

MYCHELLE CARVALHO

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA A PARTIR DE FOLHAS IMATURAS E  
FLORES DESENVOLVIDAS *IN VITRO* DE DENDEZEIRO  
(*Elaeis guineensis* Jacq)

Tese apresentada à Universidade  
Federal de Viçosa, como parte das  
exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Fitotecnia, para obtenção  
do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2009

MYCHELLE CARVALHO

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA A PARTIR DE FOLHAS IMATURAS E FLORES  
DESENVOLVIDAS *IN VITRO* DE DENDEZEIRO (*Elaeis guineensis* Jacq)

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**APROVADA:** 13 de novembro de 2009.

---

Prof<sup>a</sup>. Marília Contim Ventrella  
(Coorientador)

---

Prof. Wagner Campos Otoni  
(Coorientador)

---

Dsc. Aurora Yoshiko Sato

---

Pesquisador José Mauro Valente Paes

---

Prof. Sérgio Yoshimitsu Motoike  
(Orientador)

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me proporcionar tantas oportunidades e realizações.

Ao meu filho Raul, razão da minha vida.

A meus pais, pelo apoio e carinho sempre.

Aos meus irmãos por estarem sempre por perto.

À amiga-filha Elisa Monteze pela amizade sincera e pela imprescindível ajuda neste trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa e ao curso de pós-graduação em Fitotecnia pela oportunidade concedida.

A Fapemig pela concessão da bolsa de estudos.

Ao orientador, Sérgio Y. Motoike, pela paciência, ensinamentos, confiança, incentivo e oportunidades proporcionadas.

À conselheira Marília Contin Ventrella, pela dedicação, apoio e sugestões.

Ao conselheiro Wagner Campos Otoni, pela disponibilidade e sugestões.

A pesquisadora Aurora Sato pela amizade e sugestões.

Ao pesquisador José Mauro pela disponibilidade e sugestões

Ao aluno de iniciação científica Aduino Quirino, pela ajuda neste trabalho.

A amiga Melissa Pisaroglo pela amizade e ajuda nas análises estatísticas.

Aos funcionários do Laboratório de Cultura de Células e Tecidos Vegetais do Departamento de Fitotecnia da UFV, Márcio e Cenira, pela ajuda sempre que precisei.

Aos professores, alunos e funcionários do Laboratório de Anatomia Vegetal da UFV, especialmente a Dona Edite e à estudante Bárbara pela grande ajuda na análise histológica.

Aos amigos da pós-graduação, em especial Andressa, Rosmery, Elisa Moura, Carlos Nick, Fabiana, Candida, Cristiane Gamarano, Lucimar, Mara Rosane e Yonara pela troca de conhecimentos e pelos momentos de descontração.

Aos meus vizinhos, em especial Zazá e Etelvina pela amizade e ajuda sempre que precisei.

Aos sócios e amigos da Acrotech Sementes e Reflorestamento pela compreensão.

A todos aqueles que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

## BIOGRAFIA

Mychelle Carvalho, filha de João Lázaro Carvalho e Maria Margarida Carvalho, nasceu em Perdões – MG, no dia 22 de fevereiro de 1978. Graduou-se em Agronomia em agosto de 2002 pela Universidade Federal de Lavras. Em fevereiro de 2005 recebeu o título de mestre em Fitotecnia pela Universidade Federal de Lavras. Em março de 2005, iniciou o curso de doutorado em Fitotecnia pela Universidade Federal de Viçosa e concluiu-o em novembro de 2009.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABELAS .....	vii
RESUMO .....	ix
ABSTRACT.....	x
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REVISÃO DE LITERATURA.....	3
1 . Aspectos botânicos do dendezeiro .....	3
2. Embriogênese somática.....	4
3. Poliaminas .....	6
REFERÊNCIAS.....	7
RESUMO .....	13
ABSTRACT.....	15
1 - INTRODUÇÃO.....	17
2 - MATERIAL E MÉTODOS.....	18
2.1 - Indução da embriogênese somática .....	18
2.2 - Multiplicação e manutenção de massas pró-embriogênicas.....	19
2.3 – Regeneração e maturação dos embriões somáticos .....	20
2.5 – Análise histológica.....	24
3 - RESULTADOS .....	24
3.1 - Indução da embriogênese somática .....	24
3.2 – Multiplicação e manutenção das massas pró-embriogênicas.....	26
3.3 – Regeneração e maturação dos embriões somáticos .....	27
3.4 – Germinação .....	33
4 - DISCUSSÃO .....	35
5 - CONCLUSÕES .....	38
6. REFERÊNCIAS.....	39
RESUMO .....	46
ABSTRACT.....	48
1. INTRODUÇÃO .....	50
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	51
2.1 - Indução da embriogênese somática .....	52
2.2 - Multiplicação de calos .....	54
2.3 – Regeneração de embriões somáticos.....	55
2.4 - Análise histológica.....	55
3. RESULTADOS.....	56
3.1 - Indução da embriogênese somática .....	56
3.2 - Multiplicação de calos .....	59
3.3 – Regeneração de embriões somáticos.....	61
4. DISCUSSÃO .....	64
5. CONCLUSÕES .....	66
6. REFERÊNCIAS.....	66
ANEXO.....	70

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

#### USO DE POLIAMINAS NA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA A PARTIR DE FOLHAS IMATURAS DE GENÓTIPOS DE DENDEZEIRO

- Figura 1.** Esquema representativo dos experimentos de regeneração e maturação dos embriões somáticos de dendezeiro.....21
- Figura 2.** Formação de calos em folhas imaturas de dendezeiro. A - Explante foliar inicial em meio de indução. B – Explante foliar aos 15 dias em meio de indução (setas pretas destacam nervura). C – Explante foliar aos 30 dias em meio de indução (setas pretas destacam início da formação de calos em regiões próximas à nervura). D – Formação de calos após os 60 dias de inoculação (setas pretas: calos iniciais). E - Calos formados aos 90 dias da inoculação. Barras: 1 mm.....25
- Figura 3.** Estimativa da porcentagem de indução de calos em explantes foliares de genótipos de dendezeiro, aos três meses de cultivo em meio Y3, suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D ( $\mu\text{M}$ ).....26
- Figura 4.** Tipos de calos obtidos na fase de multiplicação. A – Calo não embriogênicos. B – Calo embriogênico. C – Secção transversal de massa pró-embriogênica (setas: regiões meristemáticas). D – Destaque de região meristemática, com células isodiamétricas, altamente coradas e alta relação núcleo/citoplasma (Barras: A = B = 0,5 mm, C = 400  $\mu\text{m}$ , D = 30  $\mu\text{m}$ ).....28
- Figura 5.** Regeneração de embriões somáticos a partir de massas pró-embriogênicas oriundas de explantes foliares de dendezeiro. A – Massa pró-embriogênica pré-condicionada formada por estruturas globulares translúcidas. B – Secção transversal de massa pró-embriogênica: setas pretas indicam início de formação de protoderme nas estruturas globulares e setas brancas indicam início de formação dos cordões procambiais nas estruturas globulares. C – Embriões somáticos regenerados de massa pró-embriogênica. D – Secção longitudinal de embrião somático, as setas indicam cordões procambiais. E – Secção transversal de meristema apical de embrião somático. F – Detalhe de cordão procambial em secção transversal de embrião somático. G – Secção longitudinal de embrião somático de dendezeiro, em destaque cordão procambial e protoderme, indicados pelas setas; cp: cordão procambial, pt: protoderme (Barras: A = C = 2 mm, B = D = 400  $\mu\text{m}$ , E = 200  $\mu\text{m}$ , F = G = 30  $\mu\text{m}$ ).....31
- Figura 6.** Ocorrência de embriogênese secundária. A – Formação de embriões por meio da embriogênese secundária; setas pretas indicam os embriões sendo formados por brotação. B e C – Secção longitudinal dos embriões; seta preta (B) indica embrião sendo formado por brotação, e seta preta (C) indica formação dos cordões procambiais no embrião formado por brotação; cp: cordão procambial (Barras: A = 2 mm, B = C = 300  $\mu\text{m}$ ).....32

**Figura 7.** Germinação de embriões somáticos e aclimatização das plântulas de dendezeiro. A – Secção longitudinal de embrião somático em alongamento. B – Embrião somático de dendezeiro em início de germinação. C – Desenvolvimento não sincronizado de plântula de dendezeiro. D – Plântula aos 90 dias em meio de germinação. E – Plântulas em processo de aclimatização. F – Planta aos oito meses após aclimatização. Barras: A = 300 µm, B = C = D = 1 cm, E = 5 cm, F = 10 cm.....34

## CAPÍTULO 2

### EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM DENDEZEIRO A PARTIR DE FLORES DESENVOLVIDAS *IN VITRO*

**Figura 1.** Inflorescência feminina imatura e indução de flores em ráquulas imaturas de *E. guineensis*. A – Inflorescência imatura protegida pelas espatas. B – inflorescência imatura após a retirada das espatas. C – Ráquulas retiradas das duas inflorescências femininas imaturas (IF1 e IF2) utilizadas no experimento (If1: ráquila proveniente da inflorescência de 30 cm e IF2: ráquila proveniente da inflorescência de 45 cm). D – Ráquila da IF1 em meio de indução de flores após 60 dias da inoculação. E – Ráquila da IF2 em meio de indução de flores após 60 dias da inoculação. F – Flores formadas (setas) após 120 dias em meio de indução de flores. (Barras: A = 2,0 cm; B = 1,0 cm; C = 0,5 cm; D = E = F = 1,5 cm).....57

**Figura 2.** Indução de calos em flores formadas *in vitro* a partir de ráquulas retiradas de inflorescências femininas imaturas. A – Flor formada *in vitro*, setas indicam perianto envolvendo o gineceu (g). B – Secção longitudinal de flor formada *in vitro*, setas indicam perianto envolvendo o gineceu. C – Secção longitudinal da região epidérmica e sub-epidérmica do gineceu de flor aos dez dias da inoculação. A região mais intensamente corada corresponde ao início de proliferação celular. D – Detalhe da região de início de proliferação celular próxima aos elementos traqueais (et), indicados por setas brancas. As setas pretas indicam células com alta razão núcleo/citoplasma e células com dois nucléolos indicando atividade mitótica. E – Flor em processo de calogênese aos trinta dias em meio de indução de calos. F – Secção da flor com formação de calo próximos aos elementos traqueais (et) e evidencia da zona meristemática (zm) na periferia do calo. G – Massa de calos formada após sessenta dias em meio de indução. H – Secção da massa de calos formada após sessenta dias em meio de indução. Nota-se proliferação celular em torno dos elementos traqueais (et) e região de células tipicamente meristemáticas (zm) (Barras: A = E = G = 2 mm; B = F = 350 µm; C = 150 µm; D = 50 µm; H = 200 µm).....60

**Figura 3.** Formação e desenvolvimento de estruturas globulares a partir de calos embriogênicos. A - Calos embriogênicos com formação de estruturas globulares, seta branca indica estruturas globulares. B – Secção dos calos embriogênicos com formação de estruturas globulares, setas pretas indicam estruturas globulares. C - Estruturas globulares aos 30 dias em meio de regeneração. D - Secção das estruturas globulares aos 30 dias em meio de regeneração. E – Detalhe da estrutura globular, seta mostra a protoderme bem definida. (Barras: A = 2 mm, B = D = 400 µm, C = 0,5 mm, E = 100 µm).....62

**Figura 4.** Embriões somáticos obtidos em tratamentos com picloram e putrescina após 60 dias de incubação dos explantes. A – Embriões somáticos. B – Secção longitudinal de embrião somático com destaque para cordões procambiais (cp). C – Detalhe de secção transversal de embrião somático de dendezeiro com destaque para a protoderme (pt) e cordões procambiais (cp). D – Detalhe de secção longitudinal de embrião somático de dendezeiro com destaque para protoderme (pt) e cordões procambiais (cp). (Barras: A = 2 mm; B = 400 µm; C = 100 µm; D = 50 µm).....63

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

---

#### USO DE POLIAMINAS NA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA A PARTIR DE FOLHAS IMATURAS DE GENÓTIPOS DE DENDEZEIRO

<b>Tabela 1.</b> Tratamentos utilizados na multiplicação e manutenção de massas pró-embriogênicas de dendezeiro.....	20
<b>Tabela 2.</b> Tratamentos utilizados nos experimentos A e B de regeneração e maturação dos embriões somáticos de dendezeiro.....	22
<b>Tabela 3.</b> Tratamentos utilizados na germinação de embriões somáticos de dendezeiro.....	23
<b>Tabela 4.</b> Efeito do tipo de poliamina combinado com carvão ativado na porcentagem de massas pró-embriogênicas com desenvolvimento sincrônico.....	27
<b>Tabela 5.</b> Efeito do pré-condicionamento e do experimento com diferentes poliaminas na porcentagem de massas com regeneração de embriões somáticos.....	29
<b>Tabela 6.</b> Efeito das interações pré-condicionamento x composição do meio quanto a auxina e pré-condicionamento x experimentos com diferentes poliaminas no número médio de embriões somáticos regenerados.....	29
<b>Tabela 7.</b> Efeito das concentrações de ANA e carvão ativado na porcentagem de germinação de embriões somáticos de dendezeiro.....	33

### CAPÍTULO 2

---

#### EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM DENDEZEIRO A PARTIR DE FLORES DESENVOLVIDAS IN VITRO

<b>Tabela 1.</b> Tratamentos utilizados no desenvolvimento <i>in vitro</i> de flores a partir das ráquias de inflorescências imaturas de dendezeiro.....	53
--	----



<b>Tabela 2.</b> Tratamentos utilizados nos experimentos de indução de calos em flores de dendezeiro.....	54
<b>Tabela 3.</b> Efeito do meio de cultivo (MC), estágio de desenvolvimento da inflorescência (EDI) e auxina no desenvolvimento <i>in vitro</i> de flores.....	53
<b>Tabela 4.</b> Efeito de experimentos com diferentes auxinas, tipo de flor e putrescina na indução de calos a partir de flores oriundas de inflorescências imaturas.....	59

## RESUMO

CARVALHO, Mychelle D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2009.  
**Embriogênese somática a partir de folhas imaturas e flores desenvolvidas *in vitro* de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq)** Orientador: Sérgio Yoshimitsu Motoike. Co-orientadores: Marília Contin Ventrella e Wagner Campos Otoni.

O trabalho teve como objetivos estabelecer um protocolo eficiente para embriogênese somática do dendezeiro, sobretudo de cultivares exploradas no Brasil, bem como realizar a caracterização anatômica do processo embriogênico. Para a indução da embriogênese somática utilizou-se dois tipos de explantes, segmentos foliares e inflorescências femininas, resultando em dois experimentos. No primeiro experimento, secções de 5 mm de folhas imaturas retiradas de dois genótipos (G1001 e G2301) de dendê de 1,5 ano de idade foram inoculadas em meio de cultura Y3 (Eeuwens, 1978), adicionado de 0,3% de carvão ativado e quatro concentrações de 2,4-D (800, 1000, 1200 e 1400  $\mu\text{M}$ ). Maior porcentagem de indução de calos foi obtida em explantes foliares do G2301 submetidos à concentração 800  $\mu\text{M}$  de 2,4-D. A obtenção de massas pró-embriogênicas a partir dos calos ocorreu em meio suplementado com 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D adicionado de 1000  $\mu\text{M}$  putrescina ou 100  $\mu\text{M}$  espermina. Maior porcentagem de regeneração de embriões somáticos ocorreu a partir de massas pró-embriogênicas que passaram pelo pré-condicionamento e foram inoculadas em meio de regeneração adicionado de 0,045  $\mu\text{M}$  2,4-D e 1000  $\mu\text{M}$  putrescina. Os embriões somáticos regenerados exibiram protoderme característica, cordões de procâmbio e meristema apical e germinaram em meio de cultura Y3 adicionado de 0,54  $\mu\text{M}$  ANA e 1000  $\mu\text{M}$  putrescina. As plântulas obtidas apresentaram desenvolvimento simultâneo de parte aérea e radícula, e puderam ser aclimatizadas, sendo de 70,4% a porcentagem de plantas obtidas. No segundo experimento, ráquulas retiradas de inflorescências femininas imaturas, em dois estágios de desenvolvimento foram inoculadas em diferentes meios de cultivo (MS e Y3), adicionado de 475  $\mu\text{M}$  de diferentes auxinas (Picloram e 2,4-D) e 0,3% de carvão ativado. O desenvolvimento das flores ocorreu após 120 dias da inoculação *in vitro*, em função do estágio de desenvolvimento da inflorescência e do meio de cultivo utilizado. As flores formadas em meio de cultivo Y3 foram destacadas das ráquulas e inoculadas em mesmo meio de cultivo com redução da concentração das auxinas para 9  $\mu\text{M}$  sendo combinadas ou não com 1000  $\mu\text{M}$  de putrescina. Após 60 dias,

maior formação de calos ocorreu em flores cultivadas em meio adicionado de 9  $\mu\text{M}$  Picloram combinado com 1000  $\mu\text{M}$  de putrescina. A regeneração dos embriões somáticos ocorreu após a redução em 100 vezes na concentração de auxina no meio de cultivo, sendo mantida a mesma concentração de putrescina. Os embriões apresentaram protoderme bem definida, delimitando uma massa homogênea de células correspondentes ao meristema fundamental, entremeada por cordões procambiais bem definidos. Por meio da análise histológica verificou-se que a formação de calos ocorreu a partir das regiões perivasculares no gineceu e a formação dos embriões ocorreu a partir das regiões meristemáticas destes calos, seguindo o padrão multicelular.

## ABSTRACT

CARVALHO, Mychelle D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November of 2009.  
**Somatic embryogenesis from immature leaves and flowers developed *in vitro* from oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq)** Orientador: Sérgio Yoshimitsu Motoike. Co-orientadores: Marília Contin Ventrella and Wagner Campos Otoni.

The study aimed to establish an efficient protocol for somatic embryogenesis of the oil palm, especially all of cultivars explored in Brazil, as well as to accomplish the anatomical characterization of the embryogenic process. For induction of somatic embryogenesis we used two explants types, leaves segments and female inflorescences, resulting in two experiments. In the first experiment, sections of the 5 mm in immature leaves from two oil palm genotypes (G1001 e G2301) of 1,5 years of age were inoculated in culture medium Y3 (Eeuwens, 1978) supplemented with 0.3% activated charcoal and 2,4-D at four concentrations (800, 1000, 1200 and 1400  $\mu\text{M}$ ). Higher percentage of callus induction was obtained in G2301 leaf explants submitted to the concentration 800  $\mu\text{M}$  of 2,4-D. The obtaining of pro-embryogenic masses starting of the calli occurred in medium supplemented with 9  $\mu\text{M}$  2,4-D added to 1000  $\mu\text{M}$  putrescine or 100  $\mu\text{M}$  spermine. A higher percentage of regeneration of somatic embryos occurred from pro-embryogenic masses that were pre-conditioned and inoculated on regeneration medium supplemented with 0.045  $\mu\text{M}$  2,4-D and 1000  $\mu\text{M}$  putrescine. The somatic embryos regenerated exhibited characteristic protoderm, procambium strands and shoot meristem and germinated in culture medium Y3 added 0.54  $\mu\text{M}$  ANA and 1000  $\mu\text{M}$  putrescine. The seedlings showed simultaneous development of shoot and root and 70.4% of plants could be successfully acclimatized. In the second experiment, rachillas taken from immature female inflorescences in two developmental stages were inoculated in different culture media (MS and Y3), the supplemented with 475  $\mu\text{M}$  of different auxins (Picloram and 2,4-D) and 0.3% activated charcoal . The development of flowers occurred after 120 days of inoculation *in vitro*, depending on the developmental stage of the inflorescence and the growing medium. The flowers formed in Y3 culture medium were detached from rachillas and inoculated in the same culture medium with reduced auxin concentrations for 9  $\mu\text{M}$  being combined or not with 1000  $\mu\text{M}$  of putrescine. After 60 days, greater callus formation occurred in flowers

grown in medium supplemented with 9  $\mu\text{M}$  Picloram combined with 1000  $\mu\text{M}$  of putrescine. The regeneration of somatic embryos occurred after reduction at 100 times the concentration of auxin in the culture medium, maintaining the same concentration of putrescine. Embryos showed protoderm well defined, delimiting a homogeneous mass of cells corresponding to the ground meristem, interspersed with well-defined procambium strands. By means of histological analysis it was found that the formation occurred from the perivascular regions in the gynoecium and embryo formation occurred from the regions of meristematic callus, following the multicellular pattern.

## INTRODUÇÃO GERAL

O dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) é uma palmeira oleaginosa de origem africana, largamente cultivada em regiões de clima tropical úmido. O principal produto do dendezeiro é o óleo extraído da polpa do fruto, conhecido internacionalmente como *palm oil* ou óleo de palma. Atualmente, o óleo de palma é o mais produzido e consumido no mundo, apresentando usos alimentício, medicinal e oleoquímico.

A produção mundial de óleo de palma em 2008 foi de 43,1 milhões de toneladas, dos quais 44,7% produzidos pela Indonésia, 41% pela Malásia e 2,7 % pela Tailândia. A representatividade do Brasil nessa produção é baixa, ficando em 10<sup>o</sup> lugar, com produção de 220 mil toneladas, correspondendo a 0,5 % da produção mundial (Oil World, 2008).

Entretanto, as limitações de disponibilidade de terra agricultável em países tradicionalmente produtores de dendê para a ampliação dos seus plantios, dão ao Brasil grande oportunidade de expandir sua participação no mercado mundial. Isto porque a área ocupada pela cultura do dendezeiro no Brasil corresponde a menos de 0,1% de seus 70 milhões de hectares aptos a seu cultivo (Veiga et al., 2001).

Além disso, com a crescente demanda por biocombustíveis, a cultura do dendê constitui importante fonte de matéria-prima para produção do biodiesel, por apresentar a maior produtividade de óleo entre as plantas oleaginosas, com rendimento entre 4 e 6 t por hectare, índice este, cerca de 10 vezes maior que o rendimento de produção de óleo de soja. Ressalta-se, ainda, sua condição de planta perene, com longo período de exploração econômica, aproximadamente 25 anos, e produção distribuída durante todo ano, o que implica em menor custo ambiental quando comparado ao cultivo de plantas anuais.

Segundo Boddey (1993), se 30% da área desflorestada da Amazônia brasileira fossem utilizadas para o plantio desta palmeira, haveria possibilidade de suprir a demanda diária de 460.000 barris de óleo diesel consumidos no país, com a vantagem de gerar milhares de empregos para a população desta região.

No entanto, para o Brasil se estabelecer como grande produtor e exportador de óleo de palma e seus derivados torna-se necessário o cultivo de plantas melhoradas e mais produtivas. Contudo, em função da alta heterozigose desta espécie, a propagação por sementes, como é feito no Brasil, apresenta o inconveniente de formação de plantios

heterogêneos, o que promove a desuniformidade na produção e dificuldades nas práticas de manejo (Srisawat & Kanchanapoom, 2005). Além disso, nos programas de melhoramento da espécie, a multiplicação de genótipos e/ou progênies também ocorre por sementes, fato que impede que características agronômicas desejáveis em um genótipo sejam perpetuadas.

Nesse sentido, a cultura de tecidos, constitui-se como alternativa promissora para a multiplicação clonal desta espécie. Em função da natureza morfoanatômica e fisiológica do dendezeiro, a propagação de clones elite só é possível por meio da embriogênese somática.

Em função das vantagens oferecidas pelo uso de clones elite, diversos protocolos de embriogênese somática do dendezeiro já foram publicados. No entanto, a micropropagação do dendezeiro é ainda cercada de mistérios e segredos industriais (Rajesh et al., 2003), fazendo com que o custo de obtenção da muda micropropagada seja mais que sete vezes superior ao obtido por método convencional. Além disso, os protocolos publicados apresentam diversas limitações, tais como o baixo índice de conversão dos embriões somáticos (Teixeira et al., 1995; Touchet et al., 1991) e ocorrência de variações somaclonais ou epigenéticas em mudas micropropagadas, associadas ao uso de reguladores de crescimento no meio de cultivo, especificamente citocininas (Eeuwens et al., 2002).

No Brasil, as pesquisas na área de cultura de tecidos têm proporcionado bons resultados para algumas espécies de palmáceas, como *Cocus nucifera* (Gomes et al., 2004), *Euterpe oleracea* (Fermino Jr. et al., 2007) e *Bactris gasipaes* (Steinmacher et al., 2007). No entanto, para o dendezeiro, praticamente não existem pesquisas relacionadas às técnicas de cultivo *in vitro*, impossibilitando a efetiva utilização de clones elite na dendeicultura brasileira.

O acompanhamento do processo de embriogênese somática por técnicas histológicas tem se mostrado essencial para o entendimento da embriogênese e vem potencializando os protocolos em várias espécies vegetais. Os trabalhos têm demonstrado que a origem do embrião depende muito do explante utilizado e das condições do meio de cultivo. Em dendezeiro, o estudo histológico do processo embriogênico foi realizado quando folhas imaturas (Schwendimann et al., 1988) e embriões zigóticos (Kanchanapoom & Domyoas, 1999) foram utilizados como fonte de explante.

O presente trabalho tem como objetivos estabelecer um protocolo eficiente para embriogênese somática do dendezeiro (*Elaeis guineensis*, Jacq.), sobretudo de cultivares

exploradas no Brasil, bem como realizar a caracterização anatômica do processo embriogênico.

## REVISÃO DE LITERATURA

### 1 . Aspectos botânicos do dendezeiro

Conhecido cientificamente por *Elaeis guineensis* (Jacq.), o dendezeiro, pertence à classe Monocotyledonae, ordem Arecales, família Arecaceae e gênero *Elaeis* (Cronquist, 1981). É uma espécie de origem africana (Guiné-Bissau) cultivada em regiões tropicais úmidas na África, Ásia e América. No Brasil, acredita-se que o dendezeiro foi introduzido por escravos africanos, por volta de 1.616, dando origem aos dendezais subespontâneos do litoral baiano (Valois, 1997).

O dendezeiro é uma palmeira com até 15m de altura, com sistema radicular do tipo fasciculado, sendo a maioria das raízes encontradas na faixa de 20 a 60 cm de profundidade, próximo à planta (Ferwerda, 1975). O caule é ereto e sem ramificações, sendo denominado de estipe (Gonçalves, 2001). As folhas pinadas, medindo de 5 a 7 m são compostas por um eixo central, subdividido em parte basal, que se liga ao estipe, denominada pecíolo, cujo comprimento é de aproximadamente 1,5 m e em parte distal denominada ráquis, que suporta os folíolos. As inflorescências, formadas na axila de cada folha são espádices compostas por espigas protegidas por duas brácteas fibrosas, denominadas espatas. Cada inflorescência possui os dois sexos, porém um deles fica, quase sempre, rudimentar. Inflorescências masculinas e femininas são produzidas na mesma planta, sendo o dendezeiro, classificado como uma planta monóica.

A polinização é principalmente entomófila, realizada por polinizadores como *Elaeidobius kamerunicus*, *Elaeidobius subvittatus* (espécies africanas) e por *Mystrops costaricensis* espécie americana. A espécie *Elaeidobius kamerunicus* é a mais eficiente (Genty et al., 1986).

O fruto do dendezeiro é uma drupa séssil, mais ou menos esférica e alongada. Tem 2 a 5 cm de comprimento e 3 a 30 g de peso. A principal característica comercial do fruto de dendê é a espessura do endocarpo, controlada por um gene principal, classificando as plantas em três tipos:



1. *Dura*: plantas em estado homocigoto (sh+ sh+). Usada como planta feminina na produção de híbridos comerciais.
2. *Psifera*: plantas em estado homocigoto do tipo psífera (sh- sh-). Usada como fornecedora de pólen na produção de híbridos comerciais.
3. *Tenera*: híbrido do cruzamento Psifera x Dura. Suas sementes são recomendadas para plantios comerciais. Tem vida econômica entre 20-30 anos, produz 10-12 cachos anualmente. É boa produtora de inflorescências femininas (Barcelos et al., 2000).

A propagação do dendê é realizada basicamente por meio de sementes, as quais possuem dormência quando colhidas, e sob condições naturais germinam esporadicamente. Portanto, para otimizar e homogeneizar a produção comercial de mudas, torna-se necessário a utilização de métodos para quebra de dormência. Estudos fisiológicos realizados por Hussey (1958, 1959) e Rees (1962) mostraram a necessidade de manter as sementes à temperatura de 39-40° C por mais de 80 dias para a quebra de dormência. Assim, a produção de sementes pré-germinadas precede a produção de mudas. Existem vários fornecedores de sementes (Müller, 2000), tanto em nível internacional (ASD, SOCFIN e MPOB), quanto nacional (Embrapa Amazônia Ocidental e CEPLAC).

## 2. Embriogênese somática

A embriogênese somática pode ser descrita como o processo pelo qual, células somáticas haplóides ou diplóides se diferenciam em embriões somáticos, por meio de seqüência ordenada de estádios embriogênicos característicos, sem ocorrência de fusão dos gametas (Guerra et al., 1999; Jiménez, 2001; George et al., 2008). Durante o seu desenvolvimento, embriões somáticos passam por estádios similares àqueles observados na embriogênese zigótica, caracterizando-se como estrutura bipolar sem nenhuma conexão vascular com o tecido materno (Durzan, 1988; Vicent & Martinez, 1998).

Em dendezeiro, a indução da embriogênese somática tem sido obtida a partir de diferentes explantes, tais como raízes terciárias e quaternárias (Eeuwens et al., 2002), folhas imaturas (Eeuwens et al., 2002), inflorescências imaturas (Teixeira et al., 1994) e embriões zigóticos (Teixeira et al., 1995). O processo de embriogênese ocorre de forma indireta, inicialmente, através do desenvolvimento de massa pró-embriogênica que se diferencia formando os embriões somáticos.

O uso de reguladores de crescimento, sobretudo o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é fundamental neste processo (Teixeira et al., 1994). Além do 2,4-D, outros reguladores de crescimento, tais como picloram (Teixeira et al., 1995), ácido naftalenoacético (Eeuwens et al., 2002), ácido abscísico (Teixeira et al., 1994) e 6-benziladenina (Aberlenc-Bertossi et al., 1999) são, freqüentemente, empregados nas diversas fases da embriogênese somática desta planta. Nesses protocolos, a indução da embriogênese é realizada em meios de cultivo adicionados de alta concentração de auxina. A subsequente proliferação de calos e regeneração de embriões somáticos são obtidas com a redução dos níveis ou retirada total da auxina, além da adição de outros tipos de reguladores de crescimento, como citocininas ou ácido abscísico (Parthasarathy et al., 2001).

Contudo, apesar de diversos protocolos publicados, são muitos os fatores que podem interferir no processo de embriogênese somática, dificultando a repetibilidade dos protocolos, permanecendo a incerteza em relação aos melhores procedimentos. Em dendezeiro, em função das vantagens oferecidas pelo uso de clones elite, as pesquisas sobre os processos de multiplicação do dendezeiro são conduzidas geralmente por empresas privadas e muitos detalhes importantes para o sucesso da embriogênese não são disponibilizados.

Além disso, atualmente, a utilização em larga escala da multiplicação vegetativa de clones superiores está sendo bloqueada pelo aparecimento freqüente de anomalia floral (*mantled flower*) que ocorre nas plantas obtidas de cultivo *in vitro*, afetando severamente o potencial produtivo da planta. A anomalia floral é caracterizada pela feminização do androceu de flores femininas e masculinas, em que, os primórdios de estames rudimentares se desenvolvem em carpelos suplementares. Esta anormalidade é acompanhada pela produção de frutos partenocárpicos (Corley et al., 1986). A intensidade dessa anomalia é variável entre clones, entre plantas do mesmo clone e entre inflorescências da mesma planta. Além disso, pesquisas mostram que essa anomalia pode ser reversível ao longo dos ciclos produtivos (Duval et al., 1997; Paranjothy et al., 1995).

A causa desta anomalia é investigada. De acordo com Agamuthu et al. (1996) e Jagliot et al. (2000), em plantas com anomalia, ocorre mudança no estado de metilação de genes homeóticos que controlam o desenvolvimento do primórdio floral. Jones (1995)

demonstrou que plantas normais e anormais diferiram no grau de metilação do DNA. Estudos mostram que o uso de citocinina (Eeuwens et al., 2002; Jones et al., 1995; Jones, 1990) e intervalos curtos de subcultivos (Eeuwens et al., 2002) aumentam a incidência desta anomalia.

Várias pesquisas são dedicadas à solução deste problema, buscando viabilizar a produção de plantas via embriogênese somática, que associada aos resultados de produção dos clones no campo, permitem esperar avanços significativos na produtividade em médio prazo (Duval et al., 1997). A produtividade de dendezaes formados por clones elite é 40 a 50% superior àqueles formados a partir de sementes (Khaw et al. 1999, Rohani et al., 2003).

### 3. Poliaminas

As poliaminas são polications de baixo peso molecular, encontradas em todos seres vivos. Em plantas, estão envolvidas no crescimento e desenvolvimento, além de respostas a estresses. As poliaminas também participam de diversas respostas fisiológicas, como divisão celular, iniciação radicular, desenvolvimento floral, amadurecimento de frutos, embriogênese, regulação da replicação do DNA e transcrição de genes (Buchanan et al., 2000). Putrescina, espermina e espermidina são as poliaminas mais comumente encontradas em plantas. Elas podem ocorrer na forma livre ou conjugada (Kong et al., 1998).

Estudos do nível endógeno de poliaminas durante o processo de embriogênese somática de várias espécies evidenciam aumento de sua concentração principalmente durante a fase de regeneração de embriões somáticos (Wu et al., 2009; Li & Burritt, 2003; Minocha et al., 1999; Yadav and Rajam, 1998). De acordo com Smith (1985), o nível de poliaminas é frequentemente alto em células meristemáticas, as quais são observadas em calos embriogênicos. Yadav & Rajam (1998), mostraram existência de correlação positiva entre indução da embriogênese somática e aumento do conteúdo de putrescina em calos embriogênicos.

A ação das poliaminas como reguladores de crescimento promovendo a divisão e a diferenciação celular durante o processo de embriogênese somática é descrita por vários autores (Wu et al., 2009; Viu et al., 2009; Mogor et al., 2007; Li & Burritt, 2003; Teixeira da Silva, 2002; Minocha et al., 1999; Rajam, 1997; Bajaj & Rajam, 1996). Alguns estudos

têm mostrado a importância das poliaminas na otimização do processo de embriogênese somática (Paul et al., 2009; Kumar et al., 2008; Steiner et al., 2007; Silveira et al., 2006; Takeda et al., 2002; Kevers et al., 2000).

As poliaminas também apresentam ação antioxidante, inibindo a peroxidação de lipídios (Tibúrcio et al., 1997; Lovaas, 1996; Tibúrcio et al., 1993). Tang et al. (2004) demonstraram associação entre aumento na acumulação de polifenol oxidase e decréscimo de poliaminas em calos oxidados de *Pinus virginiana*.

O uso das poliaminas no processo de embriogênese somática do dendezeiro se torna bastante atrativo visto que as poliaminas atuam na replicação do DNA, promovendo sua estabilidade (Khan et al., 1992, Galston & Kaur-Sawhney, 1990) podendo assim, serem utilizadas em substituição as citocininas, na tentativa de se evitar a produção de plantas com anomalia floral.

## REFERÊNCIAS

Aberlenc-Bertossi F, Noirot M, Duval Y. BA enhances the germination of oil palm somatic embryos derived from embryogenic suspension cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 56:53-57, 1999.

Agamuthu P, Krause A, Broughton WJ, Ho CC. The possible role of homeotic gene in flower morphogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology** 4:103–105, 1996.

Bajaj S, Rajam MV. Polyamine accumulation and near loss of morphogenesis in long-term callus cultures of rice. **Plant Physiology** 112:1343–1348, 1996.

Barcelos E, Nunes CDM, Cunha RNV. Melhoramento genético e produção de sementes comerciais de dendezeiro. In: Viégas I de JM, Müller AA. (Ed.) **A cultura do dendezeiro na Amazônia Brasileira**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental/Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, p. 145-174, 2000.

Boddey R. Green energy from sugar cane. **Chemistry and Industry**, London 12:355-358, 1993.

Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. 1ed. American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland, USA, 911-915, 2000.

Corley RHV, Lee CH, Law IH, Wong CY. Abnormal flower development in oil palm clones. **Planter** 62:233–240, 1986.

Cronquist A. **An integrated system of classification of flowering plants**. Columbia University Press. 1981.

Duval Y, Amblard P, Rival A, Konan E, Gogor S, Durand-Gasselín T. Progress in oil palm tissue culture on clonal performance in Indonesia in the Côte d'Ivoire. In: International Planters Conference, 1997, Kuala Lumpur. **Proceedings**. Kuala Lumpur: RRIM, 17 p. 1997.

Durzan DJ. Somatic polyembryogenesis for the multiplication of tree crops. **Biotechnology Genetics Engineering Review** 6:339-376, 1988.

Eeuwens CJ, Lord S, Donough CR, 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** 70 (3):311-323, 2002.

Fermino Júnior PCP, Silva RA, Maciel AS, Guedes RS, Pereira JES. Análises morfo-histológicas da embriogênese somática de açazeiro (*Euterpe oleraceae* Mart.). **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental** 1:845-848, 2007.

Ferwerda JD. Ecophysiology of the african oil palm. In: Alvim, P. de. (Coord.). **Ecophysiology of tropical crops**. Ilhéus: Ceplac 2:1-49, 1975.

Galston AW & Kaur-Sawhney R. Polyamines in plant physiology. **Plant Physiology** 94:406-410, 1990.

Genty P, Garzon A, Luchine F, Delvare G. Polinización entomófila de la palma-africana en América Tropical. **Oléagineux** 41 (3):99-112, 1986.

George EF, Hall MA, De Klerk GJ. **Plant propagation by tissue culture**. 3<sup>rd</sup> Edition. Vol. 1 The Background. Springer. 2008. 501p.

Gomes KKP, Oliveira VC de, Ledo AdaS, Ângelo PCdaS, Costa JLdaS. Indução de calo a partir de eixo embrionário de coqueiro (*Cocos nucifera* L.). **Revista Brasileira Fruticultura** 26 (1):124-126, 2004.

Gonçalves ACR. Dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.). In: Castro PRC, Kluge RA. (Coord.) **Ecofisiologia de culturas extrativas: cana-de-açúcar, seringueira, coqueiro, dendezeiro e oliveira**. Cosmópolis: Stoller do Brasil, p. 95-112, 2001.

Guerra MP, Torres AC, Teixeira JB. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: Torres, A. C.; Caldas, L. S.; Buso, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa SPI/Embrapa- CNPH, 2, p.533-568, 1999.

Hussey G. An analysis of the factors controlling the germination of the seed of the oil palm, *Elaeis guineensis* (Jacq.) **Annals of Botany** 22:259-286, 1958.

Hussey G. The germination of oil palm seed: experiments with tenera nuts and kernels. **Journal of the West African Institute for Oil Palm Research** 2:331-354, 1959.

Jaligot E, Rival A, Beule T, Dussert S, Verdeil JL. Somaclonal variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.): the DNA methylation hypothesis. **Plant Cell Reports** 19:684–690, 2000.

Jiménez VM. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** 13 (2):196-223, 2001.

Jones LH, Hanke DE, Eeuwens CJ. An evaluation of the role of cytokinins in the development of abnormal inflorescences in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) regenerated from tissue culture. **Journal Plant Growth Regulator** 14:135–142, 1995.

Jones LH. Endogenous cytokinins in oil palm (*Elaeis guineensis* L.) callus, embryoids and regeneration plants measured by radioimmunoassay. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 20:201-209, 1990.

Kanchanapoom K, Domyoas P. The origin and development of embryoids in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) embryo culture. **Science Asia** 25:195-202, 1999.

Khan AU, Mei YH, Wilson T. A proposed function for spermine and spermidine: protection of replicated DNA against damage by singlet oxygen, **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 89:1126-1127, 1992.

Khaw CH, Ng SK, Thong KC. Commercial production of clonal palms by tissue culture – prerequisites, constraints and issues. In: **Proceedings of the 1999 PORIM International Palm Oil Congress – Agriculture**. Emerging Technologies and Opportunities in the Next Millennium. Palm Oil Research Institute of Malaysia (PORIM), Kuala Lumpur, Malaysia, 1-6 February, 1999.

Kevers C, Le Gal N, Monteiro M, Dommes J, Gaspar TH. Somatic embryogenesis of *Panax ginseng* in liquid cultures: a role for polyamines and their metabolic pathways. **Plant Growth Regulator** 31:209-214, 2000.

Kong L, Attree SM, Fowke LC. Effects of polyethylene glycol and methylglyoxal bis (guanyldrazone) on endogenous polyamine levels and somatic embryo maturation in white spruce (*Picea glauca*). **Plant Science** 133:211–220, 1998.

Kumar V, Giridhar P, Chandrashekar A, Ravishankar GA. Polyamines influence morphogenesis and caffeine biosynthesis in *in vitro* cultures of *Coffea canephora* P. ex Fr. **Acta Physiologia Plantarum** 30:217–223, 2008.

Li Z, Burritt DJ. Changes in endogenous polyamines during the formation of somatic embryos from isogenic lines of *Dactylis glomerata* L. with different regenerative capacities. **Plant Growth Regulator** 40:65–73, 2003.

Lovaas E. Antioxidant and metal-chelating effects of polyamines. In: Sies H (ed) **Advances in Pharmacology. Antioxidants in Disease Mechanisms and Therapy**, Vol. 38. Academic Press, New York, p 119–149, 1996.

Minocha R, Long S, Maki H, Minocha SC. Assays for the activities of polyamine biosynthetic enzymes using intact tissues. **Plant Physiology Biochemistry** 37:597-603, 1999.

Mogor G, Lima GPP, Mogor AF. Espermidina e espermina exógena na micropropagação de *Aloe vera* (L.) Burm. **Revista Cubana de Plantas Medicinales** 12(2), 2007. Disponível em [http://www.bvs.sld.cu/revistas/pla/vol12\\_2\\_07/pla08207.htm](http://www.bvs.sld.cu/revistas/pla/vol12_2_07/pla08207.htm).

Müller AA. Produção de mudas de dendzeiro. In: Viégas I deJM, Müller AA. (Ed.) **A cultura do dendzeiro na Amazônia Brasileira**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental/Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, p. 175-191, 2000.

Paranjothy K, Rohani O, Tan CC, Wong G, Soh AC. Incidence of abnormalities in relation to in vitro protocols. In: **Recent developments in oil palm tissue culture and biotechnology**, p. 77-85. 1995.

Parthasarathy U, Parthasarathy VA, Karun A. Oil palm. In: Parthasarathy VA, Bose TK, Deka PC, Das P, Mitra SK & Mohandas S. (eds) **Biotechnology of Horticultural Crops** Vol. 1. Naya Prokash, Calcutta, p. 595–608, 2001.

Paul A, Mitter K, Raychaudhuri SS. Effect of polyamines on in vitro somatic embryogenesis in *Momordica charantia* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 97:303–311, 2009.

Rajam MV. Polyamines. In: Prasad MNV (ed) **Plant ecophysiology**. John Wiley & Sons, New York, p 343–374, 1997.

Rajesh MK, Radha E, Karun A, Parthasarathy VA. Plant regeneration from embryo-derived callus of oil palm – the effect of exogenous polyamines. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 75:41-47, 2003.

Rees AR. High-temperature pre-treatment and the germination of seed of the oil palm, *Elaeis guineensis* (Jacq). **Annals of Botany** 26:569-581, 1962.

Rohani O, Zamzuri I, Tarmizi AH. Oil palm cloning: MPOB protocol. Malaysian Palm Oil Board. Ministry of Primary Industries, Malaysia. **MPOB Technology** 26, p. 1-26. 2003.

Schwendiman J, Pannetier C, Michaux-Ferriere N. Histology of somatic embryogenesis from leaf explants of the oil palm *Elaeis guineensis*. **Annals of Botany** 62:43-52, 1988.

Silveira V, Santa-Catarina C, Tun NN, Scherer GFE, Handro W, Guerra MP, Floh EIS. Polyamine effects on the endogenous polyamine contents, nitric oxide release, growth and differentiation of embryogenic suspension cultures of *Araucaria angustifolia* (Bert) O Ktze. **Plant Science** 171:91–98, 2006.

Smith TA. Polyamines. **Annual Review Plant Physiology** 36:117–143, 1985.

Srisawat T & Kanchanapoom K. The influence of physical conditions on embryo and protoplast culture in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Science Asia** 31:23-28, 2005.

Steiner N, Santa-Catarina C, Silveira V, Floh EIS, Guerra MP. Polyamine effects on growth and endogenous hormones levels in *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 89:55–62, 2007.

Steinmacher DA, Krohn NG, Dantas ACM, Stefenon VM, Clement CR, Guerra MP. Somatic Embryogenesis in Peach Palm Using the Thin Cell Layer Technique: Induction, Morpho-histological Aspects and AFLP Analysis of Somaclonal Variation **Annals of Botany** 100:699–709, 2007.

Takeda R, Hayakawa F, Oe K, Matsuoka H. Effects of exogenous polyamines on embryogenic carrot cells. **Biochemical Engineering Journal** 12:21–28, 2002.

Tang W, Ronald J. Increase of polyphenol oxidase and decrease of polyamines correlate with tissue browning in Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.). **Plant Science** 167:621-628, 2004.

Teixeira da SJA. Polyamines in the regulation of chrysanthemum and Tobacco *in vitro* morphogenetic pathways. **Property of Ornamental Plants** 2:9–15, 2002.

Teixeira JB, Söndhal NR, Nakamura T, Kirby EG. Establishment of oil palm cell suspensions and plant regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 40:105–111, 1995.

Teixeira JB, Sandahl MR, Kirby EG. Somatic embryogenesis from immature inflorescences of oil palm. **Plant Cell Reports** 13:247-250 1994.

Tibúrcio AF, Altabella T, Borrell T, Masgrau C. Polyamines metabolism and its regulation. **Physiologia Plantarum** 100:664–674, 1997.

Tibúrcio AF, Campos JL, Figueras X, Besford RT. Recent advances in the understanding of polyamine functions during plant development. **Plant Growth Regulator** 12:331–340, 1993.

Touchet B, Duval Y, Pannetier C. Plant regeneration from embryogenic suspension culture of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Plant Cell Reports** 10:529-532, 1991.

Valois ACC. Possibilidades da cultura do dendê na Amazônia. Brasília: Embrapa-Cernagem, **Comunicado Técnico**, 19. 1997.

Veiga AS, Furlan Júnior J, Kaltner JF. Situação atual e perspectivas futuras da dendeicultura nas principais regiões produtoras: a experiência do Brasil. In: Müller AA, Furlan Júnior J. (Ed.) **Agronegócio do dendê: uma alternativa social, econômica e ambiental para o desenvolvimento sustentável da Amazônia**. Belém: Embrapa Amazônia Ocidental, p. 41-66, 2001.



Vicient CM, Martinez FX. The potential uses of somatic embryogenesis in agroforestry are not limited to synthetic seed technology. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** 1(10):1-12, 1998.

Viu AFM, Viu MAO, Tavares AR, Vianello F, Lima GPP. Endogenous and exogenous polyamines in the organogenesis in *Curcuma longa* L. **Scientia Horticulturae** 121:501–504, 2009.

Wu XB, Wang J, Liu JH, Deng XX. Involvement of polyamine biosynthesis in somatic embryogenesis of Valencia sweet orange (*Citrus sinensis*) induced by glycerol. **Journal of Plant Physiology** 166(1):52-62, 2009.

Yadav JS, Rajam MV. Temporal regulation of somatic embryogenesis by adjusting cellular polyamine content in eggplant. **Plant Physiology** 116:617–625, 1998.

## CAPÍTULO 1

### **USO DE POLIAMINAS NA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA A PARTIR DE FOLHAS IMATURAS DE GENÓTIPOS DE DENDEZEIRO (*Elaeis guineensis* Jacq)**

#### **RESUMO**

CARVALHO, Mychelle D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2009. **Uso de poliaminas na embriogênese somática a partir de folhas imaturas de genótipos de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq).** Orientador: Sérgio Yoshimitsu Motoike. Co-orientadores: Marília Contin Ventrella e Wagner Campos Otoni.

A cultura de tecidos constitui-se como alternativa promissora para a multiplicação clonal do dendezeiro. Em função de sua natureza morfoanatômica e fisiológica, a propagação de clones elite só é possível por meio da embriogênese somática. Assim, o trabalho teve por objetivo estabelecer um protocolo eficiente para embriogênese somática de genótipos de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.), a partir de explantes foliares, substituindo o uso de citocininas por poliaminas. Seções de 5 mm de folhas imaturas retiradas de dois genótipos (G1001 e G2301) de dendê de 1,5 ano de idade foram inoculadas em meio de cultura Y3 (Eeuwens, 1978), adicionado de 0,3% de carvão ativado e quatro concentrações de 2,4-D (800, 1000, 1200 e 1400  $\mu\text{M}$ ). Maior porcentagem de indução de calos foi obtida em explantes foliares do G2301 submetidos à concentração 800  $\mu\text{M}$  de 2,4-D. Os calos obtidos foram subcultivados para os meios de multiplicação e a obtenção de massas pró-embriogênicas ocorreu em meio suplementado com 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D adicionado de 1000  $\mu\text{M}$  putrescina ou 100  $\mu\text{M}$  espermina. Para a regeneração de embriões somáticos as poliaminas utilizadas na fase de multiplicação foram mantidas, resultando em dois experimentos referentes a cada tipo de poliamina. Nesses experimentos testou-se três composições do meio quanto a auxina (0; 0,045  $\mu\text{M}$  2,4-D e 0,045  $\mu\text{M}$  ANA) e dois tipos de pré-condicionamento da massa pró-embriogênica (com e sem). O pré-condicionamento consistiu de subcultivo da massa pró-embriogênica em meios com 0,1  $\mu\text{M}$  de 2,4D e acrescido de 0,3% carvão de ativado. As massas pró-embriogênicas que não passaram pelo pré-condicionamento foram transferidas diretamente do meio de multiplicação para os tratamentos de regeneração. Maior porcentagem de regeneração de embriões somáticos

ocorreu a partir de massas pró-embriogênicas que passaram pelo pré-condicionamento e foram inoculadas em meio de regeneração adicionado de 0,045  $\mu\text{M}$  2,4-D e 1000  $\mu\text{M}$  putrescina. Os embriões somáticos regenerados exibiram protoderme característica, cordões de procâmbio e meristema apical e germinaram em meio de cultura Y3 adicionado de 0,54  $\mu\text{M}$  ANA e 1000  $\mu\text{M}$  putrescina. As plântulas obtidas apresentaram desenvolvimento simultâneo de parte aérea e radícula e puderam ser aclimatizadas, sendo de 70,4% a porcentagem de plantas obtidas.

**USE OF POLYAMINES ON SOMATIC EMBRYOGENESIS FROM IMMATURE  
LEAVES OF GENOTYPES OIL PALM (*Elaeis guineensis* Jacq)**

**ABSTRACT**

CARVALHO, Mychelle D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November of 2009. **Use of polyamines on somatic embryogenesis from immature leaves of genotypes oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq).** Adviser: Sérgio Yoshimitsu Motoike. Co-advisers: Marília Contin Ventrella and Wagner Campos Otoni.

Tissue culture is as a promising alternative to the multiplication of clonal oil palm, and because of its anatomical and physiological nature, the propagation of elite clones is only possible through somatic embryogenesis. Thus, the study had to establish an efficient protocol for somatic embryogenesis of genotypes oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.), from leaf explants, replacing the use of cytokinins by polyamines. Sections of 5 mm in immature leaves from two genotypes (G1001 and G2301) palm of 1.5 years of age were inoculated in culture medium Y3 (Eeuwens, 1978) added 0.3% activated charcoal and four concentrations 2,4-D (800, 1000, 1200 and 1400  $\mu\text{M}$ ). Higher percentage of callus induction was obtained in leaf explants submitted to the G2301 concentration 800  $\mu\text{M}$  of 2,4-D. The calli obtained were subcultured for the medium of multiplication and obtain pro-embryogenic masses occurred in medium supplemented with 9  $\mu\text{M}$  2,4-D added to 1000  $\mu\text{M}$  putrescine or 100  $\mu\text{M}$  spermine. For the regeneration of somatic embryos, the polyamines used in the multiplication phase were maintained, resulting in two experiments for each type of polyamine. In these experiments we tested three compositions of the resource as an auxin (0.045  $\mu\text{M}$  2,4-D and 0.045  $\mu\text{M}$  ANA) and two types of pre-conditioning of the pro-embryogenic mass (with and without). The pre-conditioning consisted of subculture of pro-embryogenic mass medium with 0.1  $\mu\text{M}$  of 2-4 D and plus 0.3% activated charcoal. The pro-embryogenic masses that did not pass the pre-conditioning were transferred directly from the culture medium for the regeneration treatments. A higher percentage of regeneration of somatic embryos occurred from pro-embryogenic masses that passed through the pre-conditioning and were inoculated on

regeneration medium with the addition of 0.045  $\mu\text{M}$  2,4-D and 1000  $\mu\text{M}$  putrescine. The embryos regenerated exhibited characteristic protoderm, procambium strands and shoot meristem and germinated in culture medium Y3 added 0.54  $\mu\text{M}$  ANA and 1000  $\mu\text{M}$  putrescine. The seedlings showed simultaneous development of shoot and root and could be acclimatized, and 70.4% the percentage of plants.

## 1 - INTRODUÇÃO

O Brasil possui diversas espécies oleaginosas que podem ser utilizadas como fonte de matéria-prima para produção de biocombustíveis. No entanto, existe grande expectativa em relação às espécies oleaginosas perenes, uma vez que elas apresentam alta produtividade e baixo custo ambiental, comparada às espécies anuais. As palmáceas constituem o grupo de espécies mais propício, sendo o dendê a planta que apresenta a maior produtividade de óleo, com rendimento entre 4 e 6 t por hectare, índice este, cerca de 10 vezes maior que o rendimento de produção de óleo de soja.

A Amazônia brasileira tem cerca de 70 milhões de hectares adequados para essa cultura, e 50 milhões encontra-se no Estado do Amazonas e 20 milhões no Estado do Pará. Essas áreas têm condições de produzir dendê para absorver grandes demandas internas e externas, o que tornaria o país um dos maiores produtores mundiais.

Em função da alta heterozigose desta espécie, a propagação por sementes, como é feito no país, apresenta o inconveniente de formação de plantios heterogêneos, o que promove a desuniformidade na produção e dificuldades nas práticas de manejo (Srisawat & Kanchanapoom, 2005).

A uniformidade dos dendezais e o conseqüente aumento da produtividade podem ser alcançados adotando-se o cultivo de clones elite, gerados a partir de plantas matrizes híbridas, selecionadas e propagadas vegetativamente por meio da embriogênese somática.

Apesar de diversos protocolos de embriogênese somática do dendezeiro já terem sido publicados, a micropropagação do dendezeiro é ainda cercada de mistérios e segredos industriais (Rajesh et al., 2003), fazendo com que o custo de obtenção da muda micropropagada seja mais que sete vezes superior ao obtido por método convencional. Além disso, os protocolos publicados apresentam diversas limitações, tais como o baixo índice de conversão dos embriões somáticos (Teixeira et al., 1995; Touchet et al., 1991) e ocorrência de anomalias em mudas micropropagadas, associadas ao uso de reguladores de crescimento no meio de cultivo, especificamente citocininas (Eeuwens et al., 2002).

De acordo com os protocolos descritos, a embriogênese somática em dendezeiro requer na fase de indução a adição de altas concentrações de auxinas, principalmente 2,4-D e a posterior formação de embriões somáticos é alcançada com a redução gradativa da concentração de auxinas e a adição de citocinina (Parthasarathy et al., 2001).

Além das auxinas e citocininas, as poliaminas por se apresentarem como importantes moduladoras de processos biológicos como divisão celular, crescimento e diferenciação, são utilizadas nos processos de morfogênese *in vitro* de muitas espécies (Paul et al., 2009; Steiner et al. 2007; Silveira et al., 2006; Takeda et al., 2002; Shoeb et al., 2001). Segundo esses autores, o uso das poliaminas é efetivo na obtenção da embriogênese somática. Em dendezeiro, apenas Rajesh et al. (2003) obteve embriogênese somática a partir de embrião zigótico utilizando poliaminas em substituição à citocinina, no entanto, a porcentagem e o número de embriões formados foi muito baixa.

No Brasil, as pesquisas na área de cultura de tecidos têm proporcionado bons resultados para algumas espécies de palmáceas, como *Cocus nucifera* (Gomes et al., 2004), *Euterpe oleracea* (Fermino Jr. et al., 2007) e *Bactris gasipaes* (Steinmacher et al., 2007), no entanto para o dendezeiro praticamente não existem pesquisas relacionadas às técnicas de cultivo *in vitro*, impossibilitando a efetiva utilização de clones elite na dendeicultura brasileira. Dessa forma, tornam-se importantes os testes para otimização dos protocolos existentes.

Assim, o trabalho teve por objetivo estabelecer um protocolo eficiente para embriogênese somática de genótipos de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.), a partir de explantes foliares, substituindo o uso de citocininas por poliaminas.

## **2 - MATERIAL E MÉTODOS**

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Células e Tecidos Vegetais do setor de Fruticultura, Departamento de Fitotecnia e no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa em Minas Gerais, Brasil. Folhas imaturas foram extraídas de plantas de dois genótipos (G1001 e G2301) de dendê de 1,5 anos de idade, obtidas a partir de sementes pré-germinadas cedidas pela Embrapa Amazônia Ocidental.

### **2.1 - Indução da embriogênese somática**

Folhas imaturas foram inicialmente lavadas em água corrente por 5 minutos e, em seguida, com solução de Detertec<sup>®</sup> 50% (Vetec). Após lavagem, as folhas mais externas foram retiradas e as folhas internas levadas para câmara de fluxo laminar onde foram submetidas a desinfestação através da imersão em álcool 70% por 1 minuto, seguido de imersão em solução de hipoclorito de sódio (1,0% cloro ativo) por 30 minutos. Após cada etapa da desinfestação, as folhas foram enxaguadas em água deionizada estéril por três vezes.

Após desinfestação, em câmara de fluxo laminar as folhas imaturas foram seccionadas transversalmente em segmentos de cinco milímetros (Figura 1A) e inoculadas em meio de cultura básico (MB) adicionado de 3 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado. O MB foi composto de sais de Y<sub>3</sub> (Euweens, 1978), 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 1 g.L<sup>-1</sup> de caseína hidrolisada, 100 mg.L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 100 mg.L<sup>-1</sup> de glutamina, 100 mg.L<sup>-1</sup> de asparagina, 100 mg.L<sup>-1</sup> de arginina e 2,5 g.L<sup>-1</sup> de Gelrite<sup>®</sup> (Sigma, USA) para solidificação. O pH do MB foi ajustado para 5,7±0,01, e autoclavado a 121°C e 1,5 atm por 20 minutos. Para meios em placas de Petri, estes foram autoclavados em frascos Erlenmeyer e vertidos nas placas em câmara de fluxo laminar.

Baseado em testes preliminares quatro concentrações de 2,4-D (800, 1000, 1200 e 1400 µM) foram testadas. O experimento foi instalado utilizando o fatorial 2 x 4, em tubos de ensaio de 25 mm x 150 mm, contendo 10 mL do meio de cultura. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições. Cada repetição foi representada por cinco tubos de ensaio, com um explante por tubo. Os explantes foram incubados no escuro, em sala de cultura mantida a 27°C ± 2°C por 90 dias.

Após este período de incubação, determinou-se a porcentagem de explantes com formação de calos. Os dados foram submetidos à análise de variância e os efeitos da interação genótipo x concentração de 2,4-D foram ajustados ao modelo de regressão.

## 2.2 - Multiplicação e manutenção de massas pró-embriogênicas

Em função da baixa porcentagem de indução de calos no G1001, foram utilizados na fase de multiplicação e manutenção de massas pró-embriogênicas apenas calos oriundos de explantes foliares do G2301.



Os calos foram subcultivados aleatoriamente para os meios de multiplicação em placas de Petri de poliestireno com 90 x 15 mm de dimensão, contendo 30 mL de meio de cultura MB, suplementado com 9 µM de 2,4-D. Dois tipos de poliamina e carvão ativado foram testados nesta fase, em esquema fatorial 2x2, totalizando quatro tratamentos (Tabela 1). O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições. Cada repetição foi representada por uma placa de Petri com quatro calos de aproximadamente 5 mm de diâmetro. Após a inoculação, as placas de Petri foram mantidas no escuro a 25±2°C por 60 dias. Foram avaliadas a porcentagem de calos embriogênicos e a porcentagem de massas pró-embriogênicas com desenvolvimento sincrônico. Os dados foram submetidos à análise de variância e a comparação das médias dos tratamentos foi realizada por meio do teste de F a 5% de probabilidade.

Tabela 1. Tratamentos utilizados na multiplicação e manutenção de massas pró-embriogênicas de dendezeiro.

Tratamento	Poliamina (µM)	Carvão Ativado*( g.L <sup>-1</sup> )
TM1	1000 putrescina	-
TM2	100 espermina	-
TM3	1000 putrescina	3,0
TM4	100 espermina	3,0

\*Ecibra<sup>®</sup>, Brasil

### 2.3 – Regeneração e maturação dos embriões somáticos

Massas pró-embriogênicas utilizadas nesta fase tiveram duas origens, conseqüentemente foram separadas em dois grupos (Figura 1). Esses grupos foram denominados GA, quando as massas pró-embriogênicas originaram de TM1; e GB, quando as massas pró-embriogênicas originaram de TM2. A partir desses grupos foram montados dois experimentos de regeneração e maturação de embriões somáticos: experimento A e experimento B.

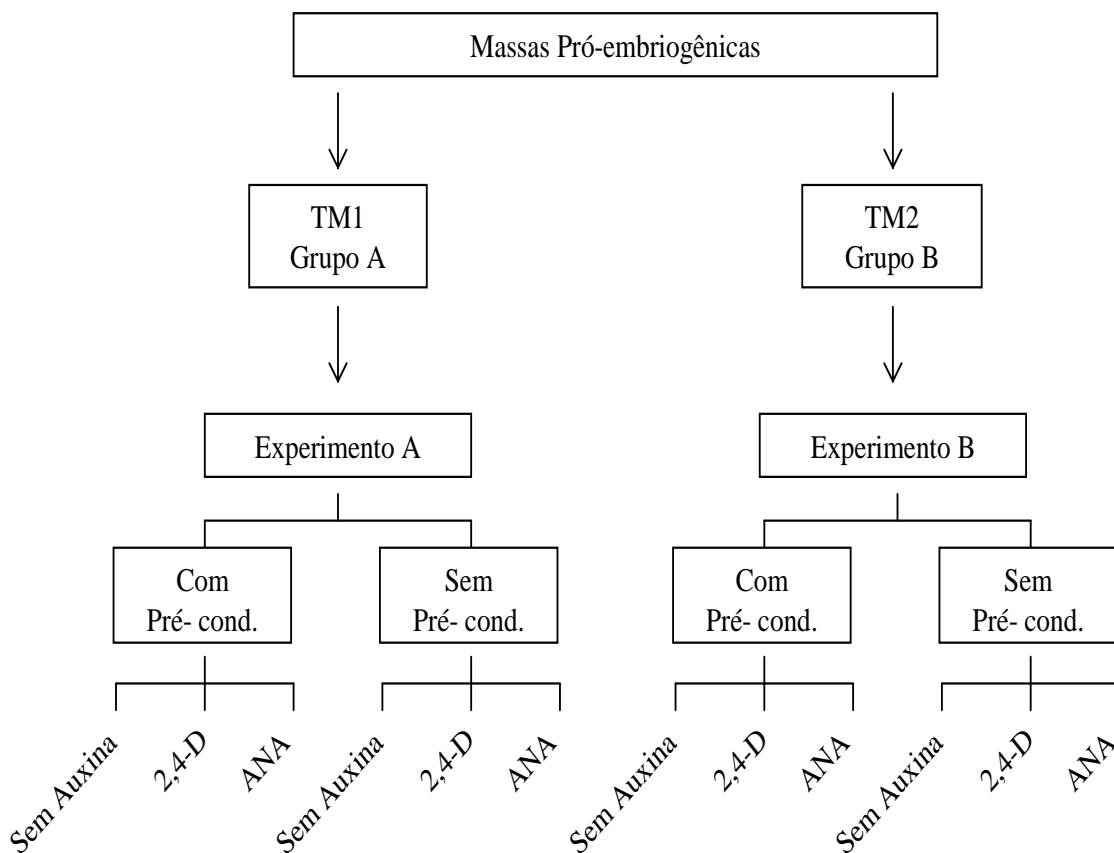


Figura 1. Esquema representativo dos experimentos de regeneração e maturação dos embriões somáticos de dendezeiro.

Experimento A. O experimento A consistiu de massas pró-embriogênicas GA, as quais foram subcultivadas em meio MB modificado, acrescido de 1000  $\mu\text{M}$  de putrescina.

Experimento B. O experimento B consistiu de massas pró-embriogênicas GB, as quais foram subcultivadas em meio MB modificado, acrescido de 100  $\mu\text{M}$  de espermina.

O MB modificado consistiu de meio MB no qual se alterou a concentração dos seus aminoácidos glutamina, asparagina e arginina para 333  $\text{mg.L}^{-1}$ .

Em ambos os experimentos foram testados três composições do meio de cultura quanto à auxina e pré-condicionamento da massa pró-embriogênica (Tabela 2), em esquema fatorial 3x2.

O pré-condicionamento consistiu de subcultivo da massa pró-embriogênica em meios de acondicionamento por 45 dias, no escuro a  $25\pm 2^\circ\text{C}$ . Os meios de acondicionamento foram os mesmos meios TM1 e TM2, porém com nível de 2,4-D reduzido para 0,1  $\mu\text{M}$  e acrescido de 3  $\text{g.L}^{-1}$  carvão de ativado. As massas pró-

embriogênicas que não passaram pelo pré-condicionamento foram transferidas diretamente do meio de multiplicação e manutenção TM1 e TM2 para os tratamentos de regeneração e maturação de embriões somáticos.

Tabela 2. Tratamentos utilizados nos experimentos A e B de regeneração e maturação dos embriões somáticos de dendezeiro.

Tratamento	Auxina ( $\mu\text{M}$ )	Pré-condicionamento
TR1	-	sem
TR2	-	com
TR3	0,045 de 2,4-D	sem
TR4	0,045 de 2,4-D	com
TR5	0,045 de ANA	sem
TR6	0,045 de ANA	com

Os experimentos foram montados em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições. Cada parcela experimental foi constituída por uma placa de petri com cinco massas pró-embriogênicas de aproximadamente 5 mm de diâmetro.

Após a inoculação, as placas de Petri foram incubadas em sala de cultivo mantida em fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de  $30 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , obtida com lâmpadas fluorescentes de 40W Osram® e temperatura de  $25\pm 2^\circ\text{C}$ , por 60 dias. Após esse período avaliou-se a porcentagem de massas pró-embriogênicas que regeneraram embriões somáticos e o número de embriões somáticos formado em cada tratamento.

Realizou-se a análise de variância de cada experimento, para se estimar a relação entre o maior e o menor quadrado médio do resíduo, a fim de se verificar a necessidade de ajustes de grau de liberdade das fontes de variação, para posterior análise de variância conjunta dos experimentos.

A análise de variância de cada experimento indicou que a razão entre o maior e o menor quadrado médio residual, para as variáveis analisadas, foi menor que sete, indicando que os quadrados médios residuais, relativos aos experimentos envolvidos na análise são homogêneos. Isso indica que a precisão experimental entre os ensaios não foi discrepante, o

que permitiu a realização da análise conjunta dos dados, sem o ajuste dos graus de liberdade (Pimentel-Gomes, 1991).

A comparação das médias dos tratamentos foi realizada por meio do teste de F e pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

#### 2.4 – Germinação

Embriões somáticos regenerados no experimento A foram transferidos para meio de cultura MB modificado acrescido de 1000  $\mu\text{M}$  de putrescina combinado com três concentrações de ANA e duas concentrações de carvão ativado resultando em um fatorial 3x2 (Tabela 3). O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, com sete repetições por tratamento. Cada parcela experimental foi representada por um frasco de 300 mL contendo 30 mL do meio de cultivo onde foram inoculados três embriões somáticos. Os frascos foram incubados em sala de cultura mantida a  $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , sob fotoperíodo de 16 horas/dia e intensidade luminosa de  $30 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , obtida com lâmpadas fluorescentes de 40W Osram<sup>®</sup>. Após 90 dias de incubação foi avaliada a porcentagem de germinação. Os dados foram submetidos à análise de variância e a comparação das médias dos tratamentos foi realizada por meio do teste de Tukey e pelo teste de F a 5% de probabilidade.

Tabela 3. Tratamentos utilizados na germinação de embriões somáticos de dendezeiro.

Tratamento	Auxina ( $\mu\text{M}$ )	Carvão Ativado*( $\text{g.L}^{-1}$ )
TG1	-	-
TG2	-	-
TG3	0,54 de ANA	1,5
TG4	0,54 de ANA	-
TG5	5,37 de ANA	1,5
TG6	5,37 de ANA	-

\*Ecibra<sup>®</sup>, Brasil

As plântulas com mais de 4 folhas e com sistema radicular desenvolvido foram aclimatizadas em sacolas plásticas contendo substrato comercial Plantmax<sup>®</sup> em casa de

vegetação com nebulização intermitente protegidos com sombrite 70%. Durante 60 dias as plântulas foram mantidas nesse ambiente. Para nutrição das plântulas, quinzenalmente colocou-se 20 mL de solução MS ( $1/2$  força) nas sacolas.

## 2.5 – Análise histológica

Amostras de estruturas obtidas nas fases de multiplicação e manutenção de massas pró-embriogênicas, regeneração e maturação de embriões somáticos e germinação foram coletadas aleatoriamente para estudo anatômico.

Para a obtenção dos cortes anatômicos, o material foi fixado em FAA<sub>50</sub>(formol: ácido acético: álcool etílico<sub>50%</sub>, na proporção de 5: 5: 90) e estocado em etanol 70% (Johansen, 1940). As amostras foram incluídas em metacrilato (Historesin-Leica<sup>®</sup>), de acordo com as recomendações do fabricante. O material emblocado foi seccionado em micrótomo rotativo, com 6 µm de espessura. O material foi corado com azul de toluidina, para metacromasia (O'Brien et al., 1964) e as lâminas montadas em resina sintética (Permount<sup>®</sup>). As imagens foram obtidas em fotomicroscópio (Olympus AX70) equipado com sistema U-photo.

## 3 - RESULTADOS

### 3.1 - Indução da embriogênese somática

O método de desinfestação utilizado foi eficaz no controle de infecções *in vitro*, apresentando 86,25% de eficácia e não inviabilizou a resposta morfogênica dos explantes aos tratamentos de indução da embriogênese somática.

Aos 15 dias de cultivo, os explantes foliares responsivos apresentavam modificações na superfície adaxial e abaxial. Essas modificações aparentemente resultaram do maior crescimento inicial do tecido ao longo das nervuras (Figura 2B,C). O início da morfogênese foi observado aos 60 dias de incubação *in vitro* (Figura 2D), culminando com a formação de massa de calos aos 90 dias. As massas apresentavam aspecto nodular com

algumas estruturas globulares (Figura 2E). Houve oxidação de alguns explantes foliares no final do processo de indução, mas essa oxidação não foi prejudicial à calogênese.

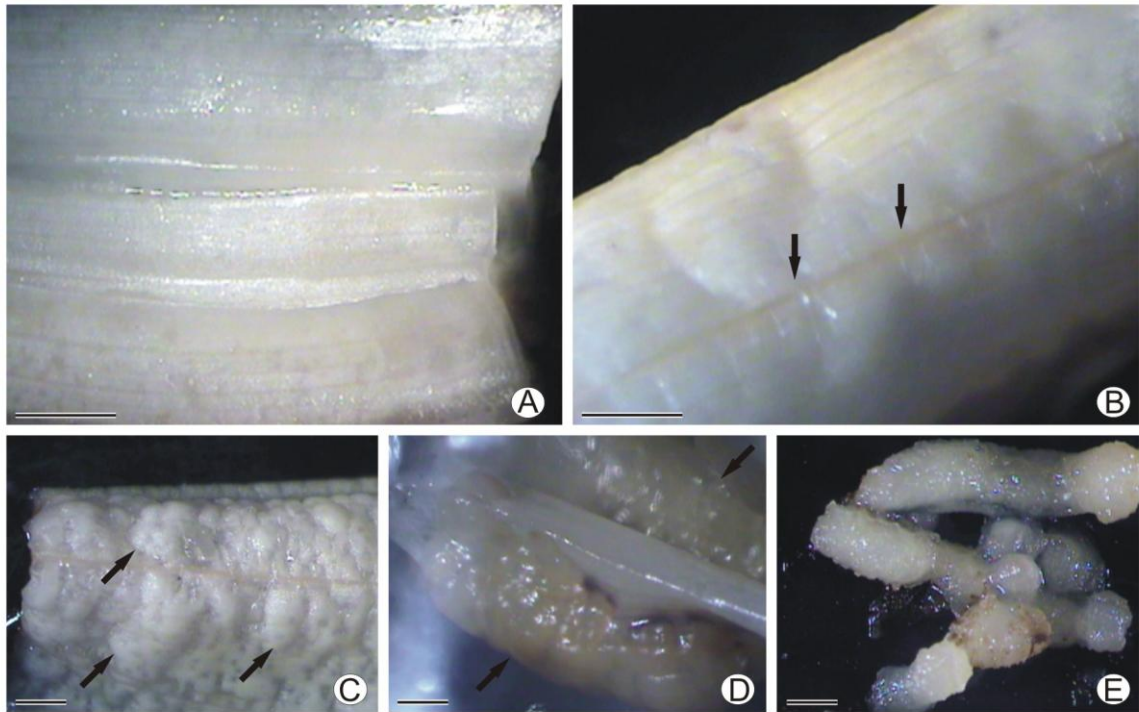


Figura 2. Formação de calos em folhas imaturas de dendezeiro. A - Explante foliar inicial em meio de indução. B – Explante foliar aos 15 dias em meio de indução (setas pretas destacam nervura). C – Explante foliar aos 30 dias em meio de indução (setas pretas destacam início da formação de calos em regiões próximas à nervura). D – Formação de calos após os 60 dias de inoculação (setas pretas: calos iniciais). E - Calos formados aos 90 dias da inoculação. Barras: 1 mm.

A indução da embriogênese variou em função do genótipo e da concentração de 2,4-D utilizada (Tabela 1A). Observou-se efeito linear das concentrações de 2,4-D utilizadas sobre a porcentagem de calogênese (Figura 3). Em ambos os genótipos a porcentagem de indução de calos apresentou redução linear com o aumento da concentração de 2,4-D. Pela função ajustada, a maior porcentagem de indução de calos foi obtida em explantes foliares submetidos à concentração 800  $\mu$ M de 2,4-D, sendo de 26,04% no genótipo G2301 e 9,69% no genótipo G1001.

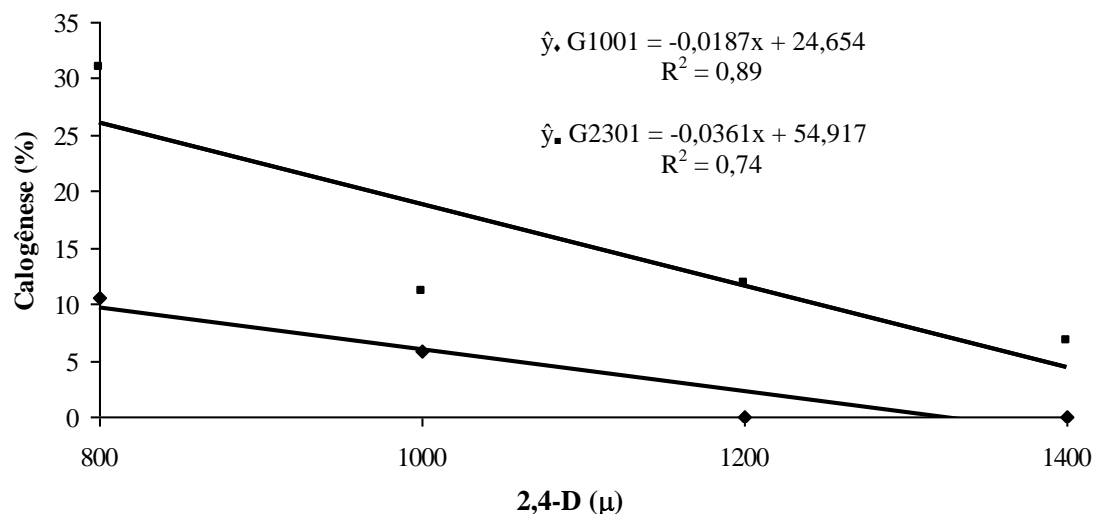


Figura 3. Estimativa da porcentagem de indução de calos em explantes foliares de genótipos de dendezeiro, aos três meses de cultivo em meio Y3, suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D (µM).

### 3.2 – Multiplicação e manutenção das massas pró-embriogênicas

Ao final dos 60 dias verificou-se em todos os tratamentos a presença de dois tipos de calos, não-embriogênico e embriogênico. O calo não-embriogênico tinha aparência compacta e não se multiplicava (Figura 4A). O calo embriogênico apresentou alta taxa de multiplicação e era friável, com estruturas globulares esponjosas, resultando na formação das massas pró-embriogênicas (Figura 4B). Não houve efeito significativo dos fatores com relação à porcentagem de calos embriogênicos (Tabela 2A). Do total de 80 calos cultivados em meios de multiplicação, 77,5% eram embriogênicos.

Com relação à porcentagem de massas pró-embriogênicas com desenvolvimento sincrônico houve efeito significativo da interação carvão ativado x poliaminas (Tabela 3A). O carvão ativado causou efeito negativo na manutenção do desenvolvimento sincrônico (Tabela 4). As massas pró-embriogênicas cultivadas na presença do carvão ativado apresentaram alteração de cor que passou de amarela para branca. A superfície das estruturas globulares se tornou mais lisa e ocasionalmente houve formação de embriões nesses meios, porém mal formados.

Tabela 4. Efeito do tipo de poliamina combinado com carvão ativado na porcentagem de massas pró-embriogênicas com desenvolvimento sincrônico.

	Massas pró - embriogênicas com desenvolvimento sincrônico (%)	
	Putrescina	Espermina
Com carvão	50b	70b
Sem carvão	100a	100a

As médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade.

Nos tratamentos sem carvão, 100% das massas pró-embriogênicas apresentaram desenvolvimento sincrônico independente do tipo de poliamina utilizado. Esses tratamentos Tm1 e Tm2 permitiram a manutenção das culturas embriogênicas (Figura 4B) em constante multiplicação por longo período. Subcultivos foram realizados a cada 60 dias durante um período de dois anos. As massas pró-embriogênicas aumentavam em média cinco vezes de tamanho durante esse período, repetindo-se em todos os cultivos subseqüentes. Avaliação histológica dessa massa confirmou o caráter embriogênico, caracterizado pela presença de regiões meristemáticas (Figura 4C) formadas por células isodiamétricas com alta relação núcleo-citoplasma e intensamente coradas com azul de toluidina (Figura 4D).

### 3.3 – Regeneração e maturação dos embriões somáticos

#### 3.3.1- Porcentagem de regeneração de embriões somáticos

Verificou-se pela análise de variância conjunta, que não houve efeito significativo das interações entre os experimentos com diferentes poliaminas e os fatores estudados. Mas houve efeito significativo de experimentos com diferentes poliaminas e do fator pré-condicionamento (Tabela 4A).



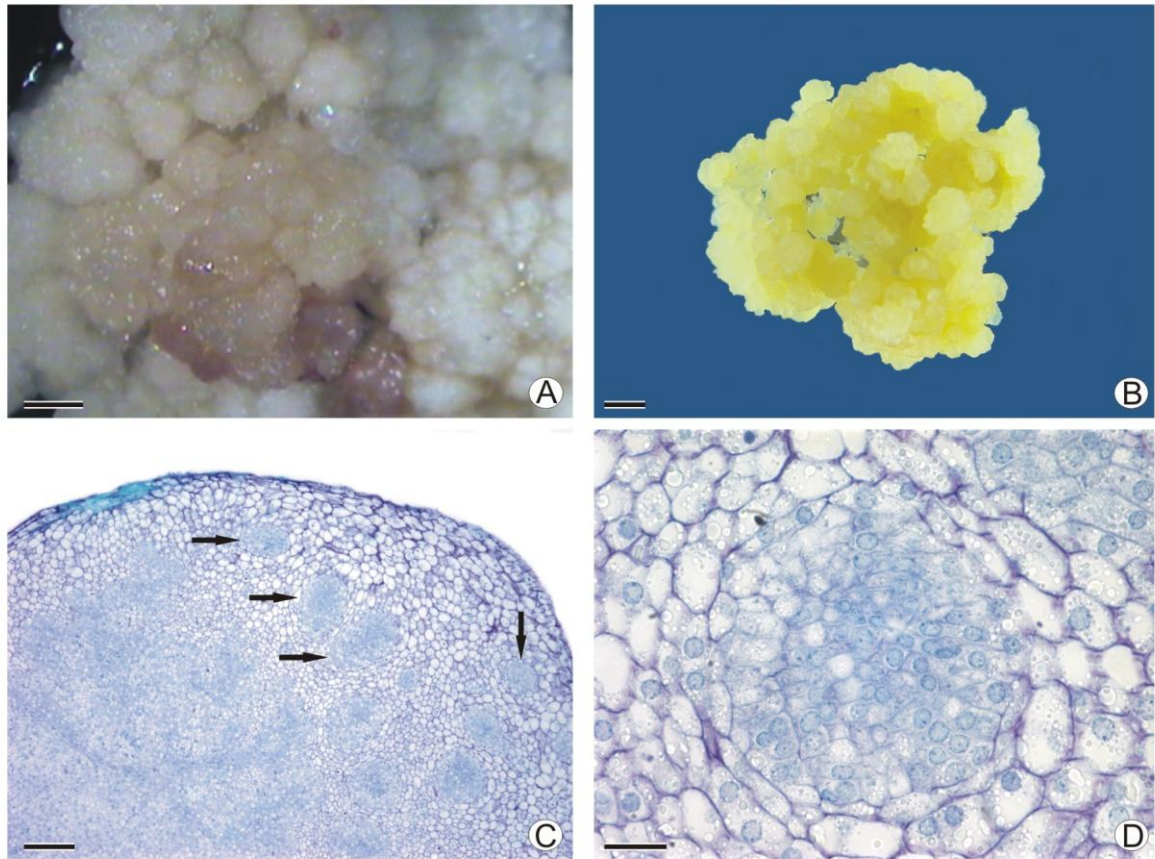


Figura 4. Tipos de calos obtidos na fase de multiplicação. A – Calo não embriogênicos. B – Calo embriogênico. C – Secção transversal de massa pró-embriogênica (setas: regiões meristemáticas). D – Destaque de região meristemática, com células isodiamétricas, altamente coradas e alta relação núcleo/citoplasma (Barras: A = B = 0,5 mm, C = 400  $\mu$ m, D = 30  $\mu$ m).

No experimento A (putrescina), a porcentagem de massas com regeneração de embriões somáticos foi superior ao experimento B (espermina), sendo esta 17,5% maior. Observou-se também que o pré-condicionamento aumenta a porcentagem de massas com regeneração de embriões somáticos, sendo este 64,1% superior em tratamentos com pré-condicionamento (Tabela 5). Massas pró-embriogênicas pré-condicionadas quando colocadas em meios de regeneração caracterizavam-se por apresentar estruturas globulares translúcidas (Figura 5A). Em análise histológica, verificou-se que as estruturas globulares resultaram da fragmentação e crescimento das regiões meristemáticas e apresentavam início de formação de protoderme e cordões de procâmbio (Figura 5B). Essas características não

foram visualizadas nas massas pró-embriogênicas que não passaram pelo pré-condicionamento, oriundas diretamente dos meios de multiplicação.

Tabela 5: Efeito do pré-condicionamento e do experimento com diferentes poliaminas na porcentagem de massas com regeneração de embriões somáticos.

	Pré-condicionamento		Experimento (Poliamina)	
	Sem	Com	A (Putrescina)	B (Espermina)
Porcentagem de Regeneração	24,2b	88,3a	65,0a	47,5b

As médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha não diferem entre si, pelo teste F, ao nível de 5% de probabilidade.

### 3.3.2 Número médio de embriões somáticos regenerados

Observou-se efeito significativo da interação entre experimentos com diferentes poliaminas x pré-condicionamento e entre pré-condicionamento x composição do meio quanto à auxina (Tabela 5A).

O número de embriões somáticos regenerados em ambos os experimentos foi maior em massas pró-embriogênicas submetidas ao pré-condicionamento. Contudo, o número de embriões somáticos obtidos foi maior no experimento A (putrescina), com média de 29,5 embriões por massa pró-embriogênica (Tabela 6).

O efeito da auxina foi maior em massas pró-embriogênicas submetidas ao pré-condicionamento. O tratamento com 2,4-D foi o mais eficiente, com 30 embriões por massa pró-embriogênica (Tabela 6).

Tabela 6. Efeito das interações pré-condicionamento x composição do meio quanto a auxina e pré-condicionamento x experimentos com diferentes poliaminas no número médio de embriões somáticos regenerados.

	Número médio de embriões somáticos				
	Auxina			Experimento (Poliamina)	
	0	2,4-D	ANA	A (Putrescina)	B (Espermina)
Com Pré-condicionamento	16,5aB	30,4aA	17,6aB	29,8aA	13,9aB
Sem Pré-condicionamento	4,6 bA	6,8 bA	5,1 bA	7,8 bA	3,2 bA

As médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

As médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste F, ao nível de 5% de probabilidade.

Observou-se também que ao final de 60 dias nos meios de regeneração e maturação, os embriões somáticos formados a partir de massas pró-embriogênicas pré-condicionadas eram mais desenvolvidos. A análise histológica realizada em embriões somáticos (Figura 5C) coletados no final da fase de regeneração demonstrou haver protoderme, cordões procambiais e meristema apical bem definidos (Figura 5 D, E, F, G). Os embriões somáticos se desenvolveram de forma assincrônica e a formação desses embriões ocorreu via origem multicelular, por meio da proliferação e fragmentação das massas meristemáticas.

Ao longo da fase de regeneração observou-se a ocorrência de embriogênese secundária em embriões regenerados a partir de massas pró-embriogênicas submetidas ao pré-condicionamento (Figura 6 A, B, C), no entanto esse evento não foi avaliado.

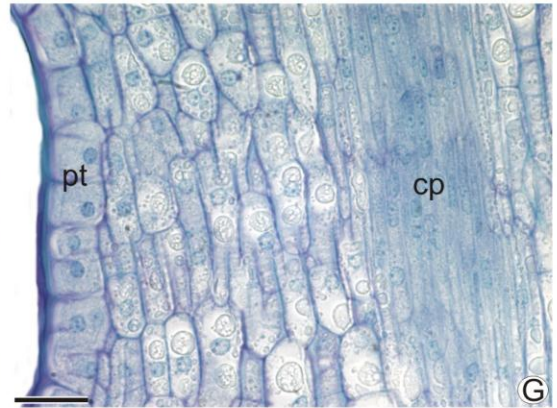
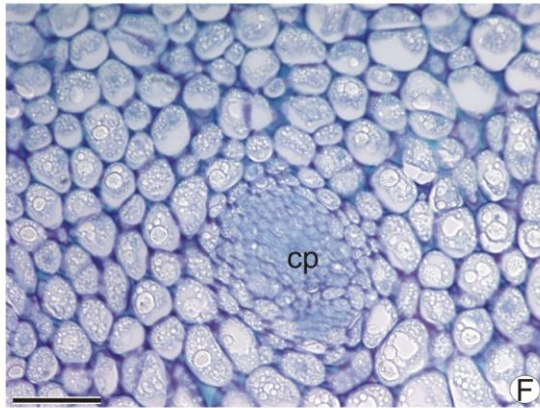
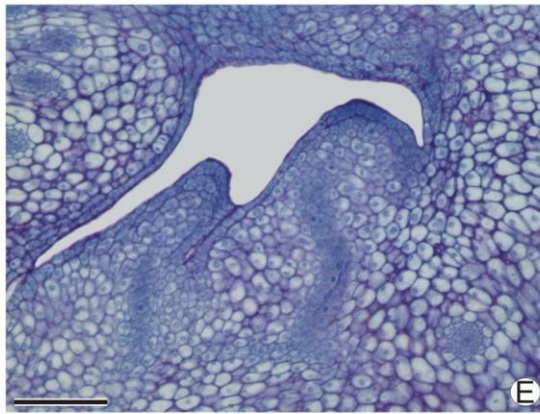
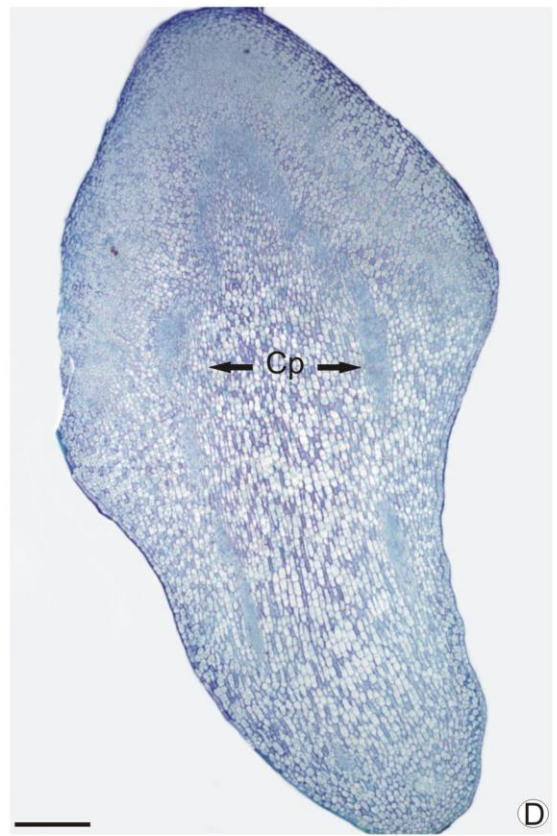
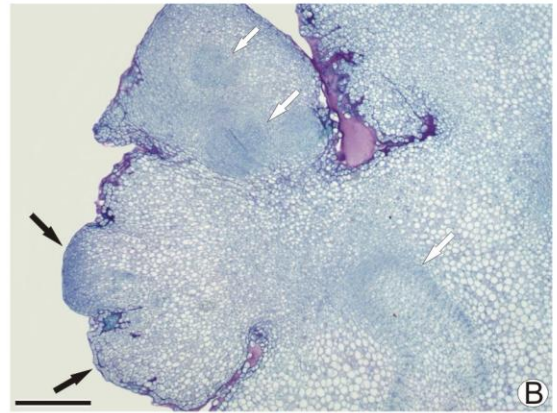
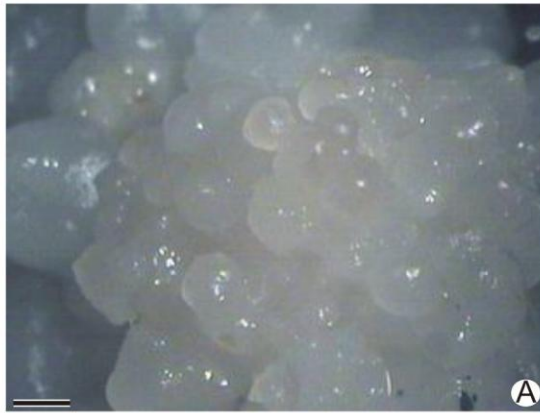


Figura 5. Regeneração de embriões somáticos a partir de massas pró-embriogênicas oriundas de explantes foliares de dendezeiro. A – Massa pró-embriogênica pré-condicionada formada por estruturas globulares translúcidas. B – Secção transversal de massa pró-embriogênica: setas pretas indicam início de formação de protoderme nas estruturas globulares e setas brancas indicam início de formação dos cordões procambiais nas estruturas globulares. C – Embriões somáticos regenerados de massa pró-embriogênica. D – Secção longitudinal de embrião somático, as setas indicam cordões procambiais. E – Secção transversal de meristema apical de embrião somático. F – Detalhe de cordão procambial em secção transversal de embrião somático. G – Secção longitudinal de embrião somático de dendezeiro, em destaque cordão procambial e protoderme, indicados pelas setas; cp: cordão procambial, pt: protoderme (Barras: A = C = 2 mm, B = D = 400  $\mu$ m, E = 200  $\mu$ m, F = G = 30  $\mu$ m).

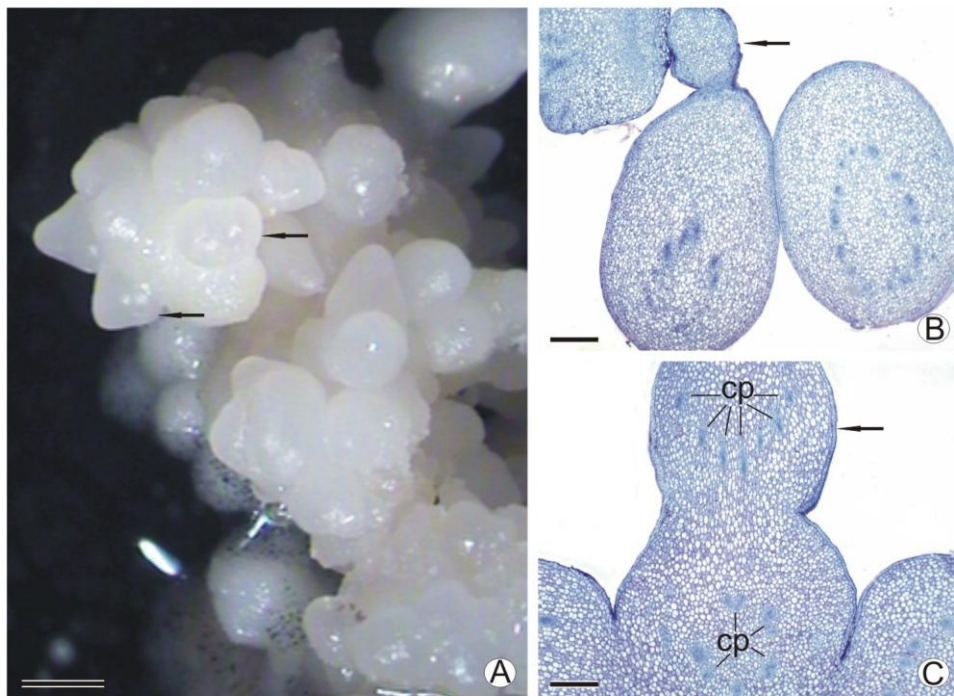


Figura 6. Ocorrência de embriogênese secundária. A – Formação de embriões por meio da embriogênese secundária; setas pretas indicam os embriões sendo formados por brotação. B e C – Secção longitudinal dos embriões; seta preta (B) indica embrião sendo formado por brotação, e seta preta (C) indica formação dos cordões procambiais no embrião formado por brotação; cp: cordão procambial (Barras: A = 2 mm, B = C = 300  $\mu$ m).

### 3.4 – Germinação

O processo de germinação iniciou-se aos 15 dias de cultivo com o alongamento do embrião (Figura 7A, B). A conversão dos embriões em plântulas ocorreu de forma não sincronizada, iniciando a partir 30<sup>o</sup> dia de cultivo estendendo-se até o 60<sup>o</sup> dia (Figura 7C).

A germinação dos embriões somáticos foi influenciada pela concentração de ANA e pelo carvão ativado (Tabela 6A). Após 60 dias no meio de cultivo acrescido de 0,54 µM de ANA, 64,3% dos embriões somáticos germinaram (Tabela 7). Com relação ao carvão ativado, verificou-se que sua presença no meio de cultivo foi prejudicial à germinação dos embriões.

No presente trabalho, apesar de a interação entre os fatores não se apresentar significativa pelo teste F, vale ressaltar que foi de 81% a porcentagem de germinação dos embriões cultivados na concentração de 0,54 µM de ANA na ausência de carvão ativado. Além disso, nesse tratamento 100% das plântulas apresentou desenvolvimento simultâneo de parte aérea e radícula. Assim, eliminou-se a etapa de enraizamento, a qual é comum nos protocolos de embriogênese somática de *E. guineensis*.

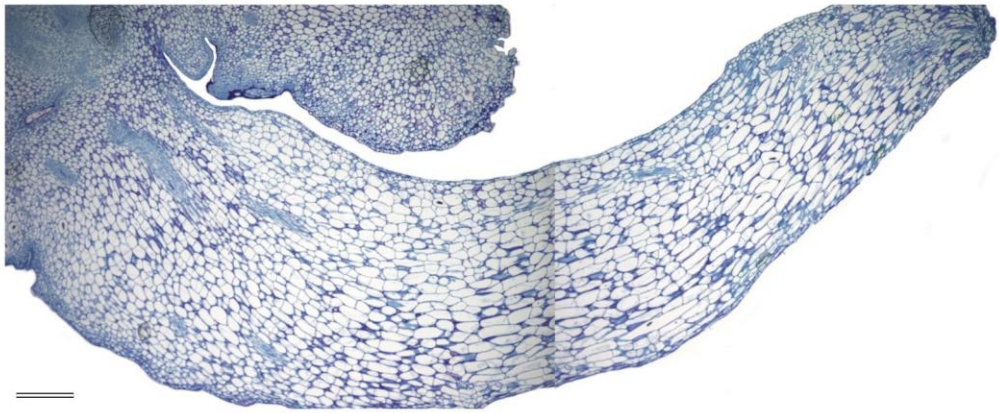
Tabela 7. Efeito das concentrações de ANA e carvão ativado na porcentagem de germinação de embriões somáticos de dendezeiro.

	ANA (µM)			Carvão Ativado	
	0	0,54	5,37	Com	Sem
Germinação (%)	19,0C	64,3A	38,1B	31,7b	49,2a

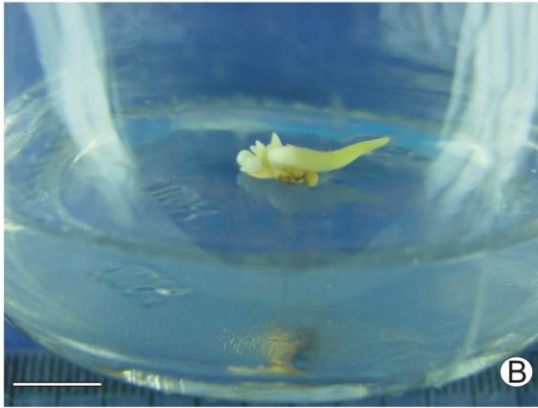
As médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

As médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si, pelo teste F, ao nível de 5% de probabilidade.

Após 90 dias em meio de germinação as plântulas com no mínimo 4 folhas e com sistema radicular desenvolvido foram aclimatizadas (Figura 7D). A aclimatização das plântulas foi realizada com sucesso (Figura 7E) e, foi de 70,4% (31 de 44 plântulas) a porcentagem de plantas obtidas (Figura 7F).



(A)



(B)



(C)



(D)



(E)



(F)

Figura 7. Germinação de embriões somáticos e aclimatização das plântulas de dendezeiro. A – Secção longitudinal de embrião somático em alongamento. B – Embrião somático de dendezeiro em início de germinação. C – Desenvolvimento não sincronizado de plântula de dendezeiro. D – Plântula aos 90 dias em meio de germinação. E – Plântulas em processo de aclimatização. F – Planta aos oito meses após aclimatização. Barras: A = 300  $\mu$ m, B = C = D = 1 cm, E = 5 cm, F = 10 cm.

#### 4 - DISCUSSÃO

Em Arecaceae, altas concentrações de auxina associadas ao carvão ativado são usuais na indução da embriogênese somática, sendo o 2,4-D a principal auxina utilizada (Pérez-Núñez et al., 2006; Sáenz et al., 2006; Rajesh et al., 2003; Fernando & Gamage, 2000; Karun & Sajini, 1996; Verdeil et al., 1994; Teixeira et al., 1994; Bhaskaran & Smith, 1992; de Touchet, 1991). A interação entre concentração de auxina e o genótipo utilizado desempenham também importante função na indução da embriogênese somática. Comportamento diferente *in vitro* em função da concentração de auxina ou genótipo utilizado é reportado em *Elaeis guineensis* (Thawaro & Te-chato, 2009; Chehmalee & Te-chato, 2008; Rival, 2000; Teixeira et al., 1995) e também em outras Arecaceae tais como, *Bactris gasipaes* (Steinmacher et al., 2007a), *Areca catechu* (Karun et al., 2004), *Phoenix dactylifera* (Al-Khayri & Al-Bahrany, 2004), *Hyophorbe lagenicaulis* (Sarasan et al., 2002) e *Cocus nucifera* (Verdeil et al., 1994).

Após a obtenção dos calos na fase de indução, no processo de embriogênese somática de Arecaceae, comumente a redução da concentração de auxina é requerida para a multiplicação e o desenvolvimento das massas pró-embriogênicas (Chehmalee & Te-chato, 2009; Steinmacher et al., 2007b; Wang et al., 2006; Karun et al., 2004; Fki et al., 2003; Galo-Meagher & Green, 2002; Kanchanapoom & Domyoas, 1999; Chan et al., 1998).

No presente trabalho a redução de 2,4-D foi realizada de forma gradativa entre as fases de multiplicação e regeneração. Foi evidenciada a importância do pré-condicionamento de massas pró-embriogênicas para a regeneração de embriões somáticos. Sob meio de pré-condicionamento a proliferação da massa pró-embriogênica foi inibida e o desenvolvimento de embriões somáticos estimulada. A redução de 2,4-D no meio de cultura induz o desenvolvimento de pró-embriões, levando eventualmente à regeneração de embriões somáticos (Komanime et al., 1992). Auxinas sintéticas não são metabolizadas



pelas células como as auxinas naturais, podendo as mesmas bloquear a expressão dos genes envolvidos no desenvolvimento dos embriões (George et al., 2008).

O carvão ativado exerce também papel modulador importante no meio de pré-condicionamento, adsorvendo excessos e resíduos de 2,4-D do meio de cultura e das massas pró-embriogênicas originárias do meio de multiplicação (Tomas, 2008; Toering & Pullman, 2005; Van Winkle & Pullman, 2005; Gallo-Meagher and Green, 2002; Ebert & Taylor, 1990).

Após a retirada do excesso de auxina propiciando o desenvolvimento dos pró-embriões, as massas pró-embriogênicas de *E. guineensis* necessitam de suplementação de auxina para completar o seu perfeito desenvolvimento, resultando em embriões somáticos de alta qualidade. Auxinas são fatores importantes no desenvolvimento de embriões somáticos, e devem ser disponibilizadas em meios de cultura, quando a cultura não é autosuficiente na sua produção (Steinmacher et al., 2007b; Verdeil & Buffard-Morel, 1995). Em baixas concentrações, o 2,4-D pode substituir auxinas naturais contribuindo para a formação de embriões somáticos (Rajesh et al., 2003; Verdeil et al., 1994).

Além do controle na suplementação de auxina nas diferentes fases, a adição de citocinina é considerada primordial para o sucesso da embriogênese somática em *E. guineensis* (Parthasarathy et al., 2001; Aberlenc-Bertossi et al., 1999) e em outras *Arecaceae*, tais como *C. nucifera* (Sáenz et al., 2006; Chan et al., 1998), *B. gasipaes* (Steinmacher et al., 2007b) e *A. catechu* (Karun et al., 2004). No entanto, em *E. guineensis*, a adição de citocinina ao meio de cultivo é apontada como uma das causas da anomalia das flores de dendê (Euweens et al., 2002; Jones et al., 1995), sendo importante a sua substituição no processo de embriogênese somática. Nesse trabalho, citocininas foram substituídas por poliaminas, a fim de se evitar a anomalia das flores. As poliaminas atuam na replicação do DNA, promovendo sua estabilidade (Khan et al., 1992, Galston & Kaur-Sawhney, 1990).

A ação das poliaminas como reguladores de crescimento promovendo a divisão e a diferenciação celular durante o processo de embriogênese somática é descrita por vários autores (Wu et al., 2009; Viu et al., 2009; Paul et al., 2009; Mogor et al., 2007; Li & Burritt, 2003; Teixeira da Silva, 2002; Minocha et al., 1999; Rajam, 1997; Bajaj & Rajam, 1996).

De acordo com Smith (1985), o nível de poliaminas é frequentemente alto em células meristemáticas, as quais são observadas em calos embriogênicos.

A inclusão das poliaminas na embriogênese somática de *E. guineensis* contribuiu para a multiplicação e manutenção das massas pró-embriogênicas e para a regeneração de embriões somáticos, sendo a putrescina, a poliamina mais efetiva.

Paul et al. (2009), em explantes foliares de *Momordica charantia*, verificaram que a putrescina na concentração de 1 mM foi a poliamina mais efetiva no aumento da massa fresca de calos embriogênicos e no número de embriões somáticos regenerados. Em *Panax ginseng* a adição de poliamina aumentou a produção de embriões somáticos quatro vezes em relação ao uso de citocinina, e os embriões germinaram produzindo plântulas viáveis (Kevers et al., 2000). Rajesh et al. (2003), também na embriogênese somática de *E. guineensis*, obtiveram maior taxa de regeneração no meio com 0,045  $\mu$ M de 2,4-D combinado com 1 mM de putrescina. Porém, o número de embriões somáticos regenerados foi seis vezes menor ao obtido no presente trabalho.

No presente trabalho, os embriões somáticos se desenvolveram de forma assincrônica, padrão comumente observado em palmáceas (Steinmacher et al., 2007b; Valverde et al., 1987). A formação desses embriões ocorreu via origem multicelular, por meio da proliferação e fragmentação das massas meristemáticas (Moura et al., 2009; Steinmacher et al., 2007b; Chan et al., 1998; Guerra & Handro, 1998; Karun & Sajini, 1996; Schwendiman et al., 1988).

Os embriões somáticos germinaram bem resultando em elevada conversão de plântulas com desenvolvimento balanceado de parte aérea e raízes, que puderam ser submetidas à aclimatização. Steinmacher et al. (2007 a, b) também obtiveram a formação de plântulas completas de *B. gasipaes* utilizando o ANA no meio de germinação. A produção de embriões somáticos de boa qualidade é importante para aumentar as taxas de germinação e conversão. A baixa conversão dos embriões somáticos em plântulas constitui-se sério problema dos protocolos de embriogênese somática de *Arecaceae* (Moura et al., 2009; Sáenz et al., 2006; Pérez-Núñez et al., 2006).

A formação de plântulas completas elimina a etapa de enraizamento dos brotos que é comum em *Arecaceae* (Sáenz et al., 2006; Rajesh et al., 2003; Karun & Sajini, 1996). Em geral, a conversão de plântulas apenas com parte aérea (brotos) ocorre em meio de

germinação sem regulador de crescimento ou utilizando o 2,4-D como auxina. Nesses protocolos, o ANA é a auxina mais comumente utilizada no enraizamento dos brotos, em concentrações entre 0,44  $\mu\text{M}$  e 5,37  $\mu\text{M}$  (Fki et al. 2003, Rival 2000, Rival et al. 1997, Karun e Sajini, 1996).

As poliaminas estimulam a rizogênese em diferentes espécies de plantas (Mógor et al., 2007; Teixeira da Silva, 2002; Tibúrcio et al., 1989), podendo também ter contribuído para a obtenção de plântulas completas. Além disso, em algodão, o uso de putrescina aumentou a porcentagem de germinação de embriões somáticos (Sakhanokho et al., 2005).

A produção contínua de massas pró-embriogênicas e a subsequente formação de embriões somáticos similares a embriões zigóticos indicam o potencial do protocolo para multiplicação massal de clones elite de dendezeiro. A prática de se manter calos embriogênicos em meio de multiplicação é muito promissora, resultando na produção de grande quantidade de calos embriogênicos (Pérez-Núñez et al., 2006). No entanto, com a multiplicação repetida dos calos há o risco de perda da capacidade embriogênica (Pérez-Núñez et al., 2006; Das Neves et al., 1999). Assim, uma alternativa para manter a produção de embriões somáticos por tempo maior seria alternar o uso da multiplicação de massas pró-embriogênicas e a embriogênese secundária. A embriogênese somática secundária também foi descrita no presente trabalho, no entanto, novos ensaios são necessários a fim de se verificar sua frequência e as melhores condições de cultivo para sua ocorrência.

## 5 - CONCLUSÕES

A resposta embriogênica em explantes foliares de dendezeiro depende do genótipo e da concentração de 2,4-D utilizada.

O uso de poliaminas, especificamente da putrescina, é eficiente na indução da competência embriogênica e subsequente regeneração de embriões somáticos, sendo indicada na substituição das citocininas no processo de embriogênese somática de *E. guineensis*.

A redução gradual do 2,4-D é fator limitante para o sucesso na regeneração de embriões somáticos de *E. guineensis*.

## 6. REFERÊNCIAS

- Aberlenc-Bertossi F, Noirot M, Duval Y. BA enhances the germination of oil palm somatic embryos derived from embryogenic suspension cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 56(1):53-57, 1999.
- Al-Khayri JM, Al-Bahrany AM. Growth, water content, and proline accumulation in drought-stressed callus of date palm. **Biologia Plantarum** 48(1):105-108, 2004.
- Almeida M, Almeida CV. Somatic embryogenesis and in vitro plant regeneration from pejobaye adult plant leaf primordial. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 41(9):1449-1452, 2006.
- Arnold SV. Somatic Embryogenesis. In: George et al (ed) **Plant Propagation by Tissue Culture**. 3ª ed, Springer, p. 335-354, 2008.
- Bajaj S. Rajam MV. Polyamine accumulation and near loss of morphogenesis in long-term callus cultures of rice **Plant Physiology** 112:1343–1348, 1996.
- Buffard-Morel J, Verdeil JL, Dussert S, Magnaval C, Huet C, Grosdemange F Initiation of somatic embryogenesis in coconut (*Cocos nucifera* L.). In: Oropeza C et al (eds) **Lethal Yellowing: Research and Practical Aspects**, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, p. 217-223, 1995.
- Chan JL, Saéñz L, Talavera C, Hornung R, Robert M, Oropeza C. Regeneration of cocout (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports** 17:515-521, 1998.
- Chehmalee S, Te-chato S. Induction of somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured zygotic embryo of oil palm. **Journal of Agricultural Technology** 4(2): 137-146, 2008.
- Das Neves LO, Duque SRL, Almeida JS, Fevereiro PS. Repetitive somatic embryogenesis in *Medicago truncatula* ssp. *Narbonensis* and *M. truncatula* Gaertn cv. *Jemalong*. **Plant Cell Reports** 18(5):398-405, 1999.
- Duval Y, Engelmann F, Durand-Gasselin T. Somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). In: Bajaj YPS (ed) **Biotechnology in agriculture and forestry 30: somatic embryogenesis and synthetic seed I**. Springer-Verlag, Berlin, p 335–352, 1995.
- Ebert A, Taylor HF. Assessment of the changes of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentrations in plant tissue culture media in the presence of activated charcoal. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 20:165-172, 1990.

Eeuwens CJ. Effects of organic nutrient and hormones on growth and development of tissue explants from coconut (*Cocos nucifera*) and date (*Phoenix dactylifera*) palms cultured *in vitro*. **Physiology Plant** 42:173-178, 1978.

Eeuwens CJ, Lord S, Donough CR, 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** 70(3):311-323, 2002.

Fehér A, Pasternak TP, Dudits D. Transition of somatic cells to an embryogenic state. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** 74:201–228, 2003.

Fienberg AA, Choi JH, Lubich WP, Sung ZR. Developmental regulation of polyamine metabolism in growth and differentiation of carrot culture. **Planta** 162:532–539, 1984.

Fermino Júnior, P.C.P, Silva RA, Maciel AS, Guedes RS, Pereira JES. Análises morfo-histológicas da embriogênese somática de açazeiro (*Euterpe oleraceae* Mart.). **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental** 1:845-848, 2007.

Fki L, Masmoudi R, Drira N, Rival A. An optimized protocol for plant regeneration from embryogenic suspension cultures of date palm, *Phoenix dactylifera* L., cv. Degls et Nour. **Plant Cell Reports** 21:517-524, 2003.

Fernando SC, Gamage CKA. Abscisic acid induced somatic embryogenesis in immature embryo explants of coconut (*Cocos nucifera* L.). **Plant Science** 151:193-198, 2000.

Gallo-Meagher M, Green J. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of saw palmetto, an important landscape and medicinal plant. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 68:253-256, 2002.

Gomes KKP, Oliveira VC de, Ledo A da S, Ângelo PC da S, Costa JL da S. Indução de calo a partir de eixo embrionário de coqueiro (*Cocos nucifera* l.). **Revista Brasileira Fruticultura** 26 (1):124-126, 2004.

Guerra MP, Handro W. Somatic embryogenesis and plant regeneration in different organs of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae): control and structural features. **Journal of Plant Research** 111:65–71, 1998.

Jaiswal VS, Amin MN. *In vitro* propagation of guava from shoot cultures of mature trees. **Journal of Plant Physiology** 130:7-12, 1987.

Johansen DA. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book Co. Inc. 1940. 523p.

Johanson L, Calleberg E Gedin A. Correlation between activated charcoal, Fe-EDTA and other organic media ingredients in cultures of anthers of *Anemone canadensis*. **Physiologia Plantarum** 80:243–249, 1990.

Jones LH, Hanke DE, Eeuwens CJ. An evaluation of the role of cytokinins in the development of abnormal inflorescences in oil palms (*Elaeis guineensis* Jacq.) regenerated from tissue culture. **Journal of Plant Growth Regulator** 14:135-142, 1995.

Kanchanapoom K, Domyoas P. The origin and development of embryoids in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) embryo culture. **Science Asia** 25:195-202, 1999.

Karun A, Sajini KK. Plant regeneration from leaf explant of oil palm. **Current Science** 71:922–926, 1996.

Karun A, Siril E, Radha E, Parthasarathy VA. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from leaf and inflorescence explants of arecanut (*Areca catechu* L.). **Current Science** 86:1623-1628, 2004.

Kaur-Sawhney R, Applewhite PB. Endogenous protein bound polyamines: correlation with regions of cell division in tobacco leaves, internodes and ovaries. **Plant Growth Regulation** 12,223–227, 1993.

Kevers C, Le Gal N, Monteiro M, Dommès J, Gaspar TH. Somatic embryogenesis of *Panax ginseng* in liquid cultures: a role for polyamines and their metabolic pathways. **Plant Growth Regulator** 31:209-214, 2000.

Khan AU, Mei YH, Wilson T. A proposed function for spermine and spermidine: protection of replicated DNA against damage by singlet oxygen. **Proceedings National Academic Science USA** 89:1126-1127, 1992.

Komanime A, Kawahara R, Matsumoto S, Sunabori S, Toya T, Fujiwara A, Tsukahara M, Smith J, Ito M, Fukuda H, Nomura K, Fujimura T. Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures: physiology, biochemistry and molecular biology. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant** 28:11-14, 1992.

Kumar V, Giridhar P, Chandrashekar A, Ravishankar GA. Polyamines influence morphogenesis and caffeine biosynthesis in *in vitro* cultures of *Coffea canephora* P. ex Fr. **Acta Physiologiae Plantarum** 30:217–223, 2008.

Li Z, Burritt DJ. Changes in endogenous polyamines during the formation of somatic embryos from isogenic lines of *Dactylis glomerata* L. with different regenerative capacities. **Plant Growth Regulator** 40:65–73, 2003.

Lovaas E. Antioxidant and metal-chelating effects of polyamines. In: Sies H (ed) **Advances in Pharmacology. Antioxidants in Disease Mechanisms and Therapy** 38, Academic Press, New York, p.119–149, 1996.

Malá J, Cvikrová M, Máchová P, Martinčová O. Polyamines during somatic embryo development in Norway spruce (*Picea abies* [L.]). **Journal of Forest Science** 55(2):75–80, 2009.

M'Kada J, Dorin N, Bigot C. *In vitro* micropropagation of *Arctostaphylos uvaursi* L. Sprengel.: comparison between two methodologies. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** 24:217-222, 1991.

Minocha R, Long S, Maki H, Minocha SC. Assays for the activities of polyamine biosynthetic enzymes using intact tissues. **Plant Physiology Biochemistry** 37:597-603, 1999.

Mogor G, Lima GPP, Mogor AF. Espermidina e espermina exogena na micropropagação de *Aloe vera* (L.) Burm. **Revista Cubana de Plantas Medicinales** 12(2), 2007. Disponível em [http://www.bvs.sld.cu/revistas/pla/vol12\\_2\\_07/pla08207.htm](http://www.bvs.sld.cu/revistas/pla/vol12_2_07/pla08207.htm).

Moura EF, Ventrella MC, Motoike SY, Sá Júnior AQ, Carvalho M, Manfio CE. Histological study of somatic embryogenesis induction on zygotic embryos of macaw palm (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Martius). **Plant Cell Tissue and Organ Culture** 95 (2):175–184, 2008.

O'Brien TP, Feder N, McCully ME. Pylchromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma** 59:368-373, 1964.

Parthasarathy U, Parthasarathy VA, Karun A. Oil palm. In: Parthasarathy VA, Bose TK, Deka PC, Das P, Mitra SK, Mohandas S (eds) **Biotechnology of Horticultural Crops**, Naya Prokash, Calcutta 1:595–608, 2001.

Paul A, Mitter K, Raychaudhuri SS. Effect of polyamines on *in vitro* somatic embryogenesis in *Momordica charantia* L. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** 97:303–311, 2009.

Perez-Núñez MT, Chan JL, Saenz L, Gonzalez T, Verdeil JL, Oropeza C. Improved somatic embryogenesis from *Cocos nucifera* (L.) plumule explants. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant** 42:37-43, 2006.

Pimentel-Gomes F. **Curso de Estatística Experimental**. Nobel, Piracicaba, 468p, 1990.

Rajam MV. Polyamines. In: Prasad MNV (ed) **Plant ecophysiology**. John Wiley & Sons, New York, p. 343–374, 1997.

Rajesh MK, Radha E, Karun A, Parthasarathy VA. Plant regeneration from embryo-derived callus of oil palm - the effects of exogenous polyamines. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 75: 41–47, 2003.

Rival A, Tregear J, Jaligot E, Morcillo F, Aberlenc F, Billotte N, Richaud F, Beule T, Bogel A, Duval Y. Oil palm biotechnology: progress and prospects. **OCL-1 Corps. Grass. Lipids** 8:295-306, 2001.

Sáenz L, Azpeitia A, Chuc-Armendariz B, Chan JL, Verdeil JL, Hocher V, Oropeza C. Morphological and histological changes during somatic embryo formation from coconut plumule explants. **In Vitro Cell Development Biology Plants**. 42:19-25, 2006.

Sakhanokho HF, Ozias-Akins P, May OL, Chee PW. Putrescine enhances somatic embryogenesis and plant regeneration in upland cotton. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** 81:91–95, 2005.

Sarasan V, Ramsay MM, Roberts AV. Rescue of endangered palms by *in vitro* methods: the case of ‘bottle palm’. In: **Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants**, The Netherlands: Springer 77, p.267-274, 2002.

Schwendiman J, Pannetier C, Michaux-Ferriere N. Histology of somatic embryogenesis from leaf explants of the oil palm *Elaeis guineensis*. **Annals of Botany** 62:43-52, 1988.

Shoeb F, Yadav JS, Bajaj S, Rajam MV. Polyamines as biomarkers for plant regeneration capacity: improvement of regeneration by modulation of polyamine metabolism in different genotypes of indica rice. **Plant Science** 160:1229–1235, 2001.

Silveira V, Santa-Catarina C, Tun NN, Scherer GFE, Handro W, Guerra MP, Floh EIS. Polyamine effects on the endogenous polyamine contents, nitric oxide release, growth and differentiation of embryogenic suspension cultures of *Araucaria angustifolia* (Bert) O Ktze. **Plant Science** 171:91–98, 2006.

Smith TA. Polyamines. **Annual Review Plant Physiology** 36:117–143, 1985.

Srisawat T, Kanchanapoom K. The influence of physical conditions on embryo and protoplast culture in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Science Asia** 31:23-28, 2005.

Steiner N, Santa-Catarina C, Silveira V, Floh EIS, Guerra MP. Polyamine effects on growth and endogenous hormones levels in *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** 89:55–62, 2007.

Steinmacher DA, Clement CR, Guerra MP. Somatic embryogenesis from immature peach palm inflorescence explants: towards development of an efficient protocol. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 89:15–22, 2007.

Takeda R, Hayakawa F, Oe K, Matsuoka H. Effects of exogenous polyamines on embryogenic carrot cells. **Biochemical Engineering Journal** 12:21–28, 2002.

Tang W, Ronald J. Increase of polyphenol oxidase and decrease of polyamines correlate with tissue browning in Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.). **Plant Science** 167:621-628, 2004.

Teixeira JB, Sondahl MR, Nakamura T, Kirby EG. Establishment of oil palm cell suspensions and plant regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 40:105-111, 1995.



Teixeira JB, Sandahl MR, Kirby EG. Somatic embryogenesis from immature inflorescences of oil palm. **Plant Cell Reports** 13:247-250, 1994.

Teixeira JB, Sandahl MR, Kirby EG. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of oil palm. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 34(3):227-233, 1993.

Teixeira da Silva JA. Polyamines in the regulation of chrysanthemum and Tobacco *in vitro* morphogenetic pathways. **Property of Ornamental Plants** 2:9-15, 2002.

Thawaro S, Te-chato S. Effect of genotypes and auxins on callus formation from mature zygotic embryos of hybrid oil palms. **Journal of Agricultural Technology** 5(1):167-177, 2009.

Tiburcio AF. Polyamine metabolism. In: Mifflin, B. (ed). **Intermediary nitrogen metabolism: the biochemistry of plants**. New York: Academic 16:283-325, 1990.

Tiburcio AF, Altabella T, Borrell T, Masgrau C. Polyamines metabolism and its regulation. **Physiologia Plantarum** 100:664-674, 1997.

Tiburcio AF, Campos JL, Figueras X, Besford RT. Recent advances in the understanding of polyamine functions during plant development. **Plant Growth Regulation** 12:331-340, 1993.

Toering A, Pullman G. Modeling available 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in a tissue culture medium containing activated carbon. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** 82(2):179-188, 2005.

Touchet B, Duval Y, Pannetier C. Plant regeneration from embryogenic suspension culture of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Plant Cell Reports** 10:529-532, 1991.

Thomas YDS, Saare-Surminski K, Lieberei R. Plant regeneration via somatic embryogenesis of *Camptocheca acuminata* in temporary immersion system (TIS). **Plant Cell Tissue and Organ Culture** 95(2):163-173, 2008.

Valverde R, Arias O, Thorpe TA. Picloram-induced somatic embryogenesis in pejibaye palm (*Bactris gasipaes* H.B.K.). **Plant Cell Tissue and Organ Culture** 10:149-156, 1987.

Van Winkle SC, Pullman G. Achieving desired plant growth regulator levels in liquid plant tissue culture media that include activated carbon. **Plant Cell Reports** 24(4):201-208, 2005.

Verdeil JL, Buffard Morel J. In: Bajaj YPS (ed) **Somatic embryogenesis and synthetic seed 1**, Berlin, Springer, p.299-317, 1995.

Verdeil JL, Huet C, Grosdemange F, Buffard-Morel J. Plant regeneration from cultured immature inflorescences of cocconut (*Coccus nucifera* L.): evidence for somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**. 13:218-221, 1994.

Viu AFM, Viu, MAO, Tavares AR, Vianello F, Lima GPP. Endogenous and exogenous polyamines in the organogenesis in *Curcuma longa* L. **Scientia Horticulturae** 121:501–504, 2009.

Wang HC, Chen JT, Chang WC. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf, root and stem-derived callus cultures of *Areca catechu*. **Biologia Plantarum** 50:279-282, 2006.

Williams EG, Maheswaran G. Somatic embryogenesis: factors influencing behaviour of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany** 57:443–462, 1986.

Wu XB, Wang J, Liu JH, Deng XX. Involvement of polyamine biosynthesis in somatic embryogenesis of Valencia sweet orange (*Citrus sinensis*) induced by glycerol. **Journal of Plant Physiology** 166(1):52-62, 2009.

Zimmerman JL. Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. **Plant Cell** 5:1411-1423, 1993.

## CAPÍTULO 2

---

### EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM DENDEZEIRO A PARTIR DE FLORES DESENVOLVIDAS *IN VITRO*

#### RESUMO

Carvalho, Mychelle D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Novembro de 2009.  
**Embriogênese somática em dendezeiro a partir de flores desenvolvidas *in vitro*.**  
Orientador: Sérgio Yoshimitsu Motoike. Co-orientadores: Marília Contin Ventrella e  
Wagner Campos Otoni.

Inflorescências imaturas constituem importante fonte de explante para a embriogênese somática do dendezeiro, pois são de fácil obtenção e sua retirada não compromete o vigor da planta matriz, além de serem disponíveis em abundância em plantas adultas. No entanto, os protocolos de embriogênese somática a partir de inflorescências exibem limitações, como baixa porcentagem de indução, além de demandar muito tempo para completar o processo embriogênico. Assim, o presente trabalho teve por objetivo estabelecer um protocolo de indução de embriogênese somática em dendezeiro a partir de flores desenvolvidas *in vitro*, substituindo citocinina por poliamina e também realizar o acompanhamento do processo embriogênico por meio de técnicas histológicas. Ráquulas retiradas de inflorescências femininas imaturas, em dois estágios de desenvolvimento foram inoculadas em diferentes meios de cultivo (MS e Y3), adicionado de 475  $\mu\text{M}$  de diferentes auxinas (Picloram e 2,4-D) e 0,3% de carvão ativado. O desenvolvimento das flores ocorreu após 120 dias da inoculação *in vitro*, em função do estágio de desenvolvimento da inflorescência e do meio de cultivo utilizado. As flores formadas em meio de cultivo Y3 foram destacadas das ráquulas e inoculadas em mesmo meio de cultivo com redução da concentração das auxinas para 9  $\mu\text{M}$  e combinadas ou não com 1000  $\mu\text{M}$  de putrescina. Após 60 dias, maior formação de calos ocorreu em flores cultivadas em meio adicionado de 9  $\mu\text{M}$  Picloram combinado com 1000  $\mu\text{M}$  de putrescina. A regeneração dos embriões somáticos ocorreu após a redução em 100 vezes na concentração de auxina no meio de cultivo, sendo mantida a mesma concentração de putrescina. Os embriões apresentaram

protoderme bem definida, delimitando uma massa homogênea de células correspondentes ao meristema fundamental, entremeada por cordões procambiais bem definidos. Por meio da análise histológica verificou-se que a formação de calos ocorreu a partir das regiões perivasculares no gineceu e a formação dos embriões ocorreu a partir das regiões meristemáticas destes calos, seguindo o padrão multicelular.

**SOMATIC EMBRYOGENESIS IN OIL PALM FROM FLOWERS DEVELOPED  
*IN VITRO***

**ABSTRACT**

**CARVALHO, Mychelle** D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November of 2009.  
**Somatic embryogenesis in oil palm from flowers developed *in vitro*.** Adviser: Sérgio Yoshimitsu Motoike. Co-advisers: Marília Contin Ventrella and Wagner Campos Otoni.

Immature inflorescences are an important source of explants for somatic embryogenesis of the oil palm. They are easily accessible and its removal does not compromise the strength of the donor plant, in addition to being available in abundance in adult plants. However, the protocols of somatic embryogenesis from inflorescences exhibit limitations such as low rate induction, and require a long time to complete the embryogenic process. The present study aimed to establish a protocol for induction of somatic embryogenesis in oil palm from flowers developed *in vitro* by replacing a polyamine and cytokinin also follow up the embryogenic process by histological techniques. Rachillas taken from immature female flowers in two developmental stages were inoculated in different culture media (MS and Y3), the addition of 475  $\mu\text{M}$  of different auxins (Picloram and 2,4-D) and 0.3% activated charcoal. The development of flowers occurred after 120 days after inoculation *in vitro*, depending on the developmental stage of the inflorescence and the growing medium. The flowers formed in culture medium were detached from Y3 rachillas and inoculated in the same culture medium with reduced auxin concentrations for 9  $\mu\text{M}$  being combined or not with 1000  $\mu\text{M}$  of putrescine. After 60 days, greater callus formation occurred in flowers grown in medium supplemented with 9  $\mu\text{M}$  Picloram combined with 1000  $\mu\text{M}$  of putrescine. The regeneration of somatic embryos occurred after reduction at 100 times the concentration of auxin in the culture medium, maintaining the same concentration of putrescine. Embryos showed protoderm well defined, delimiting a homogeneous mass of cells corresponding to the ground meristem, procambium strands interspersed with well-defined. By means of histological analysis it was found that the

formation occurred from the perivascular regions in the gynoecium and embryo formation occurred from the regions of meristematic callus, following the pattern multicellular.

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil dispõe de clima propício para produção de inúmeras espécies oleaginosas, dentre elas o dendê constitui importante fonte de matéria-prima para a produção de biocombustível por apresentar a maior produtividade de óleo entre as plantas oleaginosas, com rendimento entre 4 e 6 toneladas por hectare. No entanto, a produção brasileira de óleo de palma ainda é incipiente, representando apenas 5% da produção mundial. Para o país se estabelecer como grande produtor e exportador de óleo de palma e seus derivados torna-se necessário a expansão da área cultivada associada ao cultivo de plantas melhoradas e mais produtivas. A indução da embriogênese somática é importante passo para a clonagem de plantas elite de dendezeiro. Atualmente, o método mais empregado é a indução da embriogênese utilizando explantes foliares obtidos de folhas imaturas (Low et al., 2008). Contudo, a retirada de folhas imaturas de dendezeiro adulto inviabiliza a planta matriz por quatro anos, pois o método disponível para obtenção deste tipo de explante é bastante invasivo, enfraquecendo a planta (Corley & Tinker, 2003).

Nesse contexto, inflorescências se constituem numa importante fonte de explante, pois são de fácil obtenção e sua retirada não compromete o vigor da planta matriz (Teixeira et al., 1994), e são disponíveis em abundância em plantas adultas. A regeneração de embriões somáticos utilizando inflorescências imaturas como explante já foi descrita para algumas palmeiras como *Cocos nucifera* L. (Verdeil et al., 1994), *Euterpe edulis* Mart. (Guerra e Handro, 1998), *Phoenix dactylifera* (Fki et al., 2003), *Areca catechu* (Karun et al., 2004), *Bactris gasipaes* (Steinmacher et al., 2007a) e também para *Elaeis guineensis* (Teixeira et al., 1994). Mas esses protocolos exibem limitações como alta porcentagem de oxidação dos explantes e baixa porcentagem de indução da embriogênese somática, além de demandar muito tempo para completar o processo embriogênico.

As inflorescências imaturas quando cultivadas *in vitro* apresentam principalmente o desenvolvimento de estruturas florais, resultado de seu elevado grau de determinação (Teixeira et al., 1994; Zaid & Tisserat, 1983). Essa resposta é mais significativa em inflorescências mais desenvolvidas, as quais também apresentam crescimento *in vitro* mais rápido e menor taxa de oxidação (Steinmacher et al., 2007a). Assim, uma alternativa para potencializar o uso de inflorescências imaturas seria utilizar as flores desenvolvidas *in vitro*

como explante para indução da embriogênese somática. Teixeira et al. (1994) em trabalho com inflorescências femininas de dendezeiro, descreveu que os calos originavam-se da base das estruturas florais presentes nas ráquias.

O acompanhamento do processo de embriogênese somática por técnicas histológicas tem se mostrado essencial para o entendimento da embriogênese e vem potencializando os protocolos em várias espécies vegetais. Em *Hevea brasiliensis*, o tempo adequado de subcultivos foi determinado por meio de análises histológicas (Michaux-Fèrrière & Carron, 1989). Ao se utilizar embriões zigóticos de *C. nucifera* como fonte de embriogênese somática, verificou-se que o processo tem origem principalmente na plúmula (Chan et al., 1998), e o cultivo desta estrutura vem potencializando os protocolos de embriogênese dessa espécie (Pérez-Nuñez et al., 2006, Sané et al., 2006; Saénz et al., 2006). Em dendezeiro, o estudo histológico do processo embriogênico foi realizado somente quando folhas imaturas (Schwendimann et al., 1988) e embriões zigóticos (Kanchanapoom & Domyoas, 1999) foram utilizados como fonte de explantes. Esses trabalhos demonstraram que a origem do embrião depende muito do explante utilizado e das condições do meio de cultivo utilizado.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo estabelecer um protocolo de indução de embriogênese somática em dendezeiro a partir de flores desenvolvidas *in vitro*, substituindo citocinina por poliamina e também realizar o acompanhamento do processo embriogênico por meio de técnicas histológicas.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Células e Tecidos Vegetais do setor de Fruticultura, Departamento de Fitotecnia e no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa em Minas Gerais, Brasil. Foram utilizadas no trabalho inflorescências femininas imaturas em dois estágios de desenvolvimento classificadas em IF1 e IF2, de acordo com o tamanho da bráctea externa, com 30 cm e 45 cm de comprimento, respectivamente. As inflorescências foram extraídas da mesma planta matriz de *E. guineensis*, tipo "Tenera", da



coleção de plantas de dendezeiro da Universidade Federal de Viçosa, localizada na Fazenda Experimental da Sementeira, no município de Visconde do Rio Branco-MG.

## 2.1 - Indução da embriogênese somática

### 2.1.1 - Desenvolvimento *in vitro* de flores

As inflorescências imaturas (Figura 1A) foram, inicialmente, lavadas com solução de Detertec<sup>®</sup> 50% (Vetec), e, em seguida, foram enxaguadas em água deionizada estéril por três vezes. Após a lavagem a espata externa foi removida e as inflorescências foram submetidas a tratamento de desinfestação com hipoclorito de sódio (2% cloro ativo) por 15 minutos. Após a desinfestação, as inflorescências foram enxaguadas em água deionizada estéril por três vezes. Em câmara de fluxo, a espata interna foi removida (Figura 1B) e as ráquias (Figura 1C) foram separadas das inflorescências e seccionadas transversalmente em segmentos de aproximadamente cinco milímetros de comprimento.

As secções das ráquias foram inoculadas em tubos de ensaio de 25 mm x 150 mm, contendo 10 mL de meio de cultura acrescido de 0,3% de carvão ativado, 3% de sacarose e 2,5 g.L<sup>-1</sup> de Gelrite<sup>®</sup> (Sigma, USA) para solidificação. Baseado em estudos preliminares, foram testados dois estágios de desenvolvimento de inflorescência, dois meios de cultura e duas fontes de auxina na concentração de 475 µM, em esquema fatorial 2 x 2 x 2 (Tabela 1). O pH do meio foi ajustado para 5,7±0,01, sendo autoclavado a 121°C e 1,5 atm por 20 minutos

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Cada repetição representada por 10 tubos de ensaio, com um explante por tubo. Os explantes foram incubados no escuro, em sala de cultura mantida a 25°C ± 2 durante 120 dias para a formação das flores, sendo subcultivados a cada 60 dias. Após esse período avaliou-se a porcentagem de ráquias oxidadas e a porcentagem de ráquias com flores. A porcentagem de ráquias oxidadas refere-se as ráquias que não responderam aos tratamentos devido a oxidação. Os dados foram submetidos à análise de variância e a comparação das médias dos tratamentos foi realizada por meio do teste de F a 5% de probabilidade.

Tabela 1. Tratamentos utilizados no desenvolvimento *in vitro* de flores a partir das ráquulas de inflorescências imaturas de dendezeiro.

Tratamento	Estágios de desenvolvimento	Meios de cultivo	Auxinas
Inflorescência			
Tif1	IF1	Y3*	Picloram
Tif2	IF1	Y3	2,4-D
Tif3	IF1	MS**	Picloram
Tif4	IF1	MS	2,4-D
Tif5	IF2	Y3	Picloram
Tif6	IF2	Y3	2,4-D
Tif7	IF2	MS	Picloram
Tif8	IF2	MS	2,4-D

\*Euweens (1978)

\*\*Murashige & Skoog (1962)

### 2.1.2 - Indução de calos

Nesta fase, as flores formadas em meio de cultivo Y3, foram destacadas das ráquulas, individualizadas e separadas em dois experimentos de indução de calos, nomeados experimento 1 e 2. A separação das flores foi realizada considerando a fonte de auxina do meio de cultivo onde as mesmas se formaram.

No experimento 1, o explante consistiu de flores oriundas dos tratamentos com picloram, Tif1 e Tif5, as quais foram inoculadas em meio de cultivo Y3 adicionado de 9  $\mu$ M de picloram.

No experimento 2, o explante consistiu de flores oriundas dos tratamentos com 2,4-D, Tif2 e Tif6, as quais foram inoculadas em meio de cultivo Y3 adicionado de 9  $\mu$ M de 2,4-D.

Em ambos os experimentos de indução de calos foram testados o efeito de dois fatores: tipos de flores (A e B) e putrescina (0 e 1000  $\mu$ M), em esquema fatorial 2x2, gerando quatro tratamentos (Tabela 2). O tipo de flor refere-se à inflorescência de origem, as flores tipo A e B são oriundas de IF1 e IF2, respectivamente.

Para solidificação do meio de cultura utilizou-se 2,5 g.L<sup>-1</sup> de Gelrite® (Sigma, USA), sendo o pH do meio ajustado para 5,7±0,01 e autoclavado a 121°C e 1,5 atm por 20 minutos.

Os experimentos foram instalados em delineamento inteiramente casualizado, com seis repetições. Cada parcela experimental foi constituída por uma placa de Petri com seis flores. Após inoculação, as placas de Petri foram incubadas no escuro, em sala de cultura mantida a 27°C ± 2°C por 60 dias.

A avaliação realizada referiu-se à porcentagem de flores com formação de calos após 60 dias de cultivo. Realizou-se a análise de variância de cada experimento, para se estimar a relação entre o maior e o menor quadrado médio do resíduo, a fim de se verificar a possibilidade de realização da análise de variância conjunta dos experimentos. A comparação das médias dos tratamentos foi realizada por meio do teste de F a 5% de probabilidade.

Tabela 2. Tratamentos utilizados nos experimentos de indução de calos em flores de dendezeiro.

Tratamento	Experimento 1 - Picloram		Experimento 2 – 2,4-D	
	Tipo de Flor	Poliamina	Tipo de Flor	Poliamina
Tic1	A	-	A	-
Tic2	A	1000 µM	A	1000 µM
Tic3	B	-	B	-
Tic4	B	1000 µM	B	1000 µM

## 2.2 - Multiplicação de calos

Para multiplicação, os calos obtidos nos tratamentos Tic2 e Tic4 em ambos os experimentos de indução da calogênese foram separados do explante de origem. Em seguida foram subcultivados para o mesmo meio de cultivo utilizado na indução com os respectivos reguladores de crescimento. Os calos foram inoculados em placas de Petri utilizando-se seis repetições por tratamento e a parcela experimental representada por uma placa de Petri com seis calos. As placas foram incubadas no escuro, em sala de cultura

mantida a  $25^{\circ}\text{C} \pm 2$  durante 60 dias, quando foi avaliada a porcentagem de calos que se multiplicaram.

### 2.3 – Regeneração de embriões somáticos

Após 60 dias de incubação, os calos embriogênicos obtidos na fase de multiplicação foram transferidos para os mesmos meios de cultivo e reguladores de crescimento utilizados na fase anterior. Entretanto, reduziu-se em 100 vezes a concentração das auxinas picloram e 2,4-D, resultando nos tratamentos  $0,09 \mu\text{M}$  Picloram +  $1000 \mu\text{M}$  de putrescina e  $0,09 \mu\text{M}$  2,4-D +  $1000 \mu\text{M}$  de putrescina, denominados Tr1 e Tr2, respectivamente. Foram utilizadas cinco repetições, representada por uma placa de Petri com quatro massas de calos embriogênicos. As placas de Petri foram incubadas por 60 dias em sala de cultivo mantida em fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de  $30 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , obtida com lâmpadas fluorescentes de 40W Osram® e temperatura de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Após esse período avaliou-se a porcentagem de explantes que regeneraram embriões somáticos.

### 2.4 - Análise histológica

A análise histológica foi realizada em flores formadas *in vitro* oriundas da inflorescência de 30 cm (IF1). Os explantes foram coletados ao 0, 10, 30 e 60 dias após a inoculação em meio de indução da calogênese e aos 30 e 60 dias após a inoculação em meio de regeneração. Foram coletados dois explantes a cada período.

Os explantes foram fixados em FAA<sub>50</sub> (formol: ácido acético: álcool etílico<sub>50%</sub>, na proporção de 5: 5: 90) e estocado em etanol 70% (Johansen, 1940). As amostras foram incluídas em metacrilato (Historesin-Leica®), de acordo com as recomendações do fabricante. O material emblocado foi seccionado transversal e longitudinalmente em micrótono rotativo, com 6  $\mu\text{m}$  de espessura. As seções obtidas foram coradas com azul de toluidina para detecção de metacromasia (O'Brien & McCully, 1981) e as lâminas foram montadas em resina sintética (Permount®). As imagens foram obtidas em fotomicroscópio (Olympus AX70) equipado com sistema U-photo.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 - Indução da embriogênese somática

##### 3.1.1 - Desenvolvimento *in vitro* de flores

O método de desinfestação utilizado foi eficiente no controle de contaminações biológicas e não inviabilizou o desenvolvimento das ráquulas.

As ráquulas iniciaram crescimento *in vitro* após duas semanas de cultivo, triplicando seu tamanho inicial ao final de 60 dias (Figura 1D, E). O desenvolvimento das flores foi assincrônico em ambas as inflorescências, completando-se entre 90 e 120 dias de cultivo (Figura 1F).

De acordo com a análise de variância (Tabelas 7A e 8A), o estágio de desenvolvimento da inflorescência influenciou significativamente a porcentagem de ráquulas com flores. Na inflorescência mais jovem IF1 a porcentagem de ráquulas com flores foi 22,5% superior à inflorescência mais velha IF2. Quanto à porcentagem de ráquulas oxidadas não houve diferença significativa entre as inflorescências, havendo 25,3% de perda de ráquulas por oxidação (Tabela 3).

Quanto ao meio de cultivo, verificou-se que a porcentagem de ráquulas oxidadas foi menor quando as ráquulas foram cultivadas em meio Y3 e, conseqüentemente, esse meio proporcionou maior porcentagem de ráquulas com flores, sendo 18,75% superior à obtida no meio MS (Tabela 3).

As auxinas utilizadas não apresentaram efeito significativo nas variáveis analisadas, sendo de 54,3% a porcentagem média de ráquulas com flores. (Tabela 3).

Tabela 3. Efeito do meio de cultivo (MC), estágio de desenvolvimento da inflorescência (EDI) e auxina no desenvolvimento *in vitro* de flores.

	MC		EDI		Auxina	
	Y3	MS	IF1	IF2	Picloram	2,4-D
Ráquulas com flores (%)	63,75b	45,00a	65,62a	43,12b	50,62a	58,12a
Ráquulas oxidadas (%)	20,62b	30,00a	26,87a	23,75a	25,00a	25,62a

As médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si, pelo teste F, ao nível de 5% de probabilidade.

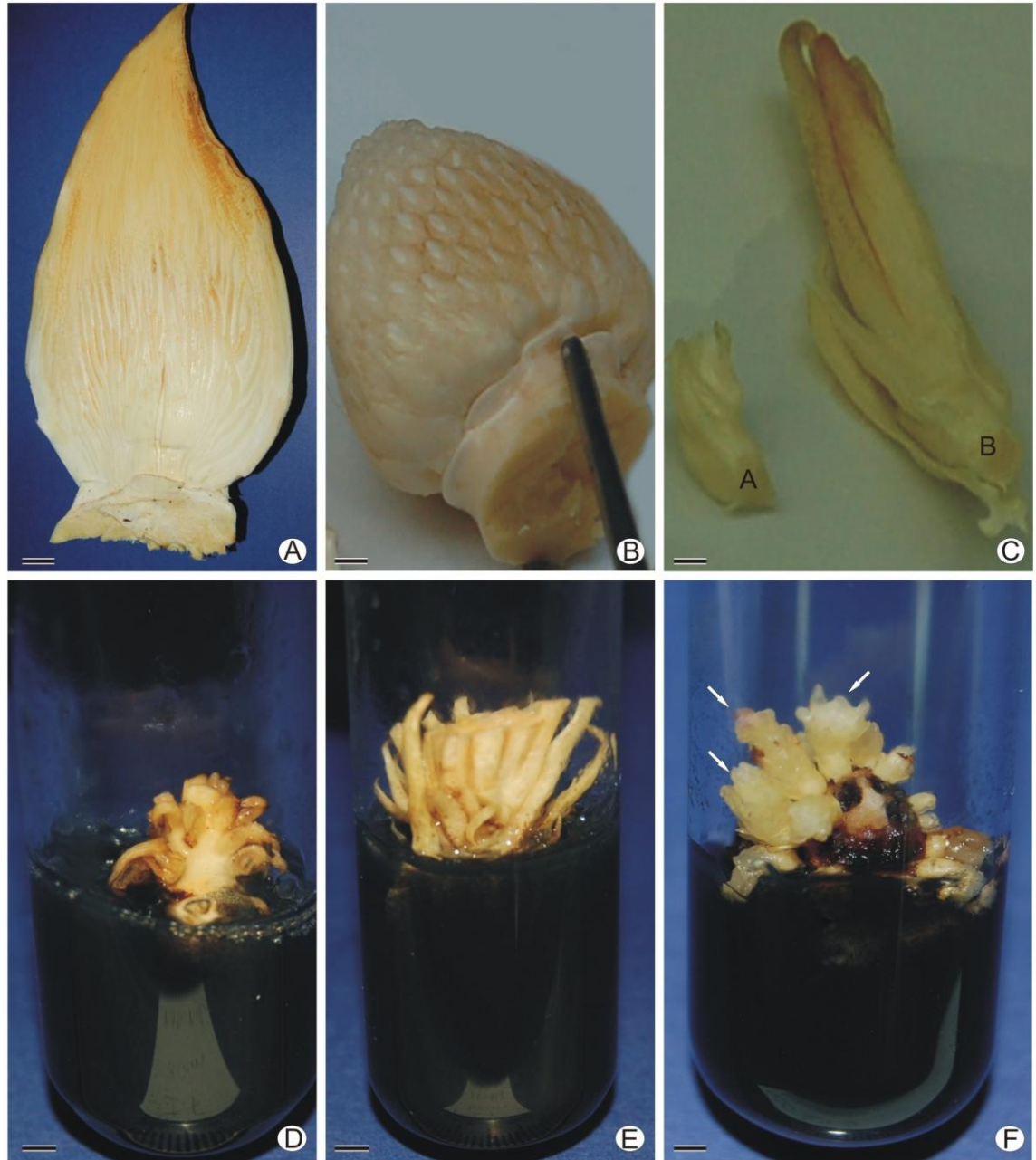


Figura 1. Inflorescência feminina imatura e indução de flores em ráquulas imaturas de *E. guineensis*. A – Inflorescência imatura protegida pelas espatas. B – inflorescência imatura após a retirada das espatas. C – Ráquulas retiradas das duas inflorescências femininas imaturas (IF1 e IF2) utilizadas no experimento (IF1: ráquila proveniente da inflorescência de 30 cm e IF2: ráquila proveniente da inflorescência de 45 cm). D – Ráquila da IF1 em meio de indução de flores após 60 dias da inoculação. E – Ráquila da IF2 em meio de indução de flores após 60 dias da inoculação. F – Flores formadas (setas) após 120 dias em meio de indução de flores. (Barras: A = 2,0 cm; B = 1,0 cm; C = 0,5 cm; D = E = F = 1,5 cm).

### 3.1.2 - Indução de calos

As flores inoculadas *in vitro* apresentavam o perianto composto por três sépalas e três pétalas o qual envolve a região interna em formação composta pelo androceu estéril e gineceu. (Figura 2A). A análise histológica dessa flor mostrou a presença de vários elementos traqueais no perianto e no gineceu (Figura 2B).

Aos dez dias em meio de indução, observou-se início da divisão celular nas regiões epidérmicas e sub-epidérmicas próximas aos elementos traqueais do gineceu (Figura 2C, D). Após 30 dias de cultivo a proliferação celular progrediu, resultando na formação de calos que foram visualizados principalmente nas regiões apical e basal da flor. Os calos apresentavam cor amarelada com aspecto esponjoso (Figura 2E). Seções histológicas dos calos evidenciavam massas meristemáticas na periferia dos calos, semelhante a uma zona meristemática (Figura 2F). As células das zonas meristemáticas eram pequenas e apresentavam citoplasma denso com alta razão núcleo/citoplasma. Aos sessenta dias a formação de calos se estendeu por toda a flor (Figura 2G). A análise histológica mostrou que a origem dos calos ocorria ao redor dos elementos traqueais, ou seja, têm origem perivascular, com desenvolvimento centrífugo (Figura 2H).

De acordo com a análise de variância conjunta, houve efeito significativo dos três fatores estudados na porcentagem de flores com formação de calos (Tabela 9A). Em tratamentos com flores tipo A, a porcentagem de formação de calos foi 31,9% superior aos tratamentos com flores tipo B (Tabela 4). Verificou-se que na presença de putrescina, a porcentagem de flores com formação de calos foi de 70,1%, e foi 19,5% superior ao tratamento sem putrescina. Observou-se também que no experimento 1 (Picloram), a porcentagem de flores com formação de calos foi de 69,4%, sendo 18,1% superior ao experimento 2 (2,4-D).

Tabela 4. Efeito de experimentos com diferentes auxinas, tipo de flor e putrescina na indução de calos a partir de flores oriundas de inflorescências imaturas.

	Experimentos (Auxinas)		Tipos de flor		Putrescina	
	1 (Picloram)	2 (2,4-D)	A (IF1)	B (IF2)	Com	Sem
Flores com calos (%)	69,4a	51,3b	76,3a	44,4b	70,1a	50,6b

As médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si, pelo teste F, ao nível de 5% de probabilidade.

### 3.2 - Multiplicação de calos

Nesta fase, observou-se a presença de dois tipos de calos, o não-embriogênico e o embriogênico. O calo não-embriogênico apresentou apenas aumento de volume de sua massa, mantendo as mesmas características iniciais. Nos calos embriogênicos, além do aumento de volume de sua massa, ocorreu também o desenvolvimento de estruturas globulares translúcidas, com superfícies relativamente lisas e de aspecto friável (Figura 3A). A análise histológica mostrou que essas estruturas globulares eram formadas, provavelmente, a partir do desenvolvimento das regiões meristemáticas dos calos descritos na fase anterior (Figura 3B), mas ainda não apresentavam organização de tecidos meristemáticos típica de embriões.

Em meio adicionado de 9  $\mu\text{M}$  Picloram + 1000  $\mu\text{M}$  de putrescina, em média 61% ( $\pm 12\%$ ) dos calos apresentaram competência embriogênica. Em meio adicionado de 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D + 1000  $\mu\text{M}$  de putrescina, a porcentagem foi de 36% ( $\pm 8\%$ ). Esse resultado demonstra que a utilização do picloram como fonte de auxina foi mais eficiente na indução de calos embriogênicos.



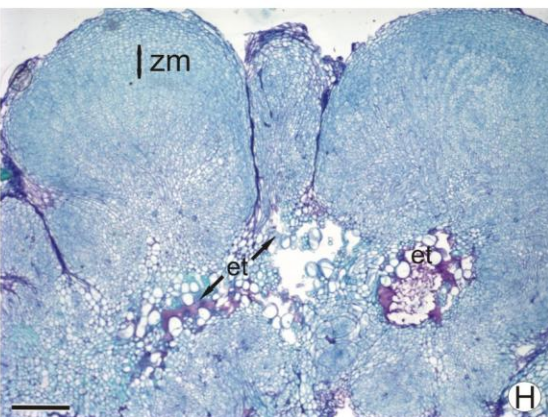
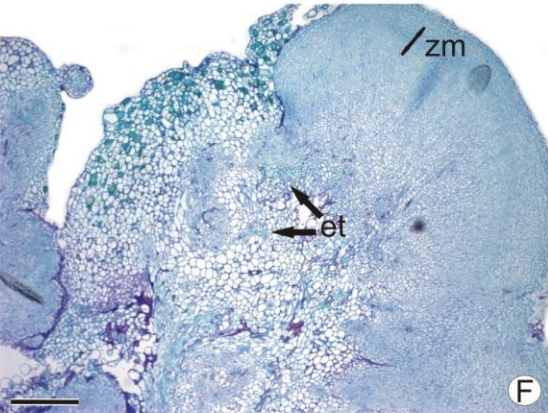
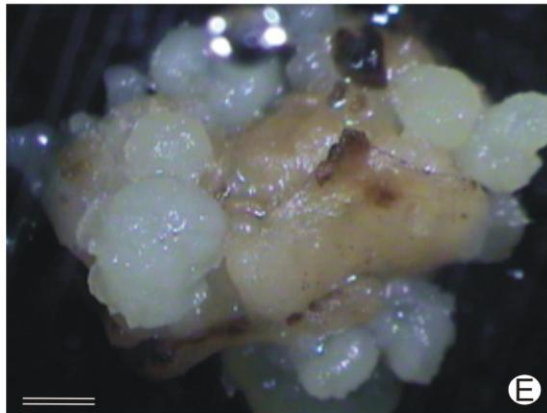
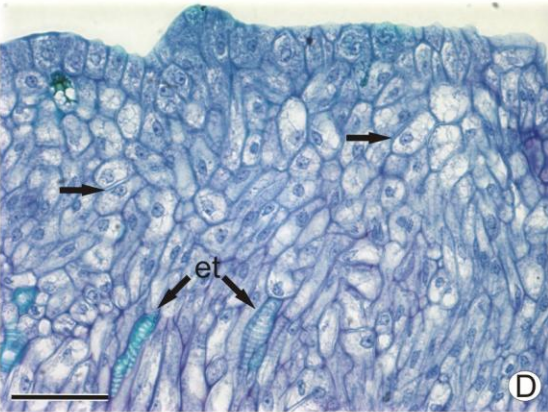
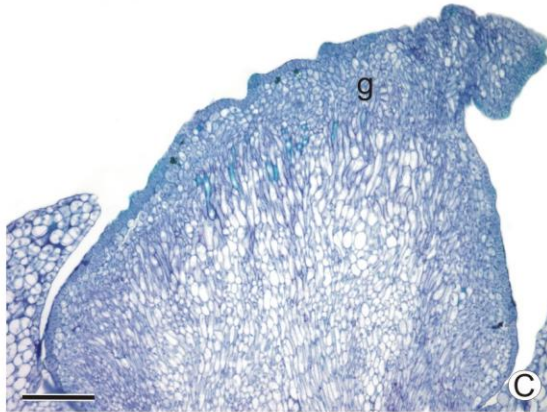
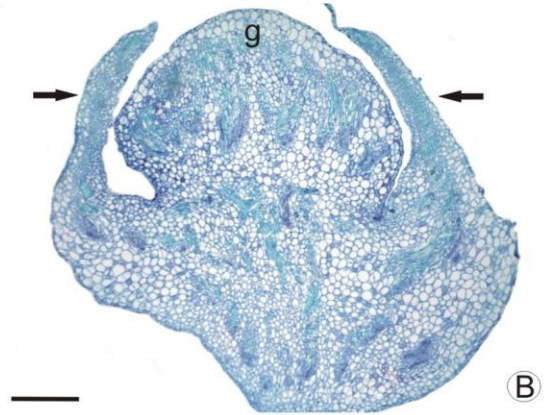
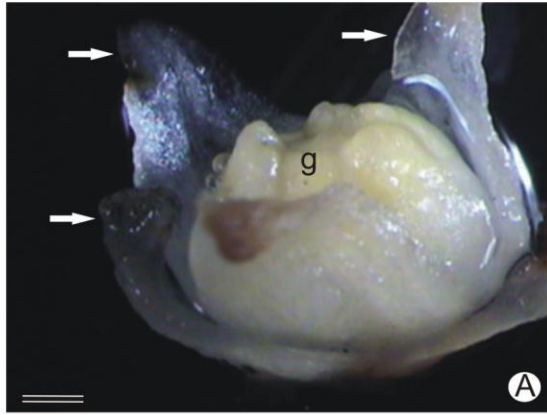


Figura 2. Indução de calos em flores formadas *in vitro* a partir de ráquulas retiradas de inflorescências femininas imaturas. A – Flor formada *in vitro*, setas indicam perianto envolvendo o gineceu (g). B – Secção longitudinal de flor formada *in vitro*, setas indicam perianto envolvendo o gineceu. C – Secção longitudinal da região epidérmica e sub-epidérmica do gineceu de flor aos dez dias da inoculação. A região mais intensamente corada corresponde ao início de proliferação celular. D – Detalhe da região de início de proliferação celular próxima aos elementos traqueais (et), indicados por setas brancas. As setas pretas indicam células com alta razão núcleo/citoplasma e células com dois nucléolos indicando atividade mitótica. E – Flor em processo de calogênese aos trinta dias em meio de indução de calos. F – Secção da flor com formação de calo próximos aos elementos traqueais (et) e evidencia da zona meristemática (zm) na periferia do calo. G – Massa de calos formada após sessenta dias em meio de indução. H – Secção da massa de calos formada após sessenta dias em meio de indução. Nota-se proliferação celular em torno dos elementos traqueais (et) e região de células tipicamente meristemáticas (zm) (Barras: A = E = G = 2 mm; B = F = 350 µm; C = 150 µm; D = 50 µm; H = 200 µm).

### 3.3 – Regeneração de embriões somáticos

As estruturas globulares provenientes do meio de multiplicação, após 30 dias em meio de regeneração, apresentaram maior desenvolvimento e individualização (Figura 3C, D). Na análise histológica desse material já foi possível a observação da protoderme relativamente bem definida, delimitando a massa central de células (Figuras 3E). Após 60 dias de incubação observou-se a completa regeneração dos embriões somáticos (Figura 4A). A análise histológica desses embriões mostrou a estrutura típica da protoderme bem definida, delimitando a massa homogênea de células correspondentes ao meristema fundamental, entremeada por cordões procambiais bem definidos (Figura 4B, C).

A porcentagem de calos embriogênicos com regeneração de embriões foi de 52% em Tr1, 23% superior ao tratamento Tr2.

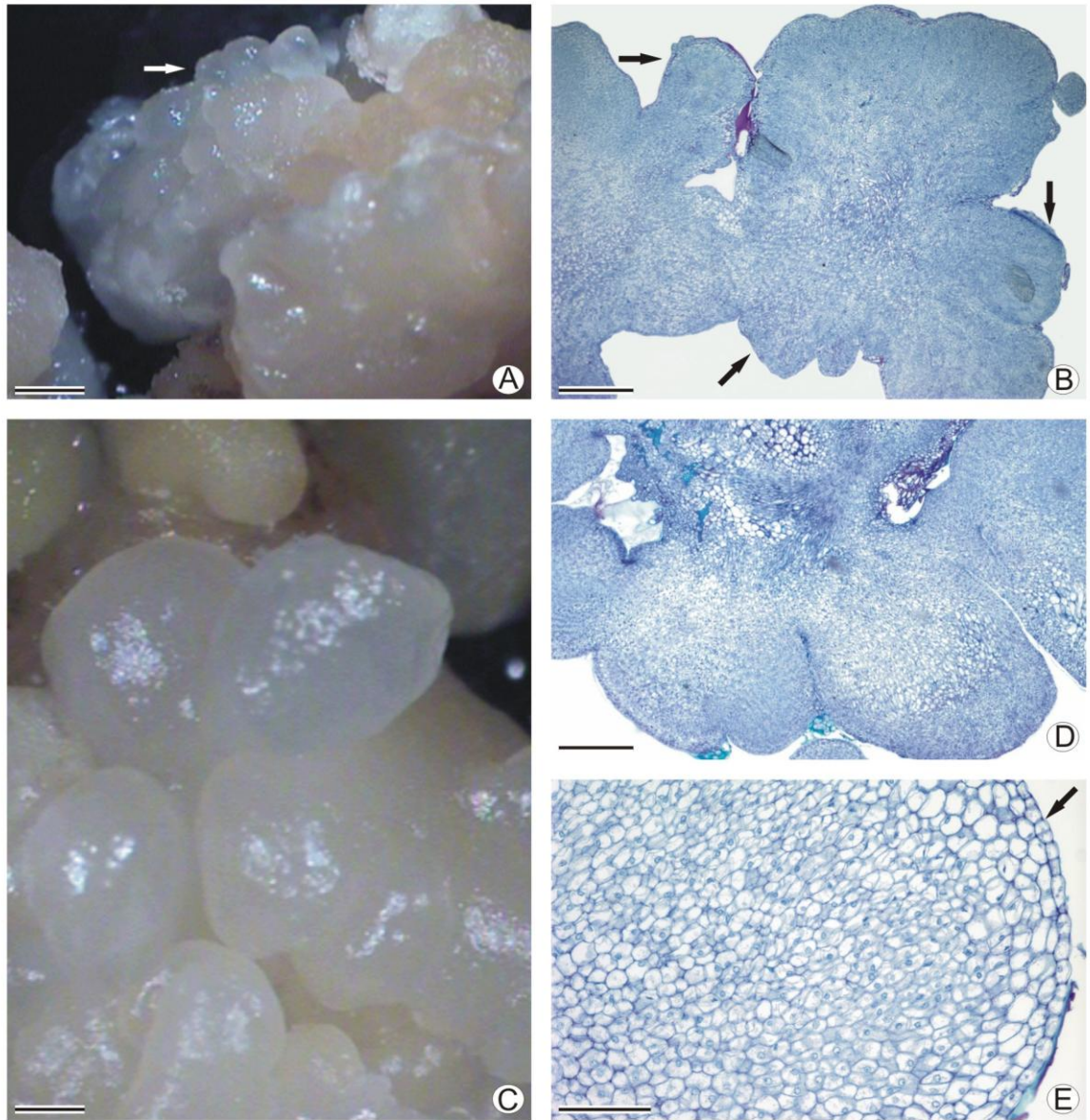


Figura 3. Formação e desenvolvimento de estruturas globulares a partir de calos embriogênicos. A - Calos embriogênicos com formação de estruturas globulares, seta branca indica estruturas globulares. B – Secção dos calos embriogênicos com formação de estruturas globulares, setas pretas indicam estruturas globulares. C - Estruturas globulares aos 30 dias em meio de regeneração. D - Secção das estruturas globulares aos 30 dias em meio de regeneração. E – Detalhe da estrutura globular, seta mostra a protoderme bem definida. (Barras: A = 2 mm, B = D = 400  $\mu$ m, C = 0,5 mm, E = 100  $\mu$ m).

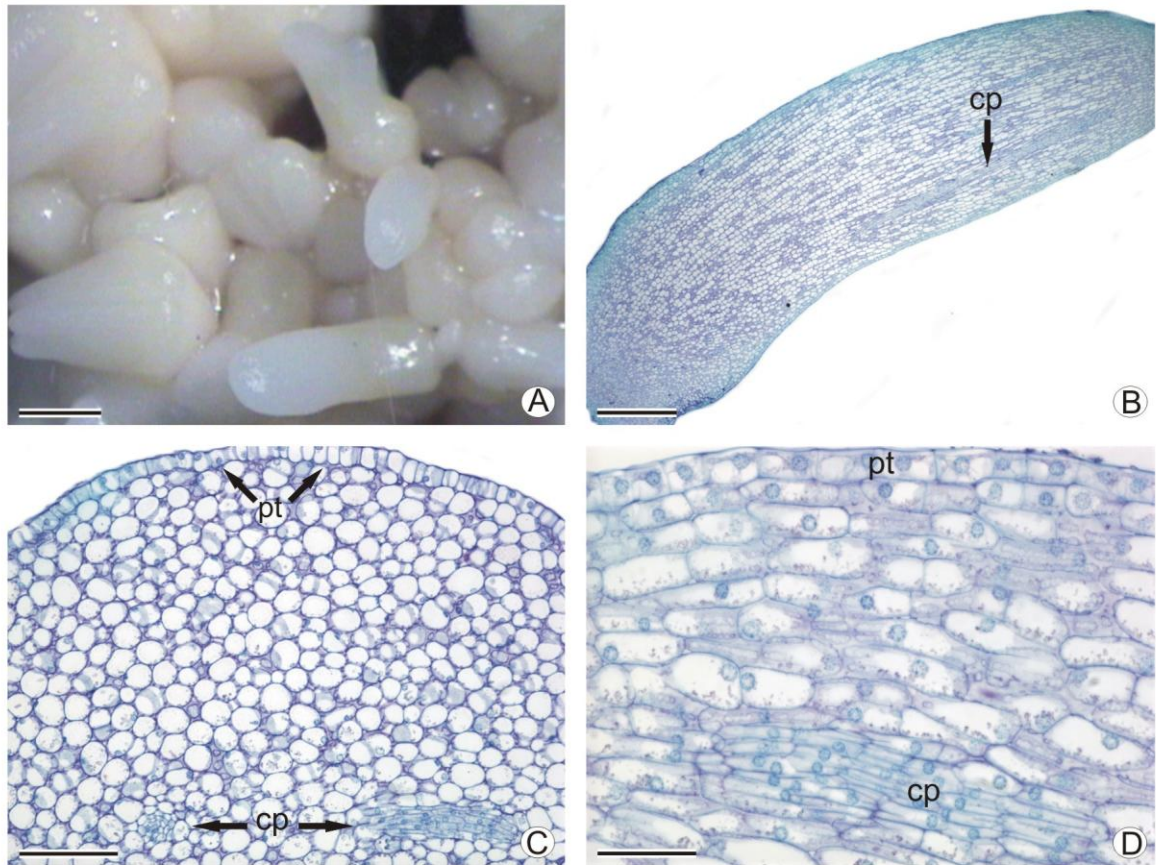


Figura 4. Embriões somáticos obtidos em tratamentos com picloram e putrescina após 60 dias de incubação dos explantes. A – Embriões somáticos. B – Secção longitudinal de embrião somático com destaque para cordões procambiais (cp). C – Detalhe de secção transversal de embrião somático de dendezeiro com destaque para a protoderme (pt) e cordões procambiais (cp). D – Detalhe de secção longitudinal de embrião somático de dendezeiro com destaque para protoderme (pt) e cordões procambiais (cp). (Barras: A = 2 mm; B = 400  $\mu$ m; C = 100  $\mu$ m; D = 50  $\mu$ m).

#### 4. DISCUSSÃO

Esse trabalho é o primeiro a descrever a indução da embriogênese somática a partir de flores desenvolvidas *in vitro* em ráquulas oriundas de inflorescências imaturas de dendezeiro. Teixeira et al. (1994) também obteve embriogênese somática a partir de inflorescências imaturas de dendezeiro, no entanto, o explante utilizado na indução de calos foram as ráquulas e esse evento não foi acompanhado por análise histológica.

Inflorescências imaturas de palmeiras quando utilizadas como fonte de explante apresentam o desenvolvimento de estruturas florais *in vitro* (Teixeira et al., 1994; Verdeil et al., 1994; Guerra & Handro, 1998; Steinmacher et al., 2007a). O estágio de desenvolvimento da inflorescência e a composição do meio de cultivo são fatores importantes nessa resposta. Segundo Steinmacher et al. (2007a), a formação de estruturas florais é maior em inflorescências mais desenvolvidas. No entanto, inflorescências em estágio de desenvolvimento muito avançado são menos responsivas, como foi evidenciado no presente trabalho, ocorrendo menor formação de flores na inflorescência mais velha. Com relação ao meio de cultivo, elevadas concentrações de auxinas associadas ao carvão ativado estimulam o crescimento e desenvolvimento das estruturas florais, reduzindo a oxidação dos explantes. De acordo com Teixeira et al. (1994) em meio de cultivo com baixa concentração ou sem auxina as inflorescências oxidaram e morreram, mesmo na presença de carvão ativado. Além disso, nesse mesmo trabalho, quando o meio de cultura MS foi substituído por Y3 a taxa de oxidação foi drasticamente reduzida, permitindo a resposta *in vitro*.

Após a obtenção das flores, o processo de indução de calos ocorreu em meio de cultivo adicionado de concentração relativamente baixa de auxina, quando comparada às concentrações utilizadas nos protocolos descritos para a indução de embriogênese a partir de inflorescências. As auxinas são utilizadas em altas concentrações com o objetivo de causar um estresse aos tecidos e estes serem reprogramados e responderem aos tratamentos de indução da embriogênese (Dodeman et al., 1997, Fehér et al., 2003). Assim, como o desenvolvimento das flores ocorreu em condições de elevados níveis de auxina, acredita-se que esse fato tenha favorecido a resposta das flores ao estímulo de indução de calos.

No processo de indução da embriogênese somática o picloram se mostrou superior ao 2,4-D, promovendo maior indução de calos embriogênicos e maior regeneração de embriões somáticos. A superioridade do picloram em relação ao 2,4-D nos processos embriogênicos é descrita em algumas *Arecaceae*, tais como *Areca catechu* (Karun et al., 2004), *Bactris gasipaes* (Steinmacher et al., 2007) e *Acrocomia aculeata* (Moura et al., 2008). Fitch & Moore (1990) sugerem que a efetiva absorção e mobilização desta auxina associada a rápida metabolização nas células alvo seja a causa desse comportamento. A regeneração dos embriões somáticos ocorreu em meio com reduzida concentração de picloram. Em palmáceas, após a indução da competência embriogênica, a transferência das culturas para meios com redução da concentração de auxina é requerida para o desenvolvimento dos embriões somáticos (Verdeil et al., 1994; Karun et al., 2004; Steinmacher et al., 2007a).

Além da auxina, o uso da putrescina também favoreceu a indução de calos e a regeneração de embriões somáticos. O efeito positivo da poliamina durante o processo de embriogênese somática é elucidado para várias espécies (Kevers et al., 2000; Sakhanokho et al., 2005; Kumar et al., 2008; Paul et al., 2009) e inclusive em *E. guineensis* (Rajesh et al., 2003).

Por meio da análise histológica verificou-se que as primeiras divisões celulares ocorreram a partir de células perivasculares. Estudos com *Cocus nucifera* (Fernando et al., 2003), *Euterpe edulis* (Guerra & Handro, 1998) e *Phoenix dactylifera* (Sané et al., 2006) também mostraram que os primeiros eventos de divisão celular foram observados nessas células, resultando na formação de calos a partir das regiões perivasculares. Em *Arecaceae*, células adjacentes aos tecidos vasculares apresentam alta capacidade morfogênica.

Após a obtenção dos calos, a formação dos embriões ocorreu a partir das regiões meristemáticas destes calos, seguindo o padrão multicelular, como descrito em *C.nucifera* (Fernando et al., 2003). Esse processo de formação de embriões é similar ao obtido por Tisserat & DeMason (1980), em que os embriões somáticos de *P. dactylifera* se originavam a partir de calos nodulares, os quais eram formados por células meristemáticas. Em *C. nucifera*, Saénz et al. (2006) também verificaram origem multicelular dos embriões somáticos que se formavam a partir de calos nodulares, com formação de zonas meristemáticas.

## 5. CONCLUSÕES

É possível obter a embriogênese somática em dendezeiro a partir de flores formadas *in vitro* em ráquulas retiradas de inflorescências imaturas de *E. guineensis*.

O estágio de desenvolvimento da inflorescência interfere na formação de flores e na calogênese das flores formadas *in vitro*.

O picloram tem melhor efeito que o 2,4-D na indução e na regeneração de embriões somáticos de *E. guineensis*.

O uso de putrescina é eficiente na indução e na regeneração de embriões somáticos, e pode substituir as citocininas no processo de embriogênese somática de *E. guineensis*.

A regeneração de embriões somáticos de *E. guineensis* ocorre após a redução da concentração de auxina no meio de cultura.

A origem dos embriões somáticos de *E. guineensis* obtidos a partir de flores formadas *in vitro* é multicelular com a formação de regiões meristemáticas a partir de células perivasculares.

## 6. REFERÊNCIAS

Chan JL, Saéñz L, Talavera C, Hornung R, Robert M, Oropeza C. Regeneration of cocout (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports** 17:515-521, 1998.

Corley RHV, Tinker PB. **The oil palm**. Blackwell Science, Oxford, 4 ed., 2003.

Dodeman VL, Ducreux G, Kreis M. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. **Journal of Experimental Botany** 48(8):1493-1509, 1997.

Euwens CJ. Effects of organic nutrient and hormones on growth and development of tissue explants from coconut (*Cocos nucifera*) and date (*Phoenix dactylifera*) palms cultured *in vitro*. **Physioloy Plant** 42:173-178, 1978.

Fernando SC, Verdeil JL, Hocher V, Weerakoon LK, Hirimburegama K. Histological analysis of plant regeneration from plumule explants of *Cocos nucifera*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 72(3):281-283, 2003.

Feher A, Pasternak TP, Dudits D. Transition of somatic cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 74:201-228, 2003.

Fitch MMM, Moore PH. Long-term culture of embryogenic sugarcane callus. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 32(3):335-343, 1993.

Fki L, Masmoudi R, Drira N, Rival A. An optimized protocol for plant regeneration from embryogenic suspension cultures of date palm, *Phoenix dactylifera* L., cv. Degls et Nour. **Plant Cell Reports** 21: 517-524, 2003.

Guerra MP, Handro W. Somatic embryogenesis and plant regeneration in different organs of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae): control and structural features. **Journal of Plant Research** 111:65–71, 1998.

Johansen DA **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book Co. Inc. 1940. 523p.

Kanchanapoom K, Domyoas P. The origin and development of embryoids in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) embryo culture. **Science Asia** 25:195-202, 1999.

Karun A, Siril E, Radha E, Parthasarathy VA. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from leaf and inflorescence explants of arecanut (*Areca catechu* L.). **Current Science** 86:1623-1628, 2004.

Kevers C, Le Gal N, Monteiro M, Dommes J, Gaspar TH. Somatic embryogenesis of *Panax ginseng* in liquid cultures: a role for polyamines and their metabolic pathways. **Plant Growth Regulator** 31:209-214, 2000.

Kumar V, Giridhar P, Chandrashekar A, Ravishankar GA. Polyamines influence morphogenesis and caffeine biosynthesis in *in vitro* cultures of *Coffea canephora* P. ex Fr. **Acta Physiologiae Plantarum** 30:217–223, 2008.

Low ET, Alias H, Boon SH, Shariff EM, Tan CA, Ooi LC. Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) tissue culture ESTs: Identifying genes associated with callogenesis and embryogenesis. **BMC Plant Biology** 8(62):1471-1490, 2008.

Michaux-Ferrière N, Carron MP Histology of early somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*: The importance of the timing of subculturing. **Plant Cell, Culture and Organ Culture** 19(3):243-256, 1989.

Moura EF, Ventrella MC, Motoike SY, Sá Júnior AQ, Carvalho M, Manfio CE. Histological study of somatic embryogenesis induction on zygotic embryos of macaw palm (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Martius). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 95 (2):175–184, 2008.

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

O'Brien TP, Feder N, McCully ME. Pylchromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma** 59:368-373, 1964.



Paul A, Mitter K, Raychaudhuri SS. Effect of polyamines on in vitro somatic embryogenesis in *Momordica charantia* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 97:303–311, 2009.

Perez-Núñez MT, Chan JL, Saenz L, Gonzalez T, Verdeil JL, Oropeza C. Improved somatic embryogenesis from *Cocos nucifera* (L.) plumule explants. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant** 42:37-43, 2006.

Rajesh MK, Radha E, Karun A, Parthasarathy VA Plant regeneration from embryo-derived callus of oil palm - the effects of exogenous polyamines. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 75:41–47, 2003.

Sáenz L, Azpeitia A, Chuc-Armendariz B, Chan JL, Verdeil JL, Hocher V, Oropeza C. Morphological and histological changes during somatic embryo formation from coconut plumule explants. **In Vitro Cell & Development Biology Plants** 42:19-25, 2006.

Sakhanokho HF, Ozias-Akins P, May OL, Chee PW. Putrescine enhances somatic embryogenesis and plant regeneration in upland cotton. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 81:91–95, 2005.

Sané D, Aberlenc-Bertossi F, Gassama-Dia YK, Sagna M, Trouslot MF, Duval Y, Borgel A. Histocytological analysis of callogenesis and somatic embryogenesis from cell suspensions of date palm (*Phoenix dactylifera*). **Annals of Botany** 98(2):301-308, 2006.

Schwendiman J, Pannetier C, Michaux-Ferriere N. Histology of somatic embryogenesis from leaf explants of the oil palm *Elaeis guineensis*. **Annals of Botany** 62:43-52, 1988.

Steinmacher DA, Cangahuala-Inocente GC, Clement CR, Guerra MP. Somatic embryogenesis from peach palm zygotic embryos. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant** 43(2):124-132, 2007.

Steinmacher DA, Clement CR, Guerra MP. Somatic embryogenesis from immature peach palm inflorescence explants: towards development of a efficient protocol. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 89(1):15-22, 2007.

Steinmacher DA, Krohn NG, Dantas ACM, Stefenon VM, Clement CR, Guerra MP. Somatic embryogenesis in peach palm using the thin cell layer technique: induction, morpho-histological aspects and AFLP analysis of somaclonal variation. **Annals of Botany** 100(4):699-709, 2007.

Teixeira JB, Sandahl MR, Kirby EG. Somatic embryogenesis from immature inflorescences of oil palm. **Plant Cell Reports** 13:247-250, 1994.

Tisserat B, Demason DA. A histological study of development of adventitious embryos in organ cultures of *Phoenix dactylifera* L. **Annals of Botany** 46:465-472, 1980.

Verdeil JL, Huet C, Grosdemange F, Buffard-Morel J. Plant regeneration from cultured immature inflorescences of cocconut (*Coccus nucifera* L.): evidence for somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports** 13:218-221. 1994.

Zaid A, Tisserat B. Morphogenetic responses obtained from a variety of somatic explant tissues of data palm. **Journal of Plant Research** 96(2):67-73, 1983.

## ANEXO

Tabela 1A. Quadro de análise de variância para a porcentagem de indução de calos em explantes foliares de genótipos de dendezeiro aos 3 meses de cultivo em meios com diferentes concentrações de 2,4-D.

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F
Concentrações 2,4-D	3	1429.780959	476.593653	44.398**
Genótipo	1	979.363153	979.363153	91.234**
Concentrações 2,4-D x Genótipo	3	286.971459	95.657153	8.911**
Erro	24	257.631475	10.734645	
Total	31	2953.747047		
CV (%)	<b>34,03</b>			

\*\*Significativo a 1% de probabilidade

Tabela 2A. Quadro de análise de variância para a porcentagem de formação de calos embriogênicos durante a fase de multiplicação do processo de embriogênese somática de dendezeiro.

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F
Poliaminas	1	31.250000	31.250000	0,034
Carvão ativado	1	31.250000	31.250000	0,034
Poliamias x Carvão ativado	1	781.250000	781.250000	0,0847
Erro	16	14750.000000	921.875000	
Total	19	15593.750000		
CV (%)	<b>39,82</b>			

Tabela 3A. Quadro de análise de variância para a porcentagem de calos embriogênicos prolíficos na fase de multiplicação do processo de embriogênese somática de dendezeiro.

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F
Poliaminas	1	500.000000	500.000000	4.571*
Carvão ativado	1	8000.000000	8000.000000	73.141**
Poliamias x Carvão ativado	1	500.000000	500.000000	4.571*
Erro	16	1750.000000	109.375000	
Total	19	10750.000000		
CV (%)	<b>13.07</b>			

\*\*Significativo a 1% de probabilidade

\*Significativo a 5% de probabilidade

Tabela 4A. Quadro de análise de variância conjunta para a porcentagem de regeneração de embriões somáticos a partir de massas pró-embriogênicas de dendezeiro.

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F
Pré-condicionamento	1	49408.333333	49408.333333	237.160**
Auxina	2	650.000000	325.000000	1.560
Pré-condicionamento x Auxina	2	516.666667	258.333333	1.240
Experimentos (Poliaminas)	1	3675.000000	3675.000000	17.640**
Pré-condicionamento x Experimentos (Poliaminas)	1	8.333333	8.333333	0.040
Auxina x Experimentos (Poliaminas)	2	350.000000	175.000000	0.840
Pré-condicionamento x Experimentos (Poliaminas) x Auxinas	2	16.666667	8.333333	0.040
Erro	36	7500.000000	208.333333	
Total	47	62125.000000		
CV (%)	25.66			

\*\*Significativo a 1% de probabilidade

Tabela 5A. Quadro de análise de variância conjunta para o número de embriões somáticos regenerados a partir de massas pró-embriogênicas de dendezeiro.

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F
Pré-condicionamento	1	3073.600208	3073.600208	59.127**
Auxina	2	628.305450	314.152725	6.043**
Pré-condicionamento x Auxina	2	351.352117	175.676058	3.379*
Experimentos (Poliaminas)	1	1179.885008	1179.885008	22.697**
Pré-condicionamento x Experimentos (Poliaminas)	1	335.915008	335.915008	6.462*
Auxina x Experimentos (Poliaminas)	2	68.756117	34.378058	0.661
Pré-condicionamento x Experimentos (Poliaminas) x Auxinas	2	54.866117	27.433058	0.528
Erro	36	1871.391500	51.983097	
Total	47	7564.071525		
CV (%)	53.48			

\*\*Significativo a 1% de probabilidade

\*Significativo a 5% de probabilidade

Tabela 6A. Quadro de análise de variância para a porcentagem de germinação de embriões somáticos de dendezeiro.

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F
Auxina	2	14443.412719	7221.706360	13.000**
Carvão ativado	1	3201.291010	3201.291010	5.763*
Auxina x Carvão ativado	2	1323.042348	661.521174	1.191
Erro	36	19998.666857	555.518524	
Total	41	38966.412933		
CV (%)	<b>58.23</b>			

\*\*Significativo a 1% de probabilidade

\*Significativo a 5% de probabilidade.

Tabela 7A. Quadro de análise de variância para a porcentagem de ráquias com flores, sendo estudados os efeitos de meio de cultivo (MC), estágio de desenvolvimento da inflorescência (EDI) e auxina.

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F
MC	1	2812.500000	2812.500000	16.463**
EDI	1	4050.000000	4050.000000	23.707**
Auxina	1	450.000000	450.000000	2.634
MC x EDI	1	50.000000	50.000000	0.293
MC x Auxina	1	0.000125	0.000125	0.000
EDI x Auxina	1	12.500000	12.500000	0.073
MC x EDI x Auxina	1	112.500000	112.500000	0.659
Erro	24	4100.000000	170.833333	
Total	31			
CV (%)	24,04			

\*\*Significativo a 1% de probabilidade

Tabela 8A. Quadro de análise de variância para a porcentagem de ráquias oxidadas sob os efeitos de meio de cultivo (MC), estágio de desenvolvimento da inflorescência (EDI) e auxina.

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F
MC	1	703.125000	703.125000	8.133**
EDI	1	78.125000	78.125000	0.904
Auxina	1	3.125000	3.125000	0.036
MC x EDI	1	3.125000	3.125000	0.036
MC x Auxina	1	78.125000	78.125000	0.904
EDI x Auxina	1	28.125000	28.125000	0.325
MC x EDI x Auxina	1	28.125000	28.125000	0.325

Erro	24	2075.000000	86.458333
Total	31		
CV (%)	36,73		

\*\*Significativo a 1% de probabilidade

Tabela 9A. Quadro de análise de variância para a indução de calos em flores formadas *in vitro* a partir de ráquulas retiradas de inflorescências imaturas.

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F
Tipo de flor	1	12246.435208	12246.435208	45.571**
Putrescina	1	4541.575208	4541.575208	16.900**
Tipo de flor x Putrescina	1	0.000208	0.000208	0.000
Experimentos (Auxinas)	1	3918.660208	3918.660208	14.582**
Tipo de flor x Experimentos (Auxinas)	1	578.935208	578.935208	2.154
Putrescina x Experimentos (Auxinas)	1	0.000208	0.000208	0.000
Tipo de flor x Putrescina x Experimentos (Auxinas)	1	0.001875	0.001875	0.000
Erro	40	10749.285000	268.732125	
Total	47	32034.893125		
CV (%)	27.15			

\*\*Significativo a 1% de probabilidade