

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**RAFAELA CARLA MATTIA**

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE  
DENDEZEIRO (*Elaeis guineensis* Jacq.)**



**CURITIBA**

**2009**

**RAFAELA CARLA MATTIA**

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE  
DENDEZEIRO (*Elaeis guineensis* Jacq.)**

Monografia apresentada à disciplina de Estágio em Botânica (BB033), como requisito parcial à conclusão do curso de Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marguerite Quoirin

**CURITIBA**

**2009**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço imensamente e primeiramente à meus pais e à meu irmão, que sempre foram magníficos nas atitudes de incentivo e compreensão perante as atividades relacionadas à minha formação intelectual e futura profissão.

À professora Marguerite Quoirin, pela aceitação, oportunidade de realização e pela orientação conferida à mim ao longo do desenvolvimento do projeto.

Aos colegas e principalmente amigos do Laboratório de Micropropagação Vegetal do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, pela ajuda constante e pela alegre convivência proporcionada diariamente.

Ao Rodrigo, pela companhia, ajuda e compreensão constantes.

À Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade de realização do curso.

Aos colegas da graduação que conviveram intimamente comigo durante esses anos e que me mostraram a verdadeira importância de uma amizade genuína.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem participar.

À EMBRAPA, pelo fornecimento de material.

Ao CNPq, pelo financiamento do projeto.

À todos aqueles que estiveram envolvidos de uma forma ou de outra neste trabalho.

## RESUMO

O dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) é uma espécie de palmeira originária do continente africano que possui um notável potencial para produção de óleo vegetal. Devido a este fato, é característica dessa espécie sua designação como matéria-prima valiosa na produção de biocombustíveis. Além disso, o dendê possui uso alimentício, industrial, oleoquímico e medicinal. A XG é um polissacarídeo obtido de sementes de plantas nativas, como o jatobá. Com isso, torna-se possível a criação de novos meios de cultivo de custo reduzido, destinados à micropropagação do dendê por embriogênese somática. Neste estudo, foi utilizada a técnica de micropropagação vegetal via embriogênese somática a partir de embriões zigóticos. O objetivo deste trabalho foi testar diferentes meios de cultura contendo misturas de xiloglucana (XG) e do agente geleificante Gelrite®, além da otimização de um protocolo de embriogênese somática de dendê, testando diferentes concentrações de reguladores vegetais. A XG foi extraída de sementes de jatobá (*Hymenaea courbaril*). Foram utilizadas sementes maduras de dendê fornecidas pela EMBRAPA Amazônia Ocidental (Manaus, Brasil). As sementes foram desinfestadas com hipoclorito de sódio a 12% por 10 minutos. Em seguida, foram lavadas com água destilada estéril por três vezes, sendo todo o processo realizado em câmara de fluxo laminar. Os embriões foram excisados com a ajuda de pinças e bisturi, e inoculados em placas de Petri contendo meio de cultura Y3-1, acrescido de 1 µM de cinetina, 0,1 µM de ácido giberélico e 0,1 µM de 2,4-D. Os embriões permaneceram neste meio cerca de 30 dias, até apresentarem sinais de crescimento em comprimento e diâmetro. Em seguida, foram cortados em fatias de 1 mm e transferidos para quatro tratamentos compostos de meio Y3-2, acrescido de 10 µM de 2,4-D e várias proporções de Gelrite® e XG ou para quatro tratamentos compostos de meio Y3-2 com várias concentrações das auxinas 2,4-D e Picloram. Após a formação das massas embriogênicas, metade dos embriões foram transferidos para meio Y3-2 com 5 µM de 2,4-D e metade para meio Y3-2 sem reguladores vegetais (Y3-3). Depois de permanecerem cerca de 120 dias neste meio, os embriões foram transferidos para meio Y3-3. As culturas foram mantidas em sala de crescimento no escuro com temperatura de 25± 2°C de dia e 18± 2°C de noite. Para a maioria dos experimentos, o maior desenvolvimento de massas embriogênicas friáveis e de embriões somáticos foi verificado no tratamento sem XG, mas embriões em estádios mais avançados de desenvolvimento, como o cordiforme e o torpedo, puderam ser visualizados também nos tratamentos com XG. Maior desenvolvimento de massas embriogênicas foi observado nos tratamentos que foram transferidos de meio com 10 µM de 2,4-D para meio isento de 2,4-D. Tanto o 2,4-D quanto o Picloram foram eficientes na formação de calos. Para o estabelecimento de um protocolo de embriogênese somática há necessidade de mais estudos das etapas de maturação e conversão de embriões somáticos em plantas.

Palavras-chave: micropropagação, géis, palmeiras.

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1A** - XILOGLUCANA EXTRAÍDA DE SEMENTES DE JATOBÁ (*Hymenaea courbaril*). **1B** - SEMENTES DE *Elaeis guineensis* FORNECIDAS PELA EMBRAPA AMAZÔNIA OCIDENTAL EM 20/03/2009. **1C** - DESINFESTAÇÃO DE SEMENTES DE *Elaeis guineensis* COM HIPOCLORITO DE SÓDIO A 12% POR 10 MINUTOS, EM CÂMARA DE FLUXO LAMINAR. **1D** - EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE *Elaeis guineensis* INOCULADOS EM PLACA DE PETRI CONTENDO MEIO DE CULTURA Y3-1(Eeuwens, 1976) SEMI-SÓLIDO, ADICIONADO DE 0,1  $\mu\text{M}$  DE ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO (2,4-D), 0,1  $\mu\text{M}$  DE ÁCIDO GIBERÉLICO ( $\text{GA}_3$ ) e 0,1  $\mu\text{M}$  DE CINETINA (CIN). **1E** - EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE *Elaeis guineensis* EM MEIO DE CULTURA Y3-1(Eeuwens, 1976) SEMI-SÓLIDO, APÓS 27 DIAS. **1F** - EMBRIÃO EM MEIO DE CULTURA Y3-1(Eeuwens, 1976) SEMI-SÓLIDO, APÓS 27 DIAS, EM DETALHE ..... 40
- FIGURA 2A** - MASSA EMBRIOGÊNICA FRIÁVEL DE *Elaeis guineensis* APÓS 60 DIAS DE SUBCULTIVO EM MEIO Y3-2, ACRESCIDO DE 10  $\mu\text{M}$  DE 2,4-D, EM MEIO GELEIFICADO COM 2  $\text{g.L}^{-1}$  DE GELRITE® E SEM XILOGLUCANA. **2B, 2C E 2D** - MASSAS EMBRIOGÊNICAS FRIÁVEIS DE *Elaeis guineensis* APÓS 60 DIAS DE SUBCULTIVO EM MEIO Y3-2, ACRESCIDO DE 10  $\mu\text{M}$  DE 2,4-D, EM MEIO GELEIFICADO COM 1.6  $\text{g.L}^{-1}$  DE GELRITE® E 0,4  $\text{g.L}^{-1}$  DE XILOGLUCANA. **2E E 2F** - MASSAS EMBRIOGÊNICAS FRIÁVEIS DE *Elaeis guineensis* APÓS 60 DIAS DE SUBCULTIVO EM MEIO Y3-2, ACRESCIDO DE 10  $\mu\text{M}$  DE 2,4-D, EM MEIO GELEIFICADO COM 2  $\text{g.L}^{-1}$  DE GELRITE® E SEM XILOGLUCANA ..... 41
- FIGURA 3A, 3B E 3C** - EMBRIÕES SOMÁTICOS DE *Elaeis guineensis* APÓS SUCESSIVOS SUBCULTIVOS EM MEIO Y3-2 ACRESCIDO DE 10  $\mu\text{M}$  DE 2,4-D E SUBSEQUENTE SUBCULTIVO PARA MEIO SEM 2,4-D, GELEIFICADO COM 2  $\text{g.L}^{-1}$  DE GELRITE® E SEM XILOGLUCANA, EM ESTÁDIOS GLOBULAR, CORDIFORME E TORPEDO, RESPECTIVAMENTE. **3D E 3E** - EMBRIÕES SOMÁTICOS DE *Elaeis guineensis* FORMADOS SOBRE MASSA EMBRIOGÊNICA EM MEIO DE CULTURA RM NA AUSÊNCIA DE REGULADORES DE CRESCIMENTO VEGETAL. **3F** – EMBRIÃO SOMÁTICO DE *Elaeis guineensis* EM ESTÁDIO COTILEDONAR ISOLADO DE MASSA EMBRIOGÊNICA EM MEIO DE CULTURA RM ADICIONADO DE CARVÃO ATIVADO, EM DETALHE ..... 42

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - PROPORÇÕES DE GELRITE® E XILOGLUCANA EM g.L <sup>-1</sup> UTILIZADAS NA SOLIDIFICAÇÃO DO MEIO DE CULTURA Y3-2 PARA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE DENDÊ .....	24
TABELA 2 - FORMAÇÃO DE CALOS A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE <i>Elaeis guineensis</i> CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA Y3-2, CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE 2,4-D, APÓS 30 E 60 DIAS .....	27
TABELA 3 - FORMAÇÃO DE CALOS A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE <i>Elaeis guineensis</i> CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA Y3-2, CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PICLORAM, APÓS 30 E 60 DIAS .....	28
TABELA 4 - FORMAÇÃO DE CALOS A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE <i>Elaeis guineensis</i> CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA Y3-2, SOLIDIFICADO COM COMBINAÇÕES DE GELRITE ® /XG APÓS 30, 60, 90 E 120 DIAS .....	29
TABELA 5 - FORMAÇÃO DE MASSAS EMBRIOGÊNICAS A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE <i>Elaeis guineensis</i> APÓS CULTIVO POR 90 DIAS EM MEIO Y3-2, SUPLEMENTADO COM 5 µM DE 2,4-D E NA AUSÊNCIA DE 2,4- D .....	30
TABELA 6 - FORMAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE <i>Elaeis guineensis</i> APÓS CULTIVO POR 60 e 90 DIAS EM MEIO Y3-2, SUPLEMENTADO COM 5 µM DE 2,4-D E NA AUSÊNCIA DE 2,4- D .....	30
TABELA 7 - RESPOSTAS MORFOGENÉTICAS DE CALOS DE <i>Elaeis guineensis</i> CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA Y3-2, SOLIDIFICADO COM COMBINAÇÕES DE GELRITE®/XG APÓS 120 E 240 DIAS .....	31
TABELA 8 - RESPOSTAS MORFOGENÉTICAS DE CALOS DE <i>Elaeis guineensis</i> OBTIDAS EM MEIO DE CULTURA Y3-2, SOLIDIFICADO COM COMBINAÇÕES DE GELRITE®/XG APÓS 60 E 90 DIAS .....	32

## LISTA DE ABREVIATURAS

**AIA** - Ácido indol-3-acético

**ABA** – Ácido abscísico

**ANA** – Ácido  $\alpha$ -naftalenoacético

**CIN** – Cinetina

**GA<sub>3</sub>** – Ácido giberélico

**2,4-D** – Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético

**Y3** - Eeuwens (1976)

**RM** - Teixeira *et al.* (1995)

**KM** - Kao e Michayluk (1975)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	8
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	11
2.1 OBJETIVO GERAL .....	11
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	11
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	12
3.1 A ESPÉCIE <i>Elaeis guineensis</i> .....	12
3.2 MICROPROPAGAÇÃO VEGETAL.....	13
3.3 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA.....	14
3.3.1 Fatores que influenciam a embriogênese somática <i>in vitro</i> .....	17
3.3.1.1 Escolha do explante .....	17
3.3.1.2 Composição do meio de cultura .....	17
3.4 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM DENDEZEIRO .....	19
3.5 XILOGLUCANAS .....	20
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	21
4.1 LOCAL DE TRABALHO .....	21
4.2 OBTENÇÃO DE XILOGLUCANA.....	21
4.3 MATERIAL VEGETAL.....	21
4.4 DESINFESTAÇÃO.....	21
4.5 FONTES DE EXPLANTES.....	21
4.6 MEIOS DE CULTURA.....	21
4.7 CONDIÇÕES DE CULTIVO .....	22
4.8 INDUÇÃO E MANUTENÇÃO DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS .....	22
4.8.1 Experimento preliminar .....	22
4.8.2 Efeito do 2,4-D na embriogênese somática.....	23
4.8.3 Efeito do Picloram na embriogênese somática.....	23
4.8.4 Efeito dos agentes geleificantes .....	23
4.8.4.1 Experimento 1 .....	23
4.8.4.2 Experimento 2 .....	24
4.8.4.3 Experimento 3 .....	25
4.9 AVALIAÇÃO.....	25
<b>5 RESULTADOS</b> .....	26
5.1 Experimento preliminar .....	26
5.2 Efeito do 2,4-D na embriogênese somática.....	26
5.3 Efeito do Picloram na embriogênese somática.....	27
5.4 Efeito dos agentes geleificantes .....	28
5.4.1 Experimento 1 .....	28
5.4.2 Experimento 2 .....	31
5.4.3 Experimento 3 .....	31
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	33
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	37
<b>8 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	38
<b>FIGURAS</b> .....	39
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	43
<b>ANEXOS</b> .....	48

## 1 INTRODUÇÃO

A utilização de energias limpas e renováveis torna-se cada vez mais importante à medida que as matérias-primas não-renováveis utilizadas atualmente em larga escala para abastecer a demanda de energia no mundo gradativamente tornam-se mais escassas. Neste cenário, os biocombustíveis tornam-se extremamente importantes como uma alternativa à finitude dos recursos energéticos utilizados atualmente, além de contribuírem com a diminuição dos efeitos poluidores causados por esses recursos.

A demanda mundial por combustíveis renováveis tem se expandido de forma muito rápida nos últimos anos e deverá acelerar ainda mais, principalmente nos países que são grandes consumidores de combustíveis. Frente à esta realidade, em 2002 o governo brasileiro instituiu o Programa Brasileiro de Biocombustíveis, numa tentativa de viabilizar a utilização do biodiesel, considerando que este combustível poderia contribuir favoravelmente para o equacionamento de questões como a geração de emprego e renda, inclusão social, redução das emissões de gases poluentes, das disparidades regionais de desenvolvimento e da dependência de importações de petróleo, abrangendo aspectos de natureza social, estratégica, econômica e ambiental (MIRAGAYA, 2005).

O programa brasileiro de biocombustíveis busca viabilizar a utilização do biodiesel, constituído das misturas de ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos, obtidos da reação química de transesterificação de diversos óleos, entre eles o de dendê (MIRAGAYA, 2005).

O Brasil tem capacidade para produzir combustíveis alternativos a partir de diversas espécies oleaginosas. O dendezeiro (*Elaeis guineensis*) mostra-se como a cultura mais promissora para a produção de óleo e sua consequente conversão em biocombustível. Entre as plantas oleaginosas mais utilizadas, o dendezeiro é a espécie com maior produtividade, podendo atingir 6 toneladas de óleo por hectare por ano. Contudo, diante das exigências edafo-climáticas, seu cultivo no território brasileiro prevalece em áreas restritas nos estados do Pará e Bahia. Além disso, o uso do biodiesel produzido a partir do óleo de dendê limita-se a regiões de clima quente, em função de suas características físico-químicas. O óleo solidifica à

temperaturas amenas, inviabilizando seu uso nas regiões sul do Brasil (TEIXEIRA, 2005).

O dendezeiro, pertencente à família Arecaceae, é originário do continente africano. Desenvolve-se em climas de região tropical, em vários tipos de solo ricos em matéria orgânica (CARVALHO *et al.*, 2001). O óleo extraído das sementes do dendê tem uso alimentício, medicinal, oleoquímico e industrial (MIRAGAYA, 2005).

A propagação do dendezeiro ocorre por meio de sementes e, mesmo quando se utilizam híbridos selecionados, as plantas podem apresentar alta variabilidade, constituindo-se num dos principais fatores da baixa produtividade em plantios comerciais (JUAN e RODRIGUES, 1989).

Devido à dificuldade de usar a propagação via sementes, a cultura de tecidos surge como uma excelente alternativa para a multiplicação clonal de espécies selecionadas (SCHERWINSKI-PEREIRA *et al.*, 2007).

A técnica de clonagem *in vitro* de plantas tornou-se possível mediante a cultura de tecidos, fundamentando-se na totipotência das células vegetais, por meio da regeneração *in vitro*, via organogênese ou embriogênese somática, para originar as novas plantas (CARVALHO *et al.*, 2006). Porém, como método de propagação vegetativa e como sistema para estudos morfogenéticos, apresenta resultados relativamente escassos para o caso das Palmáceas (GUERRA *et al.*, 1999).

As características biológicas do dendezeiro não permitem sua propagação vegetativa por meio de métodos convencionais. Além disso, a excisão de ápices leva à morte da planta mãe. Portanto, o melhor caminho para a propagação clonal de dendezeiro é pelo método de embriogênese somática (DUVAL *et al.*, 1995). A cultura de tecidos em dendezeiro tem sido comprometida principalmente com o propósito de propagação clonal (TEIXEIRA *et al.*, 1993).

A xiloglucana (XG) é uma hemicelulose da parede celular primária das plantas, que também aparece em sementes de algumas dicotiledôneas como polissacarídeo de reserva (SALAMONI, 2004). As xiloglucanas são encontradas em grandes quantidades nas sementes de *Hymenaea courbaril*, popularmente conhecida como jatobá (SOUZA LIMA, 2005). A XG bruta já foi combinada com ágar, obtendo-se interação entre os dois polissacarídeos e formação de um gel verdadeiro (LIMA-NISHIMURA, 2002). A possibilidade de substituição de parte do agente geleificante ágar ou gelana pela xiloglucana nos meios de cultura, a partir da

formação de um gel verdadeiro, pode proporcionar uma redução de custos em micropropagação vegetal.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Contribuir para a otimização de um protocolo de embriogênese somática de dendezeiro (*Elaeis guineensis*).

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Testar diferentes concentrações das auxinas 2,4-D e Picloram que permitam a manutenção e multiplicação de massas embriogênicas e a consequente indução de embriões somáticos.
- Testar misturas de agentes geleificantes como Gelrite® e xiloglucana (XG) em um protocolo de embriogênese somática de dendezeiro.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 A ESPÉCIE *Elaeis guineensis*

O dendezeiro pertence a família Arecaceae. No estágio adulto, esta monocotiledônea arborescente apresenta características típicas de palmeiras, com uma copa consistindo de 40 a 50 folhas abertas e um cone com 40 a 50 folhas em vários estágios de desenvolvimento. Seu crescimento é representado por um único meristema terminal que produz uma média de duas folhas por mês (DUVAL *et al.*, 1995).

É uma espécie dióica que apresenta ciclos alternados de flores masculinas e femininas durante a vida de um indivíduo (CRUDEN, 1988). Os cachos de frutos podem ser colhidos de 5 a 6 meses após a floração. O fruto é caracterizado como drupa séssil, de coloração preta até a alaranjada, dependendo do estágio de maturação, com 2 a 5 cm de comprimento e peso de 10 a 30 gramas. O mesocarpo consiste de 30 a 60% do fruto e o endocarpo ao redor da semente é quem contém o óleo (DUVAL *et al.*, 1995).

O dendê é principalmente cultivado em plantações industriais localizadas entre 7° S e 7° N, em uma altitude abaixo de 400 metros, em áreas com chuvas abundantes e bem distribuídas durante todo o ano. A exploração industrial do dendezeiro teve seu início no século 20, inicialmente no sudeste da Ásia, depois na África e então no Brasil na década de 20. Desde a década de 60, sua área de cultivo se estendeu para a América Latina, principalmente na Região Amazônica e na costa do Pacífico (DUVAL *et al.*, 1995).

O dendezeiro é uma palmeira de origem africana, trazida para o Brasil no século XVII pelos escravos. É uma planta perene, com vida econômica de 25 anos, quando em exploração agroindustrial. As características de planta perene, com produção distribuída durante todos os meses do ano, sem entressafras e alta produtividade, conferem a esta palmeira atributos de grande importância econômica, ecológica e social. É uma cultura agroindustrial, devendo a plantação estar sempre próxima da indústria de extração de óleo (BARCELOS *et al.*, 1995).

Entre as oleaginosas, a cultura do dendê é a de maior produtividade, com um rendimento de 4 a 6 toneladas/ha. A produção de óleo de dendê exige longos tempos para colheita, mínimo de três anos, necessidade de extração do óleo dentro

de 24 horas após sua colheita e a mecanização da colheita é bastante difícil (SUFRAMA, 2003).

A reprodução de dendezeiro para aumento do rendimento é lento e difícil porque as plantas são naturalmente incompatíveis e porque o rendimento de frutos e conteúdo de óleo somente podem ser avaliados depois de 6 a 10 anos quando as mudas começam a florescer. A propagação vegetativa não é possível por meios tradicionais e as populações de mudas são variáveis. Dentro da família de árvores resultantes de um cruzamento, as melhores podem produzir até 60% mais do que a média. A micropropagação, portanto, parece fornecer meios ideais de clonar genótipos desejáveis e durante a década de 70 programas de pesquisa foram estabelecidos para explorar apropriadas técnicas comerciais (NOIRET, 1981).

Inúmeras justificativas tem sido reportadas ao uso de técnicas de cultura *in vitro* em palmeiras como uma prática auxiliar para estudos morfogênicos e para acelerar programas de melhoramento genético. No caso de palmeiras, os programas de melhoramento são demorados e complexos devido ao longo ciclo, hábito de crescimento e ausência de métodos convencionais de propagação vegetativa. Neste contexto, a cultura de tecidos, quando integrada a um programa de melhoramento, torna-se um instrumento valioso na obtenção de plantas livres de vírus, na propagação vegetativa *in vitro* para clonagem rápida de genótipos superiores, na preservação e intercâmbio de germoplasma e no melhoramento genético. Portanto, a clonagem de embriões zigóticos maduros, ou imaturos, com alto potencial de produção, é de grande importância. Com isso, é possível buscar um aumento da produtividade e da uniformidade fisiológica (FERREIRA *et al.*, 1998).

### 3.2 MICROPROPAGAÇÃO VEGETAL

A micropropagação é uma técnica pela qual se propaga plantas dentro de tubos de ensaio ou similares de vidro, sob condições adequadas de assepsia, nutrição e fatores ambientais, como luz, temperatura, oxigênio e gás carbônico. A cultura *in vitro* de plantas é umas das técnicas mais polivalentes no campo da biotecnologia (CID, 2001). Neste ambiente, é utilizado um meio nutritivo que tenha sido definido anteriormente (TORRES *et al.*, 2000).

Esta técnica foi possibilitada graças à totipotência característica das células vegetais. Em outras palavras, isso significa dizer que toda célula vegetal viva, que

possua um núcleo, possui a capacidade de fielmente reproduzir a morfologia da planta inteira da qual se origina (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

A micropropagação *in vitro* é a aplicação mais prática da cultura de tecidos e aquela de maior impacto, haja vista permitir condições para se obterem plantas de difícil propagação e de ciclos de vida longa, em menor espaço de tempo, comparativamente ao melhoramento convencional (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Os principais estágios da prática de micropropagação são: seleção e preparação da planta mãe, estabelecimento de uma cultura asséptica, produção de propágulos adequados, preparação para o crescimento em ambiente natural e transferência para o ambiente natural (GEORGE, 1993).

Trata-se de uma forma de propagação assexuada, em que se utilizam explantes do vegetal, os quais, por meio de divisões celulares induzidas pelos hormônios vegetais e pelos fitorreguladores, produzem grande quantidade de indivíduos, genética e fenotipicamente idênticos, podendo ser conduzida pela proliferação de gemas axilares, indução de gemas adventícias por organogênese direta ou indireta, e embriogênese somática, direta ou indireta (CARVALHO *et al.*, 2006).

### 3.3 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

A embriogênese somática *in vitro* foi observada, de início, em 1958, em cultivo de células isoladas em raiz de cenoura (STEWART, 1958). Consiste na formação de embriões somáticos a partir de tecidos somáticos; neste processo, as células ou tecidos somáticos se desenvolvem até a formação completa de uma planta, por meio de uma série de estádios, característicos do desenvolvimento de embriões zigóticos (CARVALHO *et al.*, 2006).

Do ponto de vista do potencial de multiplicação e custos envolvidos, a embriogênese somática apresenta uma enorme vantagem sobre os outros sistemas de micropropagação. Grandes quantidades de embriões podem se formar em suspensões de células embriogênicas com um mínimo de manipulação manual e espaço físico de laboratório, principais componentes do custo de uma planta micropropagada (STYER, 1985).

O embrião se forma a partir de células embriogênicas, as quais se distinguem das outras células do calo devido ao aspecto similar às células meristemáticas; sendo assim, pequenas, isodiamétricas, pouco vacuoladas, ricas em citoplasma, com núcleos evidentes e paredes delgadas (GUERRA *et al.*, 1999).

Durante seu desenvolvimento, o embrião somático apresenta muitas semelhanças morfológicas com o embrião zigótico, pois ambos apresentam uma diferenciação inicial em estrutura bipolar, constituída de ápice caulinar e radicular, e passam por estádios de desenvolvimento pró-embriônários e pelos embriônários propriamente ditos: globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar (GUERRA *et al.*, 1999).

No estágio globular, em monocotiledôneas, os embriões somáticos são facilmente confundidos com brotações meristemáticas esféricas, e isso pode dificultar a visualização real da embriogênese. Contudo, os embriões de monocotiledôneas originam-se como discretos corpos globulares, os quais, ao crescerem, desenvolvem estruturas que se assemelham a um escutelo e um coleóptilo (GEORGE, 1993).

Dois padrões básicos de expressão da embriogênese somática ocorrem *in vitro*. O primeiro corresponde ao modelo direto, no qual os embriões somáticos originam-se dos tecidos-matrizes sem a formação de estádios intermediários de calo. O segundo padrão corresponde ao modelo indireto no qual os embriões somáticos se formam a partir de um calo, que apresenta células em diferentes estádios de diferenciação e, conseqüentemente, com diferentes graus de determinação, as quais podem adquirir novas competências mediadas por mensageiros químicos específicos (GUERRA *et al.*, 1999).

A embriogênese somática indireta requer que as células diferenciadas do explante sejam induzidas a se dividir para formar calos indiferenciados para que, então, a partir daí, as células redeterminem seu padrão embriogênico novamente (GEORGE, 1993).

No processo de embriogênese somática, são utilizados hormônios sintéticos ou reguladores vegetais. Os reguladores vegetais são uma classe de compostos químicos endógenos facilmente transportados para células responsivas, onde estão diretamente envolvidos no controle da atividade gênica, na transcrição e na tradução, em um grande número de processos. Em geral, na maioria dos modelos de embriogênese somática induzidas *in vitro*, as auxinas e entre elas o 2,4-D (ácido

diclorofenoxiacético), adicionadas ao meio de cultura, são consideradas as substâncias responsáveis por desencadear os processos de desdiferenciação (modelos indiretos) e rediferenciação (modelos diretos), alterando a determinação e conferindo novas competências às células responsivas presentes (GUERRA *et al.*, 1999).

A indução de embriogênese normalmente inicia quando os explantes são colocados em um meio contendo auxina. Reguladores vegetais desta natureza estimulam a divisão celular e tornam as células comprometidas à formação de embriões. Em células de calos que cresceram por um certo tempo de forma desorganizada sem a indução de morfogênese, essas células desdiferenciadas necessitam ser completamente redeterminadas à uma condição embriogênica antes de poderem dar origem à embriões somáticos (GEORGE, 1993).

O primeiro passo em qualquer protocolo de embriogênese somática é tratar os explantes em direção a um caminho que expresse seu potencial para a formação de embriões. Na embriogênese somática indireta, a indução de calos é necessária para explantes que não contêm células predeterminadas para formar embriões somáticos diretamente. A indução é conquistada por meio da transferência das células para um meio de cultura com uma alta concentração de auxina (2,4-D) (HARTMANN *et al.*, 2002).

As auxinas estão envolvidas na indução e iniciação de embriões somáticos. A alta concentração de auxinas utilizadas para indução, contudo, usualmente é inibitória para o desenvolvimento dos embriões a partir dos estádios globulares até a condição de plantas (GAMBORG *et al.*, 1995).

Uma fase importante no desenvolvimento do embrião, tanto no zigótico quanto no somático, é o processo de maturação, fase em que ocorrem várias mudanças morfológicas e bioquímicas, evidente pela deposição de materiais armazenados, pela interrupção da germinação e pela tolerância à dessecação, principalmente em espécies com sementes ortodoxas (THOMAS *et al.*, 1993).

Há diversos casos em que os embriões somáticos cultivados não se desenvolvem normalmente, não germinam nem se convertem em plantas normais, enquanto em outros o desenvolvimento e a maturação do embrião são interrompidos pela germinação precoce, conduzindo à ocorrência de plântulas mal desenvolvidas. Grandes esforços tem sido contornados para evitar esses problemas, sobretudo pela suplementação dos meios de cultura com reguladores vegetais que favorecem as

últimas fases da embriogênese somática, para que progrida similarmente àquelas da embriogênese zigótica (CARVALHO *et al.*, 2006).

### 3.3.1 Fatores que influenciam a embriogênese somática *in vitro*

#### 3.3.1.1 Escolha do explante

Em geral, quase todas as partes da planta podem ser usadas na indução da embriogênese somática: ápices caulinares, hipocótilos, discos foliares, segmentos foliares, inflorescências e raízes, dentre outros (GUERRA *et al.*, 1999). Material juvenil, embriões, raízes e folhas de mudas assépticas são comumente utilizadas devido ao fato de que tecidos de origem juvenil são mais responsivos do que aqueles de material adulto (DUVAL *et al.*, 1995).

Para a indução e estudo da embriogênese somática, o explante mais comumente utilizado é o embrião zigótico imaturo. Esse tecido já é embriogenético por natureza e aparentemente requer menos suplementos no meio de cultura do que outros tecidos para a ocorrência de uma resposta de embriogênese somática (FINER, 1994).

#### 3.3.1.2 Composição do meio de cultura

Para a embriogênese somática normalmente são empregados pelo menos dois diferentes meios de cultura. O primeiro é otimizado visando à indução da embriogênese somática, enquanto que o segundo meio objetiva permitir o desenvolvimento dos embriões somáticos. As condições que favorecem a primeira fase geralmente inibem a segunda (GUERRA *et al.*, 1999).

Quanto à composição salina dos meios de cultura, formulações inadequadas do meio de cultura contribuem para o escurecimento do meio. Quando o balanço dos sais é apropriado, diminui-se o estresse do explante, diminuindo também a produção de compostos fenólicos. Em geral, menores concentrações de sais contribuem para a diminuição da oxidação e do escurecimento do meio (PREECE, 1995).

Outras substâncias que influenciam na embriogênese e que podem ser adicionadas ao meio de cultura para otimizar o processo são vitaminas e

aminoácidos, estes últimos, para suprir as necessidades de nitrogênio reduzido (GEORGE, 1993).

A sacarose tem sido a fonte de carboidrato mais usada para a embriogênese somática, embora outros mono e dissacarídeos possam ser utilizados. A concentração de sacarose influencia os processos de iniciação e diferenciação dos embriões somáticos, uma vez que o seu metabolismo em plantas é regulado por um grupo de genes cujas respostas são moduladas de acordo com a variação de sua concentração. Normalmente a concentração de 3% de sacarose é satisfatória para os processos de iniciação e diferenciação (GUERRA *et al.*, 1999).

As auxinas estão envolvidas na indução e iniciação de embriões somáticos. Tem sido sugerido que a auxina é necessária para a formação de agregados embriogênicos a partir de células individuais, expressando a totipotência das células competentes (GUERRA *et al.*, 1999).

O efeito das auxinas no desenvolvimento de embriões somáticos é primariamente inibitório e se manifesta nos estádios subseqüentes ao globular. Com isso, tem sido sugerido que culturas embriogênicas cuja manutenção é prolongada em meio com 2,4-D acabam por apresentar variações genéticas e epigenéticas que afetam o potencial embriogênico (GUERRA *et al.*, 1999)

As citocininas tem papel fundamental na embriogênese somática de várias espécies de plantas. A utilização das citocininas é indispensável à divisão celular, quebra da dominância apical, indução e proliferação de gemas axilares e diferenciação de gemas adventícias (PREECE, 1995).

Algumas espécies necessitam de meios suplementados com ácido giberélico ou ácido abscísico para o desenvolvimento de embriões somáticos, enquanto outras não precisam desta suplementação, uma vez que o processo de indução foi estabelecido (OBATÃ, 2003). No ciclo de maturação da embriogênese somática, após passar pelos estádios iniciais de desenvolvimento em meio contendo auxina, os pró-embriões são estimulados a seguir seu desenvolvimento pela retirada da auxina do meio de cultura, ou pela indução de ácido abscísico (ABA), citocininas e de agentes que promovam estresse osmótico (MORAES, 2006).

Diferentes agentes geleificantes, em diferentes concentrações, influenciam na difusão dos nutrientes do meio e dos exsudatos produzidos pelo explante. Também apresentam diferenças quanto à presença de impurezas orgânicas e inorgânicas que podem interferir no desenvolvimento do explante (GEORGE, 1993).

Os meios sólidos, ou semi-sólidos, tradicionalmente, são solidificados com ágar, um polissacarídeo extraído de algas marinhas. A consistência do meio depende da concentração de ágar utilizada, do pH, da concentração de sais e da presença de certas substâncias como carvão ativado, que interferem na geleificação (CALDAS *et al.*, 1998).

Além do ágar, a gelana PS-60 (conhecida comercialmente como Gelrite® ou Phytigel®) é um outro agente geleificante usado em cultura *in vitro*, obtido a partir da bactéria *Pseudomonas elodea*. Ela é um polissacarídeo linear, formado por unidades repetitivas de um tetrassacarídeo formado por  $\beta$ -D-glucose, ácido  $\beta$ -D-glucurônico e  $\alpha$ -L-ramnose, e um substituinte O-acetílico por monossacarídeo (CALDAS *et al.*, 1998).

Também solidificam-se ou geleificam-se na presença de cátions mono ou bivalentes, como o ágar, numa reação termorreversível. Os meios preparados com essas gomas utilizam, aproximadamente, um quarto da concentração do ágar para a mesma consistência, sendo que os meios são mais transparentes daqueles feitos com o ágar. As gomas não são tóxicas e resistem à degradação enzimática (CALDAS *et al.*, 1999).

### 3.4 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM DENDEZEIRO

A cultura de tecidos de dendezeiro tem sido empreendida principalmente com o propósito de propagação clonal. Estudos iniciais utilizaram embriões zigóticos maduros e mudas como explantes. O uso de embriões como explantes são convenientes porque frutos são prontamente disponíveis, tem um alto grau de uniformidade fisiológica e podem ser expedidos para longas distâncias (TEIXEIRA *et al.*, 1993).

A indução e multiplicação de células embriogênicas friáveis de dendezeiro são importantes para a produção massal de embriões somáticos e para o estabelecimento de suspensões de células embriogênicas. A possibilidade de se obter suspensões embriogênicas de alta qualidade derivadas de explantes de plantas elite de dendezeiro podem conduzir à utilização de um eficiente método de micropropagação por possibilitar desenvolvimento de embriões em grande quantidade de culturas (TEIXEIRA *et al.*, 1995).

A regeneração do dendê por meio da embriogênese somática compreende quatro passos (calogênese, embriogênese, desenvolvimento caulinar e enraizamento). A cultura *in vitro* desta planta é caracterizada por um extenso período de tempo (cerca de dois anos entre a inoculação dos primeiros explantes até a aclimatização das plantas regeneradas), a baixa eficiência de alguns passos do processo e a produção de polifenóis. A influência desses fatores para o sucesso da regeneração é pouco conhecida (DUVAL *et al.*, 1995).

### 3.5 XILOGLUCANAS

As xiloglucanas são polissacarídeos vegetais, com função estrutural e de reserva, encontradas na parede celular e no endosperma de sementes (REID, 1985). Na parede celular são responsáveis pela viscoelasticidade. Entre outras propriedades, possui a habilidade de modificar a viscosidade dos meios aquosos formando géis através de interações com outros polissacarídeos (FREITAS *et al.*, 2005).

As xiloglucanas são encontradas em grandes quantidades nas sementes de *Hymenaea courbaril*, popularmente conhecida como jatobá. A constituição das xiloglucanas é basicamente uma cadeia principal de unidades de glucose, parcialmente substituídas em O-4 por unidades de  $\beta$ -D-galactopiranosII e substituídas em O-6 por unidades de  $\alpha$ -D-XilopiranosII parcialmente substituídos em O-2 por unidades  $\beta$ -D-galactopiranosII (SOUZA LIMA, 2005).

No Brasil, o ágar é importado e seu alto custo constitui em uma restrição econômica para a pesquisa e para laboratórios comerciais (LIMA-NISHIMURA *et al.*, 2003). A perspectiva da aplicação de polissacarídeos na cultura *in vitro* de plantas, e a existência de oligossacarídeos de XG com atividade biológica impulsionaram a realização de trabalhos especificamente dentro da aplicação biotecnológica. Com isso, por meio da observação de um gel verdadeiro, foi possível observar a interação entre o ágar do meio de cultura e o polissacarídeo de sementes de *Hymenaea courbaril* (LIMA-NISHIMURA *et al.*, 2003).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 LOCAL DE TRABALHO

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Micropropagação Vegetal, no Departamento de Botânica, localizado no setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba-Paraná.

### 4.2 OBTENÇÃO DE XILOGLUCANA

A xiloglucana (Figura 1A) foi extraída de sementes de jatobá (*Hymenaea coubaril*) (Figura 1B) no Laboratório POLINATBIOTEC do Departamento de Química da UFPR.

### 4.3 MATERIAL VEGETAL

Foram utilizadas sementes maduras de dendezeiro fornecidas pela EMBRAPA Amazônia Ocidental (Manaus, Brasil). As sementes foram coletadas em julho e setembro de 2008, março e setembro de 2009 (Figura 1B). O tegumento das sementes foi quebrado e removido com o auxílio de uma morsa.

### 4.4 DESINFESTAÇÃO

As sementes foram desinfestadas com hipoclorito de sódio a 12% por 10 minutos e em seguida foram lavadas com água destilada estéril por três vezes, sendo todo o processo realizado em câmara de fluxo laminar (Figura 1C).

### 4.5 FONTES DE EXPLANTES

Embriões zigóticos maduros foram excisados das sementes de dendê e inoculados em placas de Petri de 10 cm de diâmetro e 2 cm de altura contendo aproximadamente 40 mL de meio de indução de embriogênese em cada (Figura 1D).

## 4.6 MEIOS DE CULTURA

A composição de compostos orgânicos e reguladores vegetais nos meios de cultura foi diferente para cada experimento, para os variados tratamentos e para as diferentes fases dos experimentos, de acordo com os sucessivos estádios de diferenciação apresentados pelos embriões. Todos os meios continham sais do meio Y3 (Eeuwens, 1976) (Anexo 2) e sacarose em diferentes concentrações. O pH dos meios de cultura foi ajustado em 5,5 ou 6,0 com NaOH 1N ou HCL 1N antes de serem autoclavados a 120°C por 20 minutos.

## 4.7 CONDIÇÕES DE CULTIVO

As culturas foram mantidas em sala de crescimento, com temperatura em torno de 25°C ± 2°C de dia e de 18± 1°C de noite, em condições de escuro para a indução e manutenção de calos e massas embriogênicas, e em fotoperíodo de 16 horas para a maturação dos embriões somáticos, sob luz fluorescente do tipo branca fria com fluxo de fótons de aproximadamente 40  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

## 4.8 INDUÇÃO E MANUTENÇÃO DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS

### 4.8.1 Experimento preliminar

As sementes de dendezeiro foram coletadas em julho de 2008 e armazenadas por três meses. Em seguida, cinquenta embriões foram retirados das sementes com o auxílio de pinças e bisturi e inoculados em placas de Petri contendo meio de cultura Y3-1 semi-sólido (Anexo 1), num total de 5 placas com 10 embriões em cada (Figura 1D).

Os embriões permaneceram no meio Y3-1 por 42 dias, até que se observasse o crescimento em volume e diâmetro dos mesmos (Figura 1E e 1F). Em seguida, os embriões foram cortados em fatias de aproximadamente 1 mm e inoculados em meio de cultura Y3-2 (Anexo 1), contendo 6  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e adicionado de 200 mg/L de inositol. Os embriões permaneceram nesse meio por 14 meses e após, foram transferidos para meio Y3-2, onde a concentração de 2,4-D foi aumentada para 10  $\mu\text{M}$ . Os embriões permaneceram neste meio por um mês, até que se observasse a

formação de massas embriogênicas e, então, foram transferidos para meio de regeneração RM (Teixeira *et al.*, 1995). Após 17 meses, embriões em estágio cotiledonar foram isolados em meio RM, sem reguladores vegetais e adicionado de carvão ativado.

#### 4.8.2 Efeito do 2,4-D na embriogênese somática

As sementes de dendezeiro foram coletadas em junho de 2009 e armazenadas por dois meses. Em seguida, 184 embriões foram inoculados em meio de cultura Y3-1 (Anexo 1) semi-sólido, num total de 23 placas com 8 embriões em cada. Os embriões permaneceram nesse meio por 24 dias. Em seguida, foram cortados em fatias de aproximadamente 1 mm e metade deles foram inoculados em meio de cultura Y3-2 em quatro tratamentos diferentes, consistindo de três concentrações da auxina 2,4-D (5, 10 e 20  $\mu\text{M}$ ) e um meio sem 2,4-D. Foram utilizadas 10 placas por tratamento com 6 explantes cada e as culturas foram mantidas no escuro. Os explantes encontram-se neste meio há 65 dias para indução de calos.

#### 4.8.3 Efeito do Picloram na embriogênese somática

A outra metade dos embriões do experimento anterior, cortados após crescerem por 24 dias em meio Y3-1 (Anexo 1), foram inoculados em meio de cultura Y3-2 em quatro tratamentos diferentes, consistindo de três concentrações da auxina Picloram (5, 10 e 20  $\mu\text{M}$ ) e um meio sem Picloram. Foram utilizadas 10 placas por tratamento com 6 explantes cada e as culturas foram mantidas no escuro. Os explantes encontram-se neste meio há 64 dias para indução de calos.

#### 4.8.4 Efeito dos agentes geleificantes

##### 4.8.4.1 Experimento 1

As sementes de dendezeiro foram coletadas em março de 2008 e armazenadas por quatro meses. Em seguida, cinquenta embriões foram inoculados

em placas de Petri contendo meio de cultura Y3-1 (Anexo 1) semi-sólido, num total de 5 placas com 10 embriões em cada (Figura 1D).

Os embriões permaneceram no meio Y3-1 por 27 dias, até que se observasse o intumescimento e o crescimento em comprimento e diâmetro dos mesmos (Figura 1E e 1F). Em seguida, foram cortados em fatias de aproximadamente 1 mm e inoculados em meio de cultura Y3-2 (Anexo 1). Neste meio, foram utilizadas quatro combinações de Gelrite® e xiloglucana como agentes geleificantes, correspondendo aos tratamentos Controle, 1, 2 e 3 (Tabela 1). Foram utilizadas 6 placas por tratamento com 5 explantes cada.

TABELA 1 PROPORÇÕES DE GELRITE® E XILOGLUCANA EM g.L<sup>-1</sup> UTILIZADAS NA SOLIDIFICAÇÃO DO MEIO DE CULTURA Y3-2\* PARA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE DENDÊ

	<b>Controle</b>	<b>Tratamento 1</b>	<b>Tratamento 2</b>	<b>Tratamento 3</b>
Gelrite	2	1,6	1,2	1
Xiloglucana	0	0,4	0,8	1

Após serem subcultivados por aproximadamente 120 dias em meio Y3-2, os explantes de 3 placas de cada tratamento foram transferidos para meio Y3-2 modificado com 5 µM de 2,4-D e os das 3 placas restantes para meio Y3-2 sem 2,4-D (Y3-3).

Os explantes que apresentaram formação de embriões somáticos em meio Y3-2 após 90 dias foram transferidos para meio de regeneração RM (Teixeira *et al.*, 1995) e mantidos em condição de luz, para que pudesse ocorrer o desenvolvimento dos embriões e a conversão em plantas.

#### 4.8.4.2 Experimento 2

Cinquenta embriões da coleta de setembro de 2008 foram inoculados em placas de Petri contendo meio de cultura Y3-1 (Anexo 1) semi-sólido, num total de 5 placas com 10 embriões em cada.

Os embriões permaneceram no meio Y3-1 por 68 dias, até que se observasse o intumescimento e o crescimento em comprimento e diâmetro dos mesmos. Em

seguida, foram cortados em fatias de aproximadamente 1 mm e inoculados em meio de cultura Y3-2 (Anexo 1). Neste meio, foram feitos quatro tratamentos diferentes, consistindo de variadas proporções de Gelrite® e xiloglucana como agentes geleificantes, correspondendo aos tratamentos Controle, 1, 2 e 3 (Tabela 1). Foram utilizadas 6 placas com 5 explantes cada em cada tratamento e as culturas foram mantidas no escuro.

Após serem subcultivados por aproximadamente 308 dias em meio Y3-2, os explantes de 3 placas de cada tratamento foram transferidos para meio Y3-2 modificado com 5  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, e os das 3 placas restantes para meio Y3-3.

#### 4.8.4.3 Experimento 3

132 embriões da coleta de março de 2009 foram inoculados em placas de Petri em meio de cultura Y3-1 (Anexo 1) semi-sólido, num total de 12 placas com 11 embriões em cada.

Os embriões permaneceram no meio Y3-1 por 28 dias. Em seguida, foram cortados em fatias de aproximadamente 1 mm e inoculados em meio de cultura Y3-2 (Anexo 1). Neste meio, foram feitos quatro tratamentos diferentes, consistindo de variadas proporções de Gelrite® e xiloglucana como agentes geleificantes, correspondendo aos tratamentos Controle, 1, 2 e 3 (Tabela 1). Foram utilizadas 6 placas por tratamento com 12 explantes cada e as culturas foram mantidas no escuro.

Após serem subcultivadas por aproximadamente 164 dias em meio Y3-2 com 10  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, os explantes foram transferidos para meio Y3-2 modificado com 5  $\mu\text{M}$  de 2,4-D.

### 4.9 AVALIAÇÃO

Os experimentos realizados com embriões maduros de *Elaeis guineensis* foram observados e avaliados seguindo critérios, tais como: porcentagem de calos, de massas embriogênicas, de oxidação dos explantes e presença de embriões somáticos em diferentes estádios de diferenciação (globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar)

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Experimento preliminar

Todos os explantes oriundos de embriões zigóticos maduros de dendezeiro apresentaram aumento em volume e comprimento nos primeiros 42 dias após a inoculação em meio Y3-1 (Anexo 1).

As respostas morfogênicas começaram a ser visualizadas após a transferência dos embriões intumescidos para meio Y3-2 (Anexo 1), com o início da formação de calos. As massas embriogênicas formadas apresentaram, na sua maioria, coloração branco-amarelada e textura friável após 104 dias. A formação de massas embriogênicas foi observada em todos os explantes, enquanto que 39% desses explantes apresentaram oxidação parcial. Embriões somáticos em estágio globular puderam ser observados em 17% dos explantes após 104 dias em meio Y3-2.

Após, as massas embriogênicas e embriões somáticos foram transferidos para meio RM, para desenvolvimento dos embriões somáticos em estádios avançados. Após 515 dias em meio RM (Figura 3E), 23 embriões somáticos em estágio cotiledonar foram transferidos para meio RM sem reguladores vegetais, adicionado de carvão ativado, para que ocorra a conversão dos embriões em plantas (Figura 3F).

### 5.2 Efeito do 2,4-D na embriogênese somática

Todos os explantes oriundos de embriões zigóticos maduros de dendezeiro apresentaram aumento em volume e comprimento nos primeiros 24 dias após a inoculação em meio Y3-1 (Anexo 1).

As respostas morfogênicas começaram a ser visualizadas após a transferência dos embriões para meio Y3-2 (Anexo 1) com diferentes concentrações de 2,4-D, com o início da formação de calos. Os calos formados apresentaram, na sua maioria, coloração branco-amarelada para todas as combinações de Gelrite®/XG após 30 e 60 dias (Tabela 2).

TABELA 2 FORMAÇÃO DE CALOS A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE *Elaeis guineensis* CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA Y3-2, CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE 2,4-D, APÓS 30 E 60 DIAS

2,4-D ( $\mu\text{M}$ )	Explantos parcialmente oxidados (%)		Formação de calos (%)	
	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias
<b>0</b>	66	81	32	35
<b>5</b>	55	66	50	78
<b>10</b>	61	63	38	40
<b>20</b>	85	85	15	23

Em 30 dias de cultivo em meio Y3-2, observou-se formação de calos em todos os tratamentos, sendo que a maior porcentagem de calos após 60 dias de subcultivo em meio Y3-2 pôde ser visualizada no meio adicionado de 5  $\mu\text{M}$  de 2,4-D.

As menores porcentagens de oxidação após 60 dias de subcultivo em meio Y3-2 foi observada nos explantes cultivados nos meios contendo 5 ou 10  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, como pode ser visto na tabela 2.

### 5.3 Efeito do Picloram na embriogênese somática

Todos os explantes oriundos de embriões zigóticos maduros de dendezeiro apresentaram aumento em volume e comprimento nos primeiros 24 dias após a inoculação em meio Y3-1 (Anexo 1).

As respostas morfogenéticas começaram a ser visualizadas após a transferência dos embriões intumescidos para meio Y3-2 (Anexo 1) com diferentes concentrações de Picloram, com o início da formação de calos. Os calos formados apresentaram, na sua maioria, coloração branco-amarelada em todas as combinações de Gelrite®/XG após 30 e 60 dias (Tabela 3).

TABELA 3 FORMAÇÃO DE CALOS A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE *Elaeis guineensis* CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA Y3-2, CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PICLORAM, APÓS 30 E 60 DIAS

Picloram ( $\mu\text{M}$ )	Explantos parcialmente oxidados (%)		Formação de calos (%)	
	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias
<b>0</b>	75	83	22	25
<b>5</b>	65	65	73	86
<b>10</b>	83	83	48	71
<b>20</b>	81	83	64	65

Em 30 dias de cultivo em meio Y3-2, observou-se formação de calos globulares em todos os tratamentos, sendo que a maior porcentagem de calos e menor porcentagem de oxidação após 60 dias de subcultivo em meio Y3-2 pôde ser visualizada no meio adicionado de 5  $\mu\text{M}$  de Picloram.

#### 5.4 Efeito dos agentes geleificantes

##### 5.4.1 Experimento 1

Todos os explantes oriundos de embriões zigóticos maduros de dendezeiro apresentaram aumento em volume e comprimento nos primeiros 27 dias após a inoculação em meio Y3-1.

As respostas morfogênicas começaram a ser visualizadas após a transferência dos embriões intumescidos para meio Y3-2, com o início da formação de calos. Os calos formados apresentaram, na sua maioria, coloração branco-amarelada para todas as combinações de Gelrite®/XG após 30, 60, 90 e 120 dias (Tabela 4).

TABELA 4 FORMAÇÃO DE CALOS A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE *Elaeis guineensis* CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA Y3-2\*, SOLIDIFICADO COM COMBINAÇÕES DE GELRITE®/XG APÓS 30, 60, 90 E 120 DIAS

Gelrite®/XG ( g.L <sup>-1</sup> )	Explantos parcialmente oxidados (%)				Formação de calos (%)			
	30 dias	60 dias	90 dia	120 dias	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias
<b>2/0</b>	27	57	60	60	97	97	97	97
<b>1,6/0,4</b>	40	50	55	66	68	70	70	76
<b>1,2/0,8</b>	23	47	50	53	63	63	66	66
<b>1/1</b>	50	47	53	56	53	60	66	76

\*percentagem do total sem os explantes contaminados

Todas as combinações de Gelrite®/XG foram eficientes para a formação de calos, que puderam ser observados já nos primeiros 30 dias de cultivo. A formação de calos aumentou de modo crescente nos subcultivos seguintes, sendo que o tratamento contendo apenas Gelrite® como agente geleificante apresentou a maior porcentagem de calos formados, como pode-se observar na tabela 4.

Em todos os subcultivos também pôde-se observar um escurecimento dos explantes devido à oxidação, sendo que a combinação de 1,6/0,4 de Gelrite®/XG foi a que apresentou a maior porcentagem.

Após permanecerem 120 dias em meio Y3-2 para indução e formação de calos, metade dos explantes de cada tratamento foram transferidos para meio Y3-2 com redução da concentração de 2,4-D pela metade, enquanto a outra metade dos explantes de cada tratamento foram transferidos para meio Y3-3.

Em 8 semanas de subcultivo em meio Y3-2, observou-se formação de massas embriogênicas em todas as combinações de Gelrite®/XG, tanto nos explantes em meios que tiveram a concentração de auxina reduzida quanto nos meios sem auxina (Tabela 5). As massas embriogênicas observadas após 60 e 90 dias em meio Y3-2 apresentaram morfologia friável e coloração branca-amarelada (Figura 2A).

TABELA 5 FORMAÇÃO DE MASSAS EMBRIOGÊNICAS A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE *Elaeis guineensis* APÓS CULTIVO POR 90 DIAS EM MEIO Y3-2\*, SUPLEMENTADO COM 5  $\mu\text{M}$  DE 2,4-D E NA AUSÊNCIA DE 2,4- D

2,4-D ( $\mu\text{M}$ )	Gelrite®/XG (g.L <sup>-1</sup> )			
	2 / 0	1,6 / 0,4	1,2 / 0,8	1 / 1
5	83	77	66	83
0	83	77	83	83

\* % de explantes formando massas embriogênicas

Houve formação de embriões somáticos no estágio globular em todas as combinações de Gelrite®/XG, bem como nos explantes que tiveram a concentração de auxina reduzida ou eliminada no meio (Tabela 6). Embriões nos estádios cordiforme e torpedo após 60 e 90 dias em meio Y3-2 foram observados no tratamento que continha apenas Gelrite® e no tratamento que possuía a combinação de 1,6 / 0,4 de Gelrite®/XG (Figuras 3B e 3C).

TABELA 6 FORMAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS GLOBULARES A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE *Elaeis guineensis* APÓS CULTIVO POR 90 DIAS EM MEIO Y3-2\*, SUPLEMENTADO COM 5  $\mu\text{M}$  DE 2,4-D E NA AUSÊNCIA DE 2,4- D

2,4-D ( $\mu\text{M}$ )	Gelrite®/XG (g.L <sup>-1</sup> )			
	2 / 0	1,6 / 0,4	1,2 / 0,8	1 / 1
5	12,0	3,3	0	11,0
0	20,0	13,0	12,0	0

\* % de explantes formando embriões somáticos

Para três tratamentos que continham as seguintes proporções de Gelrite®/XG, 2 / 0; 1,6 / 0,4 e 1,2 / 0,8, a eliminação de 2,4-D após subcultivo de 120 dias em meio com 10  $\mu\text{M}$  de 2,4-D apresentou melhores resultados, com formação de 20, 13 e 12% de embriões somáticos ao final de 90 dias de cultivo em meio Y3-2, respectivamente.

Os explantes que apresentaram formação de embriões somáticos em estágio globular e cordiforme foram transferidos para meio Y3-3, sem reguladores vegetais,

e os explantes que continham embriões em estádios torpedo e cotiledonar foram transferidos para meio de conversão RM, a fim de se obter a conversão em plantas.

#### 5.4.2 Experimento 2

Os explantes deste experimento apresentaram aumento em volume e comprimento nos primeiros 68 dias após a inoculação em meio Y3-1, tendo desenvolvimento mais lento se comparado ao experimento anterior.

As respostas morfogênicas começaram a ser visualizadas após a transferência dos embriões intumescidos para meio Y3-2, com o início da formação de calos. Os calos formados apresentaram, na sua maioria, coloração escura, devido à oxidação, para todas as combinações de Gelrite®/XG após 120 e 240 dias (Tabela 7).

TABELA 7 RESPOSTAS MORFOGENÉTICAS DE CALOS DE *Elaeis guineensis* CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA Y3-2\*, SOLIDIFICADO COM COMBINAÇÕES DE GELRITE®/XG APÓS 120 E 240 DIAS

<b>Gelrite®/XG (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Explantes parcialmente oxidados (%)</b>		<b>Formação de calos (%)</b>		<b>Massas embriogênicas (%)</b>	
	120 dias	240 dias	120 dias	240 dias	120 dias	240 dias
<b>2/0</b>	60	83	22	30	24	27
<b>1,6/0,4</b>	72	97	20	25	30	37
<b>1,2/0,8</b>	55	57	25	45	20	23
<b>1/1</b>	75	97	15	52	30	37

Em 240 dias de cultivo em meio Y3-2, houve baixa formação de massas embriogênicas para todas as combinações de Gelrite®/XG, sendo que os tratamentos que continham as proporções de 1,6/0,4 e 1/1, apresentaram melhores resultados. As massas embriogênicas apresentavam morfologia friável e coloração branca-amarelada. Não houve formação de embriões somáticos para nenhuma das combinações de Gelrite®/XG.

Na maioria dos explantes deste experimento, a taxa de oxidação foi alta, e maior nos explantes cultivados nos meios contendo combinação de 1,6/04 e 1/1 de

Gelrite®/XG. Grande parte dos explantes apresentaram necrose e foram descartados.

#### 5.4.3 Experimento 3

Todos os explantes apresentaram aumento em volume e comprimento nos primeiros 28 dias após a inoculação em meio Y3-1.

As respostas morfogênicas começaram a ser visualizadas após a transferência dos embriões intumescidos para meio Y3-2, com o início da formação de calos. Os calos formados apresentaram, na sua maioria, coloração branco-amarelada para todas as combinações de Gelrite®/XG após 60 e 90 dias (Tabela 8).

TABELA 8 RESPOSTAS MORFOGÊNICAS DE CALOS DE *Elaeis guineensis* OBTIDAS EM MEIO DE CULTURA Y3-2\*, SOLIDIFICADO COM COMBINAÇÕES DE GELRITE®/XG APÓS 60 E 90 DIAS

<b>Gelrite®/XG ( g.L<sup>-1</sup> )</b>	<b>Explantos parcialmente oxidados (%)</b>		<b>Formação de calos (%)</b>		<b>Massas embriogênicas (%)</b>	
	60 dias	90 dias	60 dias	90 dias	60 dias	90 dias
<b>2/0</b>	60	79	22	30	58	87
<b>1,6/0,4</b>	72	97	20	25	42	58
<b>1,2/0,8</b>	80	94	25	45	40	60
<b>1/1</b>	75	93	15	52	52	80

Em 8 semanas de subcultivo em meio Y3-2, observou-se formação de massas embriogênicas em todas as combinações de Gelrite®/XG, sendo que aos 90 dias de subcultivo, os melhores resultados na formação de massas embriogênicas foram observados no tratamento que contém apenas Gelrite® como agente geleificante, bem como no tratamento que apresenta combinação 1/1 de Gelrite®/XG. As massas embriogênicas apresentavam morfologia friável e coloração branca-amarelada.

Explantos parcialmente oxidados foram observados em todas as combinações de Gelrite®/XG, mas não aparentavam prejudicar a formação das massas embriogênicas e embriões somáticos.

## 6 DISCUSSÃO

Os resultados de todos os experimentos na obtenção de calos a partir de embriões zigóticos maduros de *Elaeis guineensis* foram semelhantes aos obtidos por Teixeira *et al.* (1995) utilizando meio de cultura Y3 (Eeuwens, 1976). Massas embriogênicas friáveis de coloração amarelada e apresentando pequenos agregados de células foram obtidas nos experimentos, resultados semelhantes aos obtidos por Teixeira *et al.* (1995) para indução de embriões somáticos a partir de embriões zigóticos maduros e imaturos de dendezeiro mantidos em meio de cultura acrescido das auxinas 2,4-D ou picloram.

No quarto experimento, a partir da instalação das culturas de embriões zigóticos de dendezeiro, houve a formação de calos, seguidos de massas embriogênicas friáveis e posterior formação de embriões somáticos. Este padrão de embriogênese somática é similar ao obtido por Teixeira *et al.* (1993) com embriões zigóticos de dendezeiro.

Teixeira *et al.* (1993) obtiveram uma porcentagem de 93% de explantes formando calos a partir de embriões zigóticos maduros de dendezeiro cultivados por três meses em meio Y3 adicionado de 500  $\mu$ M de 2,4-D e 0,3% de carvão ativado, enquanto a porcentagem de formação de calos a partir de embriões imaturos variou de 55% a 88%. Neste trabalho, após a manutenção das culturas em meio de indução de calos e a formação das massas embriogênicas friáveis, estas foram transferidas para meio de regeneração, onde houve a diferenciação e desenvolvimento normal de embriões somáticos, demonstrando um protocolo eficiente para embriogênese somática de dendezeiro a partir de embriões zigóticos.

Os resultados positivos para formação de embriões somáticos podem ser explicados pelo fato das auxinas estarem envolvidas na indução e iniciação de embriões somáticos. Em muitas espécies, o processo de iniciação se verifica ao se cultivar o explante em meio de cultura com concentração relativamente elevada de 2,4-D e as citocininas podem favorecer a formação de calo embriogênico. O desenvolvimento subsequente dos embriões somáticos ocorre após transferência do calo ou suspensão celular para meio com baixa concentração de auxina, ou desprovido desta substância (GUERRA *et al.*, 1999).

Scherwinski-Pereira *et al.* (2007) também verificaram que a influência de auxinas sobre os explantes mostrou ser fundamental para a indução e, conseqüentemente, a formação de embriões somáticos a partir de estruturas foliares e de discos apicais de plantas jovens de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq).

Apesar de todos os tratamentos terem induzido a formação de massas embriogênicas friáveis e iniciação de embriões somáticos no primeiro experimento, observou-se a paralisação da formação dos embriões somáticos em estágio globular em grande parte dos explantes, sem progressão para os estágios subsequentes. É provável que as altas concentrações de 2,4-D tenham inibido a progressão das culturas, sendo recomendável a redução do tempo de permanência dos explantes em culturas com as concentrações de 2,4-D indicadas.

Tem-se observado que, em alguns sistemas, os embriões somáticos tornam-se habituados durante períodos prolongados de subcultivos em 2,4-D, resultando na perda do potencial de maturação. Em *Ipomoea batatas*, os embriões somáticos perdem a capacidade de se converter em plantas quando as culturas são mantidas por longos períodos em meio com 2,4-D (TAUTORUS *et al.*, 1991).

Os explantes do quinto experimento não apresentaram um desenvolvimento satisfatório das etapas características da embriogênese somática descritas por Teixeira *et al.* (1993), apesar de tanto os procedimentos quanto a remessa de sementes serem as mesmas do experimento anterior. Pode-se intuir que diferenças na origem das sementes, na época do ano da maturação dos frutos e da inoculação dos embriões nos meios de cultura, além de outros fatores, podem ter provocado diferenças no desenvolvimento dos explantes.

A alta taxa de oxidação observada nos tratamentos também pode ser conferida ao tempo de permanência elevado dos explantes em meio contendo 2,4-D, sugerindo-se a diminuição deste tempo em culturas futuras. Segundo Wooi (1990), o escurecimento dos explantes não é um fator negativo em dendezeiro.

Guerra e Handro (1998) também alcançaram a expressão de um modelo de embriogênese somática, a partir de embriões zigóticos imaturos e maduros de *Euterpe edulis* Mart., com a transferência dos explantes de meio enriquecido com altas concentrações de 2,4-D (50-100 mg.L<sup>-1</sup>) para meio suplementado com ANA e 2-iP.

Comparando-se os resultados dos tratamentos com 2,4-D e Picloram, verificou-se que ambas as auxinas apresentaram eficiência praticamente similar

para a formação de calos globulares de *Elaeis guineensis* na concentração de 5  $\mu\text{M}$ . Posteriores subcultivos dessas culturas poderão evidenciar qual dessas auxinas possui maior eficiência para a formação de massas embriogênicas e embriões somáticos.

Para Scherwinski-Pereira *et al.* (2007), o Picloram proporcionou melhores resultados, quando se refere à formação de número de embriões somáticos por explante em *Elaeis guineensis*. Além disso, os explantes oriundos de meios contendo Picloram apresentaram melhores resultados de multiplicação dos calos, principalmente na formação de calos multi-granulares, formados em até 19% dos explantes, enquanto que, para aqueles cultivados em presença de 2,4-D registrou-se esse tipo de calos em apenas 11% dos explantes.

Picloram na concentração de 10  $\mu\text{M}$  também foi eficiente para indução de calos embriogênicos na embriogênese somática de pupunheira (*Bactris gasipaes*) a partir de embriões zigóticos (Steinmacher, 2007).

A possibilidade de substituição de parte do agente geleificante Gelrite® pelo polissacarídeo xiloglucana nos meios de cultura pode ser uma nova ferramenta para redução de custos, pois se apresenta como um método simples e natural para a aplicação em micropropagação.

Lima-Nishimura *et al.* (2003) verificaram um crescimento de caules maior e uma taxa de multiplicação elevada durante a micropropagação de macieiras Marubakaido (*Malus prunifolia* Borkh) e Jonagored (*Malus domestica*) quando cultivadas em meio de cultura composto pela mistura de 0,4% de ágar e 0,2% de xiloglucana extraída de sementes de jatobá (*Hymenaea courbaril*), em comparação com as cultivadas em meio de cultura composto somente por ágar.

Com relação à contribuição da xiloglucana para a formação e o desenvolvimento de massas embriogênicas e embriões somáticos, as maiores porcentagens dos mesmos neste trabalho foram obtidas no tratamento que não apresenta a combinação de xiloglucana e Gelrite no meio de cultura, o que não exclui a possibilidade de a xiloglucana contribuir para o processo de embriogênese somática, visto que nos tratamentos com a adição de xiloglucana também houve a formação de embriões somáticos, principalmente no meio que contém uma concentração de Gelrite®/Xiloglucana de 1,2/0,8  $\text{g.L}^{-1}$ , onde apareceram embriões somáticos em estádios mais avançados de diferenciação. Esse processo também foi descrito no trabalho de Lima-Nishimura (2002), onde a substituição de 33% de ágar

por xiloglucana proporcionou um aumento no número de embriões somáticos regenerados e uma diminuição no tempo de cultivo para embriogênese somática em cenoura (*Daucus carota*).

Lima-Nishimura (2002) ainda observou, em outros experimentos, realizados com café (*Coffea canephora* e *Coffea arabica*) que, em relação ao meio com Gelrite® (controle), o meio geleificado com Gelrite®/Xiloglucana promoveu um desenvolvimento mais rápido dos embriões somáticos para o estágio cotiledonar. Neste mesmo trabalho, numa análise da porcentagem de plantas regeneradas por embriões somáticos, o meio com Gelrite®/Xiloglucana se sobrepôs, novamente, ao meio controle, promovendo o dobro de regeneração deste.

Com relação à utilização da xiloglucana como um dos componentes geleificantes dos meios de cultura para embriogênese somática em dendezeiro no presente trabalho, não foi verificada uma correlação direta entre a presença da xiloglucana e a formação de massas embriogênicas e embriões somáticos. Diferenças genéticas e fisiológicas entre espécies podem influenciar a capacidade de formação de embriões somáticos em meios solidificados com misturas de agentes geleificantes como ágar e gelana com a xiloglucana.

## 7 CONCLUSÕES

O uso de 2,4-D ou Picloram foi eficiente na formação de calos e massas embriogênicas e, a partir dos resultados obtidos com meios de cultura adicionados destes reguladores vegetais, recomenda-se a concentração de 5  $\mu\text{M}$  para indução de calos em embriões zigóticos de dendezeiro.

A utilização da xiloglucana em diferentes combinações com o agente geleificante Gelrite® nos meios de cultura não afetou a formação de massas embriogênicas e embriões somáticos e pode proporcionar uma redução de custos dos meios de cultura utilizados em micropropagação.

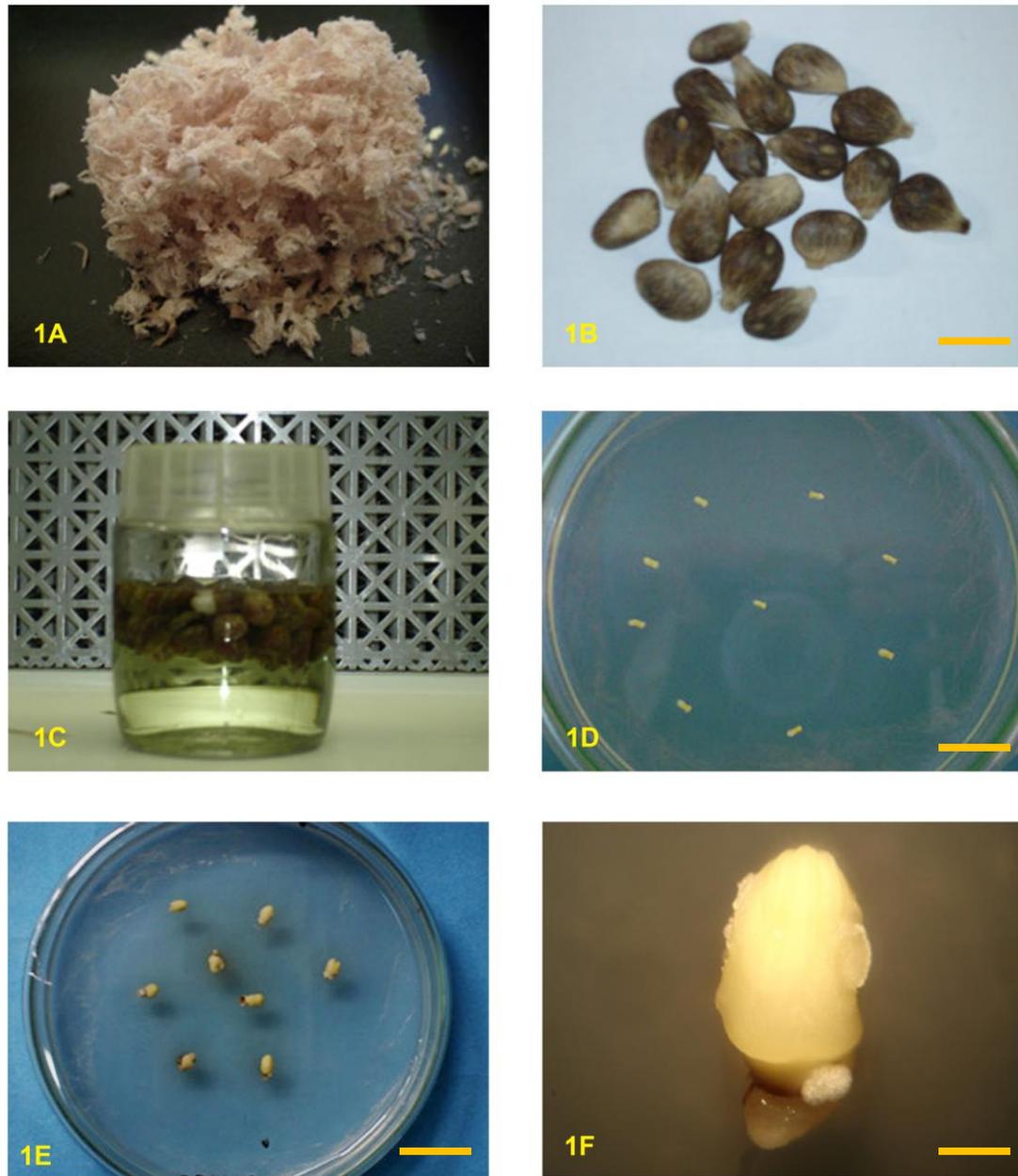
## **8 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O presente trabalho contribuiu para a otimização de algumas etapas da micropropagação via embriogênese somática, por meio da possibilidade de conquista da multiplicação clonal do dendezeiro em tempo reduzido, em comparação com os métodos convencionais de propagação desta espécie, além de proporcionar a possibilidade de um material de propagação livre de doenças e com características genéticas desejáveis.

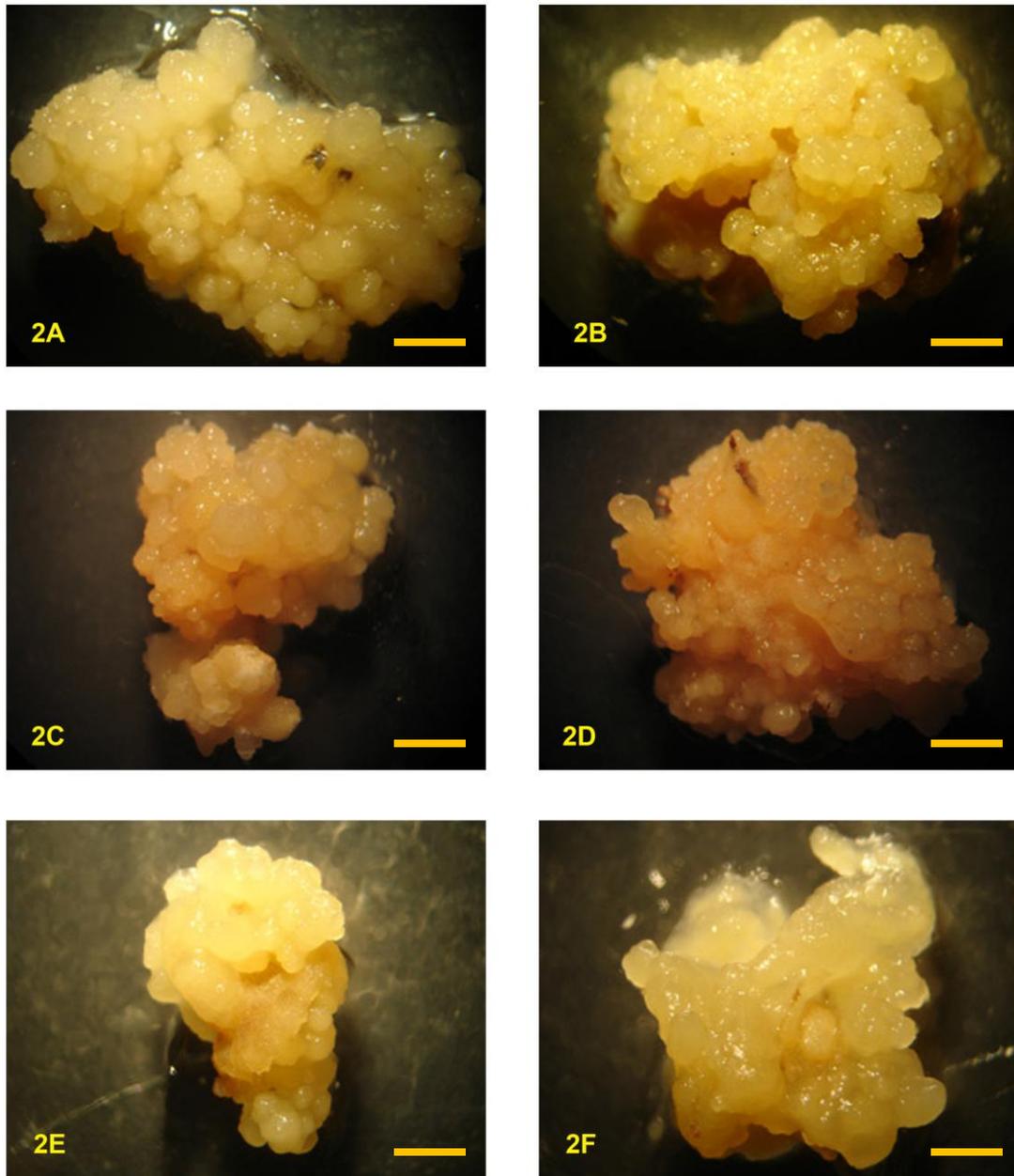
Para o estabelecimento de um protocolo eficiente de embriogênese somática utilizando-se a xiloglucana, são necessários mais estudos, tanto para o propósito de formação de embriões somáticos, quanto para as etapas de maturação e regeneração dos embriões somáticos em plantas.

Experimentos futuros permitirão determinar quais são os melhores meios de cultivo que incluem a xiloglucana em sua composição para os processos de micropropagação via embriogênese somática. Novas culturas com diferentes concentrações de reguladores vegetais em combinação com a xiloglucana também poderão ser testados para um protocolo de embriogênese somática eficiente.

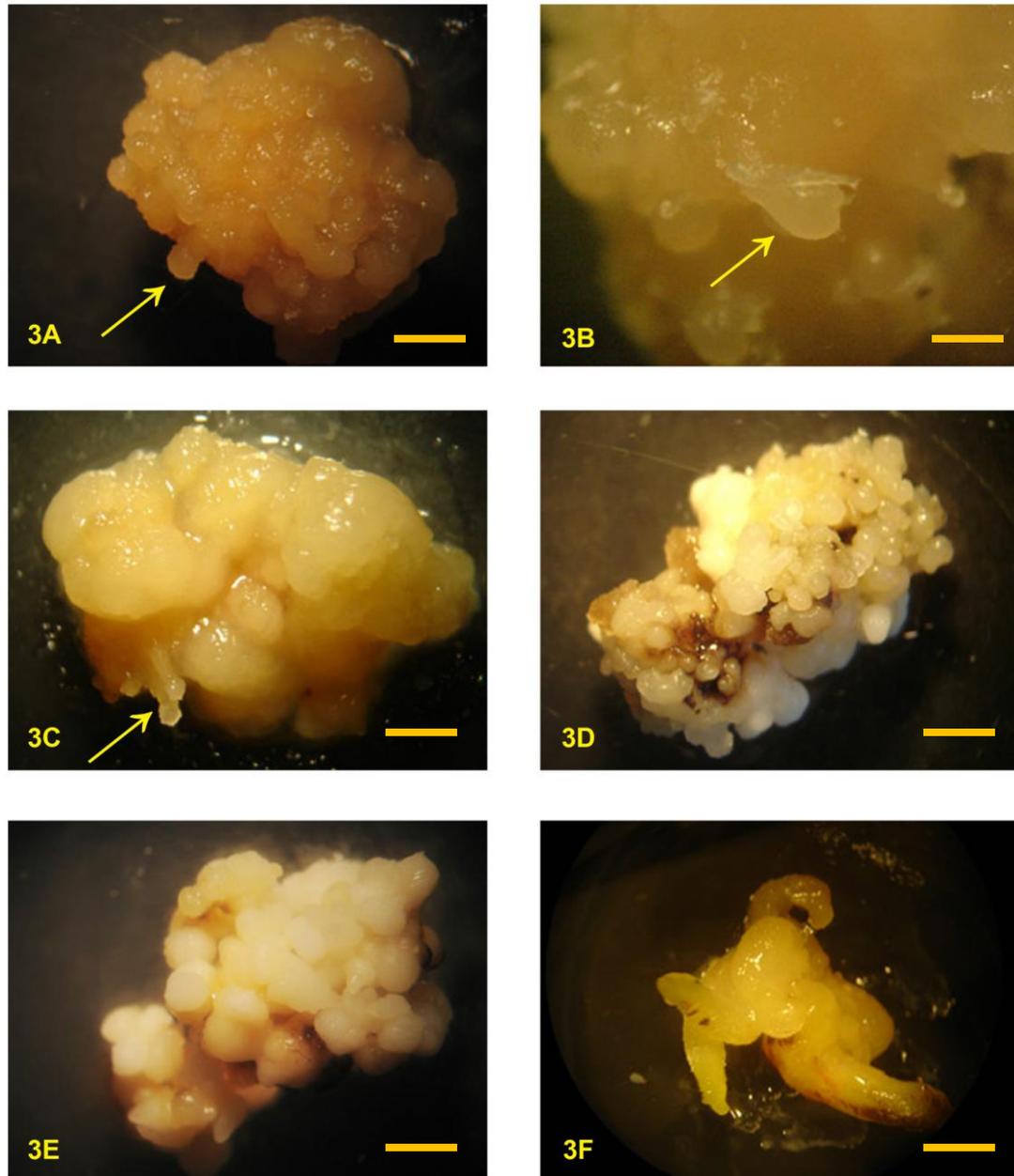
## FIGURAS



**FIGURA 1A** - XILOGLUCANA EXTRAÍDA DE SEMENTES DE JATOBÁ (*Hymenaea courbaril*). **1B** - SEMENTES DE *Elaeis guineensis* FORNECIDAS PELA EMBRAPA AMAZÔNIA OCIDENTAL EM 20/03/2009. Barra = 3 cm. **1C** - DESINFESTAÇÃO DE SEMENTES DE *Elaeis guineensis* COM HIPOCLORITO DE SÓDIO A 12% POR 10 MINUTOS, EM CÂMARA DE FLUXO LAMINAR. **1D** - EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE *Elaeis guineensis* INOCULADOS EM PLACA DE PETRI CONTENDO MEIO DE CULTURA Y3-1(Eeuwens, 1976) SEMI-SÓLIDO, ADICIONADO DE 0,1  $\mu\text{M}$  DE ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO (2,4-D), 0,1  $\mu\text{M}$  DE ÁCIDO GIBERÉLICO ( $\text{GA}_3$ ) e 0,1  $\mu\text{M}$  DE CINETINA (CIN). Barra = 1 mm. **1E** - EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE *Elaeis guineensis* EM MEIO DE CULTURA Y3-1(Eeuwens, 1976) SEMI-SÓLIDO, APÓS 27 DIAS. Barra = 1 mm. **1F** - EMBRIÃO ZIGÓTICO DE *Elaeis guineensis* EM MEIO DE CULTURA Y3-1(Eeuwens, 1976) SEMI-SÓLIDO, APÓS 27 DIAS, EM DETALHE. Barra = 1,2 mm.



**FIGURA 2A** - MASSA EMBRIOGÊNICA FRIÁVEL DE *Elaeis guineensis* APÓS 60 DIAS DE SUBCULTIVO EM MEIO Y3-2, ACRESCIDO DE 10  $\mu\text{M}$  DE 2,4-D, EM MEIO GELEIFICADO COM 2  $\text{g.L}^{-1}$  DE GELRITE® E SEM XILOGLUCANA. Barra = 1 mm. **2B, 2C E 2D** - MASSAS EMBRIOGÊNICAS FRIÁVEIS DE *Elaeis guineensis* APÓS 60 DIAS DE SUBCULTIVO EM MEIO Y3-2, ACRESCIDO DE 10  $\mu\text{M}$  DE 2,4-D, EM MEIO GELEIFICADO COM 1,6  $\text{g.L}^{-1}$  DE GELRITE® E 0,4  $\text{g.L}^{-1}$  DE XILOGLUCANA. Barra = 1 mm, 1 mm e 1,2 mm. **2E E 2F** - MASSAS EMBRIOGÊNICAS FRIÁVEIS DE *Elaeis guineensis* APÓS 60 DIAS DE SUBCULTIVO EM MEIO Y3-2, ACRESCIDO DE 10  $\mu\text{M}$  DE 2,4-D, EM MEIO GELEIFICADO COM 2  $\text{g.L}^{-1}$  DE GELRITE® E SEM XILOGLUCANA. Barra = 2,5 mm e 1 mm.



**FIGURA 3A, 3B E 3C** - EMBRIÕES SOMÁTICOS DE *Elaeis guineensis* APÓS SUCESSIVOS SUBCULTIVOS EM MEIO Y3-2 ACRESCIDO DE 10  $\mu\text{M}$  DE 2,4-D E SUBSEQUENTE SUBCULTIVO PARA MEIO SEM 2,4-D, GELEIFICADO COM 2 g.L<sup>-1</sup> DE GELRITE® E SEM XILOGLUCANA, EM ESTÁDIOS GLOBULAR, CORDIFORME E TORPEDO, RESPECTIVAMENTE. Barra = 1,2 mm, 1,6 mm e 1,2 mm. **3D E 3E** - EMBRIÕES SOMÁTICOS DE *Elaeis guineensis* FORMADOS SOBRE MASSA EMBRIOGÊNICA EM MEIO DE CULTURA RM NA AUSÊNCIA DE REGULADORES DE CRESCIMENTO VEGETAL. Barra = 1,2 mm. **3F** - EMBRIÃO SOMÁTICO DE *Elaeis guineensis* EM ESTÁDIO COTILEDONAR ISOLADO DE MASSA EMBRIOGÊNICA EM MEIO DE CULTURA RM ADICIONADO DE CARVÃO ATIVADO, EM DETALHE. Barra = 1,25 mm.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, S.R.M. **Princípios da Cultura de Tecidos Vegetais**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 16 p., 2002.

BARCELOS, E., CHAILLARD, H., NUNES, C., MACÊDO, J., RODRIGUES, M., CUNHA, R., TAVARES, A., DANTAS, J., BORGES, R., SANTOS, W. **A Cultura do Dendê**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental – Brasília: EMBRAPA-SPI, 1995. 68 p.; 16 cm. – (Coleção plantar, 32).

CALDAS, L.S., HARIDASAN, P., FERREIRA M.E. Meios Nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPq. v.1, p.87-116, 1998.

CARVALHO, A.R.V.; REIS, V.M.; BALDANI, V.L.D. **O dendê (*Elaeis guineensis* Jacq.)**. Rio de Janeiro: Embrapa Agrobiologia, p. 25, 2001.

CARVALHO, J.; LIMA, M.; AIRES, P.; VIDAL, M.; PIMENTEL, N. **Embriogênese Somática**. Campina Grande, 35 p. 2006. (Embrapa Algodão. Documentos, 152).

CID, L.P.B. **A propagação *in vitro* de plantas**. Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento, v.2, n.19, p.16-21, 2001.

CRUDEN, R.W. **Temporal dioecism: systematic breadth, associated traits, and temporal patterns**. Bot Gaz. 149:1-15, 1988.

DUVAL, Y., ENGELMANN, F., DURAND-GASSELIN, T. Somatic Embryogenesis in Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). In: **Biotechnology in Agriculture and Forestry. Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I**. Y.P.S Bajaj. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, v. 30, 1995.

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

EMBRAPA. **Dendê da Amazônia no Programa de Biodiesel**, 2005. Disponível em: <http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2005/dezembro/foldernoticia.2005-11-03.1633002266/noticia.2005-12-07.5725602765/?searchterm=dendezeiro>. Acesso em: 12/11/2009

FERREIRA, A.T.; CALDAS, L.S.; PEREIRA, E.A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de Tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPq, v.1, p.21-24, 1998.

FINER, J.J. Plant regeneration via embryogenic suspension cultures. In: DIXON, R. A.; GONZALES, R.A. **Plant cell culture: a practical approach**. Oxford University Press, New York, 2 ed., p. 99-125, 1994.

FREITAS, R.A. MARTIN, S., SANTOS, G.L., VALENGA, F., BUCKERIDGE, M.S., REICHER, F., SIERAKOWSKI, M.R. Physico-Chemical Properties of Seed Xyloglucans from Different Sources. **Carbohydrate Polymers**. 60, p. 507-514, 2005.

GAMBORG, O.L., PHILLIPS, G.C. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture: Fundamental Methods**. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. Nova York, 1995.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture: The technology**. Exegetics Limited, England, 1 ed., v. 1, p. 285-455, 1993.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture: In practice**. Exegetics Limited, England, 2 ed., v. 2, p. 619-631, 1996.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa- CNPq. v.1, p 183-242, 1998.

GUERRA, M.P., HANDRO, W. Somatic embryogenesis in tissue cultures. In: AHUJA, M.R. **Woody Plant Biotechnology**. New York: Plenum Press, 1991. p. 189-196.

GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A.C; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-CBAB, v.2, p.533-568, 1999.

HARTMANN, H.T., KESTER, D.E. DAVIES, F.T.Jr., GENEVE, R.L. **Plant propagation: Principles and Practices**. Prentice Hall, New Jersey, 7 ed., p. 639-643, 2002.

JUAN, A; RODRIGUES, A. Produção de embriões em dendê a partir de cultura de embriões imaturos. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 1, p. 119-120, 1989.

KAO, K.N & MICHAYLUK, M.R. Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts of very low population densities in liquid media. **Planta**, 126:105-110, 1975.

LIMA-NISHIMURA, N., QUOIRIN, M. NADDAF, Y.G., WILHELM, H.M., RIBAS, L.L.F. SIERAKOWSKI, M.-R. A Xiloglucan from seeds of the native Brazilian species *Hymenaea courbaril* for micropropagation of Marubakaido and Jonagored apples. **Plant Cell Report**, 21:402-407, 2003.

LIMA-NISHIMURA, N. **Utilização da xiloglucana extraída de sementes de *Hymenaea courbaril* L. em géis para a micropropagação de cenoura, café e macieira**. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Departamento de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2002.

MIRAGAYA, J.C.G. **Biodiesel: tendências no mundo e no Brasil**. Informe Agropecuário. Minas Gerais, v. 26, p. 229, 2005.

MORAES, F.M.S. **Análise proteômica da embriogênese somática e da aquisição de competência embriogênica de *Ocotea catharinensis* mez (Lauracea)**. Dissertação (Pós-Graduação em Biologia Molecular) – Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas, Universidade de Brasília. Brasília, 2006.

NOIRET, J.M. Application de la culture in vitro à l'amélioration et à la production de matériel clonal chez le palmier à huile. **Oléagineux**. 36:123-126, 1981.

OBATÃ, C.V. Embriogênese somática indireta em explantes foliares de *Coffea arabica* L. **Ciências Agrotécnicas**, Lavras. v. 27, n. 1, pg. 107-116, jan/fev., 2003.

PREECE, J.E. Can Nutrient Salts Partially Substitute for Plant Growth Regulators? **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, v. 1, p. 26-37, 1995.

QUOIRIN, M. **Micropropagação. In: Manual de Cultura de Tecidos Vegetais *in vitro*** (apostila). UFPR, Curitiba, 2003.

REID, J.S.G. Structure and function in legume seed polyssacharides. In: Brett, C.T.; Hillman, J.R. **Biochemistry of plant cell walls**. London. Ed. Cambridge University Press., p.259-268, 1985.

SALAMONI, A.T. **Obtenção, caracterização e efeitos de xiloglucanas e derivados de sementes de jatobá na cultura de tecidos vegetais**. Curitiba, 2004. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Departamento de Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E.; MACIEL, S.A; SILVA, T.L.; GUEDES, R.; FERMINO, J.R.; P.C.P. Indução da embriogênese somática em dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq) a partir de estruturas foliares e potencial de indução utilizando discos apicais de plantas jovens. **16º Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais/3º Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas/1º Simpósio de Plantas Ornamentais Nativas**. p. 837-840, 2007.

SILVA, J.C. **Macaúba: fonte de matéria-prima para os setores alimentício, energético e industrial**. Viçosa, Minas Gerais, 59 p., 2005.

SOUZA LIMA, M. M.; BORSALI, E.; ALMEIDA DE SOUZA, R. P.; FINGER, F. L.; SIERAKOWSKI, M. R.; CARDOSO, M. L. Estudo reológico da xiloglucana de *Hymenaea courbaril*. **Anais da 57ª Reunião Anual da SBPC** - Fortaleza, CE - Julho/2005.

STEINMACHER, D.A.; CANGAHUALA-INOCENTE, G.C.; CLEMENT, C.R.; GUERRA, M.P. **Somatic embryogenesis from peach palm zygotic embryos**. In *Vitro Cell.Dev.Biol.* – Plant (2007) 43:124-132.

STEWART, F.C., MAPES, M.O., MEARS, K. Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures from freely suspended cells. **American Journal of Botany**, v.45, p.705-708, 1958.

STYER, D.J. Bioreactor technology for plant propagation. **Basic Life Science**, v. 32, p. 117-130, 1985.

SUFRAMA. **Estudo de viabilidade econômica: dendê**. 2003. Disponível em: <[http://www.suframa.gov.br/suframa\\_publicacoes.cfm](http://www.suframa.gov.br/suframa_publicacoes.cfm)> Acesso em: 12/11/2009.

TAUTORUS, T.E., FOWKE, L.C., DUNSTAN, D.I. Somatic embryogenesis in conifers. **Can. J. Bot.**, 1873-1899, 1991.

TEIXEIRA, L.C. Potencialidades de oleaginosas para produção de biodiesel. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 229, p. 18-27, 2005.

TEIXEIRA, J. B., SÖNDAHL, M. R., NAKAMURA, T., KIRBY, E. G. Establishment of oil palm cell suspensions and plant regeneration. **Plant Cell Tissue, and Organ Culture**, v. 40, p.105 - 111, 1995.

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

THOMAS, T.L. Gene expression during plant embryogenesis and germination: an overview. **Plant Cell**, v.5, p.1401–1410, 1993.

TORRES, A. C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. v.1, p. 183-260. Brasília: Embrapa SPI/ Embrapa-CNPQ, 1998.

TORRES, A. C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. v.2, p. 533-558. Brasília: Embrapa SPI/ Embrapa-CNPQ, 1999.

TORRES, A.C.; FERREIRA, A.T.; SÁ, F.G.; BUSO, J.A.; CALDAS, L.S.; NASCIMENTO, A.S.; BRÍGIDO, M.M.; ROMANO, E. **Glossário de Biotecnologia Vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 128 p., 2000.

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

WOOI, K.C. Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.): tissue culture and micropropagation. **In: Biotechnology in Agriculture and Forestry**. Bajaj YPS, vol. 10. Legumes and oilseed crops I. Springer. Berlin Heidelberg New York, p. 569-592, 1990.

**ANEXOS**

### Anexo 1 – Composição dos meios utilizados na embriogênese somática de dendê

Componentes	Y3*-1	Y3-2	RM***
Sais	Y3	Y3	Y3
Vitaminas	Y3	KM**	Y3
CIN	1 $\mu$ M	-	-
GA <sub>3</sub>	0,1 $\mu$ M	-	-
2,4-D	0,1 $\mu$ M	10 $\mu$ M	-
ANA	-	-	15 $\mu$ M
ABA	-	-	2 $\mu$ M
Inositol	100 mg.L <sup>-1</sup>	200 mg.L <sup>-1</sup>	100 mg.L <sup>-1</sup>
Sacarose	45 g.L <sup>-1</sup>	30 g.L <sup>-1</sup>	20 g. L <sup>-1</sup>
pH	5,5	5,5	6,0

\* meio de Eeuwens (1976) \*\* Kao e Michayluk (1975) \*\*\* Teixeira et al., 1995. CIN =

Cinetina, GA<sub>3</sub> = Ácido giberélico nº3, ANA = Ácido naftalenoacético, ABA = Ácido Abscísico

**Anexo 2 - Concentração de sais do meio Y3 (Eeuwens, 1976)**

<b>Componentes</b>	<b>mg. L<sup>-1</sup></b>
KCl	1492
KNO <sub>3</sub>	2020
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	312
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3,1
KI	8,3
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,24
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,24
NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,024
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	294
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	247
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	11,2
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	7,2
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,16
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,80
Na <sub>2</sub> EDTA	37,30
NH <sub>4</sub> Cl	535

**Anexo 3 – Composição das Vitaminas KM (Kao & Michayluk, 1975)**

<b>Componentes</b>	<b>mg. L<sup>-1</sup></b>
Tiamina	1
Ácido pantotênico	1
Colina Cl	1
Ácido ascórbico	2
Ácido nicotínico	1
Piridoxina	1
Ácido fólico	0,4
Riboflavina	0,2
Ácido aminobenzóico	0,02
Vitamina B <sub>12</sub>	0,02
Biotina	0,01
Vitamina A - retinol	0,01
Vitamina D <sub>3</sub> - cholecalciferol	0,01
Inositol	100