30 a	12,20 b	14,73 a	73,06 a
DMS		31,38	47,6	32,73	54,57	59,08
CV%		63,49	30,6	31,38	99,0	56,26

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Média de quatro repetições.

A concentração de auxina influenciou o desenvolvimento dos calos, pois explantes de TCLs basais cultivados na presença de diferentes concentrações de 2,4-D tiveram formação de calos em torno de 30% em concentrações de 250 e 500  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, enquanto que, em concentrações acima de 500  $\mu\text{M}$ , não formaram calos ou formaram em baixas porcentagens (2 e 4% respectivamente para 800 e 1000  $\mu\text{M}$ ) (TABELA 7 e APÊNDICE 19).

TABELA 7 – FORMAÇÃO DE CALOS A PARTIR DE TCLs BASAIS DA PARTE AÉREA DE DENDEZEIRO HÍBRIDO BRS MANICORÉ CULTIVADOS POR 60 DIAS NO MEIO Y3 ADICIONADO DE 2,4-D.

Tratamentos meio Y3		
2,4-D ( $\mu\text{M}$ )	Formação de calos (%)	Sem resposta (%)
0	2,13 b	97,83 a
250	33,17 a	60,73 b
500	31,88 a	69,13 b
800	2,20 b	97,80 a
1000	4,33 b	95,66 a
DMS	22,73	24,96
CV%	57,31	11,02

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Média de três repetições.

### 3.2.2 EFEITO DE DUAS CONCENTRAÇÕES DE 2,4-D COMBINADO COM 100 $\mu\text{M}$ DE PUTRESCINA EM CULTURAS EMBRIOGENICAS

Os calos de TCLs basais com seis meses, transferidos para meios de cultura Y3 sem ou com 2,4-D (50 ou 100  $\mu\text{M}$ ) acrescidos de putrescina, apresentaram calos embriogênicos com pré-embriões somáticos independentemente da presença do 2,4-D, com percentagens de 49 a 53% (FIGURA 4 E e F e TABELA 8 e APÊNDICE 20). Alguns destes calos apresentavam uma média de 5 a 20 embriões no estágio globular e torpedo (FIGURA 4 G). Embriões somáticos no estágio torpedo foram individualizados e convertidos em plântulas (FIGURA 4 H, I e J).



FIGURA 4: ETAPAS DA EMBRIOGENÊSE SOMÁTICA A PARTIR DE TCLs BASAIS DA PARTE AÉREA DE DENDEZEIRO HÍBRIDO BRS MANICORÉ EM MEIO Y3. A) COM 500  $\mu\text{M}$  DE 2,4-D APÓS UM MÊS. B) e C) COM 800  $\mu\text{M}$  DE 2,4-D APÓS UM MÊS. D) CALO EMBRIOGENICO COM 100  $\mu\text{M}$  DE 2,4-D + 100  $\mu\text{M}$  DE PUTRESCINA APÓS 5 MESES. E) CALO EMBRIOGENICO COM 50  $\mu\text{M}$  DE 2,4-D + 100  $\mu\text{M}$  DE PUTRESCINA APÓS 5 MESES. F) EMBRIÕES GLOBULARES EM MEIO SEM REGULADORES APÓS 8 MESES. G) EMBRIÕES SOMÁTICOS EM MEIO SEM REGULADORES APÓS 8 MESES E 10 DIAS. H) EMBRIÃO SOMÁTICO INDIVIDUALIZADO APÓS 9 MESES. I) EMBRIÃO CONVERTIDO EM PLÂNTULA APÓS 14 DIAS NO MEIO Y3 SEM REGULADORES. J) PLÂNTULA APÓS 21 DIAS. BARRAS: A), B) e C) 1 cm. D), E), F) e G) 1,5 cm. H), I) e J) 2 cm. Fonte: a autora (2014).

TABELA 8 – CALOS COM FORMAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS OBTIDOS A PARTIR DE TCLs BASAIS DA PARTE AÉREA DE DENDEZEIRO HÍBRIDO BRS MANICORÉ CULTIVADOS POR QUATRO MESES NO MEIO Y3 COM 100  $\mu\text{M}$  DE PUTRESCINA

Y3+putrescina (100 $\mu\text{M}$ ) +2,4-D ( $\mu\text{M}$ )	Calos embriogênicos* (%)	Calos não embriogênicos (%)
0	52,87 a	26,19 b
50	49,20 a	50,80 a
100	52,22 a	47,77 a
DMS	33,5	16,03
CV%	26	15,39

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. \*com embriões nos estádios globular e coleoptilar.

### 3.2.3 CONVERSÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DO HÍBRIDO DE DENDEZEIRO BRS MANICORÉ, OBTIDOS A PARTIR DE TCLs BASAIS.

Aproximadamente 230 embriões somáticos foram transferidos para meio de conversão em plantas (Y3 sem reguladores) em condições de luz. Após uma a duas semanas permaneciam na cor branca e, após duas semanas começavam a ficar verdes e desenvolver pecíolo cotiledonar e raiz primária (FIGURA 4 I e J e TABELA 9). Após 45 dias, 50 plantas de um total de 230 (21,7%) tinham parte aérea e radicular e foram aclimatizadas em casa de vegetação; as que não apresentavam essas características ficaram mais 15 dias *in vitro*. As plantas aclimatizadas não sobreviveram, sendo que testes de substrato, temperatura e umidade devem ser realizados.

TABELA 9 – FORMAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS NO MEIO DE CULTURA Y3 SEM REGULADORES VEGETAIS EM CONDIÇÕES DE LUZ A PARTIR DE TCLs DE DENDEZEIRO HÍBRIDO BRS MANICORÉ

Coloração dos embriões somáticos	Nº de ES*/total (soma de 2 repetições)
Cor branca (1-2 semanas na luz)	10/230= 1,0%
Cor verde (2 semanas)	99/230= 43,0%
Com raiz (2-3 semanas)	6/230= 2,6%
Com raiz e folha (3 semanas)	115/230= 50,0%

\*embriões somáticos

O processo de embriogênese somática a partir de TCLs basais da parte aérea ficou dividido em três etapas até a conversão dos embriões somáticos em plantas (FIGURA 5).

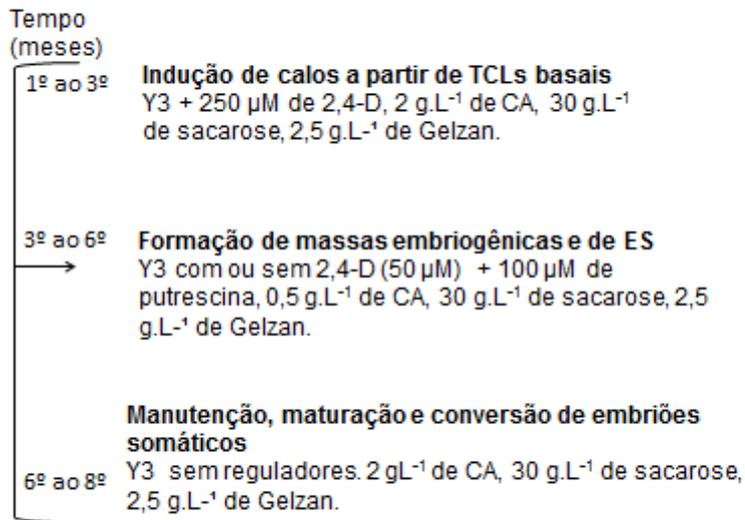


FIGURA 5 – ETAPAS DA EMBRIOGENÊSE SOMÁTICA A PARTIR DE TCLs BASAIS DA PARTE AÉREA DO HÍBRIDO DE DENDEZEIRO BRS MANICORÉ

### 3.2.4 EFEITO DE DUAS AUXINAS E DOIS MEIOS DE CULTURA NA FORMAÇÃO DE CALOS EM TCLs CENTRAIS

A taxa de formação de calos em TCLs centrais foi muito baixa em ambos os meios (Y3 ou SH) na presença de dois tipos de auxina (picloram ou 2,4-D) e quatro concentrações (225, 445, 500 ou 675 µM) (TABELAS 10 e 11).

TABELA 10 – FORMAÇÃO DE CALOS A PARTIR DE TCLs CENTRAIS DA PARTE AÉREA DE DENDEZEIRO HÍBRIDO BRS MANICORÉ CULTIVADOS NO MEIO SH ADICIONADO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PICLORAM APÓS 60 DIAS

Concentrações de Picloram (µM)	Formação de calos (%)	Sem resposta (%)
Controle	1,5 a	98,5 a
225	1,4 a	90,5 a
445	3,0 a	94,5 a
675	5,5 a	92,5 a
DMS	14,3	33,46
CV%	100,0	8,74

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

TABELA 11 – FORMAÇÃO DE CALOS A PARTIR DE TCLs CENTRAIS DA PARTE AÉREA DE DENDEZEIRO HÍBRIDO BRS MANICORÉ CULTIVADOS NOS MEIOS Y3 E SH ADICIONADOS DE 500  $\mu$ M de 2,4-D APÓS 60 DIAS.

Meios	Formação de calos (%)	Sem resposta (%)
Y3	10,6 a	89,40 a
SH	5,5 a	94,40 a
DMS	24,84	25,03
CV%	71,67	6,33

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## 4 DISCUSSÃO

### 4.1 Embriogênese somática a partir de EZ

As auxinas 2,4-D e picloram foram eficientes na embriogênese somática do híbrido de dendê (BRS Manicoré) a partir de embriões zigóticos. Da mesma maneira, Silva *et al.* (2007) utilizando o meio de cultura MS, acrescido de 450  $\mu$ M de picloram ou Y3 adicionado de 500  $\mu$ M de 2,4-D, observaram que 60 ou 76,3%, respectivamente, dos embriões zigóticos de dendê formaram calos. Já Thuzar *et al.* (2011), cultivando embriões zigóticos no meio de cultura N6 suplementado com 9  $\mu$ M de 2,4-D, picloram ou dicamba, obtiveram 32, 17 e 21,5% de calos embriogênicos, respectivamente, valores menores que aqueles apresentados no meio Y3 com 2,4-D ou picloram no presente estudo (76,3 e 60,9%).

Concentrações de 250 a 500  $\mu$ M de 2,4-D ou picloram são adequadas para a iniciação da embriogênese somática do híbrido de dendê BRS Manicoré, quando a auxina é adicionada ao meio de cultura MS ou Y3. Muniran *et al.* (2008) cultivando embriões zigóticos de *E. guineensis* "Dura", também observaram que os meios Y3, MS e N6 são eficientes na formação de calos quando suplementados de 11  $\mu$ M de 2,4-D, obtendo 98, 80 e 82% de explantes formando calos, respectivamente.

Diferentes tipos e concentrações de auxinas devem ser usados para cada espécie ou genótipo de dendê. No presente estudo, concentrações de 250 ou 500  $\mu$ M são eficientes. Já para as variedades de dendê SJ-165 e SJ-167 concentrações de 375 e 625  $\mu$ M de 2,4-D são necessárias para a formação de calos em embriões zigóticos no meio de cultura MS $\frac{1}{2}$  (ALVES *et al.*, 2011). Para a var. SJ-165, 30% de

explantes formaram calos na concentração de 625  $\mu\text{M}$  e 31,6% para a var. SJ-167 na concentração de 375  $\mu\text{M}$  (ALVES *et al.*, 2011). Respostas semelhantes foram obtidas por Silva *et al.* (2012) em diferentes genótipos de dendezeiro, no meio de cultura MS acrescido de 450  $\mu\text{M}$  de picloram. Esses autores mostraram que o genótipo de dendê BRSC 2328 e o do híbrido BRSCM 1115 (Manicoré x dendezeiro) tinham alto potencial para a formação de calos embriogênicos e diferenciação em embriões somáticos.

A combinação de baixas concentrações de auxina com uma citocinina é eficiente para a etapa de multiplicação dos calos deste híbrido. No presente estudo, 100  $\mu\text{M}$  de 2,4-D ou picloram, combinado com 7,9  $\mu\text{M}$  de BAP ou 2iP, provocaram a multiplicação dos calos em 50 a 54% dos explantes. Resultados semelhantes foram obtidos por Silva *et al.* (2012) para o genótipo de dendê BRS C2328: utilizando o meio de cultura MS acrescido de 0,6  $\mu\text{M}$  de ANA e 12,3  $\mu\text{M}$  de 2iP, obtendo 48% de calos embriogênicos e 52,5 embriões somáticos por calo. Da mesma maneira, Padilha (2013, não publicado) obteve 53% de TCLs foliares de macaúba formando calos friáveis no meio de cultura Y3 com 75  $\mu\text{M}$  de picloram e 12,5  $\mu\text{M}$  de 2iP.

No presente estudo, embriões somáticos foram formados em meios sem 2,4-D ou com baixas concentrações (9  $\mu\text{M}$ ), acrescido de putrescina (1 mM), numa média de 25 a 30 embriões por calo. Isto é devido à propriedade da putrescina de promover a diferenciação e maturação celular durante o processo de embriogênese somática e também de atuar na replicação do DNA (GALSTON e KAUR-SAWHNEY, 1990). A formação de embriões somáticos na ausência de 2,4-D é muito importante uma vez que permite evitar problemas de variação somaclonal. Com a cultivar de dendê Tenera, Thuzar *et al.* (2011 e 2012) também obtiveram embriões somáticos quando os calos embriogênicos foram transferidos para meio de maturação N6 acrescido de 0,45  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, 1,8 mM de putrescina, 0,5  $\text{g.L}^{-1}$  de caseína hidrolizada e 2  $\text{g.L}^{-1}$  de CA. Da mesma maneira, Carvalho (2009) obteve 65% de massas com regeneração de embriões somáticos, nos meios de cultura adicionados de 0,045  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 1 mM de putrescina a partir de segmentos foliares e inflorescências femininas de dendezeiro (*Elaeis guineensis*). No presente estudo, os calos cultivados no meio Y3 com putrescina começaram a diferenciar-se em embriões. Isto pode estar relacionado com a formação de novas células, ligada ao aumento na síntese de DNA, RNA, proteínas e com a formação de poliaminas (COHEN *et al.*, 1982). Rajesh *et al.* (2003) também obtiveram calos embriogênicos

em dendezeiro, no meio MS modificado, acrescido de 1 mM de putrescina e 0,045  $\mu$ M de 2,4-D.

Para a conversão de embriões somáticos em plantas, os meios de cultura sem reguladores vegetais foram eficientes. No presente estudo, o meio de cultura Y3 sem reguladores foi utilizado para converter embriões somáticos em plantas e estas apresentaram parte aérea e raízes, sendo essas raízes mais desenvolvidas que as raízes de plantas provenientes da germinação *in vitro* de embriões zigóticos. Isto pode ser devido a que esses embriões somáticos estão em contato com auxina desde a indução de calos e, quando são retirados desse meio com auxina, desenvolvem raízes por já terem absorvido uma quantidade suficiente para a produção das raízes. Teixeira *et al.* (1994) também obtiveram a regeneração e conversão de embriões somáticos de dendê em plantas no meio de cultura MS sem reguladores. Já Muniran *et al.* (2008) obtiveram resultados diferentes para a conversão de embriões somáticos dessa espécie em plântulas. Utilizaram os meios de cultura MS e Y3 modificado e compararam esses meios desprovidos de reguladores ou acrescidos de 2 mg.L<sup>-1</sup> de AIB. Os melhores resultados foram obtidos quando o AIB foi adicionado nos meios de cultura (36 e 96% de conversão respectivamente para os dois meios de cultura); já para os meios sem reguladores foram 18 e 62%.

#### 4.2 Embriogênese somática a partir de TCLs

A técnica do TCL utilizando a base da parte aérea de plântulas cultivadas *in vitro* do híbrido de dendezeiro BRS Manicoré é adequada para a indução de calos e obtenção de embriões somáticos. Está técnica vem se destacando desde os trabalhos de Tran Thanh Van *et al.* (1973) e é considerada eficaz para a regeneração de embriões de diversas espécies incluindo as palmeiras (SAMOSIR *et al.*, 1998; NHUT *et al.*, 2003; STEINMACHER *et al.*, 2007). Também é vantajosa pelo uso de pequenos explantes e por esses terem mais contato com o meio de cultura, podendo absorver os nutrientes do meio mais facilmente (FEHER *et al.*, 2003). Também foi utilizada com sucesso por Pannetier *et al.* (1981) que, após sete

meses de cultivo de fragmentos foliares de dendê (*Elaeis guineensis*), obtiveram de 49 a 53% de calos com pré-embriões somáticos.

Os TCL basais, quando cultivados em meios de cultura com 2,4-D (250 e 500  $\mu\text{M}$ ), formaram calos em 33,1 e 31,8% dos explantes, já quando cultivados em meio sem 2,4-D não apresentaram essa formação. Resultados semelhantes foram obtidos por Guedes (2008) em TCLs basais de segmentos caulinares de dendezeiro, onde 41,5% dos explantes formaram calos no meio de cultura MS com 450  $\mu\text{M}$  de Picloram. Pádua *et al.* (2013) também observaram indução de calos em explantes foliares de *E. guineensis* var. *tenera*, cultivados no meio de cultura Y3 com picloram ou 2,4-D (9  $\mu\text{M}$ ) e nenhuma formação de calos em meio sem auxina.

Para a formação de calos embriogênicos e obtenção de embriões somáticos, os calos precisam de uma menor exposição às auxinas, associadas a uma citocinina ou putrescina. Nesta pesquisa, embriões somáticos foram obtidos tanto no meio de cultura Y3 com 2,4-D quanto no meio sem 2,4-D, ambos acrescidos de 100  $\mu\text{M}$  de putrescina. Embriões somáticos também foram obtidos por Guerra e Handro (1998), em *Euterpe edulis*, utilizando a combinação de uma auxina com uma citocinina (0,54  $\mu\text{M}$  de ANA e 9,8  $\mu\text{M}$  de 2-iP).

Nesta pesquisa, o processo de embriogênese somática do híbrido de dendezeiro BRS Manicoré a partir de TCL mostrou-se mais eficaz para a propagação da espécie do que a partir de EZ, pelo fato de que uma só planta fornece de cinco a oito explantes para serem utilizados na formação de calos. O custo da técnica também é menor, pois o processo se resume em três etapas até a conversão dos embriões somáticos, e somente em duas fases são utilizados os reguladores vegetais. Quanto ao número de embriões somáticos por calo, os calos provenientes de EZ apresentaram 1 a 5 embriões a mais do que os de TCL, uma vez que permaneceram dois meses em meio com citocinina e auxina enquanto os de TCLs passaram diretamente para um meio com putrescina e auxina, o que proporcionou a diferenciação em embriões somáticos. Entretanto, a técnica do TCL continua sendo melhor, pois a partir de uma só planta (dos cinco explantes) são formados em média 30 a 50 embriões somáticos, enquanto que, a partir de EZ, seria necessário 3 a 4 EZ para obter o mesmo número de ES.

## 5 CONCLUSÕES

A obtenção de embriões somáticos é possível a partir de calos desenvolvidos de EZ ou TCLs da parte aérea de dendezeiro híbrido BRS Manicoré. Para a indução de calos a partir de EZ é necessário adicionar 250  $\mu\text{M}$  de 2,4-D ao meio de cultura. A combinação de 100  $\mu\text{M}$  de auxina com uma citocinina é eficiente para a etapa de multiplicação dos calos. Calos embriogênicos e embriões somáticos são formados em meios sem 2,4-D ou com baixas concentrações (9  $\mu\text{M}$ ), adicionados de putrescina (1000  $\mu\text{M}$ ). Os embriões somáticos podem ser convertidos em plantas com raiz e parte aérea no meio de cultura Y3 sem reguladores vegetais.

Os TCLs basais respondem bem ao 2,4-D, concentrações de 250 ou 500  $\mu\text{M}$  sendo eficientes para a indução de calos. Para a formação de calos embriogênicos e embriões somáticos, os calos devem ser cultivados em meio contendo concentrações de auxina menores que 100  $\mu\text{M}$ , associada à putrescina (100  $\mu\text{M}$ ).

## REFERÊNCIAS

ALVES, S. A. O. **Resgate *in vitro* de híbridos interespecíficos de dendezeiro *Elaeis guineensis* Jacq.** Dissertação (Mestrado em Botânica). Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, PA, 2007

ALVES, S. A. O.; LEMOS, O. F. de; FILHO, B. G. S. dos.; SILVA, A.L. *In vitro* protocol optimization for development of interspecific hybrids of oil palm (*Elaeis oleifera* (H.B.K) Cortés x *Elaeis guineensis* Jacq). **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v.2, n.3, 2011.

CARDOSO, J. de N. O. **Conversão *in vitro* de embriões zigóticos de híbridos de dendezeiro (*Elaeis guineensis* x *E. oleifera*) em plântulas.** Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Federal Rural da Amazônia. Belém, PA. 2010.

CARVALHO, M. **Embriogênese somática a partir de folhas imaturas e flores desenvolvidas *in vitro* de dendezeiro Jacq.** Tese (Doutorado em Ciências) Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais, 2009.

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

CONCEIÇÃO, E.O; MULLER, A.A. Botânica e morfologia do dendezeiro. In: VIEGAS, I. de J.M; MULLER, A.A. (Ed.). **A cultura do dendezeiro na Amazônia brasileira**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental; Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2000.

CHU, C. C.; WANG, C. C; SUN, C. C; HSU, C.; YIN, K. C; CHU, C. Y; BI, F. Y. Establishment Of An Efficient Medium For Anther Culture Of Rice Through Comparative Experiments On The Nitrogen Sources. **Science Sinica**. v.18, p.659, 1975.

CUNHA, R.N.V. da; LOPES, R. BRS Manicoré: híbrido interespecífico entre o caiaué e o dendezeiro africano recomendado para áreas de incidência de amarelecimento-fatal. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental. **Comunicado técnico**, 85. 2010.

EEUWENS, C.J. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera* L.) and culture *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, v. 36. p. 23-28, 1976.

EEUWENS, C. J; LORD, S; DONOUGH, C. R; RAO, V; VALLEJO, G; NELSON, S. Effects of tissue culture conditions during embryoid multiplication on the incidence of

“mantled” flowering in clonally propagated oil palm. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 70, p.311–323. 2002.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T.P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.74, p.201–228, 2003.

FURLAN, L. F. Projeto Potencialidades Regionais. Estudo de viabilidade econômica do Dendê. Boa Vista: **SUFRAMA**, 2003.

GUEDES, R. S da. **Embriogênese Somática e regeneração de plantas de dendezeiro**. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal do Acre, Rio Branco, 2008.

GUERRA, M. P.; HANDRO, W. Somatic embryogenesis and plant regeneration in different organs of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae): Control and Structural Features. **Journal of Plant Research**, v.111, p.65-71, 1998.

GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, I.B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S.; Buso, IA. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília, SPI/Embrapa, v.2, p. 533-568, 1999.

KALINKA, K. Cultura de palma é nova promessa agrícola para a Amazônia. Manaus: **Amigos da Terra - Amazônia Brasileira**, 2002.

MUNIRAN, F; BHORE, S. J; SHAH, F. H. Micropropagation of *Elaeis guineensis* Jacq. “Dura”: Comparison Of Three Basal Media For Efficient Regeneration. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.46, p.79-82, 2008.

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

NHUT, T. D.; LE, B.V.; VAN, K. T. T. Somatic embryogenesis and direct shoot regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) using thin cell layer culture apical meristematic tissue. **Journal of Plant Physiology**, v.157, p.559-565, 2000.

NHUT, D. T.; ASWATH, C. R.; TEIXEIRA DA SILVA, J. A.; BUI, V. L.; THORPE, T.; TRAN THANH VAN, K. Tobacco thin cell layer morphogenesis. In: Nhut DT, Van Le B, Tran Thanh Van K, Thorpe T. (eds) **Thin Cell Layer Culture System: Regeneration and Transformation Applications**, p.65-134, 2003.

PADILHA, J. H. D. **Embriogênese somática em *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. Ex Mart. utilizando a técnica do TCL (“thin cell layer”)**. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. 2013.

PÁDUA, M. S, PAIVA, L. V; LABORY, C. R. G; ALVES, E; STEIN, V. C. Induction and characterization of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) pro-embryogenic. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**. v.85, n,4,p.1545-1556. 2013.

PANNETIER C; ARTHUIS P; LIÉVOUX C. Néof ormation de jeunes plants de *Elaeis guineensis* à partir de cals primaires obtenus sur fragments foliaires cultivés in vitro. **Oléaginoux**. v.36,p.119–122; 1981.

RAJESH, M. K.; RADHA, E.; KARUN, A.; PARTHASARATHY, V. A. Plant regeneration from embryo-derived callus of oil palm – the effect of exogenous polyamines. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.75, p. 41-47, 2003.

RAMOS, E. J. A.; VEIGA, S. A.; JUNIOR, J. F. Potencial produtivo de híbridos interespecíficos entre dendezeiro e caiauezeiro nas Condições do Nordeste Paraense. **Documento 247**. Embrapa Amazônia Oriental. Belém, PA. 2006.

SAMOSIR, Y. M. S.; GODWIN, I. D.; ADKINS, S. W.; DREW, R. A. A report on the culture of embryos of dwarf coconut, *Cocos nucifera* L. var. *nana* in vitro. In: International Symposium of Biotechnology of tropical and subtropical species. Proceedings, **Acta Horticulturae**, v.30. p.467-474, 1998.

SCHENK, R.U.; HILDEBRANDT, A.C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. **Canadian Journal of Botany**. v.50, p.199-204, 1972.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J.; GUEDES, R. S.; FERMINO, P. C; DILVA, T. L; COSTA, F. H. Somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm using the thin cell layer technique. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v.46, p.378-385, 2010.

SILVA, J. A. da. Thin Cell Layer technology in ornamental plant micropropagation and biotechnology. **African Journal of Biotechnology**, v.2, p.683-691, 2003.

SILVA, T.L da; GUEDES, R. da S; FERMINO-Jr, P. C P; PEREIRA, J. E. S. Indução da Embriogênese Somática em dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq) a partir de embriões zigóticos imaturos: Alternativa para a Propagação Clonal de Genótipos elite. (Resumo, Seminário de Iniciação Científica, **Anais**) Embrapa, Acre, Rio Branco, 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**. DOI.10.1007/s11240-012-0170-5. 2012.

STEINMACHER, D. A.; CANGAHUALA-INOCENTE, G.C.; CLEMENT, C.R.; GUERRA, M.P. Somatic embryogenesis from peach palm zygotic embryos. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v.43, p.124-132, 2007.

TEIXEIRA, J. B; SÖNDAHL, M. R; KIRBY, E. G. Somatic embryogenesis from immature inflorescence of oil palm. **Plant Cell Reports**, v.13, n.5, p.247-250, 1994.

THUZAR M, VANAICHIT A, TRAGOONRUNG S, JANTASURIYARAT C. Efficient and rapid plant regeneration of oil palm zygotic embryos cv. 'Tenera' through somatic embryogenesis. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.33, p.123–128, 2011.

TRAN THANH VAN, K. M. Direct Flower Neof ormation from Superficial Tissue of Small Explants of *Nicotiana tabacum* L. **Planta**, v.115, p.87-92, 1973.

TRAN THANH VAN, K. M. Control of morphogenesis by inherent and exogenously applied factors in thin cell layers. **International Review of Cytology**, v.32, p.291-311, 1980.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho mostrou que o teste de tetrazólio pode ser utilizado para verificar a viabilidade dos embriões zigóticos do híbrido BRS Manicoré e que a taxa de germinação das sementes esta relacionada com a viabilidade de cada lote.

A adição de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  nos meios de cultura é fundamental para a germinação do híbrido de dendezeiro, especialmente quando o meio não contem fosfato de sódio ou contem em baixas concentrações. O meio de cultura Y3 não necessita da adição de fosfato, pois já contêm a concentração adequada para a germinação e desenvolvimento das plântulas, sendo considerado adequado para o desenvolvimento da parte aérea e raiz primária.

A obtenção de embriões somáticos é possível a partir de calos desenvolvidos a partir de EZ ou TCLs da parte aérea de plântulas recém germinadas..

Para a indução de calos, é necessária a adição de uma auxina ao meio de cultura Y3 numa concentração de 250  $\mu\text{M}$  de 2,4-D. A combinação de baixa concentração de auxina com uma citocinina é eficiente para a etapa de multiplicação dos calos e obtenção de calos embriogênicos. Embriões somáticos são formados em meios sem 2,4-D ou com baixas concentrações, adicionados de putrescina e são convertidos em plantas no meio de cultura Y3 sem reguladores vegetais.

Diferentemente de outros trabalhos com o híbrido, embriões somáticos foram obtidos sem a troca de auxina na fase de formação de embriões. Para a conversão de embriões somáticos em plântulas, auxinas não foram adicionadas aos meios de cultura, e plântulas com raiz e parte aérea foram formadas.

Este trabalho é o primeiro a fazer uso da técnica do TCL no híbrido de dendê BRS Manicoré, a qual se mostrou promissora para a indução de calos e obtenção de embriões somáticos. Os TCLs basais respondem bem ao 2,4-D e concentrações de 250 ou 500  $\mu\text{M}$  são eficientes para a indução de calos. Para a formação de embriões somáticos em calos de TCLs, calos embriogênicos devem ser cultivados em meios contendo concentrações de auxina menores que 100  $\mu\text{M}$ , associada à putrescina. O papel dessa poliamina na embriogênese somática do dendezeiro precisa ser estudado.

Diferentemente do processo de embriogênese somática do dendezeiro (*E. guineensis*) que se realiza em quatro etapas, a obtenção de embriões somáticos a partir de TCLs do híbrido requer somente três meios de cultura ou três etapas: 1ª formação de calos, 2ª multiplicação de calos e formação de embriões somáticos, 3ª maturação e conversão de embriões somáticos em plântulas.

Na etapa de aclimatização das plântulas em casa de vegetação, as condições adequadas de temperatura, umidade do ar e de substrato devem ser estabelecidas de maneira a aumentar a sobrevivência.

## APÊNDICES

APÊNDICE 1 – RESUMO DA ANÁLISE VARIÂNCIA DO FATOR CURVADOS COM HAUSTÓRIO A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE DENDEZEIRO (BRS MANICORÉ) CULTIVADOS *IN VITRO* EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA E OBSERVADOS AOS 15 DIAS.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	3	51.375.000	17.112.500	0.4948 ns
Resíduo	4	138.350.000	34.587.500	
Total	7	189.687.500		

CV (%): 77,09

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

APÊNDICE 2 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO FATOR PRIMÓRDIO FOLIAR E RADICULAR A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE DENDEZEIRO (BRS MANICORÉ) CULTIVADOS *IN VITRO* EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA E OBSERVADOS AOS 30 DIAS.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	3	354.550.000	118.183.333	9.4170*
Resíduo	4	50.200.000	12.550.000	
Total	7	40.750.000		

CV (%): 25,90

\*significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

APÊNDICE 3 – RESUMO ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO FATOR COMPRIMENTO DA PARTE AÉREA 1 A 2 cm CULTIVADOS *IN VITRO* EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA E OBSERVADOS AOS 45 DIAS.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	3	41.297.375	13.765.792	1.5327 ns
Resíduo	4	35.926.500	8.981.625	
Total	7	77.223.875		

CV (%): 37,51

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

APÊNDICE 4 – RESUMO ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO FATOR COMPRIMENTO DA PARTE AÉREA 2 a 6 cm CULTIVADOS *IN VITRO* EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA E OBSERVADOS AOS 45 DIAS.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	3	123.666.000	41.222.000	76.7635 **
Resíduo	4	2.148.000	537.000	
Total	7	125.814.000		

CV (%): 27,10

\*\*significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

APÊNDICE 5 – RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO FATOR CURVADOS COM HAUSTÓRIO CULTIVADOS *IN VITRO* EM MEIO MS COM OU SEM FOSFATO E OBSERVADOS AOS 15 DIAS.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	1	75.625.000	75.625.000	24.2000 *
Resíduo	2	62.500.00	31.250.00	
Total	3	818.750.00		

CV (%): 10,40

\*significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 = < p < .05$ )

APÊNDICE 6 – RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO FATOR COM PRIMÓRDIO FOLIAR E RADICULAR CULTIVADOS *IN VITRO* EM MEIO MS COM OU SEM FOSFATO E OBSERVADOS AOS 30 DIAS.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	1	78.322.50	78.322.50	0.4091 ns
Resíduo	2	38.292.500	19.146.250	
Total	3	46.124.750		

CV (%): 30,90

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

APÊNDICE 7 – RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO FATOR CURVADOS COM HAUSTÓRIO CULTIVADOS *IN VITRO* EM MEIO Y3 COM OU SEM FOSFATO E OBSERVADOS AOS 15 DIAS.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	1	14.851.25	14.851.25	0.0145 ns
Resíduo	6	613.063.750	102.177.292	
Total	7	614.548.875		

CV (%): 58,75

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

APÊNDICE 8 –RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO FATOR PRIMÓRDIO FOLIAR E RADICULAR DE DENDEZEIRO (BRS MANICORÉ) CULTIVADOS *IN VITRO* EM MEIO Y3 COM OU SEM FOSFATO E OBSERVADOS AOS 30 DIAS.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	1	0.485.11	0.485.11	0.0006*
Resíduo	6	472.690.228	78.781.705	
Total	7	472.738.739		

CV (%): 47,66

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

APÊNDICE 9 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO FATOR FORMAÇÃO DE CALOS A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE DENDEZEIRO HÍBRIDO BRS MANICORÉ EM 4 MEIOS DE CULTURA ADICIONADOS DE 500  $\mu\text{M}$  DE AUXINA APÓS 30 DIAS.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	3	144.437.556	48.145.852	1.4859 ns
Resíduo	16	518.428.232	32.401.765	
Total	19	662.865.788		

CV (%): 28,16

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

APÊNDICE 10 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO FATOR FORMAÇÃO DE CALOS FRIÁVEIS A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE DENDEZEIRO HÍBRIDO BRS MANICORÉ EM QUATRO MEIOS DE CULTURA ADICIONADOS DE 500  $\mu\text{M}$  DE AUXINA APÓS 90 DIAS.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	3	582.376.70	547.855	54.7855**
Resíduo	4	1.417.350	3.543.37	
Total	7	59.655.020		

CV (%): 3,60

\*\*significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

APÊNDICE 11 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO FATOR FORMAÇÃO DE CALOS COMPACTOS A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE DENDEZEIRO HÍBRIDO BRS MANICORÉ EM QUATRO MEIOS DE CULTURA ADICIONADOS DE 500  $\mu\text{M}$  DE AUXINA APÓS 90 DIAS.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	3	69.561.895	23.187.298	82.6922**
Resíduo	4	1.121.620	2.80.405	
Total	7	70.683.515		

CV (%): 5,26

\*\*significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

APÊNDICE 12 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO FATOR FORMAÇÃO DE CALOS A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE DENDEZEIRO HÍBRIDO BRS MANICORÉ EM QUATRO CONCENTRAÇÕES DE AUXINA APÓS 30 DIAS.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	3	432.369.844	144.123.281	10.7211*
Resíduo	4	53.771.625	134.429.06	
Total	7	48.614.469		

CV (%): 32,45

\*significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01=<p<.05)

APÊNDICE 13 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO FATOR FORMAÇÃO DE CALOS FRIÁVEIS A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE DENDEZEIRO HÍBRIDO BRS MANICORÉ EM QUATRO CONCENTRAÇÕES DE AUXINA APÓS 90 DIAS.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	2	249.664.333	124.832.167	18.4145*
Resíduo	3	20.337.000	67.790.00	
Total	5	270.001.333		

CV (%): 15,98

\*significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01=<p<.05)

APÊNDICE 14 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO FATOR FORMAÇÃO DE CALOS COMPACTOS A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE DENDEZEIRO HÍBRIDO BRS MANICORÉ EM QUATRO CONCENTRAÇÕES DE AUXINA APÓS 90 DIAS.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	2	249.792.333	124.896.167	18.7979*
Resíduo	3	199.325.00	66.441.67	
Total	5	269.724.833		

CV (%): 16,81

\*significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01=<p<.05)

APÊNDICE 15 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO FATOR MULTIPLICAÇÃO DE CALOS EMBRIOGÊNICOS A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE DENDEZEIRO HÍBRIDO BRS MANICORÉ EM QUATRO MEIOS DE CULTURA ADICIONADOS DE 100 µM DE AUXINA E 7,9 µM DE CITOCININA APÓS 150 DIAS.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	5	203.235.940	406.471.88	65.7599**
Resíduo	6	37.086.90	6.181.15	

Total	11	206.944.630
CV (%): 5,99		

\*\*significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

APÊNDICE 16 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO FATOR MULTIPLICAÇÃO DE CALOS NÃO EMBRIOGÊNICOS A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE DENDÊ HÍBRIDO BRS MANICORÉ EM QUATRO MEIOS DE CULTURA ADICIONADOS DE 100  $\mu$ M DE AUXINA E 7,9  $\mu$ M DE CITOCININA APÓS 150 DIAS.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	5	171.432.097	34.286.419	49.7620**
Resíduo	6	41.340.50	6.890.08	
Total	11	175.566.147		
CV (%): 4,55				

\*\*significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

APÊNDICE 17 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO FATOR CALOS COM EMBRIÕES SOMÁTICOS A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE DENDEZEIRO (BRS MANICORÉ) CULTIVADOS *IN VITRO* EM DUAS CONCENTRAÇÕES DE 2,4-D ACRESCIDOS DE PUTRESCINA OBSERVADOS APÓS 60 DIAS.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	2	128.911.712	118.183.333	0.3953ns
Resíduo	9	1.467.319.258	163.035.473	
Total	11	159.230.969		
CV (%): 119,76				

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

APÊNDICE 18 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO FATOR MASSAS EMBRIOGÊNICAS A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE DENDEZEIRO (BRS MANICORÉ) CULTIVADOS *IN VITRO* EM DUAS CONCENTRAÇÕES DE 2,4-D ACRESCIDOS DE PUTRESCINA OBSERVADOS APÓS 60 DIAS.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	2	44.425.952	22.212.976	0.1789ns
Resíduo	9	1.117.564.418	124.173.824	
Total	11	1.161.990.369		
CV (%): 65,56				

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

APÊNDICE 19 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO FATOR CALOS FRIÁVEIS A PARTIR DE EZ DE DENDEZEIRO (BRS MANICORÉ) CULTIVADOS *IN VITRO* EM DUAS CONCENTRAÇÕES DE 2,4-D ACRESCIDOS DE PUTRESCINA OBSERVADOS APÓS 60 DIAS.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	2	78.056.502	39.028.251	0.9837ns
Resíduo	9	357.075.515	39.675.057	
Total	11	435.132.017		

CV (%): 149,71

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

APÊNDICE 20 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO FATOR FORMAÇÃO DE CALOS A PARTIR DE TCLs BASAIS DE DENDEZEIRO HÍBRIDO BRS MANICORÉ EM CINCO CONCENTRAÇÕES DE AUXINA APÓS 90 DIAS.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	317.519.109	79.379.777	11,1157**
Resíduo	10	71.412.367	7.141.237	
Total	14	388.931.476		

CV (%): 57,31

\*\*significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

APÊNDICE 21 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO FATOR MULTIPLICAÇÃO DE CALOS EMBRIOGÊNICOS A PARTIR DE TCLs BASAIS DE DENDEZEIRO HÍBRIDO BRS MANICORÉ COM DUAS CONCENTRAÇÕES DE AUXINA E 100  $\mu$ M DE PUTRESCINA APÓS 150 DIAS.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	2	2.304.062	1.152.031	0,0644ns
Resíduo	6	107.299.867	17.883.311	
Total	8	109.603.929		

CV (%): 26,00

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

APÊNDICE 22 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO FATOR MULTIPLICAÇÃO DE CALOS NÃO EMBRIOGÊNICOS A PARTIR DE TCLs BASAIS DE DENDEZEIRO HÍBRIDO BRS MANICORÉ COM DUAS CONCENTRAÇÕES DE AUXINA E 100  $\mu$ M DE PUTRESCINA APÓS 150 DIAS.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	2	108.077.682	54.038.841	13,1992**
Resíduo	6	245.645.87	4.094.098	
Total	8	132.642.269		

CV (%): 15,39

\*\*significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

APÊNDICE 23 - COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA MS, MS COM METADE DOS SAIS (MS1/2), Y3 e N6 UTILIZADOS PARA GERMINAÇÃO *IN VITRO* E MICROPROPAGAÇÃO DE DENDEZEIRO HÍBRIDO BRS MANICORÉ (*Elaeis guineensis* (Jacq) x *E. oleifera*).

Compostos	Concentrações				
	MS (Murashige e Skoog)	Meio MS1/2	mg/L Y3 (Eeuwens)	N6 (Chu <i>et al</i> )	SH (Shenk e Hildebrandt)
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	825	-----	-----	-----
KNO <sub>3</sub>	1900	950	2020	2850	2500
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	3,1	3,1	1,6	5,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	85	----	400	-----
KI	0,83	0,415	8,3	0,8	1,0
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25	0,125	0,24	-----	0,1
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025	0,0125	0,24	-----	0,1
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440	220	294	166	200
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	185	247	185	400
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22,30	11,15	11,2	4,4	10,0
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,6	4,3	7,2	1,5	1,0
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025	0,0125	0,16	-----	0,2
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,80	13,90	27,80	27,80	15,0
Na <sub>2</sub> EDTA	37,30	18,65	37,30	37,30	20,0
KCl	-----	-----	1492	-----	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O			312	-----	
NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O			0,024	-----	
NH <sub>4</sub> Cl			535	-----	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>			-----	463	
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>					300
ácido nicotínico	0,5	0,5	1	0,5	5,0
piridoxina HCl	0,5	0,5	1	0,5	0,5
tiamina HCl	0,1	0,1	1	0,1	5,0
glicina	2,0	2,0	-----	-----	-----
mio-inositol	100	100	100	100	1000
biotina			0,01	-----	
Ácido pantotênico sal cálcio			1	-----	
L-arginina			100	-----	

