



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**DIVERSIDADE GENÉTICA, CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE
GERMOPLASMA E ANÁLISE DO CONTEÚDO DE DNA
NUCLEAR EM PALMA DE ÓLEO {*Elaeis guineensis* Jacq. E *Elaeis
oleifera* (Kunth) Cortés}.**

JULCÉIA CAMILLO

TESE DE DOUTORADO EM AGRONOMIA

**BRASÍLIA/DF
OUTUBRO/2012**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**DIVERSIDADE GENÉTICA, CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE
GERMOPLASMA E ANÁLISE DO CONTEÚDO DE DNA
NUCLEAR EM PALMA DE ÓLEO {*Elaeis guineensis* Jacq. E *Elaeis
oleifera* (Kunth) Cortés}.**

JULCÉIA CAMILLO

**ORIENTADOR: JEAN KLEBER DE ABREU MATTOS
CO-ORIENTADOR: JONNY EVERSON SCHERWINSKI PEREIRA**

TESE DE DOUTORADO EM AGRONOMIA

PUBLICAÇÃO: 007D/2012

**BRASÍLIA/DF
OUTUBRO/2012**



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

DIVERSIDADE GENÉTICA, CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE
GERMOPLASMA E ANÁLISE DO CONTEÚDO DE DNA NUCLEAR EM
PALMA DE ÓLEO {*Elaeis guineensis* Jacq. E *Elaeis oleifera* (Kunth) Cortés}.

JULCÉIA CAMILLO

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGRONOMIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO
DO GRAU DE DOUTOR EM AGRONOMIA.

APROVADA POR:

Jean Kleber de Abreu Mattos, D.Sc., Universidade de Brasília (UnB), CPF: 022.288.181-68, e-mail: kleber@unb.br (Orientador)

José Ricardo Peixoto, D.Sc., Universidade de Brasília (UnB), CPF: 354.356.236-34, e-mail: peixoto@unb.br (Examinador interno)

Carlos Roberto Spehar, Ph.D., Universidade de Brasília (UnB), CPF: 122.262.116-94, e-mail: spehar@unb.br (Examinador interno)

Christopher William Fagg, Ph.D., Universidade de Brasília (UnB), CPF: 694.231.131-68, e-mail: fagg@unb.br (Examinador interno)

Manoel Teixeira Souza Junior, Ph.D., Embrapa Agroenergia (CNPAAE), CPF: 379.831.131-53, e-mail: manoel.souza@embrapa.br (Examinador externo)

BRASÍLIA/DF, 10 de outubro de 2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Camillo, Julcéia

Diversidade genética, conservação *in vitro* de germoplasma e análise do conteúdo de DNA nuclear em palma de óleo {*Elaeis guineensis* Jacq. e *Elaeis oleifera* (Kunth) Cortés}/Julcéia Camillo; orientação de Jean Kleber de Abreu Mattos – Brasília, 2012.

137 p.: il.

Tese de doutorado (D) – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2012.

1. Diversidade. 2. Sementes. 3. Recursos Genéticos. 4. Palma de óleo. I. Mattos, J.K.A. II. Título. D.Sc.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

CAMILLO, J. **Diversidade genética, conservação *in vitro* de germoplasma e análise do conteúdo de DNA nuclear em palma de óleo {*Elaeis guineensis* Jacq. e *Elaeis oleifera* (Kunth) Cortés}**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2012, 137 p. Tese de Doutorado.

CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Julcéia Camillo

TÍTULO DA TESE DE DOUTORADO: Diversidade genética, conservação *in vitro* de germoplasma e análise do conteúdo de DNA nuclear em palma de óleo {*Elaeis guineensis* Jacq. e *Elaeis oleifera* (Kunth) Cortés}.

GRAU: Doutor

ANO: 2012

É concedida à Universidade de Brasília a permissão para reproduzir cópias desta tese de doutorado para única e exclusivamente propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta tese de doutorado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada à fonte.

Nome: Julcéia Camillo
E-mail: julceia@gmail.com

“Abundam na terra brasílica, medra nas areias do litoral, crescem nas campinas
infindas, levantam-se destemidas e orgulhosas nos paués e brejos, expandem
sobranceiras suas lindas frondes por entre o verdume das florestas e vivem mesmo no
ressequido solo das caatingas, lugares em que apenas cardos e faveleiras logram manter
existência. Grandes ou pequenas surgem em toda parte, nas praias sobre os cômoros, na
escarpa das rochas, no solo fértil e no estéril.

Historia Naturalis Palmarum

K.F.P. Martius (1824)

Às pessoas mais importantes da minha vida,
D'vinci, João Ricardo e Pedro Arthur, que
sempre ao meu lado tornaram possível a
realização de mais este sonho, dedico com amor
e carinho.

Agradecimentos

Agradeço especialmente aos meus pais que incansáveis, trabalharam para dar aos filhos a melhor educação que puderam e nos ensinaram a nunca desistir, mesmo diante das maiores adversidades;

Ao professor orientador Dr. Jean Kleber de Abreu Mattos, pela amizade, companheirismo e auxílio durante estes anos de estudo e dedicação;

Ao co-orientador, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Dr. Jonny Everson Scherwinski-Pereira, pela orientação fundamental na execução e condução dos experimentos, correções e sugestões na elaboração dos capítulos e pela parceria de quase três anos de trabalho;

Ao também co-orientador e pesquisador chefe da Embrapa Agroenergia Dr. Manoel Teixeira Souza Junior, pela oportunidade de trabalhar com uma equipe multidisciplinar e inovadora e, em especial, pela grande ajuda em um dos momentos mais difíceis da minha jornada, tornando possível a finalização deste trabalho;

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pelo aporte físico e financeiro e também, à Embrapa Agroenergia pela concessão de bolsa de estudos;

Aos pesquisadores, Dr. Raimundo Nonato Vieira da Cunha, Dr. Ricardo Lopes e equipe da Embrapa Amazônia Ocidental pela gentileza na cessão dos materiais;

À pesquisadora Dra. Ana Luisa Sousa Azevedo e equipe, da Embrapa Gado de Leite pelo apoio na execução de parte dos experimentos;

À Engenheira Agrônoma Valentine Carpes Braga e à técnica de laboratório Luciene Dionísio Cardoso, pelo valioso auxílio na montagem e condução dos experimentos;

A todos os colegas da Universidade de Brasília, em especial a querida amiga Zanderluce Gomes Luis pela troca de idéias, ajuda e amizade;

Aos colegas da Embrapa Agroenergia André Pereira Leão, Marcelo Picanço de Farias e Luis Henrique Galli pelo incentivo e companheirismo e, aos pesquisadores Alexandre Alonso Alves e Eduardo Fernandes Formighieri pela colaboração e disponibilidade nos momentos de duvidas;

Aos amigos pesquisadores Roberto Fontes Vieira, Dijalma Barbosa da Silva e Rosa de Belém das Neves Alves, que acompanharam toda a minha história até aqui e mesmo de longe, estiveram sempre disponíveis para ouvir e aconselhar;

Ao pesquisador Dr. João Batista Teixeira, com o qual tive a honra de dar os primeiros passos na biotecnologia vegetal, pelos valiosos ensinamentos;

Aos professores do curso de pós-graduação em Agronomia da Universidade de Brasília, em especial ao seu coordenador Professor José Ricardo Peixoto, pelo seu empenho e auxílio aos alunos em todos os momentos;

A todos os colegas professores da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAV) da Universidade de Brasília, que atenciosamente me receberam como professora substituta do departamento;

A todos os amigos e familiares, que mesmo distantes, sempre se fizeram presentes em todos os momentos desta longa jornada;

Cada qual, à sua maneira, contribuiu para abrandar as dificuldades e tornar mais iluminado o caminho até aqui. A todos vocês, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1 O cultivo de palma de óleo e suas potencialidades	5
2.2 Aproveitamento de co-produtos.....	7
2.3 Caracterização botânica das principais espécies de palma de óleo.....	9
2.3.1 Descrição do gênero	9
2.3.2 Palma de óleo africana (<i>Elaeis guineensis</i> Jacq.)	10
2.3.2.1 Origem e distribuição geográfica	10
2.3.2.2 Aspectos morfológicos	11
2.3.3 Palma de óleo americana ou Caiaué { <i>Elaeis oleifera</i> (Kunth) Cortés}	13
2.3.3.1 Origem e distribuição geográfica	13
2.3.3.2 Aspectos morfológicos	14
2.4 Melhoramento genético e conservação de germoplasma	18
2.4.1 Genômica da palma de óleo: determinação do tamanho do genoma através da citometria de fluxo	20
3. REFERENCIAS	41
CAPITULO I	
Divergência genética e parâmetros biométricos de diásporos de palma de óleo {<i>Elaeis guineensis</i> Jacq e <i>E. oleifera</i> (Kunth) Cortés}.....	
	26
RESUMO	27
ABSTRACT	28
1. INTRODUÇÃO	29
2. MATERIAL E MÉTODOS	32
2.1 Material biológico	32

2.2 Avaliação e análise dos dados	32
2.3 Análises multivariadas	33
3. RESULTADOS	35
3.1 <i>Elaeis oleifera</i>	35
3.2 <i>E. guineensis</i> tipo <i>tenera</i>	37
3.3 <i>E. guineensis</i> tipo <i>dura</i>	39
4. DISCUSSÃO	54
4.1 <i>Elaeis oleifera</i>	54
4.2 <i>E. guineensis</i> tipo <i>tenera</i>	56
4.3 <i>E. guineensis</i> tipo <i>dura</i>	57
5. CONCLUSÕES	61
6. REFERENCIAS	62
CAPITULO II	
Tolerância de diásporos de palma de óleo (<i>Elaeis guineensis</i> Jacq.) à criopreservação	65
RESUMO	66
ABSTRACT	67
1.INTRODUÇÃO	68
2. MATERIAL E MÉTODOS	70
2.1 Material biológico	70
2.2 Tolerância a criopreservação e germinação <i>in vitro</i>	70
2.3 Anatomia comparativa	71
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
3.1 Germinação <i>in vitro</i> de embriões zigóticos de palma de óleo	72
3.2 Anatomia comparativa	73

4. CONCLUSÕES	78
5. REFERENCIAS	79
CAPITULO III	
Influencia da temperatura e de carboidratos na manutenção <i>in vitro</i> de germoplasma de palma de óleo {<i>Elaeis guineensis</i> Jacq. e <i>E. oleifera</i> (Kunth) Cortés} sob regime de crescimento mínimo	
	80
RESUMO	81
ABSTRACT	82
1. INTRODUÇÃO	83
2. MATERIAL E MÉTODOS	85
2.1 Material vegetal	85
2.2 Germinação <i>in vitro</i> dos embriões zigóticos	85
2.3 Efeito da temperatura na conservação <i>in vitro</i> de germoplasma de palma de óleo	86
2.4 Efeito de diferentes carboidratos e concentrações na conservação <i>in vitro</i> de germoplasma de palma de óleo	87
3. RESULTADOS	90
3.1 Efeito da temperatura na conservação <i>in vitro</i> de germoplasma de palma de óleo	90
3.2 Efeito de diferentes carboidratos e concentrações na conservação <i>in vitro</i> de germoplasma de palma de óleo	91
4. DISCUSSÃO	97
4.1 Efeito da temperatura na conservação <i>in vitro</i> de germoplasma de palma de óleo	97
4.2 Efeito de diferentes carboidratos e concentrações na conservação <i>in vitro</i> de germoplasma de palma de óleo	99
5. CONCLUSÕES	103
6. REFERENCIAS	104

CAPÍTULO IV

Reavaliação do tamanho do genoma de <i>Elaeis guineensis</i>, <i>E. oleifera</i> e seus híbridos interespecíficos	107
RESUMO	108
ABSTRACT	109
1. INTRODUÇÃO	110
2. MATERIAL E MÉTODOS	114
2.1 Material biológico	114
2.2 Estimativa do tamanho do genoma de <i>E. guineensis</i> , <i>E. oleifera</i> e do híbrido interespecífico através de citometria de fluxo	114
2.3 Delineamento experimental e análise dos dados	115
3. RESULTADOS	117
3.1 Escolha do padrão	117
3.2 Tamanho do genoma das espécies de <i>Elaeis</i> e do híbrido interespecífico	119
4. DISCUSSÃO	125
4.1 A escolha do padrão de referência influencia as estimativas do tamanho do genoma de <i>Elaeis spp.</i> realizadas por citometria de fluxo..	125
4.2 As novas estimativas do tamanho do genoma contradizem dados atualmente publicado	129
5. CONCLUSÕES	134
6. REFERENCIAS	135

INDICE DE TABELAS

CAPITULO I

Tabela 1. Acessos de palma de óleo (<i>Elaeis guineensis</i> e <i>E. oleifera</i>) analisados no experimento.	34
Tabela 2. Coeficientes de ponderação das variáveis de diásporos de <i>E. oleifera</i> nas duas primeiras componentes principais (CP1 e CP2).	41
Tabela 3. Estatística descritiva para morfologia externa dos diásporos de acessos de <i>E. oleifera</i>	41
Tabela 4. Estatística descritiva para morfologia interna de endocarpos e amêndoas de <i>E. oleifera</i>	42
Tabela 5. Coeficientes de ponderação das variáveis de diásporos de <i>E. guineensis</i> tipo <i>tenera</i> nas duas primeiras componentes principais (CP1 e CP2)	43
Tabela 6. Estatística descritiva para morfologia externa dos diásporos de <i>E. guineensis</i> tipo <i>tenera</i>	43
Tabela 7. Estatística descritiva para morfologia interna de endocarpos e amêndoas de acessos de <i>E. guineensis</i> tipo <i>tenera</i>	44
Tabela 8. Coeficientes de ponderação das variáveis de diásporos de <i>E. guineensis</i> tipo <i>dura</i> nas duas primeiras componentes principais (CP1 e CP2).....	45
Tabela 9. Estatística descritiva para morfologia externa dos diásporos de <i>E. guineensis</i> tipo <i>dura</i>	45
Tabela 10. Estatística descritiva para morfologia interna de endocarpos e amêndoas de acessos de <i>E. guineensis</i> tipo <i>dura</i>	46

CAPITULO II

Tabela 1. Germinação <i>in vitro</i> de embriões zigóticos excisados de amêndoas de cinco genótipos de palma de óleo (Fator A), submetidos (+NL) ou não (TEST) ao tratamento de criopreservação em nitrogênio líquido (Fator B) aos 14, 21 e 28 dias de cultivo	75
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

CAPITULO III

Tabela 1. Subamostras de palma de óleo (*E. guineensis* e *E. oleifera*) utilizadas nos diferentes experimentos 106

Tabela 2. Valores para a sobrevivência, altura, percentual de crescimento e aspecto das plantas de palma de óleo mantidas *in vitro* em razão de diferentes temperaturas, após 12 meses 114

Tabela 3. Valores para a sobrevivência, altura, percentual de crescimento e aspecto das plantas de palma de óleo mantidas *in vitro* sob temperatura de 25°C em função das diferentes concentrações de carboidratos, após 12 meses 115

CAPITULO IV

Tabela 1. Resultados do teste de Tukey para a quantificação de DNA nuclear (pg) para as espécies *E. guineensis* (Eg), *E. oleifera* (Eo) e seu híbrido interespecífico (H) demonstrando a inexistência de padrões específicos de agrupamento 121

Tabela 2. Resultado do teste t demonstrando que as estimativas para o tamanho do genoma de *Elaeis spp.* obtidas através de ctoimetria de fluxo, são dependentes do tipo de padrão de referencia a seu utilizado (por exemplo: tomate vs soja; padrão interno vs externo; escala logarítmica vs linear)..... 122

INDICE DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. Plantas adultas de palma de óleo mantidas no banco de germoplasma da Embrapa Amazônia Ocidental..... 16

Figura 2. Produção de cachos e frutos em palma de óleo 17

CAPITULO I

Figura 1. Agrupamento dos acessos de *E. oleifera* usando a distância euclidiana média, calculada a partir das variáveis peso e diâmetro longitudinal e transversal dos diásporos. 47

Figura 2. Componentes principais para *E. oleifera*, mostrando a separação entre os grupos com ênfase na discriminação entre B e D..... 48

Figura 3. Agrupamento de acessos de *E. guineensis* tipo *tenera* usando a distância euclidiana média, calculada a partir das variáveis peso e diâmetro longitudinal e transversal dos diásporos..... 49

Figura 4. Componentes principais para *E. guineensis* tipo *tenera* mostrando a separação entre os grupos A e B..... 50

Figura 5. Agrupamento de acessos de *E. guineensis* tipo *dura* usando a distância euclidiana média, calculada a partir das variáveis peso e diâmetro longitudinal e transversal dos diásporos..... 51

Figura 6. Componentes principais para *E. guineensis* tipo *dura* mostrando a separação dos grupos A e B 52

Figura 7. Diversidade morfológica entre diásporos de diferentes espécies de palma de óleo..... 53

CAPITULO II

Figura 1. Seqüência do desenvolvimento *in vitro* do embrião zigótico de palma de óleo até a formação da planta completa..... 76

Figura 2. Secção longitudinal (A e B) e do sistema radicular (C e D) de embriões zigóticos de <i>Elaeis</i> sp. excisados de sementes criopreservadas, aos oito dias após a inoculação <i>in vitro</i>	77
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

CAPITULO III

Figura 1. Aspectos considerados para a uniformização dos explantes e parâmetros para a determinação do aspecto das plantas de palma de óleo mantidas <i>in vitro</i>	110
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Figura 2. Aspecto das plantas de palma de óleo após 12 meses de manutenção <i>in vitro</i> sob diferentes temperaturas	116
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Figura 3. Aspecto das plantas de palma de óleo após 12 meses de manutenção <i>in vitro</i> sob diferentes concentrações de carboidratos.....	117
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

CAPITULO IV

Figura 1. Representação esquemática da quantificação de DNA nuclear em <i>Elaeis</i> sp. através da citometria de fluxo.....	123
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Figura 2. Exemplos de histogramas de intensidade de fluorescência utilizados atualmente para avaliação do tamanho do genoma da amostra.....	124
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

RESUMO

A palma de óleo responde pela maior parte de todo óleo vegetal comercializado mundialmente. No Brasil, seu cultivo teve início na década de setenta, mas nos últimos anos tem ganhado especial atenção do governo federal e das instituições de pesquisa, devido ao seu grande potencial como fonte de matéria-prima para a produção de biodiesel. No entanto, o conhecimento limitado sobre aspectos importantes como reação a doenças, diversidade genética e conservação de germoplasma dificultam o melhoramento genético da cultura e limitam a expansão dos cultivos no país. O objetivo deste trabalho foi estudar a variabilidade genética através de caracteres morfológicos em diásporos e amêndoas, desenvolver estratégias para a conservação e regeneração *ex situ* de germoplasma a curto e médio prazo e reestimar o tamanho do genoma de palma de óleo, mediante emprego de citometria de fluxo. Para o estudo de diversidade genética, foram considerados parâmetros morfológicos de diásporos e amêndoas de 18 acessos de *E. oleifera*, 11 de *E. guineensis* tipo *tenera* e 12 de *E. guineensis* tipo *dura*, mantidos no banco de germoplasma de palma de óleo da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus – AM. Destes, nove foram selecionados para testes de germinação e conservação de germoplasma *in vitro* sob regime de crescimento mínimo, em condições de baixa temperatura e presença de reguladores osmóticos. Para os estudos de determinação da quantidade de DNA nuclear foram selecionados outros 10 acessos do mesmo banco de germoplasma, sendo: três de *Elaeis guineensis*, cinco de *E. oleifera* e dois híbridos inter-específicos (OxG). Os resultados evidenciaram que existe variabilidade entre acessos da mesma origem e entre acesso de diferentes populações, mantidos no banco de germoplasma. A manutenção *in vitro* de plantas de palma de óleo, sob crescimento mínimo, pode ser realizada com sucesso sob temperatura de 20°C e, a sacarose foi o carboidrato mais eficiente para a manutenção da qualidade das plantas conservadas. Na

quantificação do conteúdo de DNA em *Elaeis*, as estimativas indicam que, em média, o tamanho do genoma de *E. guineensis* é de $4,32 \pm 0,173$ pg, enquanto que em *E. oleifera* é de $4,43 \pm 0,180$ pg. Isso indica que ambos os genomas são semelhantes em tamanho e como esperado, o tamanho do genoma do híbrido é próximo da média dos genomas parentais, $4,40 \pm 0,016$ pg.

Palavras-chave: dendezeiro, caiaué, variabilidade genética, biometria de sementes, tamanho do genoma

ABSTRACT

The oil palm is crop that currently accounts for the greatest part of all vegetable oil marketed worldwide. In Brazil, it's cultivation began in the seventies and in recent years has gained special attention from the federal government and research institutions for its great potential in biodiesel production. However, the limited knowledge about important aspects such as disease resistance, genetic diversity and conservation of germplasm, limit the expansion of cultivation in the country. The objective of this work was to study the genetic variability using morphological characters in diaspores and kernels, develop strategies for *ex situ* conservation and regeneration of germplasm in the short and medium term and estimate the size of the genome of oil palm using cytometry flow. For the study of genetic diversity were considered morphological parameters of diaspores and kernels of eighteen accessions of the *E. oleifera*, eleven *E. guineensis* var. *tenera* and twelve *E. guineensis* var. *dura*, maintained in the oil palm germplasm bank of Embrapa Western Amazon, Manaus – AM – Brazil. Of these accessions, nine were selected for germination tests and *in vitro* germplasm conservation under minimal growth regime, at low temperature and in the presence of osmotic regulators. For determination of nuclear DNA content, other ten samples were selected from the materials in the germplasm bank: three of *Elaeis guineensis*, five *E. oleifera* and two interspecific hybrids (OXG). The results obtained after analysis of the biometric parameters of the diaspores and kernels, showed differences between accessions of the same origin and differences between accessions from diverse populations maintained in the germplasm bank. The *in vitro* maintenance of oil palm plants on minimum growth, can be successfully accomplished at a temperature of 20°C, and the sucrose is the most effective carbohydrate source for maintaining the quality of preserved plants. In the measurement of DNA content in *Elaeis*, estimates indicate that, on average, the size of

the genome of *E. guineensis* is $4,32 \pm 0,173$ pg, where as in *E. oleifera* is $4,43 \pm 0,180$ pg. This indicates that both genomes are similar in size and as expected, the size of the hybrid genome is approximately the average of the parental genomes, $4,40 \pm 0,016$ pg.

Key Word: oil palm, caiaué, genetic variability, seed biometrics, genome size.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Devido à crescente preocupação com o esgotamento dos recursos naturais, o conceito de biodiesel produzido a partir de fontes renováveis tem ganhado especial atenção internacional. Energia é um dos recursos mais importantes para o desenvolvimento humano sustentável. Frente às atuais crises mundiais, esta é uma questão que nos confronta diariamente, uma vez que os combustíveis são a fonte de energia que transportam pessoas e mercadorias.

Os principais recursos energéticos são oriundos dos combustíveis fósseis, como o óleo diesel, carvão e gás natural e correspondem a aproximadamente 80% das necessidades energéticas do mundo, levando a vida cotidiana a uma forte dependência destes combustíveis (Huang et al., 2012). Diante disso, a busca por fontes alternativas e renováveis de energia, como o biodiesel de óleos vegetais, tornou-se uma das alternativas mais promissoras para diminuir a dependência por combustíveis fósseis.

No Brasil, a situação não é diferente, mas o país deu um passo à frente com o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB), criado pelo Decreto de 23/12/2003. Desde então, vários projetos foram implantados com o objetivo de viabilizar a produção de bicomcombustível a partir de fontes renováveis. Além disso, o programa também visa aumentar as oportunidades do agronegócio, abrir mais postos de trabalho na zona rural e contribuir para o fortalecimento da matriz energética brasileira (Ramos & Wilhelm, 2005, Ferreira et al., 2012). Embora no Brasil as pesquisas com biodiesel tenham sido iniciadas em 1980, apenas em 2005 com a Lei 11.097/2005 ocorreu de fato, a regulamentação para a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira (Goes & Marra, 2008), que atualmente conta com a participação de 44,7% de recursos renováveis (Marinho & Silva, 2012).

Gradativamente, o biodiesel e o etanol vêm tomando o lugar dos combustíveis líquidos derivados do petróleo como o diesel e da gasolina (Brasil, 2007), porém, a escolha da matéria-prima ainda é um problema a ser resolvido. No Brasil, cerca de 90% do biodiesel produzido utiliza a soja, uma cultura de baixo rendimento quando comparada a outras oleaginosas. Contudo, pela importância que exerce na alimentação humana e animal, seu emprego para fabricação de biodiesel tem sido combatido. Portanto, torna-se imprescindível ao Brasil, o desenvolvimento e o domínio tecnológico na produção de matérias primas que permitam a obtenção de elevada produtividade e que, possibilitem a sustentabilidade do programa em todas as suas dimensões (Goes & Marra, 2008).

Com objetivo de atender a demanda, no Brasil existem seis culturas oleaginosas com potencial para a produção de biodiesel, que são: soja, girassol, mamona, palma de óleo, amendoim e algodão (Barros et al., 2006, Marinho & Silva, 2012). Dentre estas espécies, a palma de óleo se destaca pela maior produtividade, podendo alcançar de 4 a 6 ton/ha/ano de óleo (Chia et al., 2009). O biodiesel produzido a partir da polpa dos frutos da palma de óleo pode funcionar como alternativa aos combustíveis oriundos do petróleo. Uma das razões para isso, é o fato de que suas características de viscosidade, ponto de ebulição e conteúdo de cetanos serem muito semelhantes (Jitputti et al., 2006, Huang et al., 2012).

Na tentativa de solucionar o problema da oferta de matérias primas para a produção de biodiesel, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) tem desenvolvido importantes programas de melhoramento genético para espécies oleaginosas, entre eles um amplo programa de melhoramento de palma de óleo, que teve início ainda nos anos 80 numa parceria com o instituto francês *Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement* (CIRAD) para a

coleta e introdução de germoplasma na bacia amazônica. Atualmente a Embrapa mantém uma área experimental de aproximadamente 420 ha de palma de óleo no Centro Experimental do Rio Urubu (CERU), município de Rio Preto da Eva - AM. No mesmo local, é mantido um dos Bancos Ativos de Germoplasma (BAG) mais diversos existentes no continente americano, são mais de 50 ha divididos em dois BAGs, sendo 25 ha de *Elaeis guineensis* e 28,7 ha de *E. oleifera* (Ricardo Lopes, informação pessoal).

Entre as demandas geradas pelo programa de melhoramento está a conservação dos recursos genéticos, uma vez que o banco ativo de germoplasma de palma de óleo é mantido em condições de campo, apresentando sérias limitações para a conservação a médio e longo prazo. Uma das limitações é o fato das espécies (*Elaeis guineensis* e *E. oleifera*) produzirem sementes com característica intermediárias e por isso, não podem ser armazenadas pelos métodos convencionais por longos períodos (Ellis et al., 1991). Outro problema é que o tamanho da área plantada resulta em alto custo de manutenção (Ledo et al., 2007), além disso, as coleções ficam vulneráveis a fatores bióticos e abióticos que ameaçam a segurança dos recursos genéticos vegetais conservados desta forma (Engelmann, 2011). A fim de evitar que ocorram perdas em decorrência de tais inconvenientes, torna-se imprescindível a adequação metodologias complementares que visem à conservação e integridade dos materiais pelo maior tempo possível.

Outra demanda a ser trabalhada, é a busca por fontes de resistência a doenças (Rivas et al., 2012), pois se acredita que um dos principais fatores que inibem os investimentos na expansão da palma de óleo na América latina, seja a ausência de conhecimentos sobre as doenças como o Amarelecimento Fatal (AF), que dizimam os plantios (Ramos et al., 2006). A estratégia atual dos programas de melhoramento genético da palma de óleo no Brasil visa, a avaliação de híbridos interespecíficos entre

palma de óleo africana (*Elaeis guineensis*) e palma de óleo americana ou caiaué (*E. oleifera*), a seleção dos melhores para reprodução e uso em plantios comerciais ou para obtenção de gerações avançadas de retrocruzamentos (Chia et al., 2009).

Entretanto, o trabalho que envolve o desenvolvimento de cultivares superiores é facilitado quando se conhece a variabilidade genética existente dentro de uma espécie, possibilitando a determinação do grau de relacionamento genético entre indivíduos, com a finalidade de indicar os melhores cruzamentos. Estas informações podem ser obtidas através do seqüenciamento de partes do DNA ou, quando possível, da seqüência completa do genoma estrutural das espécies envolvidas. Contudo, a dúvida que surge logo no início de um projeto de seqüenciamento, é sobre a quantidade de DNA. Então, o ponto de partida poderá ser a quantificação de DNA nuclear através da citometria de fluxo (Ferreira, 2003).

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a diversidade genética através do estudo de caracteres morfológicos dos diásporos de palma de óleo (*Elaeis guineensis* e *E. oleifera*), desenvolver estratégias para a conservação *ex situ* de germoplasma a curto e médio prazo e reestimar o tamanho do genoma das duas espécies e do híbrido interespecífico (OxG) mediante emprego de citometria de fluxo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O cultivo de palma de óleo e suas potencialidades

A demanda do mercado mundial de óleos e gorduras é cada vez maior e apenas três culturas respondem por cerca de 60% desta demanda, sendo a palma de óleo (24%), soja (24%) e a canola (12%). As pesquisas comprovam que dentre estas culturas, a palma de óleo é a que apresenta a maior rentabilidade em relação à área plantada. Estudos comparativos de produtividade demonstram que a soja produz em média 0,46 ton/ha/ano de óleo, enquanto que a palma pode produzir 4 a 6 ton/ha/ano (Chia et al., 2009; Ferreira et al., 2012).

De acordo com os dados do USDA – *United States Department of Agriculture*, os maiores produtores mundiais de óleo de palma, em milhões de toneladas, são: Indonésia (25,40), Malásia (18,20), Tailândia (1,55), Colômbia (0,92) e Nigéria (0,85), sendo que, Indonésia e Malásia juntas, respondem por mais de 90% de toda produção mundial. Os maiores mercados consumidores são China e Índia, onde o produto é utilizado como óleo de cozinha (Nantha & Tisdell, 2009). No ranking dos países produtores, o Brasil ocupa a 9ª colocação com uma produção de aproximadamente 280.000 toneladas/ano (USDA, 2012).

Na última década observou-se uma rápida expansão da palma de óleo em toda a América Latina e os países que apresentam as maiores áreas cultivadas são a Colômbia (375.000 ha), Equador (150.000 ha), Brasil (57.000 ha), Honduras, Venezuela, Costa Rica e Peru com menos de 50.000 ha plantados (Brasil, 2009). Dentre os países latinos, o Brasil é o que apresenta o maior potencial para a expansão da palma de óleo em função, principalmente, do clima e da disponibilidade de área. O zoneamento agroecológico das áreas desmatadas da Amazônia identificou aproximadamente 30 milhões de hectares

aptos para o cultivo da espécie (Ferreira, 2003). Com um zoneamento agroecológico adequado, a expansão da palmicultura nas áreas desmatadas da amazonia é reconhecida como uma excelente alternativa para a produção de óleo para fins alimentares e energéticos, propiciando além da melhoria dos aspectos socio-economicos, um melhor aproveitamento das áreas desmatadas, diminuindo a pressão sobre as áreas de floresta nativa (Ramalho Filho et al., 2010).

No Brasil, os cultivos de palma de óleo estão mais concentrados no estado do Pará, com cerca de 80% dos plantios (Chia et al., 2009). No estado também estão as maiores empresas nacionais produtoras de óleo de palma, distribuídas pelos municípios de Moju, Tailândia, Acará, Tomé-Açu, Bonito, Igarapé-Açu, Santo Antônio de Tauá, Santa Izabel do Pará e Castanhal. Quase toda a produção é destinada à indústria de alimentos, embora atualmente, o mercado de combustíveis seja a mais forte tendência (Brasil, 2009, Becker, 2010).

Independente da demanda, alguns fatores precisam ser considerados quando da escolha da cultura oleaginosa mais apropriada para cada região, tais como o rendimento, qualidade do óleo, geração e aproveitamento de co-produtos e impactos socio-ambientais. Neste contexto, observa-se que dentre as espécies vegetais cultivadas mundialmente destinadas a produção de óleo, a palma de óleo apresenta algumas vantagens que a torna ecológica e economicamente mais atrativa:

- 1) A produtividade supera, com grande vantagem outras oleaginosas (Lopes et al., 2008). Até o ano de 2007 a cultura ocupava não mais do que 5% das terras mundiais destinadas à produção de óleos vegetais e, no entanto, foi responsável pelo abastecimento de 25% do mercado global de óleos vegetais (Lam et al., 2009).

- 2) Os plantios podem ser explorados por até 25 anos sem a necessidade de preparo do solo, favorecendo a estabilidade de sua estrutura, proporcionando cobertura permanente, além de constituir uma opção de reflorestamento para as áreas desmatadas e solos com grau avançado de esgotamento (Muller & Andrade, 2010).
- 3) O processo de obtenção do biodiesel de palma emite menos CO₂ quando comparado ao diesel fóssil, uma vez que a cultura utiliza menos adubos, pesticidas e maquinário durante os processos. Além disso, as palmeiras apresentam taxas fotossintéticas muito elevadas, são capazes de absorver até 10 vezes mais CO₂ e emitir 8 a 10 vezes mais oxigênio por há/ano em comparação com a maioria das culturas anuais (Lam et al., 2009).
- 4) É uma cultura absorvedora de mão de obra, necessitando de um agricultor para cada 5 ha durante o ano todo, além de grande número de trabalhadores braçais para a colheita, que é manual (Becker, 2010).
- 5) Nos anos iniciais de implantação do cultivo, é possível organizar um sistema de agrofloresta, utilizando-se culturas de ciclo mais curto como banana, abacaxi ou mesmo um sistema de integração lavoura-pecuária, diminuindo em até 50% o custo de manutenção da cultura (Lam et al., 2009).

2.2 Aproveitamento de co-produtos

Os principais produtos da palmicultura são os óleos, que podem ser extraídos da polpa do fruto (óleo de palma) e da prensagem das amêndoas (óleo de palmiste), correspondem a 10% do total de biomassa produzida pela planta. As características especiais desses produtos conferem-lhe grande versatilidade o que possibilita sua

aceitação por indústrias mundiais diversas, desde a produção de cosméticos até a produção de biocombustíveis (Mesquita, 2002, Wahid et al., 2004).

O óleo de palma (*palm oil*) apresenta coloração variando entre amarela e avermelhada, sabor adocicado, aroma forte e característico. Na indústria oleoquímica, faz parte da composição de sabões, sabão em pó, sabonete, condicionador para cabelos, xampus, velas, tintas, detergentes, laminação de aço (siderurgia) e emulsificantes. O óleo industrializado, após refino e desodorização, é utilizado como matéria prima na fabricação de margarinas, pó para sorvete, manteiga vegetal, óleo de cozinha, óleo de salada, azeite de dendê. Também é matéria prima para obtenção da estearina, oleína, glicerina, ácido láurico e ácido oléico (Kritchevsky, 2000, Nagendran et al., 2000).

O óleo de palmiste (*palm kernel oil*) é similar ao óleo de côco e é normalmente utilizado, na indústria de cosméticos e sabões finos. Produz muita espuma quando aquecido e suas propriedades emolientes, são atribuídas à presença de grande número de ácidos graxos de cadeias curtas (Norizzah et al., 2004, Basiron, 2007).

Quanto à composição do óleo, *Elaeis guineensis* e *E. oleifera* diferem apenas na composição dos ácidos graxos principais. Enquanto que em *E. guineensis* predomina o ácido palmítico, em *E. oleifera* a maior concentração é de ácido oléico, que é um ácido graxo insaturado e confere maior fluidez ao óleo. À temperatura ambiente, o óleo de *E. guineensis* apresenta uma fração líquida próxima de 50%, enquanto que em *E. oleifera* a fração é superior a 80%. Portanto, o óleo produzido pelo híbrido entre as duas espécies, apresenta uma fluidez maior garantida pela presença do ácido oléico, reduzindo significativamente os gastos com o processo de refinamento de óleo (Rajanaidu et al., 1983, Asemota & Shah, 2004).

Além da produção de óleo, a palmicultura permite ainda a obtenção de co-produtos com alto valor comercial:

- os resíduos do processo de extração do óleo (fibras e cascas) são utilizados como combustíveis nas caldeiras de outros processos; fibras das folhas e restos de cachos podem ser processados para confecção de materiais de média densidade para tampos delareiras, aglomerados, bem como na armação de coberturas para casas e abrigos (Soom et al., 2006);
- a torta, como é chamada a massa que resta do processo de prensagem, contém 18% de proteína e pode ser usada na alimentação de animais ou como adubo orgânico (Silva et al., 2005, Silva et al., 2008);
- matéria prima para abastecer a indústria oleoquímica na produção de poliuretanos, polióis, adjuvantes e surfactantes para defensivos agrícolas (Wahid et al., 2004, Soom et al., 2006);
- biocombustíveis de segunda geração, obtidos através da conversão de fibras celulósicas ou biomassa (Wahid et al., 2004).

Na alimentação humana, o óleo de palma pode ser utilizado por apresentar um equilíbrio nas quantidades de ácidos graxos saturados e insaturados, além de ser livre de gordura *trans* (Wahid et al., 2004, Khosla & Sundram, 2011). Também é considerado uma fonte de vitamina E e β -caroteno, disponível em grande quantidade e a baixo custo (Monde et al., 2009, Mohidin, 2010).

2.3 Caracterização botânica das principais espécies de palma de óleo

2.3.1 Descrição do gênero

O gênero *Elaeis* (subtribo Elaeidae, tribo Cocoeae, subfamília Coccoideae, família Arecaceae, ordem Arecales) foi estabelecido em 1763 por Nicholas Joseph Jacquin, a partir da palavra grega “Elaion” que significa óleo. O gênero compreende

duas espécies economicamente importantes: *Elaeis guineensis* Jacq., nativo das florestas tropicais da costa oeste do continente africano e *Elaeis oleifera* (Kunth) Cortés nativo do continente americano, onde ocorre principalmente na floresta tropical amazônica, estendendo-se da Colômbia ao Panamá; são espécies de ocorrência comum em áreas antropizadas e ao longo dos cursos hídricos (Rao et al., 1989, Corley, 1982, Schultes, 1990, Chia et al., 2009, Cunha et al., 2009).

2.3.2 Palma de óleo africana (*Elaeis guineensis* Jacq.)

2.3.2.1 Origem e distribuição geográfica

Encontrado em populações espontâneas ou cultivadas nas regiões tropicais da África, sudeste asiático, América do sul e Central. Ocorre na África Ocidental e Central, naturalmente disperso desde o Senegal até Angola, Costa do Marfim, Camarões e Zaire. Ocupa uma faixa litorânea de cerca de 450 km de largura, no Congo ocorre também no interior até os limites dos lagos Alberto, Nyanza e Tanganyika (Hayati et al., 2004). Em geral, ocorrem em solos do tipo “terras pretas” e “massapé”, a densidade de plantas pode ser superior a 24 indivíduos/ha. Populações naturais ocorrem nas florestas tropicais e em geral, é o tipo arbóreo mais comum nas florestas úmidas e secundárias. (Akani et al., 2007).

No continente americano, a palma de óleo foi introduzida através do comércio de escravos (Zeven, 1964) e encontra-se dispersa desde o sul da Flórida na América do Norte até nas áreas amazônicas da América do sul. Há relatos indicando que sua chegada ao Brasil data do século XVII, sendo cultivado primeiramente na Bahia e no Rio de Janeiro (Muller & Andrade, 2010).

2.3.2.2 Aspectos morfológicos

O sistema radicular é do tipo fasciculado, formado a partir do bulbo radicular localizado na base do estipe, de onde saem raízes primárias verticais e horizontais. São muito rígidas e não possuem pêlos absorventes (Conceição & Muller, 2000, Cunha et al., 2009). O estipe cresce a partir do bulbo radicular, no sentido transversal (diâmetro) até os três anos de idade e posteriormente, inicia o alongamento dos entrenós promovendo o crescimento vertical (altura). É coroado por um tufo de folhas formado pelo meristema apical, cresce lentamente, variando de 5 a 100 cm por ano até a altura de 25 a 30 metros (Figura 1A) (Conceição & Muller, 2000).

As folhas possuem bases pecioladas que permanecem aderidas ao estipe por no mínimo 12 anos, uma palmeira adulta pode conter de 30-45 folhas verdes, medindo entre 5 a 9 metros e peso entre 5 a 8 quilogramas (Akani et al., 2007). O pecíolo mede cerca de 1,5 metros e possui espinhos na parte distal (ráquis) que servem de suporte aos folíolos e podem variar em número (250 a 350). A filotaxia é um dos fatores de identificação entre plantas e obedece a uma disposição regular e constante para cada palmeira. O ângulo formado entre duas folhas sucessivas e o eixo do estipe situa-se entre $135^{\circ} 7'$ e $137^{\circ} 5'$. Nesta angulação, não se observa duas folhas inseridas na mesma vertical e em plantas mais velhas é possível distinguir dois conjuntos de espirais foliares abertos voltados para lados contrários: um conjunto de oito espirais para um lado e outro conjunto de 13 espirais para outro lado (Conceição & Muller, 2000).

Quanto aos aspectos reprodutivos, são plantas monóicas. As inflorescências são protegidas por duas brácteas fibrosas (espatas), são espádices compostas por espigas formadas na axila de cada folha. As inflorescências, masculina e feminina são produzidas em ciclos unissexuais (Adam et al., 2005). A razão sexual entre o número de

inflorescências femininas e número de inflorescências totais, pode variar de 3 a 20 anualmente. Os frutos amadurecem entre 5 a 6 meses após a fecundação das flores femininas, são do tipo drupa, séssil, formato ovóide, medindo de 2 a 5 cm de comprimento e pesando de 3 a 30 gramas. Cada cacho mede aproximadamente 50 cm de comprimento por 35 cm de largura e o peso pode variar de 3 a 50 quilogramas (Figura 2B). A quantidade média é de 1500 frutos por cacho, representando um total de 60 a 70% do peso do cacho (Conceição & Muller, 2000).

Quando cortado transversalmente, o fruto permite distinguir, de fora para dentro: epicarpo (casca do fruto), mesocarpo (polpa), endocarpo (diásporo) e o endosperma (amêndoa) (Conceição & Muller, 2000) (Figura 2C). O diásporo (semente) apresenta normalmente três poros germinativos que correspondem a três partes do ovário tricarpelar (Figura 2D). O número de poros funcionais varia de acordo com o número de amêndoas desenvolvidas, que pode variar de 1 a 3, ovários anormais desenvolvem 4 ou mais amêndoas. A amêndoa tem forma ovóide, ocupa toda a cavidade do endocarpo e é composta por um fino tegumento de coloração amarelada que se torna negro quando seco. O embrião fica embutido em uma cavidade do endosperma logo abaixo do poro germinativo (Muller & Andrade, 2010) (Figura 2E). Com relação à coloração dos frutos, são descritos três tipos: *albescens* com frutos maduros de coloração amarela com ápice verde escuro ou preto; *nigrescens*, com frutos de coloração roxa, vermelha ou preta; *virescens* com frutos amarelados quando imaturos a vermelho-alaranjados quando maduros (Schultes, 1990).

A espécie *E. guineensis* apresenta grande variabilidade fenotípica de frutos, sendo possível distinguir três variedades de plantas de acordo com a presença e espessura do endocarpo (Schultes, 1990, Conceição & Muller, 2000, Cunha et al., 2009):

- a) Variedade *dura*: endocarpo com espessura de 2 a 8 mm, com poucas fibras dispersas na polpa do fruto, contem de 35 a 55% de polpa. A frequência desta variedade em palmares naturais é de 96% e, é o único tipo de fruto relatado na espécie *E. oleifera*;
- b) Variedade *pisifera*: possuem frutos que não apresentam endocarpo, apenas alguns vestígios representados por fibras lignificadas. Este tipo possui esterilidade feminina e em palmares naturais a frequência é inferior a 1%.
- c) Variedade *tenera*: frutos com espessura de endocarpo de 0,5 a 4 mm, apresenta fibras na polpa e de 60 a 90% de polpa sobre o fruto, frequência próxima de 3% em palmares espontâneo. Esta variedade é um híbrido inter-varietal natural entre *dura* e *pisifera*, usado em plantios comerciais.

2.3.3 Palma de óleo americana ou Caiaué {*Elaeis oleifera* (Kunth) Cortés}

2.3.3.1 Origem e distribuição geográfica

Endêmico da zona tropical úmida da América Latina ocorre, em populações espontâneas desde o sul do México até as áreas amazônicas do Brasil e Colômbia. É comumente encontrado em áreas ribeirinhas associadas à presença humana, nas depressões ou solos íngremes de áreas de pastagem, áreas úmidas em margens de rios, tolera tanto o sombreamento quanto o alagamento. Plantas que ocorrem em solos pobres e arenosos caracterizam-se pelo seu porte ainda mais reduzido. Pode ser encontrado em populações densas ou mais reduzidas, variando de acordo com a região (Hardon & Tan, 1969, Corley & Tinker, 2003).

Na Amazônia é muito frequente a ocorrência da espécie sobre manchas de solo denominadas “terra preta de índio” com característica de alta fertilidade em virtude dos

elevados teores de fósforo, cálcio e matéria orgânica (Barcelos et al., 2001, Cunha et al., 2009).

2.3.3.2 Aspectos morfológicos

O *E. oleifera* possui tronco tipo estipe, cilíndrico maciço, caracterizado pelo crescimento anual entre 5 a 10 cm, até o máximo de 5 metros de altura (Figura 1B). Por volta dos 15 anos de idade, o estipe curva-se sobre o solo permanecendo a parte terminal ereta, mantendo a coroa foliar a 2-3 metros de altura, num estágio denominado de procumbência (Corley & Tinker, 2003).

A plântula logo nos primeiros dias após a germinação desenvolve uma raiz primária envolta por finas raízes laterais, que vão aumentando de espessura e comprimento. Aos três anos de idade, a planta apresenta sistema radicular com maior concentração de raízes na camada de solo entre 10-50 cm de profundidade. Aos sete anos as raízes podem estar dispersas até cinco metros de distancia da planta. Raízes de até um metro de comprimento são formadas em toda a extensão do tronco procumbente (Figura 1C), mas ocorre maior concentração destas no ponto de emergência do tronco (Corley & Tinker, 2003).

Nas folhas, os folíolos são dispostos em um mesmo plano sobre a raque, conferindo aspecto crespo às folhas, uma das principais diferenças entre o *E. oleifera* e *E. guineensis*. O comprimento das folhas é muito variável, em condições naturais uma planta adulta pode conter até 42 folhas funcionais e o comprimento varia de 4,2 a 7,4 m dependendo da característica da população e dos locais de ocorrência (Corley & Tinker, 2003).

Quanto à reprodução, é uma planta monóica, alógama. Tanto as inflorescências masculinas como as femininas encontram-se envoltas por duas espatas externas que se rompem expondo a raque floral (Cunha et al., 2009). A raque da inflorescência feminina mede 15 a 20 cm de comprimento e é nela que estão dispostas em formato de espiral as ráquilas com 4 a 9 cm de comprimento. A raque masculina mede de 10 a 15 cm de comprimento e suporta, em espiral, entre 40 e 200 ráquilas com comprimento variando entre 8 e 14 cm (Corley & Tinker, 2003).

O fruto é uma drupa, de tamanho bem menor do que os frutos de *E. guineensis*. A porcentagem de mesocarpo em relação ao fruto varia de 21,3 a 61,9% e a espessura média do endocarpo é de 2 mm (Cunha et al., 2009). Os frutos quando maduros podem apresentar coloração variando de amarela a alaranjada, pesam entre 1,7 e 13,0 gramas (Figura 2A). É comum a ocorrência de frutos partenocápicos com frequências variáveis entre os indivíduos, em geral é superior a 80%. Os cachos pesam em média de 8 a 12 kg, embora haja relatos de até 30 kg e o número de frutos por cacho, pode chegar a 5000. O percentual de óleo em relação à quantidade de polpa pode variar de 28 a 47% e na amêndoa varia de 10 a 24% (Corley & Tinker, 2003).



Figura 1. Plantas adultas de palma de óleo mantidas no banco de germoplasma da Embrapa Amazônia Ocidental. A) *Elaeis guineensis* Jacq.; B) *Elaeis oleifera* (Kunth) Cortés; C) Planta de *E. oleifera* apresentando tronco procumbente e formação de novo sistema radicular; D) Planta de híbrido interespecífico *E. guineensis* x *E. oleifera*.



Figura 2. Produção de cachos e frutos em palma de óleo. A) Planta adulta na fase produtiva e as cores identificam o ponto de maturação dos frutos, a cor laranja indica frutos maduros; B) Cacho de *E. guineensis* em ponto ideal para a colheita; C) Fruto da palma de óleo mostrando de fora para dentro: epicarpo (casca do fruto), mesocarpo (polpa), endocarpo (diásporo) e o endosperma (amêndoa); D) diásporos (semente com o endocarpo aderido); E) Amêndoa em corte longitudinal e exposição do embrião na parte inferior.

2.4 Melhoramento genético e conservação de germoplasma

Em razão das vantagens e potencialidades da palmicultura, programas de melhoramento têm sido implementados com ênfase na introdução, seleção, clonagem e obtenção de cultivares com características agrônômicas de interesse. Embora o cultivo restrinja-se quase que exclusivamente à *E. guineensis*, a espécie *E. oleifera*, tem sido incorporada nos programas de melhoramento genético por apresentar importantes características de interesse agrônômico como: porte baixo, óleo de boa qualidade e resistência a doenças (Bergamin Filho et al., 1998, Conceição & Muller, 2000, Cunha et al., 2009).

No entanto, a expansão dos cultivos de palma de óleo na América está seriamente ameaçada por uma doença denominada Amarelecimento Fatal (AF), de etiologia ainda desconhecida e por isso de difícil controle. No Brasil, os primeiros relatos de AF ocorreram em 1974, inviabilizando vários projetos de expansão da palmicultura na região norte. Uma das soluções encontradas para enfrentar o avanço do AF, foi a obtenção de híbridos interespecíficos entre *E. guineensis* e *E. oleifera* (Figura 1D) cujos descendentes mostraram-se tolerantes à doença (Barcelos et al., 2001).

No Brasil até o final da década de 80 os plantios comerciais de palma de óleo eram realizados exclusivamente com sementes importadas da África, Ásia ou América Central. A produção de sementes comerciais no Brasil iniciou apenas em 1992 pela Embrapa Amazônia Ocidental visando, sobretudo, atender a legislação que permite apenas a comercialização no mercado brasileiro, de cultivares registradas no RNC (Registro Nacional de Cultivares). Atualmente existe 18 cultivares registradas, sendo dezesseis híbridos intervarietais *tenera* e dois cultivares híbridos interespecíficos *E. oleifera* x *E. guineensis* (OxG) (Cunha et al., 2009).

O desenvolvimento de cultivares nacionais de palma de óleo, somente foi possível graças a extensivos trabalhos de coleta, visando à implantação de um banco de germoplasma de *Elaeis oleifera* e *E. guineensis* na Bacia Amazônica, na década de oitenta (Moretzsohn et al., 2002). No entanto, o Banco Ativo de Germoplasma (BAG-Dendê) é mantido exclusivamente em condições de campo, metodologia comumente utilizada para conservar espécies arbóreas e/ou com sementes recalcitrantes. Apesar de eficiente, depende de mão-de-obra e manutenção constantes, além de exigir o desenvolvimento de formas complementares de conservação para minimizar os riscos de perdas de genótipos. Dentre as formas mais comuns de conservação *ex situ* estão, a conservação de bancos de sementes em baixa temperatura para espécies que produzem sementes ortodoxas e a conservação *in vitro*, destinada, sobretudo, para espécies com sementes recalcitrantes ou intermediárias como o caso da palma de óleo (Ellis et al., 1991, Engelmann, 1991).

Em outras regiões produtoras do mundo, a conservação *ex situ* de palma de óleo tem sido realizada com foco na criopreservação de embriões zigóticos (Villa et al., 2007), embriões somáticos (Konan et al., 2010) e pólen (Tandon et al., 2007). A conservação à longo prazo, é limitada pois a semente não suporta dessecação a níveis inferiores a 10% (Ellis et al., 1991, Hong & Ellis, 1996).

Outra forma de conservação *ex situ* é a manutenção de bancos de germoplasma em condições *in vitro* sob regime de crescimento mínimo, esta técnica tem sido utilizada para palmeiras em geral, com bons resultados. Em tamareira (*Phoenix dactilyfera*) Bekheet et al. (2007) observaram que explantes podem ser mantidos sob temperatura de 5°C durante 12 meses com sobrevivência superior a 70%. Bancos de germoplasma de coco (*Cocos nucifera*) são mantidos sob temperatura de 25°C por

períodos superiores há um ano, com 100% de sobrevivência de plantas (Ledo et al., 2007, García et al., 2008).

2.4.1 Genômica da palma de óleo: determinação do tamanho do genoma através da citometria de fluxo

A estratégia atual dos programas de melhoramento genético de palma de óleo no Brasil visa à avaliação de híbridos interespecíficos entre *Elaeis guineensis* e *E. oleifera* (OxG), com a seleção dos melhores para reprodução e uso em plantios comerciais ou para obtenção de gerações avançadas de retrocruzamentos (Chia et al., 2009). A escolha do método de melhoramento depende do prévio conhecimento da variabilidade genética existente dentro da espécie, que pode ser obtido através do seqüenciamento de partes do DNA ou da seqüência completa do genoma estrutural das espécies envolvidas. Uma ferramenta muito útil ao seqüenciamento de DNA é a citometria de fluxo, que permite determinar a quantidade de DNA que existe para ser seqüenciada em um genoma (Ferreira, 2003), além de permitir posteriormente, a diferenciação entre espécies afins e/ou seus híbridos.

A citometria de fluxo foi originalmente desenvolvida, no fim dos anos 50, para a contagem e análise de células sanguíneas. Estudos utilizando citometria de fluxo em espécies vegetais ocorreram apenas no início dos anos 80 e, o número de aplicações tem aumentado continuamente desde então. É uma técnica que envolve a análise das propriedades ópticas (dispersão da luz e fluorescência) de partículas que fluem numa suspensão líquida e baseia-se, na intensidade de fluorescência relativa de núcleos corados com um fluorocromo específico para o DNA (Loureiro & Santos, 2002). Além da estimativa do tamanho do genoma, a citometria de fluxo pode ser aplicada para

análises de ploidia (Madon et al., 2005), determinação do sexo em uma fase prévia do crescimento, detecção de genotoxicidade, análises do ciclo celular e alterações ocorridas no DNA durante as fases de cultura de tecidos (Srisawat et al., 2005).

Em palma de óleo (*E. guineensis*), o tamanho do genoma estimado por citometria de fluxo, citado e reconhecido na literatura internacional (Bennett & Leitch, 2010) é de $2C = 3,76$ pg (Rival et al., 1997). No entanto, trabalhos abordando o tamanho do genoma em *E. oleifera* e do híbrido interespecífico OxG são escassos e os resultados são controversos. Madon et al (2008) buscaram estabelecer um protocolo padrão para estimar o tamanho do genoma de *E. guineensis*, *E. oleifera* e do híbrido interespecífico (OxG), relatam valores de $2C$ (pg) para *E. guineensis* (*pisifera*) $3,64 \pm 0,28$ pg, para *E. oleifera* (Suriname) $2,08 \pm 0,04$ pg e para o híbrido interespecífico (OxG) $4,16 \pm 0,32$ pg. Entretanto, observa-se que o tamanho do genoma de *E. oleifera* corresponde a metade do genoma de *E. guineensis*, o que gerou dúvidas, uma vez que não foram encontrados relatos, na bibliografia consultada, sobre diferenças dessa magnitude entre espécies afins. Diante disso, torna-se necessário reavaliar o tamanho de genoma de *E. guineensis*, *E. oleifera* e do híbrido interespecífico (OxG) mediante emprego de citometria de fluxo, considerando que os dados atualmente disponíveis não fornecem uma avaliação precisa e confiável.

3. REFERENCIAS

- Adam, H., Jouannic, S., Escoute, J., Duval, Y., Verdeil, J. L. & Tregear, J. W. 2005. Reproductive developmental complexity in the African oil palm (*Elaeis guineensis*, Arecaceae). *American Journal of Botany*, 92, 1836-1852.
- Akani, G. C., Ebere, N., Luiselli, L. & Eniang, E. A. 2007. Community structure and ecology of snakes in fields of oil palm trees (*Elaeis guineensis*) in the Niger Delta, southern Nigeria. *African Journal of Ecology*, 46, 500-506.
- Asemota, O. & Shah, F. H. 2004. Detection of mesocarp oleoyl-thioesterase gene of the South American oil palm *Elaeis oleifera* by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *African Journal of Biotechnology*, 3, 595-598.
- Barcelos, E., Cunha, R. N. V. & Nouy, B. 2001. Recursos genéticos de dendê {*Elaeis guineensis* Jacq. e *E. oleifera* Kunth (Cortes)} disponíveis na Embrapa e sua utilização. In: MULLER, A. A. & FURLAN JUNIOR, J. (Eds.) *Agronegócio do dendê: uma alternativa social, econômica e ambiental para o desenvolvimento sustentável da Amazônia*. Belém - PA, Embrapa Amazônia Oriental.
- Barros, G. S. C., Silva, A. P., Ponchio, L. A., Alves, L. R. A., Osaki, M. & Cenamo, M. 2006. Custos de produção de biodiesel no Brasil. *Revista de Política Agrícola*, XV, 36-50.
- Basiron, Y. 2007. Palm oil production through sustainable plantations. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109, 289-295.
- Becker, B. K. 2010. Recuperação de áreas desflorestadas da Amazônia: será pertinente o cultivo da palma de óleo (Dendê)? *Revista Franco-Brasileira de Geografia*, 10, 01-20.
- Bekheet, S. A., Taha, H. S., Saker, M. M. & Solliman, M. E. 2007. Application of cryopreservation technique for *In vitro* Grown Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) Cultures. *Journal of Applied Sciences Research*, 3, 859-866.
- Bennett, M. D. & Leitch, I. J. 2010. Plant DNA C-values database. (<http://www.kew.org/cval/homepage.html>) Kew, Royal Botanical Gardens.
- Bergamin Filho, A., Amorim, L., Laranjeira, F. F., Berguer, R. D. & Haub, B. 1998. Análise temporal do amarelecimento fatal do dendezeiro como ferramenta para elucidar sua etiologia. *Fitopatologia Brasileira*, 23, 391-396.
- Brasil 2007. *Matriz Energética Nacional 2030*, Brasília, Ministério das Minas e Energia; colaboração Empresa de Pesquisa Energética.
- Brasil 2009. Anuário Estatístico da Agroenergia. In: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Ed.) Brasília, MAPA/ACS. <http://www.agricultura.gov.br>.
- Chia, G. S., Lopes, R., Cunha, R. N. V., Rocha, R. N. C. & Lopes, M. T. G. 2009. Repetibilidade da produção de cachos de híbridos interespecíficos entre caiaué e dendezeiro. *Acta Amazonica*, 39, 249-254.
- Conceição, H. E. O. & Muller, A. A. 2000. Botânica e morfologia do dendezeiro. In: VIÉGAS, I. J. M. & MULLER, A. A. (Eds.) *A Cultura do dendezeiro na Amazônia brasileira*. Belém - PA, Embrapa Amazonia Oriental.
- Corley, R. H. V. 1982. The genus *Elaeis*. In: CORLEY, R. H. V., HARDON, J. J. & WOOD, B. J. (Eds.) *Oil Palm Research*. 2 ed. New York - EUA, Elsevier Scientific Publishing Company Inc. p. 3-5.
- Corley, R. H. V. & Tinker, P. B. H. 2003. *The oil palm*, Iowa - USA, Blackwell Publishing Company. 592 p.
- Cunha, R. N. V., Lopes, R. & Barcelos, E. 2009. Domesticação e Melhoramento de caiaué. In: BORÉM, A., LOPES, M. T. G. & CLEMENT, C. R. (Eds.)

- Domesticação e melhoramento: espécies amazônicas*. Viçosa - MG, Editora Universidade Federal de Viçosa. p. 275-296.
- Ellis, R. H., Hong, T. D., Roberts, E. H. & Soetisna, U. 1991. Seed storage behaviour in *Elaeis guineensis*. *Seed Science Research*, 1, 99-104.
- Engelmann, F. 1991. *In vitro* conservation of tropical plant germoplasm - a review. *Euphytica*, 57, 227-243.
- Engelmann, F. 2011. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cell Development and Biology*, 47, 5-16.
- Ferreira, C. B. B., Lopes, M. T. G., Lopes, R., Cunha, R. N. V., Moreira, D. A., Arros, W. S. & Matiello, R. R. 2012. Molecular genetic diversity of oil palm progenies. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 47, 378-384.
- Ferreira, M. E. 2003. Melhoramento genético de arroz: impactos da genômica. In: A., B., GIUDICE, M. & SEDIYAMA, T. (Eds.) *Melhoramento genômico*. Viçosa - MG, Editora Universidade Federal de Viçosa. p. 73-129.
- García, M. B., Malaurie, B., Viltres, S. P. & Campos, D. C. 2008. Efecto de las distintas concentraciones de sacarosa en la conservación *in vitro* de coco (*Cocos*). *Revista Colombiana de Biotecnología*, X, 111-119.
- Goes, T. & Marra, R. 2008. Biocombustíveis - uma alternativa para o mundo, uma oportunidade para o Brasil. *A Lavoura*, 111, 15-19.
- Hardon, J. J. & Tan, G. Y. 1969. Interspecific hybrids in the genus *Elaeis* I. crossability, cytogenetics and fertility of F₁ hybrids of *E. guineensis* x *E. oleifera*. *Euphytica*, 18, 372-379.
- Hayati, A., Wickneswari, R., Maizura, I. & Rajanaidu, N. 2004. Genetic diversity of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) germplasm collections from Africa: implications for improvement and conservation of genetic resources. *Theoretical and Applied Genetics*, 108, 1274-1284.
- Hong, T. D. & Ellis, R. H. 1996. A protocol to determine seed storage behaviour. *IPGRI Technical Bulletin*, 1.
- Huang, D., Zhou, H. & Lin, L. 2012. Biodiesel: an Alternative to Conventional Fuel. *Energy Procedia*, 16, 1874 - 1885.
- Jitputti, J., Kitiyanan, B., Rangsunvigit, P., Bunyakiat, K., Attanatho, L. & Jenvanitpaniakul, P. 2006. Transesterification of crude palm kernel oil and crude coconut oil by different solid catalysts. *Chemical Engineering Journal*, 116, 61-66.
- Khosla, P. & Sundram, K. 2011. Nutritional characteristics of palm oil. *Reducing Saturated Fats in Food*, 112-127.
- Konan, E. K., Durand-Gasselín, T., Kouadio, Y. J., Flori, A., Rival, A., Duval, Y. & Pannetier, C. 2010. *In vitro* conservation of oil palm somatic embryos for 20 years on a hormone-free culture medium: characteristics of the embryogenic cultures, derived plantlets and adult palms. *Plant Cell Reports*, 29, 1-13.
- Kritchevsky, D. 2000. Impact of red palm oil on human nutrition and health. *Food Nutrition Bulletin*, 21, 182-188.
- Lam, M. K., Tan, K. T., Lee, K. T. & Mohamed, A. R. 2009. Malaysian palm oil: Surviving the food versus fuel dispute for a sustainable future. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13, 1456-1464.
- Ledo, A. S., Cunha, A. O., Aragão, W. M. & Tupinambá, E. A. 2007. Efeito da sacarose e do manitol na conservação *in vitro* por crescimento lento de coqueiro anão. *Magistra*, 19, 346-351.
- Lopes, R., Cunha, R. N. V., Rodrigues, M. R. L., Teixeira, P. C., Rocha, R. N. C. & Lima, W. A. A. 2008. *Palmaceas* In: ALBUQUERQUE, A. C. S. & SILVA, A.

- G. (Eds.) *Agricultura tropical: quatro décadas de inovações tecnológicas, institucionais e políticas*. Brasília - DF, Embrapa Informação Tecnológica. Vol. 1, 767-786.
- Loureiro, J. & Santos, C. 2002. Aplicação da citometria de fluxo ao estudo do genoma vegetal. *Boletim de Biotecnologia*, 18-29.
- Madon, M., Clyde, M. M., Hashim, H., Mohd Yosuf, J., Mat, H. & Saratha, S. 2005. Polyploidy induction of oil palm through colchicine and oryzalin treatments. *Journal of Oil Palm Research*, 17, 110-123.
- Madon, M., Phoon, L. Q., Clyde, M. M. & Mohd Din, A. 2008. Application of flow cytometry for estimation of nuclear DNA content in *Elaeis*. *Journal of Oil Palm Research*, 20, 447-452.
- Marinho, G. N. & Silva, C. R. J. P. 2012. Biocombustíveis como forma alternativa de energia. *Bolsista de Valor*, 2(1), 221-225.
- Mesquita, S. A. 2002. Do azeite de dendê de *Ogum* ao *Oil palm* commodity: uma oportunidade que a Bahia não pode perder. *Bahia Agrícola*, 5, 22-27.
- Mohidin, M. R. 2010. Carotech Berhad - specialized in producing many palm-based nutraceutical products. *Palm Oil Developments*, 52.
- Monde, A. A., Michel, F., Carbonneau, M. A., Tiahou, G., Vernet, M. H., Duvernay, S. E., Badiou, S., Adam, B., Konan, E., Sess, D. & Cristol, J. P. 2009. Comparative study of fatty acid composition vitamin E and carotenoids contents of palm oils from four varieties of oil palm from Côte d'Ivoire. *Journal of Food and Agricultural*, 89, 2535-2540.
- Muller, A. A. & Andrade, E. B. 2010. Aspectos gerais sobre a fenologia da cultura da palma de óleo. In: RAMALHO FILHO, A. (Ed.) *Zoneamento agroecológico, produção e manejo para a cultura da palma de óleo na Amazônia*. Rio de Janeiro - RJ, Embrapa Solos.
- Nagendran, B., Unnithan, U. R., Choo, Y. M. & Sundram, K. 2000. Characteristics of red palm oil a carotene – and vitamin E – rich refined oil for food uses. *Food Nutrition Bulletin*, 21, 189-194.
- Nantha, H. S. & Tisdell, C. 2009. The orangutan–oil palm conflict: economic constraints and opportunities for conservation. *Biodiversity and Conservation*, 18, 487-502.
- Norizzah, A. R., Chong, C. L. & Cheouw, C. S. 2004. Effects of chemical interesterification on physicochemical properties of palm stearin and palm kernel olein blends. *Food Chemistry*, 86, 229-235.
- Rajanaidu, N., Tan, B. K. & Rao, V. 1983. The interspecific hybrid *Elaeis oleifera* x *E. guineensis*: a solution for the Surinamese Oil Palm Industry. *Palm Oil Research Institute of Malaysia Bulletin*, 7, 9-20.
- Ramalho Filho, A., Motta, P. E. F., Naime, U. J., Gonçalves, A. O. & Teixeira, W. G. 2010. Zoneamento agroecológico para a cultura de palma de óleo nas áreas desmatadas da Amazônia legal. In: RAMALHO FILHO, A. (Ed.) *Zoneamento agroecológico, produção e manejo para a cultura da palma de óleo na Amazônia*. Rio de Janeiro - RJ, Embrapa Solos.
- Ramos, E. J., Veiga, A. S. & Furlan Junior, J. 2006. Comportamento do dendezeiro ao amarelecimento fatal em área de replantio, sob diferentes forma de manejo.) Belém - PA, Embrapa Amazonia Oriental.
- Ramos, L. P. & Wilhelm, H. M. 2005. Current status of biodiesel development in Brazil. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 121-124, 807-820.
- Rao, Y., Weng, C. C. & Rajanaidu, N. 1989. Biology and performance of Surinam *Elaeis oleifera* (H.B.K.) Cortes. *Elaeis*, 1, 109-118.

- Rival, A., Beule, T., Barre, P., Hamon, S., Duval, Y. & Noirot, M. 1997. Comparative flow cytometry estimation of nuclear DNA content in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq) tissue cultures and seed-derived plants. *Plant Cell Reports*, 16, 884-887.
- Rivas, M., Barbieri, R. L. & Maia, L. C. 2012. Plant breeding and *in situ* utilization of palm trees. *Ciência Rural*, 42(2), 261-269.
- Schultes, R. E. 1990. Taxonomic, nomenclatural and ethnobotanic notes on *Elaeis*. *Elaeis*, 2, 172-187.
- Silva, H. G. O., Pires, A. J. V., Carvalho, G. G. P., Veloso, C. M. & F.F., S. 2008. Capim-elefante amonizado e farelo de cacau ou torta de dendê em dietas para ovinos em crescimento. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 37, 734-742.
- Silva, H. G. O., Pires, A. J. V., Silva, F. F., Veloso, C. M., Carvalho, G. G. P., Cezário, A. S. & Santos, C. C. 2005. Farelo de cacau (*Theobroma cacao* L.) e torta de dendê (*Elaeis guineensis*, Jacq) na alimentação de cabras em lactação: consumo e produção de leite. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 34, 1786-1794.
- Soom, R. M., Hassan, W. H. W., Top, A. G. M. & Hassan, K. 2006. Thermal properties of oil palm fiber, cellulose and its derivatives. *Journal of Oil Palm Research*, 18, 272-277.
- Srisawat, T., Kanchanapoom, K., Pattanapanyasat, K., Srikul, S. & Chuthammathat, W. 2005. Flow cytometry analysis of oil palm: a preliminary analysis for cultivars and genomic DNA alteration. *Songklanakarian J. Sci. Technol.*, 27, 645-652.
- Tandon, R., Chaudhury, R. & Shivanna, K. R. 2007. Cryopreservation of oil palm pollen. *Current Science*, 92, 182-183.
- USDA - United States Department of Agricultural. Acessado em: 15/10/2012. Disponível em: <http://www.fas.usda.gov>.
- Villa, A. L., Jiménez, P. E., Valbuena, R. I., Bastidas, S. & Núñez, V. M. 2007. Preliminary study of the establishment of cryoconservation protocol for oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Agronomia Colombiana*, 25, 215-223.
- Wahid, M. B., Abdullah, S. N. A. & Henson, I. E. 2004. Oil palm -achievements and potential.) *4th International Crop Science Congress*. Brisbane, Australia.
- Zeven, A. C. 1964. On the origin of the oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Grana Palynologica*, 5, 121-123.

CAPÍTULO I

Divergência genética e parâmetros biométricos de diásporos de palma de óleo

{*Elaeis guineensis* Jacq. e *E. oleifera* (Kunth) Cortés}

CAMILLO, J.; BRAGA, V.C.; MATTOS, J.K.A.; SILVA, J.P.; LOPES, R.; CUNHA,

R.N.V.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E.

RESUMO

O estudo da variabilidade genética baseado em caracteres morfológicos tem fornecido, importantes informações para os programas de melhoramento de palmeiras. O conhecimento da biometria de sementes permite obter informações sobre a dispersão, germinação e identificação de variedades, além de informações para a conservação dos recursos genéticos e sua utilização mais racional e eficiente. O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade genética em diásporos de palma de óleo e agrupar os acessos quanto às suas características morfológicas divergentes. Foram avaliados diásporos de 41 acessos de palma de óleo (*Elaeis oleifera* e *E. guineensis*), quanto à morfologia externa (peso dos diásporos, diâmetro longitudinal e transversal) e interna (espessura do endocarpo, peso das amêndoas, diâmetro longitudinal e transversal, número de lócus e amêndoas e comprimento do embrião). Utilizou-se análise de grupamento para identificar a similaridade em relação às características morfológicas internas e externas. Os acessos de *E. oleifera* formaram grupos de acordo com a distribuição geográfica da espécie, porém com significativas diferenças entre acessos de mesma origem. Em *E. guineensis* tipo *tenera* observou-se grande divergência nos parâmetros externos, que os diferenciaram das outras espécies, sendo espessura de endocarpo a que mais se destacou na diferenciação intra e inter-populacional. Para os acessos de *E. guineensis* tipo *dura* o padrão de agrupamento foi similar aquele observado para o tipo *tenera* e diferindo quanto ao tamanho, peso dos diásporos e espessura de endocarpo.

Palavras-chave: palma de óleo, caiaué, biometria, diversidade genética, marcadores morfológicos

ABSTRACT

The study of genetic variability based on morphological characters has provided important information for breeding programs of economically important palms. The knowledge of seed biometry allows to obtain information on the dispersal, germination and identification of varieties as well as to subsidies conservation and more efficient and rational use of genetic resources. The objective of this study was to evaluate the genetic diversity of diaspores in oil palm and clustering subsamples and their morphological characteristics divergence. Forty-one accessions of oil palm (*Elaeis oleifera* and *E. guineensis*) were evaluated for external (weight of diaspores, longitudinal and transverse diameter) and internal morphology (endocarp thickness, kernel weight, longitudinal and transverse diameter, number of *locus* and kernels and length of the embryo). The observations were used in cluster analysis, to group accessions by similarity in relation to internal and external morphology. The results showed that the *E. oleifera* accessions formed groups according to the geographical distribution of species, but with significant differences among accessions of the same origin. The accessions of *E. guineensis* tipo *tenera* formed groups according to the morphology and showed a great divergence in the external parameters, which differentiated from the other genotypes. Endocarp thickness stood out in differentiating intra and inter-population. For the subsamples of *E. guineensis* tipo *dura* the pattern of clustering was similar to that observed in the *tenera* variety, differing from the other genotypes in size and weight of the diaspores, as well as the increased endocarp thickness.

Keywords: oil palm, caiaué, biometrics, genetic diversity, morphological markers.

1. INTRODUÇÃO

A caracterização biométrica serve como um indicativo da variabilidade genética existente inter e intraespecífica, que pode ser explorada em programas de melhoramento genético, além de procurar estabelecer relações entre a variabilidade e os fatores ambientais. Também fornece informações importantes para a conservação de recursos de valor econômico, permitindo utilizar o germoplasma mais eficientemente (Gusmão et al., 2006, Manfio et al., 2011, Silva et al., 2010).

Além de ser importante para programas de melhoramento, a biometria de frutos e sementes permite a obtenção de informações sobre a germinação, bem como a identificação de dormência, causada por tegumento impermeável ou por imaturidade do embrião. O estudo morfológico de uma unidade de dispersão é importante, quando se deseja obter informações sobre o estágio de maturação das sementes, possibilitando a definição da melhor época de colheita. Planejar o tipo de processamento a ser adotado para as sementes também depende do conhecimento prévio sobre sua morfologia (Castellani et al., 2008).

O fruto da palma de óleo é composto por quatro camadas: epicarpo (casca do fruto), mesocarpo (polpa), endocarpo e o endosperma (amêndoa) (Conceição & Muller, 2000), sendo que estas últimas juntas formam o diásporo (semente com o endocarpo aderido). A palma de óleo africana (*E. guineensis*) apresenta grande variabilidade fenotípica de frutos, sendo possível distinguir os tipos de plantas (*pisifera*, *dura* e *tenera*) de acordo com a presença e espessura do endocarpo (Corley, 1982). Na palma de óleo americana (*E. oleifera*) estes tipos não ocorrem, mas estudos relatam ampla variabilidade quanto à coloração e ao tamanho dos frutos (Cunha et al., 2012). Variabilidade genética para taxa de germinação das sementes também foi constatada

tanto em *E. guineensis*, com variação de 5 a mais de 80% (Fondom et al., 2010), quanto em *E. oleifera* (Murugesan et al., 2011).

A variabilidade genética baseada em caracteres morfológicos vem sendo quantificada em germoplasma de algumas espécies oleaginosas como o pinhão-mansão (Rao et al., 2008) e a mamona (Baldoni et al., 2011), tendo fornecido importantes informações para os programas de melhoramento genético. Para o germoplasma de palmeiras, nas últimas duas décadas foram realizados estudos de diversidade genética com base em caracteres morfológicos, para espécies de importância econômica como açazeiro (Oliveira et al., 2007), tamareira (Ahmed et al., 2011) e côco (Sugimura et al., 1997).

Em *E. guineensis*, Okwuangwu et al. (2008) relatam diferenças genotípicas significativas quando a variabilidade genética foi baseada em caracteres agrônômicos como o número de cachos, peso médio de cachos e rendimento dos frutos. Em *E. oleifera*, foram identificados poucos trabalhos sobre o tema, um deles relata a existência de correlação entre a morfologia polínica e a variabilidade inter-populacional, tornando possível a discriminação de populações (Martins et al., 2002). Na avaliação da diversidade genética de *E. oleifera*, também foi possível a discriminação de acessos através de medidas biométricas como o comprimento da ráquis, número de folíolos, comprimento e largura de folíolo, comprimento do pecíolo e comprimento do estipe (Rios et al., 2011).

No entanto, são muito incipientes os estudos de diversidade genética através de marcadores morfológicos em palma de óleo e, o conhecimento desta diversidade pode ser de grande importância para o melhoramento, uma vez que, poderia acelerar o ganho de seleção. Além disso, o conhecimento detalhado destas estruturas, permitiriam agilizar o processo de germinação, que segundo Martine et al. (2009), em palma de óleo

constitui um grave problema para o estabelecimento dos plantios. Sob a ótica da conservação de sementes, o conhecimento detalhado das estruturas envolvidas, permitiria ampliar o período de conservação. Trabalhos relatam que a espessura do endocarpo em palma de óleo, influencia diretamente na disponibilidade de oxigênio e na temperatura interior da semente, acelerando ou retardando o processo germinativo (Fondom et al., 2010).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade genética em diásporos de *Elaeis guineensis* tipo *dura* e *tenera* e *E. oleifera*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material biológico

Os estudos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos II e anexos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. Os acessos avaliados foram coletados no Banco Ativo de Germoplasma (BAG-Dendê), localizado no Campo Experimental do Rio Urubu (CERU), no município de Rio Preto da Eva, AM. Foram avaliados 41 acessos de palma de óleo, sendo 18 de *Elaeis oleifera* e 23 de *Elaeis guineensis*, conforme descrito na Tabela 1.

2.2 Avaliações e análise dos dados

Nas análises biométricas foram utilizados 20 diásporos de cada um dos 41 acessos e analisadas as características externas: peso do diásporo, diâmetro longitudinal (maior eixo longitudinal) e transversal (maior eixo transversal) do diásporo. Como características internas foram avaliadas: espessura do endocarpo, peso da amêndoa, diâmetro longitudinal (maior eixo longitudinal) e transversal (maior eixo transversal) da amêndoa, número de amêndoas por diásporo e comprimento do embrião. As pesagens foram realizadas em balança analítica de precisão e as medidas de diâmetro utilizando paquímetro digital. Para análise da espessura do endocarpo e das avaliações da amêndoa e embrião o endocarpo foi removido após rompimento por pressão mecânica. As observações foram submetidas à análise estatística descritiva sendo calculadas as médias, desvio padrão e coeficiente de variação.

2.3 Análises multivariadas

Na análise da similaridade entre os pares foi empregada a distância euclidiana média e para o agrupamento dos acessos o método de agrupamento da distância média. Para representação gráfica da variabilidade foi utilizada a técnica de componentes principais, método fatorial com rotação Varimax, para verificar a possibilidade de separar esses grupos em termos das correlações características morfológicas. As análises estatísticas foram realizadas no programa de linguagem estatística R (<http://www.r-project.org>).

Tabela 1. Acessos de palma de óleo (*Elaeis guineensis* e *E. oleifera*) analisadas no experimento.

Acessos		Espécie	Tipo	Origem
A312902	RUC 12	<i>Elaeis oleifera</i>	<i>dura</i>	Manicoré (Rio Madeira)
A313020	RUC 15	<i>Elaeis oleifera</i>	<i>dura</i>	Manicoré (Rio Madeira)
A313516	RUC 13	<i>Elaeis oleifera</i>	<i>dura</i>	Manicoré (Rio Madeira)
A410213	RUC 92	<i>Elaeis oleifera</i>	<i>dura</i>	Manicoré – Democracia
A410312	RUC 92	<i>Elaeis oleifera</i>	<i>dura</i>	Manicoré – Democracia
A410507	RUC 98	<i>Elaeis oleifera</i>	<i>dura</i>	Manicoré - Igarapé Açú
A410517	RUC 88	<i>Elaeis oleifera</i>	<i>dura</i>	Manicoré – Liberdade
A410610	RUC 93	<i>Elaeis oleifera</i>	<i>dura</i>	Manicoré – Democracia
A440320	RUC 36	<i>Elaeis oleifera</i>	<i>dura</i>	Moura - E. Caburis
A440322	RUC 36	<i>Elaeis oleifera</i>	<i>dura</i>	Moura - E. Caburis
A440805	RUC 07	<i>Elaeis oleifera</i>	<i>dura</i>	Manicoré - Rio Matupiri
A440902	RUC 07	<i>Elaeis oleifera</i>	<i>dura</i>	Manicoré – Atininga
A440906	RUC 07	<i>Elaeis oleifera</i>	<i>dura</i>	Manicoré - Rio Matupiri
A510528	RUC 225	<i>Elaeis oleifera</i>	<i>dura</i>	Amatari – Alambique
A510715	RUC 51	<i>Elaeis oleifera</i>	<i>dura</i>	Careiro - Igarapé Tapajós
A510726	RUC 148	<i>Elaeis oleifera</i>	<i>dura</i>	Autases - Nova Esperança
A510833	RUC 67	<i>Elaeis oleifera</i>	<i>dura</i>	Careiro – Caldeirão
A511014	RUC 225	<i>Elaeis oleifera</i>	<i>dura</i>	Amatari – Alambique
A441606	LM 10924	<i>Elaeis guineensis</i>	<i>tenera</i>	Angola
A441907	LM 9994	<i>Elaeis guineensis</i>	<i>tenera</i>	Yangambi
A442003	LM 9994	<i>Elaeis guineensis</i>	<i>tenera</i>	Yangambi
A442120	LM 9419	<i>Elaeis guineensis</i>	<i>tenera</i>	Costa do Marfim
A544029	PO 3717	<i>Elaeis guineensis</i>	<i>tenera</i>	Pobé
A545029	PO 4067	<i>Elaeis guineensis</i>	<i>tenera</i>	Nigéria Aba-Calabar
A545229	PO 4067	<i>Elaeis guineensis</i>	<i>tenera</i>	Nigéria Aba-Calabar
A630315	0.150/7152T	<i>Elaeis guineensis</i>	<i>tenera</i>	Nigéria
A630525	0.219/465D	<i>Elaeis guineensis</i>	<i>tenera</i>	Camarões
A630913	0.222/452T	<i>Elaeis guineensis</i>	<i>tenera</i>	Congo
A630920	0.233/5T	<i>Elaeis guineensis</i>	<i>tenera</i>	Congo
A401210	Bahia 43	<i>Elaeis guineensis</i>	<i>dura</i>	Bahia
A401304	Bahia 46	<i>Elaeis guineensis</i>	<i>dura</i>	Bahia
A401402	Bahia 53	<i>Elaeis guineensis</i>	<i>dura</i>	Bahia
A442204	DA 3079	<i>Elaeis guineensis</i>	<i>dura</i>	Deli – Dabou
A442220	DA 3079	<i>Elaeis guineensis</i>	<i>dura</i>	Deli – Dabou
A442514	DA 3208	<i>Elaeis guineensis</i>	<i>dura</i>	Deli – Dabou
A542221	YA 261.	<i>Elaeis guineensis</i>	<i>dura</i>	Yocoboe
A542223	YA 261.	<i>Elaeis guineensis</i>	<i>dura</i>	Yocoboe
A542526	LM 11864	<i>Elaeis guineensis</i>	<i>dura</i>	Costa do Marfim
A630207	0.150/3290T	<i>Elaeis guineensis</i>	<i>dura</i>	Nigéria
A630222	0.150/5789D	<i>Elaeis guineensis</i>	<i>dura</i>	Nigéria
A630304	0.150/7154T	<i>Elaeis guineensis</i>	<i>dura</i>	Nigéria

3. RESULTADOS

3.1 *Elaeis oleifera*

Segundo a metodologia de clusterização aplicada (Figura 1), a espécie *E. oleifera* dividiu-se em quatro grupos:

- Grupo A: contendo apenas A510528, o qual apresentou o maior diâmetro transversal do diásporo em relação aos demais, porém apresentou os menores valores quanto ao diâmetro longitudinal.
- Grupo B: contendo A410507, A410312, A410213 e A510715, os quais apresentaram os menores valores de diâmetro transversal para diásporos e amêndoas, e baixos valores para peso do diásporo;
- Grupo C: formado pelos acessos A313516, A440805, A440902, A440906, A313020 e A510833, as quais apresentaram maiores valores para peso do diásporo;
- Grupo D: reunindo A410517, A312902, A511014, A440320, A440322, A410610 e A510726, as quais apresentaram maiores valores para diâmetro longitudinal das amêndoas.

Na análise de componentes principais, tem-se que a proporção da variabilidade total explicada pelas duas primeiras componentes é de 68,8%. A primeira componente revela correlação direta entre peso do diásporo, peso da amêndoa e os diâmetros das amêndoas (transversal e longitudinal) e que estas variáveis estão indiretamente relacionadas com o número de locos e número de amêndoas (Tabela 2). Em termos de acessos, esse contraste discrimina os grupos D e B, enquanto D apresenta valores altos para o peso do diásporo, peso da amêndoa e diâmetros das amêndoas e valores baixos para o número de amêndoas e lócus e B, apresenta valores baixos para o peso do

diásporo, peso da amêndoa e diâmetros das amêndoas e valores altos para o número de amêndoas e lócus. A segunda componente mostra a relação direta entre número de lócus e número de amêndoas e por apresentar menores valores para essas variáveis, destacando-se o grupo B (Figura 2).

Os valores médios para a análise dos parâmetros externos considerados como peso, diâmetro transversal e longitudinal dos diásporos, encontram-se na Tabela 3. Considerando o desvio padrão, os maiores valores para a variável peso, foram registrados nos acessos A440322, A510726, A511014 e A312902 com $5,0 \pm 0,8$; $4,4 \pm 1,0$; $4,4 \pm 0,9$ e $4,4 \pm 1,0$ g, respectivamente. O maior valor de diâmetro transversal foi observado no acesso A510528 com $21,9 \pm 2$ mm e o maior diâmetro lateral observou-se em A510726 com $23,1 \pm 1,6$ mm.

A avaliação dos parâmetros internos mostrou que todos os acessos de *E. oleifera* apresentaram espessura de endocarpo acima de 2,0 mm. Com poucas exceções, a maioria dos diásporos é unilocular e contém uma amêndoa. A característica predominante nas amêndoas é o formato ovalado, uma vez que o diâmetro longitudinal para todos os acessos foi maior do que o diâmetro transversal. Os acessos A440320 e A440322 apresentaram os maiores embriões, medindo $3,3 \pm 0,6$ mm e $3,4 \pm 0,5$ mm, respectivamente. Da mesma forma, foram os acessos que apresentaram as amêndoas mais pesadas sendo $1,4 \pm 0,4$ e $1,6 \pm 0,3$ g, respectivamente (Tabela 4).

Observou-se que a distribuição dos grupos está fortemente ligada à região de origem (Manicoré, Amajari, Careiro, Moura e Autases). No entanto, as diferenças morfológicas entre acessos coletados em um mesmo local, são evidentes. Como pode ser observado no caso dos acessos coletados na região de Manicoré, os dados de agrupamento mostram uma divisão segundo suas características morfológicas, nos grupos B (A410507, A410312, A410213), C (A313516, A440805, A440902, A440906

e A313020) e D (A410517, A312902 e A410610), com maior concentração de acessos no grupo C. Esta separação também foi observada entre A510528 (grupo A) e A511014 (grupo D), ambos são originários da região de Amajari - Alambique e apresentaram formato e peso diferenciados. Observou-se que os acessos do grupo C correspondem a diásporos mais pesados e com formatos mais arredondados (Figuras 7E e F), semelhantes ao do grupo A, enquanto que os acessos do grupo B caracterizam-se por diásporos mais leves e de formato alongado (Figura 7D), assemelhando-se aqueles do grupo D.

3.2 *Elaeis guineensis* tipo *tenera*

Segundo a metodologia de clusterização aplicada (Figura 3), o tipo *tenera* dividiu-se em três grupos:

- Grupo A: formado por A630920, A545229 e A630525, os quais apresentaram os menores valores de diâmetro longitudinal de diásporo e de espessura do endocarpo;
- Grupo B: contendo A441606, A441907, A544029, A442003 e A630913, os quais apresentaram maior peso de diásporo e maiores valores de diâmetro longitudinal das amêndoas. Em média, destacaram-se também valores elevados para o diâmetro transversal do diásporo e das amêndoas;
- Grupo C: formado pelos acessos A442120, A545029 e A630315, os quais apresentaram peso médio mais elevado em relação aos demais grupos e maior espessura do endocarpo.

Na análise de componentes principais, tem-se que a proporção da variabilidade total explicada é de 76,6%. A primeira componente revela correlação direta entre peso do

diásporo, os diâmetros das amêndoas (transversal e longitudinal) e os diâmetros dos diásporos (transversal e longitudinal), sendo essas variáveis indiretamente relacionadas com tamanho do embrião (Tabela 5). Em termos de acessos, esse contraste discrimina os grupos A e B da seguinte maneira: em média, o grupo B apresenta valores altos para o peso do diásporo e diâmetros de amêndoas e diásporos, enquanto que o grupo A apresenta valores baixo para o diâmetro longitudinal do diásporo (Figura 4). A segunda componente mostra a relação direta entre o número de lócus e número de amêndoas que se relacionam de forma indireta com o peso da amêndoa e o tamanho do embrião. O grupo B se destaca quanto a essa componente por apresentar maiores valores de peso de diásporo, apesar de sua dispersão devido aos baixos valores do tamanho de embrião para os acessos A442003 e A630913 (Tabela 5).

Observa-se que a divisão dos grupos obedece a parâmetros biométricos e não somente de origem. O grupo A apresenta diásporos com formatos mais arredondados e endocarpo muito fino, podendo ser rompido facilmente quando prensado entre os dedos (Figura 7J). O grupo B apresenta diásporos com peso elevado e formato levemente alongado, caracterizado pela presença de amêndoas igualmente alongadas (Figura 7L), enquanto que o grupo C apresenta diásporos mais pesados conferido, provavelmente, pelo endocarpo mais espesso quando comparado aos indivíduos dos grupos A e B (Figura 7K).

Na avaliação dos parâmetros externos observou-se grande variação no peso dos diásporos, com médias variando entre $0,5 \pm 0,1$ g no acesso A630920 até $1,4 \pm 0,2$ g nos acessos A530913 e A441907. As medidas do diâmetro longitudinal foram um pouco maiores do que o diâmetro transversal, o que confere aos diásporos destes acessos o formato levemente alongado, principalmente na parte oposta aos poros germinativos (Tabela 6).

Quanto à morfologia interna observou-se grande variabilidade na espessura do endocarpo, com médias variando entre $0,2 \pm 0,1$ mm (A630920) até $0,9 \pm 0,2$ mm (A442120). Este acesso caracteriza-se por diásporos biloculados e contém, na maioria dos casos, 2 amêndoas. Assim como os diásporos, as amêndoas apresentam formato levemente alongado conferido pelo maior valor de diâmetro longitudinal em relação ao diâmetro transversal. O tamanho do embrião foi a característica de menor variação, com valores entre $2,1 \pm 0,4$ mm em A530913 até $3,0 \pm 0,4$ mm no acesso A545229. O peso das amêndoas, assim como outras características, teve grande variação de médias, sendo o menor valor observado no acesso A630525 com $0,3 \pm 0,0$ g e o maior de $0,8 \pm 0,1$ g em A630315 e A441907 (Tabela 7).

3.3 *Elaeis guineensis* tipo *dura*

Segundo a metodologia de clusterização aplicada (Figura 5), o tipo *dura* dividiu-se em três grupos:

- Grupo A: contando com A442204, A630222, A401210 e A401304, os quais apresentaram os maiores valores de diâmetro longitudinal de diásporos e amêndoas, também apresentou, em média, valores elevados para peso de diásporo, espessura do endocarpo e diâmetro transversal do diásporo;
- Grupo B: contendo A542223 e A542526, os quais apresentaram os menores valores de diâmetro longitudinal de diásporos e amêndoas, peso e diâmetro transversal de amêndoa. Porém, apresentou um número elevado de locos e amêndoas. Em média, foram observados valores baixos para peso de diásporo;
- Grupo C: formado pelos acessos A401402, A630207, A442220, A630304, A442514 e A542221, os quais apresentaram maiores valores para o tamanho do embrião;

Na análise de componentes principais, tem-se que a proporção da variabilidade total explicada é de 80,2%. A primeira componente sintetiza todas as variáveis, com exceção de número de locos e número de amêndoas, as quais se relacionam indiretamente com as demais (Tabela 8). Em termos de acessos, esse contraste discrimina os grupos A e B onde, A apresentou valores elevados para o peso de diásporo e diâmetros longitudinais de diásporos e amêndoas, enquanto que B, os valores foram baixos para tais variáveis e maiores para o número de locos e amêndoas (Figura 6). A segunda componente mostra a relação direta entre número de locos e número de amêndoas. O grupo A se destaca por apresentar menores valores para essas variáveis, contrastando com aqueles apresentados em B (Tabela 8).

A análise dos parâmetros externos mostra grande variabilidade no peso dos diásporos, com médias entre $2,3 \pm 0,4$ g (A542526) e $5,5 \pm 1,0$ g (A442204). Dentre os acessos avaliados, o *E. guineensis* tipo *dura* destaca-se por apresentar os maiores diásporos, como pode ser observado pelos valores diamétricos. O formato é predominantemente alongado e de textura áspera (Figuras 7G, H e I), com diâmetro longitudinal superior ao transversal em pelo menos 3,00 mm (Tabela 9).

No estudo da morfologia interna, observou-se espessura de endocarpo variando entre $1,6 \pm 0,3$ mm (A542526) à $2,8 \pm 0,3$ mm (A442204). Diásporos predominantemente multiloculares, podendo conter até quatro amêndoas, oblongas, com diâmetro longitudinal consideravelmente maior do que o transversal. O comprimento médio do embrião variou de $1,2 \pm 0,4$ mm no acesso A542526 à $3,1 \pm 0,8$ mm em A401304, os maiores embriões dentre todos os materiais avaliados. O peso da amêndoa foi a característica de maior variação entre os acessos, amêndoas mais leves foram registradas em A542526 com peso médio de $0,3 \pm 0,1$ g e as mais pesadas, no acesso A442204 com média de $1,5 \pm 0,3$ g (Tabela 10).

Tabela 2. Coeficientes de ponderação das variáveis de diásporos de *E. oleifera* nas duas primeiras componentes principais (CP1 e CP2).

Variável	CP1	CP2
Peso do diásporo	-0,946	-0,251
Diâmetro transversal do diásporo	-0,642	-0,299
Diâmetro longitudinal do diásporo	-0,474	-0,464
Espessura de endocarpo	-0,455	0,031
Numero de locos	0,450	-0,873
Peso das amêndoas	0,450	-0,873
Diâmetro transversal da amêndoa	-0,866	-0,158
Diâmetro longitudinal da amêndoa	-0,820	-0,255
Comprimento do embrião	-0,601	0,344
Numero de amêndoas	-0,925	-0,013

CP1 (Componente Principal 1) - expressa a relação entre as variáveis externas entre si e com as variáveis internas; CP2 (Componente Principal 2) – expressa a relação entre as variáveis internas.

Tabela 3. Estatística descritiva para morfologia externa dos diásporos dos acessos de *E. oleifera*.

Acessos	Peso (g) ¹	DT (mm) ²	DL (mm) ³
	Media ± Desvio padrão		
A312902	4,4 ± 1,0	18,6 ± 1,8	22,0 ± 2,2
A313020	3,5 ± 0,7	17,4 ± 2,1	20,6 ± 2,1
A313516	3,6 ± 0,6	17,3 ± 1,7	19,2 ± 2,2
A410213	2,7 ± 0,3	14,4 ± 1,9	19,8 ± 1,5
A410312	2,3 ± 0,4	13,9 ± 1,3	18,9 ± 1,8
A410507	3,0 ± 0,7	13,9 ± 1,5	19,9 ± 2,0
A410517	3,8 ± 1,1	18,7 ± 2,4	21,3 ± 2,7
A410610	3,2 ± 0,7	17,5 ± 2,0	22,0 ± 2,6
A440320	4,3 ± 0,8	17,8 ± 2,0	22,4 ± 1,4
A440322	5,0 ± 0,8	18,2 ± 2,0	21,7 ± 1,7
A440805	3,3 ± 1,1	18,2 ± 2,5	19,6 ± 1,8
A440902	3,5 ± 0,8	17,1 ± 2,0	21,0 ± 1,6
A440906	3,1 ± 0,6	16,5 ± 1,7	20,9 ± 2,7
A510715	2,6 ± 0,6	14,6 ± 1,7	20,0 ± 1,4
A510726	4,4 ± 1,0	16,6 ± 1,9	23,1 ± 1,6
A511014	4,4 ± 0,9	18,9 ± 2,2	22,0 ± 2,9
A510833	3,0 ± 0,5	16,7 ± 1,6	20,0 ± 1,4
A510528	3,7 ± 0,8	21,9 ± 2,2	17,1 ± 2,4

¹O peso (g) é relativo ao peso médio de cada diásporo; ²DT – Diâmetro Transversal; ³DL – Diâmetro Longitudinal

Tabela 4. Estatística descritiva para morfologia interna de endocarpos e amêndoas de *E. oleifera*.

Acessos	Espessura endocarpo (mm)	Locos (número)	Amêndoas (número)	DT (mm) ¹	DL (mm) ²	Tamanho embrião (mm)	Peso amêndoa (g) ³
Média ± Desvio padrão							
A312902	2,8 ± 0,4	1,1 ± 0,3	1,1 ± 0,3	12,3 ± 1,5	14,7 ± 2,1	2,5 ± 0,9	1,0 ± 0,3
A313020	2,7 ± 0,4	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0	11,4 ± 1,9	13,4 ± 1,8	1,9 ± 0,9	0,7 ± 0,2
A313516	2,7 ± 0,3	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0	11,8 ± 0,9	12,9 ± 1,6	2,3 ± 0,7	0,8 ± 0,2
A410213	2,4 ± 0,3	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0	9,40 ± 1,5	12,6 ± 1,1	2,7 ± 0,6	0,6 ± 0,1
A410312	2,2 ± 0,3	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0	9,60 ± 1,5	13,3 ± 1,2	2,3 ± 0,6	0,6 ± 0,1
A410507	2,5 ± 0,3	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0	10,6 ± 1,7	13,2 ± 2,1	2,7 ± 0,7	0,7 ± 0,2
A410517	2,5 ± 0,4	1,2 ± 0,4	1,2 ± 0,4	12,4 ± 1,6	14,3 ± 1,4	2,5 ± 0,6	0,9 ± 0,2
A410610	2,4 ± 0,4	1,2 ± 0,4	1,2 ± 0,4	10,4 ± 1,2	14,0 ± 1,8	1,9 ± 0,4	0,6 ± 0,1
A440320	2,3 ± 0,4	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0	12,7 ± 1,7	15,3 ± 2,0	3,3 ± 0,6	1,4 ± 0,4
A440322	2,7 ± 0,3	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0	11,9 ± 1,6	15,9 ± 1,7	3,4 ± 0,5	1,6 ± 0,3
A440805	2,2 ± 0,3	1,1 ± 0,3	1,1 ± 0,3	11,4 ± 1,4	12,9 ± 1,7	2,8 ± 0,4	0,8 ± 0,2
A440902	2,5 ± 0,5	1,1 ± 0,3	1,1 ± 0,3	10,8 ± 1,6	13,8 ± 1,5	2,6 ± 0,6	0,8 ± 0,2
A440906	2,2 ± 0,4	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0	11,4 ± 1,6	13,9 ± 2,0	2,9 ± 0,6	0,8 ± 0,2
A510715	2,2 ± 0,3	1,3 ± 0,6	1,3 ± 0,6	9,60 ± 1,1	13,0 ± 0,9	1,8 ± 0,4	0,6 ± 0,1
A510726	2,3 ± 0,3	1,1 ± 0,2	1,1 ± 0,2	11,8 ± 2,0	15,3 ± 2,3	2,7 ± 0,8	1,2 ± 0,4
A511014	3,0 ± 0,4	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0	12,0 ± 1,8	14,7 ± 2,9	2,3 ± 0,4	0,9 ± 0,3
A510833	2,4 ± 0,3	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0	11,3 ± 1,7	12,9 ± 1,2	2,7 ± 0,5	0,8 ± 0,2
A510528	2,3 ± 0,3	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0	11,4 ± 2,4	15,8 ± 1,3	2,2 ± 0,5	1,0 ± 0,3

¹DT – Diâmetro Transversal; ²DL – Diâmetro Longitudinal; ³O peso (g) é relativo ao peso médio de cada amêndoa;

Tabela 5. Coeficientes de ponderação das variáveis de diásporos de *E. guineensis* tipo *tenera* nas duas primeiras componentes principais (CP1 e CP2).

Variável	CP1	CP2
Peso do diásporo	-0,990	0,077
Diâmetro transversal do diásporo	-0,934	-0,037
Diâmetro longitudinal do diásporo	-0,788	0,124
Espessura de endocarpo	-0,521	0,054
Numero de locos	-0,671	-0,683
Peso das amêndoas	-0,671	-0,683
Diâmetro transversal da amêndoa	-0,722	0,523
Diâmetro longitudinal da amêndoa	-0,815	0,441
Comprimento do embrião	0,452	0,718
Numero de amêndoas	-0,525	0,640

CP1 (Componente Principal 1) - expressa a relação entre as variáveis externas entre si e com as variáveis internas; CP2 (Componente Principal 2) – expressa a relação entre as variáveis internas.

Tabela 6. Estatística descritiva para morfologia externa dos diásporos de *E. guineensis* tipo *tenera*.

Acessos	Peso (g) ¹	DT (mm) ²	DL (mm) ³
	Media ± Desvio padrão		
A441606	1,3 ± 0,3	12,4 ± 1,4	16,9 ± 2,4
A441907	1,4 ± 0,2	13,3 ± 0,8	16,4 ± 1,0
A442003	1,3 ± 0,2	14,2 ± 2,4	15,6 ± 1,5
A442120	0,6 ± 0,2	10,4 ± 1,1	16,2 ± 2,6
A544029	1,1 ± 0,3	12,5 ± 1,6	16,6 ± 1,2
A545029	0,7 ± 0,2	10,2 ± 1,4	14,0 ± 1,1
A545229	0,6 ± 0,2	9,9 ± 1,3	12,0 ± 1,1
A630315	1,1 ± 0,3	11,1 ± 1,2	13,9 ± 1,6
A630525	0,5 ± 0,2	10,1 ± 1,9	11,6 ± 1,1
A530913	1,4 ± 0,2	13,1 ± 1,4	15,5 ± 1,2
A630920	0,5 ± 0,1	9,7 ± 1,3	9,8 ± 0,8

¹O peso (g) é relativo ao peso médio de cada diásporo; ²DT – Diâmetro Transversal; ³DL – Diâmetro Longitudinal

Tabela 7. Estatística descritiva para morfologia interna de endocarpos e amêndoas de acessos de *E. guineensis* tipo *tenera*.

Acessos	Espessura endocarpo (mm)	Locos (número)	Amêndoas (número)	DT (mm) ¹	DL (mm) ²	Tamanho embrião (mm)	Peso amêndoa (g) ³
Media ± Desvio padrão							
A441606	0,7 ± 0,1	1,3 ± 0,4	1,3 ± 0,4	10,6 ± 1,5	13,7 ± 1,6	2,8 ± 0,6	0,7 ± 0,2
A441907	0,8 ± 0,2	1,1 ± 0,2	1,1 ± 0,2	11,5 ± 0,7	12,6 ± 0,8	2,8 ± 0,6	0,8 ± 0,1
A442003	0,5 ± 0,1	2,0 ± 0,4	2,0 ± 0,4	9,9 ± 0,8	12,1 ± 0,8	2,5 ± 0,5	0,4 ± 0,1
A442120	0,9 ± 0,2	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0	8,1 ± 0,9	9,3 ± 0,9	2,5 ± 0,8	0,3 ± 0,1
A544029	0,7 ± 0,2	1,6 ± 0,7	1,6 ± 0,7	9,2 ± 1,0	12,0 ± 1,5	2,7 ± 0,5	0,4 ± 0,1
A545029	0,8 ± 0,1	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0	8,7 ± 1,5	11,4 ± 1,1	2,7 ± 0,7	0,5 ± 0,2
A545229	0,4 ± 0,1	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0	8,8 ± 1,3	10,7 ± 1,1	3,0 ± 0,4	0,4 ± 0,1
A630315	0,8 ± 0,1	1,7 ± 0,5	1,7 ± 0,5	9,5 ± 1,1	10,8 ± 1,2	2,3 ± 0,4	0,8 ± 0,1
A630525	0,4 ± 0,1	1,4 ± 0,5	1,4 ± 0,5	7,8 ± 0,6	9,3 ± 0,9	2,7 ± 0,7	0,3 ± 0,0
A530913	0,7 ± 0,2	2,0 ± 0,3	2,0 ± 0,3	10,0 ± 0,9	11,7 ± 1,0	2,1 ± 0,4	0,4 ± 0,1
A630920	0,2 ± 0,1	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0	9,6 ± 0,9	9,6 ± 1,0	2,7 ± 0,6	0,5 ± 0,1

¹DT – Diâmetro Transversal; ²DL – Diâmetro Longitudinal; ³O peso (g) é relativo ao peso médio de cada amêndoa;

Tabela 8. Coeficientes de ponderação das variáveis de diásporos de *E. guineensis* tipo *dura* nas duas primeiras componentes principais (CP1 e CP2).

Variável	CP1	CP2
Peso do diásporo	-0,900	0,382
Diâmetro transversal do diásporo	-0,760	0,502
Diâmetro longitudinal do diásporo	-0,813	-0,059
Espessura do endocarpo	-0,790	0,110
Numero de locos	0,730	0,634
Peso das amêndoas	0,730	0,634
Diâmetro transversal da amêndoa	-0,919	0,222
Diâmetro longitudinal da amêndoa	-0,810	-0,103
Comprimento do embrião	-0,730	-0,229
Numero de amêndoas	-0,933	0,222

CP1 (Componente Principal 1) - expressa a relação entre as variáveis externas entre si e com as variáveis internas; CP2 (Componente Principal 2) – expressa a relação entre as variáveis internas.

Tabela 9. Estatística descritiva para morfologia externa dos diásporos de *E. guineensis* tipo *dura*.

Acessos	Peso (g) ¹	DT (mm) ²	DL (mm) ³
	Media ± Desvio padrão		
A401210	4,6 ± 1,3	15,9 ± 2,7	26,0 ± 3,6
A401304	4,6 ± 0,8	18,1 ± 1,3	26,8 ± 3,4
A401402	4,7 ± 1,3	18,3 ± 3,0	21,5 ± 3,3
A442204	5,5 ± 1,0	20,7 ± 1,8	25,8 ± 3,6
A442220	2,9 ± 0,7	16,0 ± 2,2	21,4 ± 2,7
A442514	3,0 ± 0,5	16,3 ± 1,6	23,9 ± 3,5
A542221	2,8 ± 1,0	15,3 ± 1,7	23,2 ± 4,5
A542223	2,4 ± 0,7	15,6 ± 2,3	18,5 ± 3,1
A542526	2,3 ± 0,4	15,6 ± 1,7	19,6 ± 2,2
A630207	2,5 ± 0,5	15,1 ± 2,0	22,3 ± 2,9
A630222	3,4 ± 0,9	16,8 ± 2,1	25,3 ± 3,9
A630304	2,8 ± 0,9	15,3 ± 2,0	20,2 ± 2,8

¹O peso (g) é relativo ao peso médio de cada diásporo; ²DT – Diâmetro Transversal; ³DL – Diâmetro Longitudinal

Tabela 10. Estatística descritiva para morfologia interna de endocarpos e amêndoas de acessos de *E. guineensis* tipo *dura*.

Acessos	Espessura endocarpo (mm)	Locos (número)	Amêndoas (número)	DT (mm) ¹	DL (mm) ²	Tamanho embrião (mm)	Peso amêndoa (g) ³
Media ± Desvio padrão							
A401210	2,1 ± 0,4	1,3 ± 0,6	1,3 ± 0,6	12,9 ± 1,4	17,5 ± 1,9	2,9 ± 0,7	1,2 ± 0,3
A401304	2,7 ± 0,5	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0	12,4 ± 0,9	15,8 ± 1,2	3,1 ± 0,8	1,1 ± 0,1
A401402	2,6 ± 0,4	1,4 ± 0,5	1,4 ± 0,5	11,7 ± 1,5	12,8 ± 2,1	2,9 ± 0,6	1,0 ± 0,2
A442204	2,8 ± 0,3	1,1 ± 0,2	1,1 ± 0,2	14,6 ± 1,7	17,0 ± 1,9	2,4 ± 0,6	1,5 ± 0,3
A442220	1,9 ± 0,3	1,1 ± 0,3	1,1 ± 0,3	11,5 ± 1,3	14,6 ± 1,7	2,3 ± 0,5	0,9 ± 0,2
A442514	1,7 ± 0,2	1,2 ± 0,4	1,2 ± 0,4	11,7 ± 0,9	13,8 ± 1,0	2,5 ± 0,8	0,9 ± 0,2
A542221	2,3 ± 0,4	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0	9,6 ± 1,0	12,4 ± 2,3	2,0 ± 0,0	0,5 ± 0,1
A542223	2,0 ± 0,4	1,3 ± 0,6	1,3 ± 0,6	9,3 ± 1,3	11,8 ± 2,1	1,8 ± 0,4	0,5 ± 0,1
A542526	1,6 ± 0,3	2,3 ± 0,6	2,3 ± 0,6	8,7 ± 0,9	10,7 ± 0,7	1,2 ± 0,4	0,3 ± 0,1
A630207	1,5 ± 0,3	1,5 ± 0,5	1,5 ± 0,5	10,3 ± 0,9	15,1 ± 1,8	2,2 ± 0,5	0,7 ± 0,2
A630222	2,3 ± 0,4	1,1 ± 0,2	1,1 ± 0,2	10,2 ± 1,0	15,6 ± 2,2	2,2 ± 0,5	0,7 ± 0,2
A630304	2,0 ± 0,4	1,3 ± 0,5	1,3 ± 0,5	10,5 ± 1,2	14,2 ± 1,1	3,0 ± 0,6	0,7 ± 0,1

¹DT – Diâmetro Transversal; ²DL – Diâmetro Longitudinal; ³O peso (g) é relativo ao peso médio de cada amêndoa;

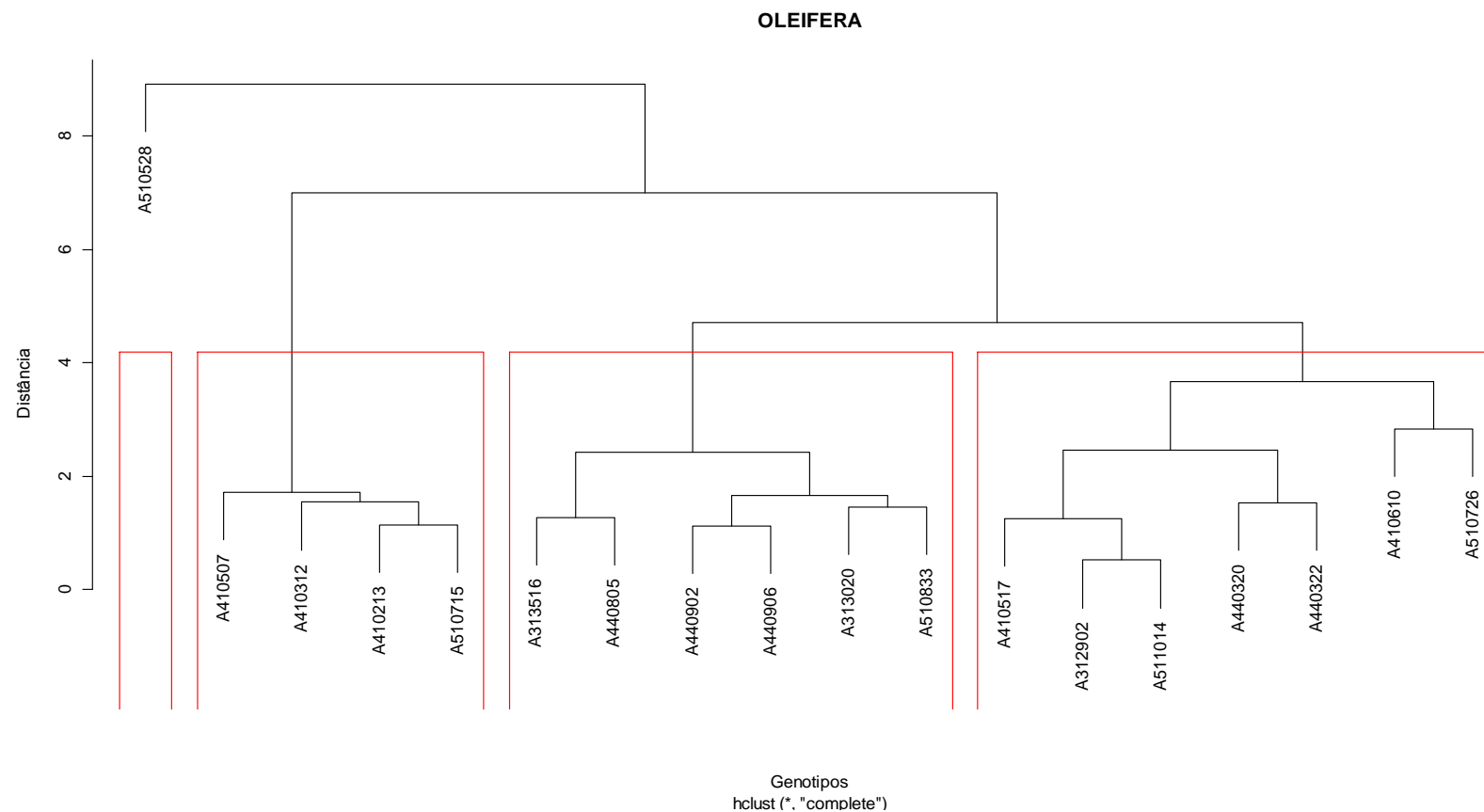


Figura 1. Agrupamento dos acessos de *E. oleifera* usando a distância euclidiana média, calculada a partir das variáveis peso e diâmetro longitudinal e transversal dos diásporos.

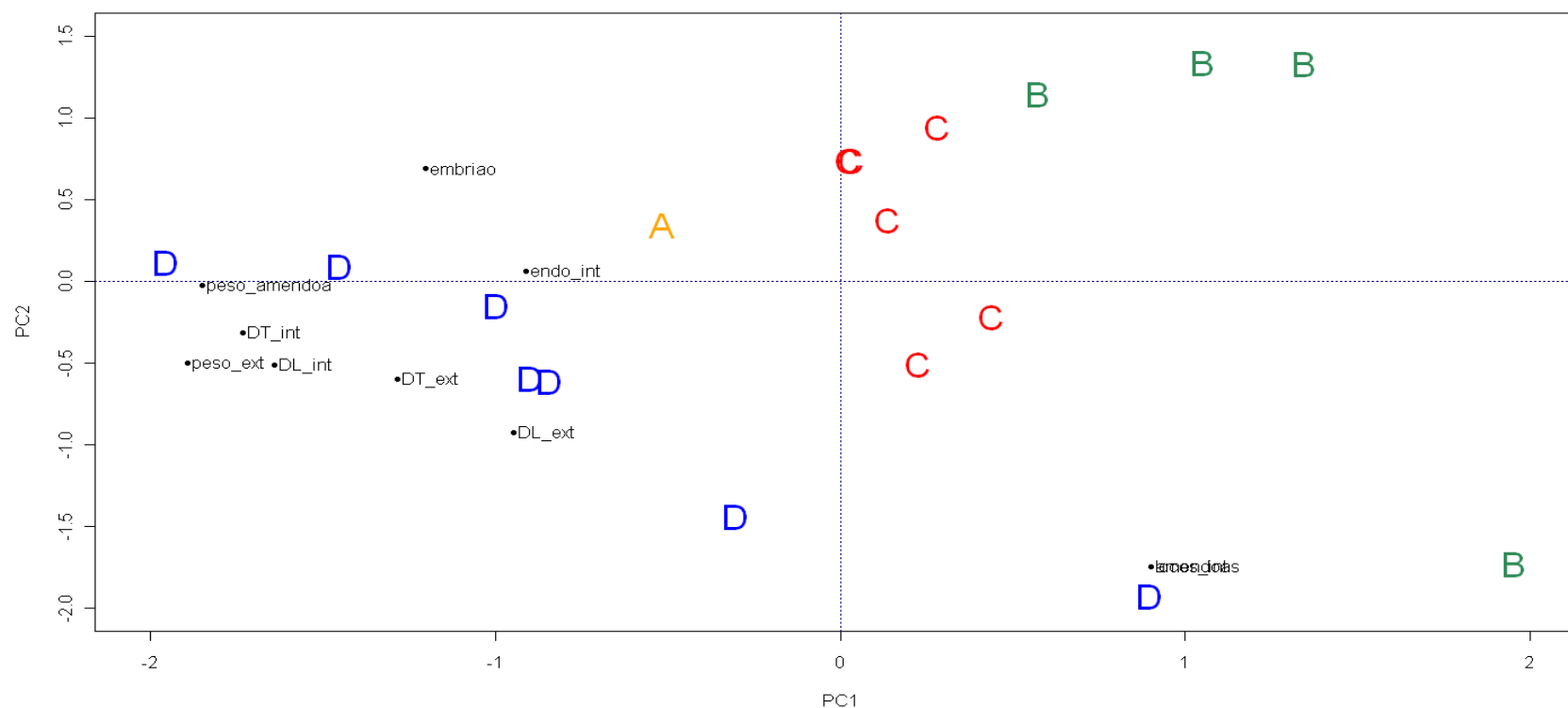


Figura 2. Componentes principais para *E. oleifera*, mostrando a separação entre os grupos com ênfase na discriminação entre B e D. A componente principal 1 (CP1) representa os parâmetros externos: peso dos diásporos e diâmetros transversal (DT) e longitudinal (DL); Componente principal 2 (CP2) representa os parâmetros internos: espessura de endocarpo, números de lócus e amêndoas, peso das amêndoas, diâmetros transversal (DT) e longitudinal (DL) e tamanho do embrião.

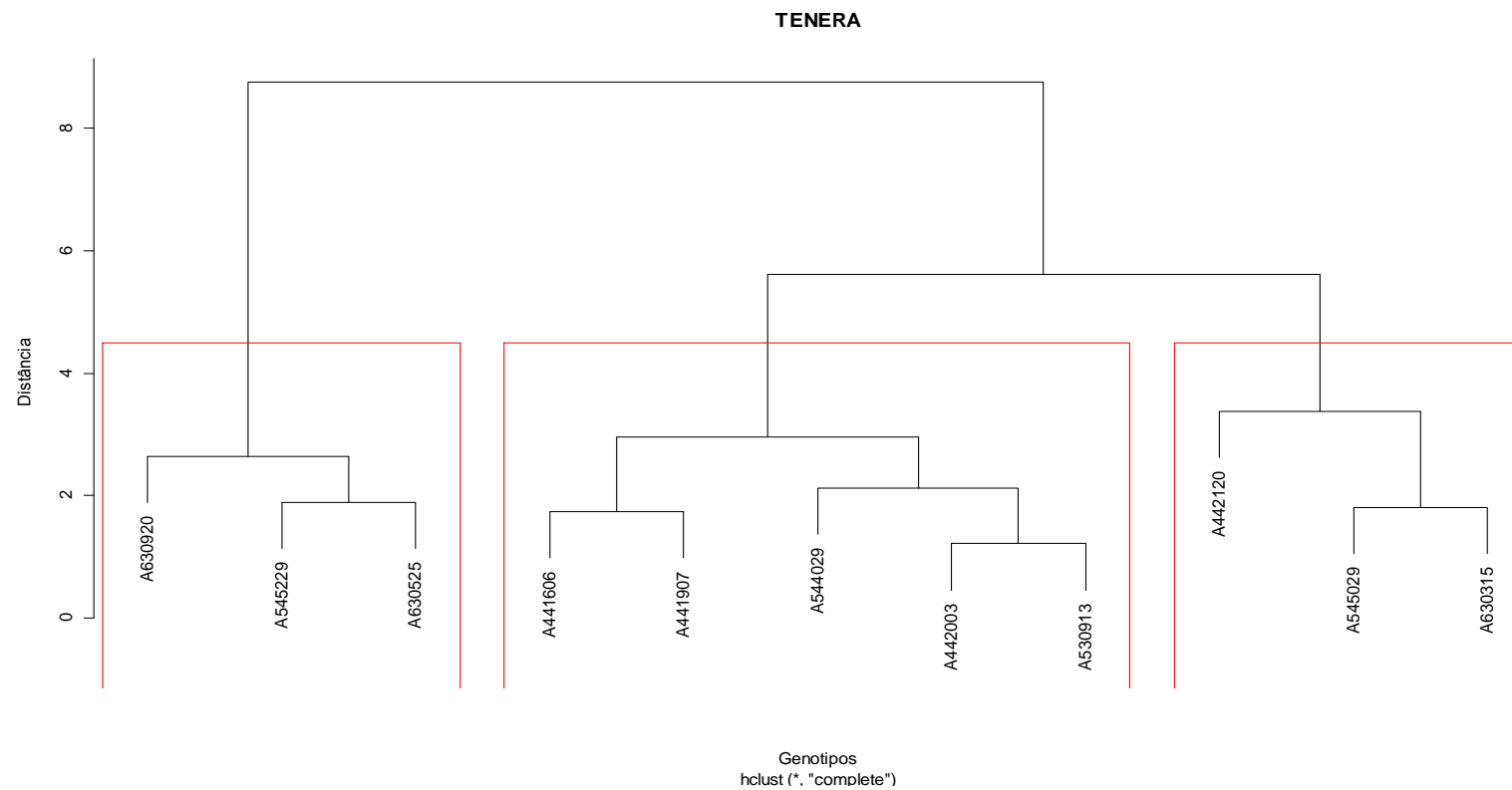


Figura 3. Agrupamento dos acessos de *E. guineensis* tipo *tenera* usando a distância euclidiana média, calculada a partir das variáveis peso e diâmetro longitudinal e transversal dos diásporos.

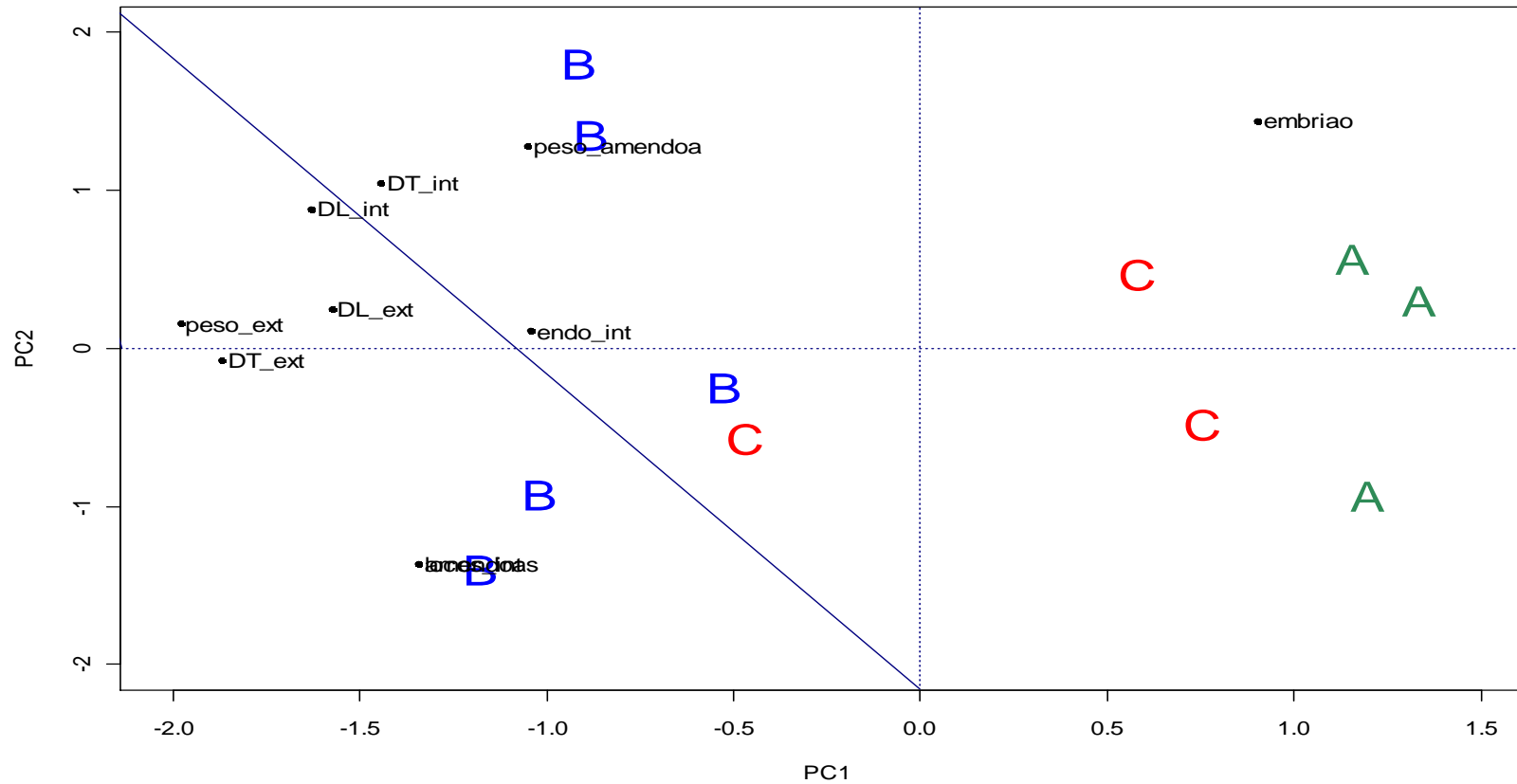


Figura 4. Componentes principais para *E. guineensis* tipo *tenera* mostrando a separação entre os grupos A e B. A componente principal 1 (PC1) representa os parâmetros externos: peso dos diásporos e diâmetros transversal (DT) e longitudinal (DL); Componente principal 2 (PC2) representa os parâmetros internos: espessura de endocarpo, números de lócus e amêndoas, peso das amêndoas, diâmetros transversal (DT) e longitudinal (DL) e tamanho do embrião.

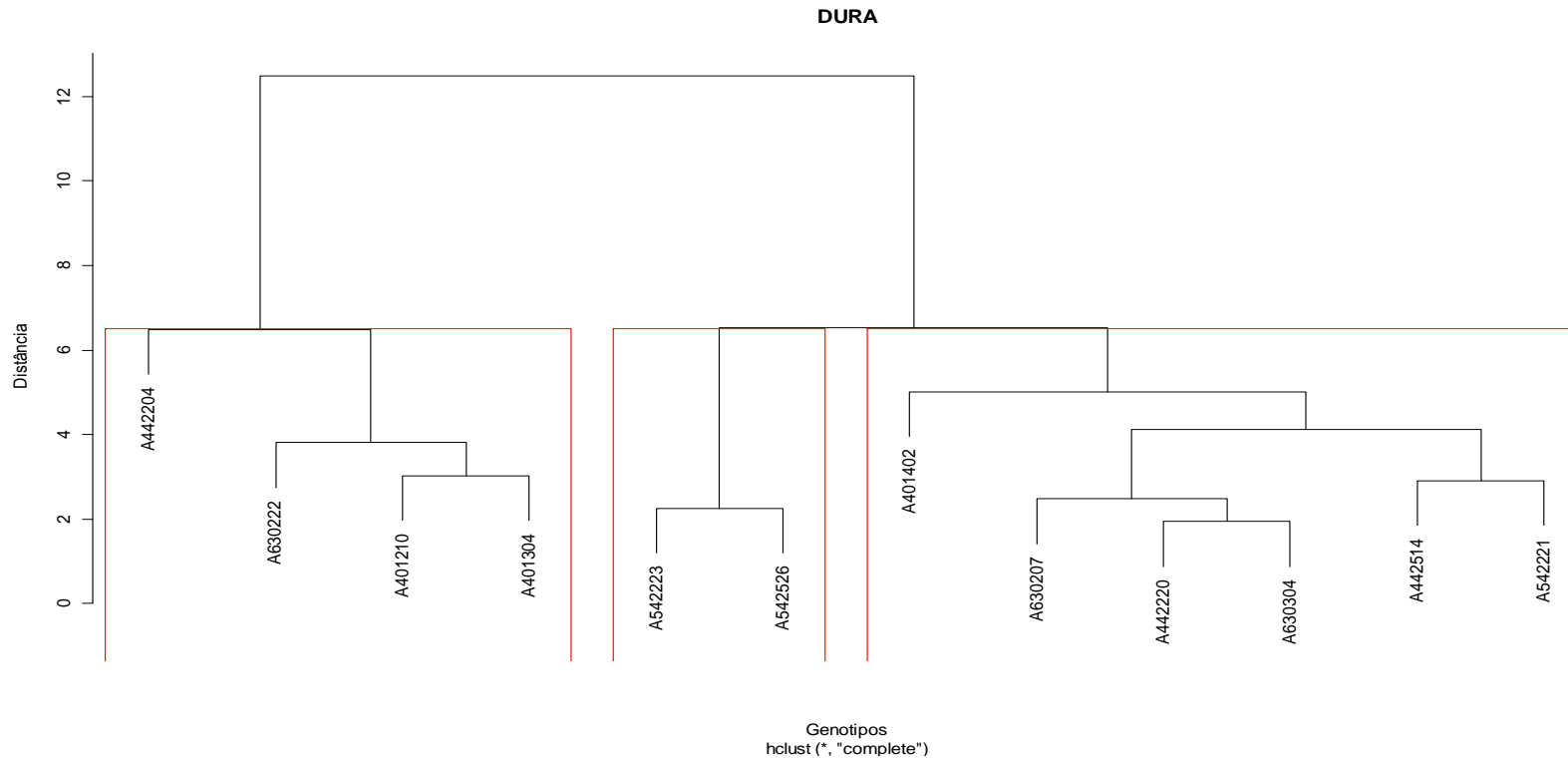


Figura 5. Agrupamento dos acessos de *E. guineensis* tipo *dura* usando a distância euclidiana média, calculada a partir das variáveis peso e diâmetro longitudinal e transversal dos diásporos.

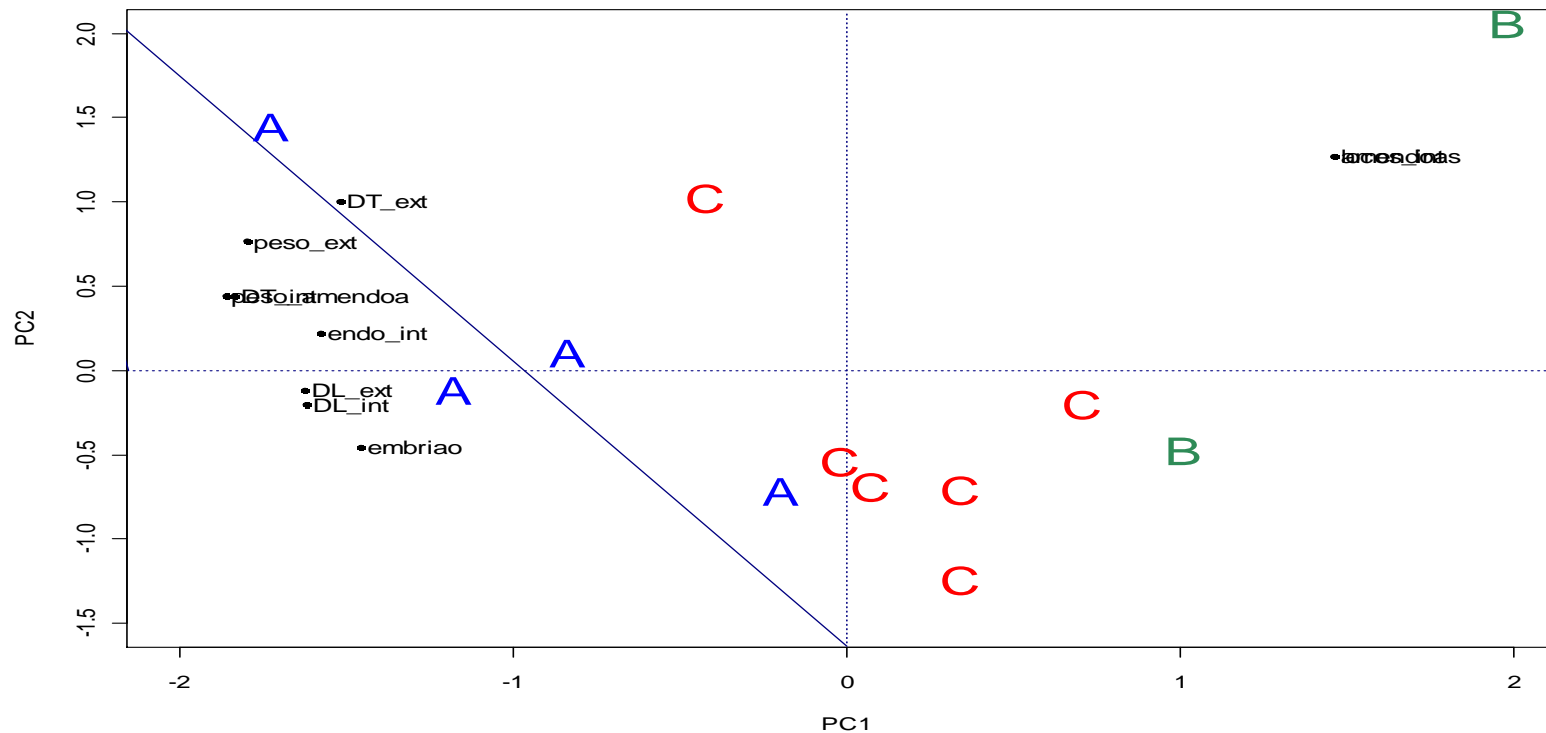


Figura 6. Componentes principais (CP) para *E. guineensis* tipo *dura* mostrando a separação entre os grupos A e B. A componente principal 1 (PC1) representa os parâmetros externos: peso dos diásporos e diâmetros transversal (DT) e longitudinal (DL); Componente principal 2 (PC2) representa os parâmetros internos: espessura de endocarpo, números de lócus e amêndoas, peso das amêndoas, diâmetros transversal (DT) e longitudinal (DL) e tamanho do embrião.

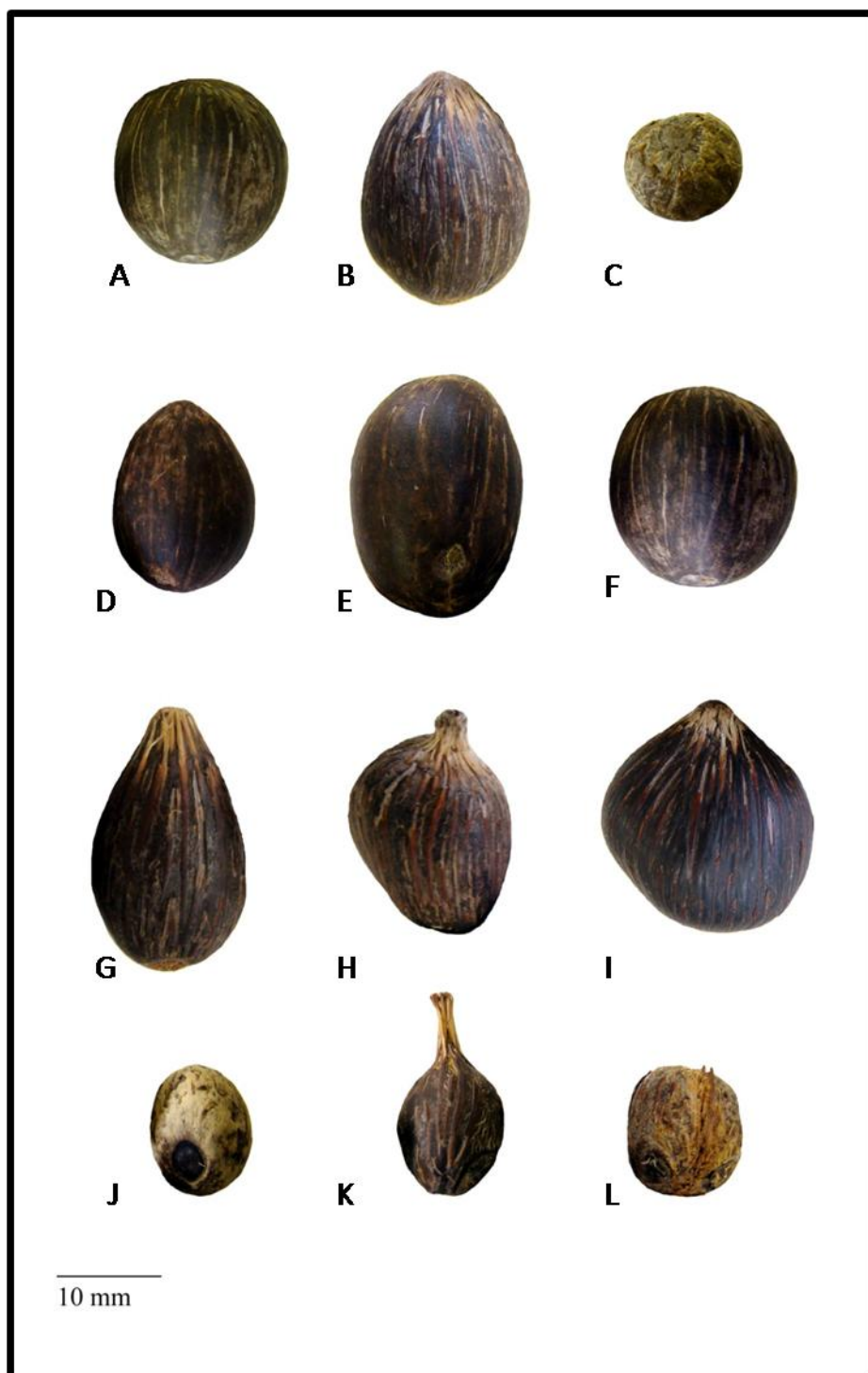


Figura 7. Diversidade morfológica entre diásporos de diferentes espécies de palma de óleo: *Elaeis oleifera* (A), *E. guineensis* tipo *dura* (B) e *E. guineensis* tipo *tenera* (C); os diásporos D, E e F ilustram os formatos observados em *E. oleifera*, que se diferencia das demais pela textura lisa do endocarpo. Os diásporos G, H e I, representam a variabilidade observada em *E. guineensis* tipo *dura*. As figuras J, K e L correspondem aos diásporos de *E. guineensis* tipo *tenera*, com tamanho reduzido em relação aos demais.

4. DISCUSSÃO

4.1 *Elaeis oleifera*

O estudo da biometria de diásporos em *E. oleifera* mostrou grande variabilidade dentro da espécie e que, algumas características podem ser identificadas através da morfologia. Escobar (1981) observou diferenças significativas entre acessos e foi um dos primeiros autores a quantificar esta variabilidade através do estudo de características vegetativas como a conformação de plantas, pecíolo das folhas e coloração dos frutos, além da composição do óleo. Ademais, variações morfológicas em populações coletadas na América do sul e central, relativas à biometria de frutos mostrou diferenças significativas entre e dentre populações (Rajanaidu, 1983). Mohd Din et al. (2000) estudaram os aspectos morfológicos de progênies coletadas no Panamá, Costa Rica, Colômbia e Honduras, dentre os aspectos avaliados, foram observadas diferenças significativas entre progênies de diferentes países quanto ao peso médios os frutos e peso médio de diásporos e amêndoas.

O estudo da diversidade genética em populações amazônicas de *E. oleifera* empregando-se diferentes métodos de análise (morfologia, ecótipos, isoenzimas ou DNA nuclear), mostrou que a divisão dos grupos pode coincidir ou não dependendo do estudo realizado. Considerando a morfologia polínica, é possível observar a divisão das populações em três grupos, coincidentes com a localização geográfica (Martins et al. 2002). Barcelos et al. (2002), relata que através da análise de fragmentos de DNA, a diversidade genética observada nas populações amazônicas foi maior do que aquela observada em populações coletadas no Peru, America Central e Guyana, além de observar a divisão destas, em grupos de acordo com a origem geográfica.

Moretzsohn et al. (2002) utilizando marcadores RAPD verificaram que os acessos de *E. oleifera* apresentam níveis moderados de diversidade, quando comparados aqueles observados em *E. guineensis* e que, os agrupamentos estavam correlacionados com sua dispersão geográfica ao longo da bacia amazônica. No entanto, as análises biométricas dos diásporos confirmaram algumas destas conclusões, mas como os estudos consideraram indivíduos diferentes, embora fossem da mesma procedência, verificou-se resultados complementares que são descritos a seguir.

No trabalho de Moretzsohn et al. (2002) um dos agrupamentos formados reuniu os acessos de origem Careiro, Moura e Amajari. Pela morfologia de diásporos observou-se um rearranjo entre essas populações e uma divisão intra-populacional entre os acessos Careiro e Amajari. Nos novos agrupamentos baseado em caracteres morfológicos, o acesso A510715 (Careiro) agrupou-se com os indivíduos do grupo B de origem Manicoré (Igarapé-Açu e Democracia) e A510833 (Careiro) com os indivíduos do grupo C, também de origem Manicoré, porém de localidades diferentes (Rio Madeira, Rio Matupiri e Atininga). Os acessos de origem Moura (A440320 e A440322) e Amajari (A511014) agruparam-se entre eles e juntos, com outros acessos de diversas origens no grupo D: Manicoré-Liberdade (A410517); Manicoré-Rio Madeira (A312902), Manicoré-Democracia (A410610) e Autases (A510726). O acesso A510528 (Amajari) apresentou características morfológicas muito diferentes, formando o grupo A, isolado dos demais.

A maior parte dos acessos de *E. oleifera* avaliados em ambos os trabalhos, são de origem Manicoré. Moretzsohn et al. (2002) observaram que 84% dos acessos Manicoré analisados por RAPD formaram um único agrupamento. No presente trabalho avaliou-se 11 acessos Manicoré que resultaram na formação de três grupos distintos, evidenciando a variabilidade entre esta população. O grupo C concentrou a maior parte

dos acessos, sendo: Manicoré-Rio Madeira (A313516, A313020), Manicoré-Rio Matupiri (A440805, A440906) e Manicoré-Atininga (A440902). Observou-se diferenças consideráveis entre os acessos Manicoré-Democracia que se dividiram em dois grupos; o grupo A reuniu acessos Manicoré-Democracia com Manicoré-Igarapé-Açu. O grupo D reuniu acessos Manicoré-Democracia com Manicoré-Liberdade e Manicoré-Rio Madeira, sendo que este último, diferiu dos demais acessos da mesma procedência do grupo C.

4.2 *Elaeis guineensis* tipo *tenera*

Entre os acessos avaliados, o tipo *tenera* foi aquele que apresentou as características mais divergentes. Diásporos e amêndoas de tamanho reduzido e endocarpo bastante fino, quando comparado com *E. oleifera* e *E. guineensis* tipo *dura*. Plantas de palma de óleo tipo *tenera* são híbridos naturais ou artificiais entre indivíduos tipo *dura*, com endocarpo mais espesso e indivíduos tipo *pisifera* de endocarpo fino ou ausente (Rival & Parveez, 2005). Provavelmente a variabilidade observada no estudo morfológico está diretamente relacionada com os cruzamentos que deram origem aos acessos tipo *tenera* mantidos no banco de germoplasma da Embrapa.

Observou-se também a formação de três grupamentos distintos o que demonstra a variabilidade intra e inter-populacional, como foi constatado nos acessos de origem Nigéria, Nigéria Aba-Calabar e Congo. No entanto, estudos sobre variabilidade genética em *E. guineensis* tipo *tenera* são escassos e inconsistentes. Um estudo realizado por Rajanaidu (1987) relata a existência de variabilidade morfológica entre acessos *tenera* coletados na Tanzânia e Madagascar. O autor observou que a frequência de indivíduos *tenera* em populações naturais é de 10% e, as variações mais significativas entre as

populações foram observadas, no peso dos frutos que foi em média, de 1,6 g para os materiais coletados em Madagascar e 8,5 g para aqueles coletados na Tanzânia. Esta variação no peso, também foi observada no presente estudo, tanto para diásporos quanto nas amêndoas.

A biometria de diásporos do tipo *tenera*, mostrou grande variação no peso, as médias foram de 0,4 a 1,6 g para diásporos e 0,2 a 0,9 g para amêndoas. Resultado semelhante foi observado por Akinoso & Raji (2011), onde a média da massa dos diásporos variou entre 1,9 a 3,7 g e a das amêndoas de 1,1 a 1,7 g, valores significativamente superiores aos observados no presente estudo. Os autores também relatam que a espessura de endocarpo no tipo *tenera* em média, varia de 0,5 a 2,0 mm e, a estrutura se rompe com facilidade com aplicação de baixa compressão mecânica.

4.3 *Elaeis guineensis* tipo *dura*

Os agrupamentos observados demonstram a variabilidade entre os acessos, especialmente aqueles de mesma origem, divergindo em parte, dos dados obtidos através de marcadores moleculares. Um estudo realizado com marcadores microsatélites (SSR) em acessos do tipo *dura* mantidos no banco de germoplasma da Embrapa Amazônia Ocidental, mostrou que os níveis de variação alélica foram relativamente baixos uma vez que estes têm ascendência em apenas sete plantas e passaram por seleção durante a condução do programa de melhoramento. A baixa diversidade genética observada nestes acessos pode ter sido causada pelo uso de poucas plantas fundadoras e sucessivas gerações de autofecundação ou cruzamento entre irmãos, seguidas de deriva genética (Hayati et al., 2004, Ferreira et al., 2012).

O estudo da diversidade genética através de marcadores moleculares tipo RFLP realizado em 38 acessos de *E. guineensis* mantidos também no banco de germoplasma da Embrapa Amazônia Ocidental (Barcelos et al., 2002) evidenciou a divisão do grupo Africano em três sub-grupos de acordo com a origem, sendo que Deli-Dabou formou um grupo isolado dos demais. Através da análise morfológica dos diásporos e amêndoas, observou-se a divisão do grupo Deli-Dabou, sendo um acesso (Grupo A) caracterizado por amêndoas e diásporos mais pesados e maior espessura de endocarpo e os demais (Grupo C) com maior tamanho de embriões.

A mesma divisão foi observada nos grupos de origem Nigéria e Bahia. A proximidade dos acessos de origem Bahia com os de origem africana, se deve ao fato de que os indivíduos mantidos no banco de germoplasma da Embrapa, coletados na década de oitenta em dendezaes subespontâneos na região do recôncavo bahiano, são descendentes da população formada por frutos trazidos pelos escravos africanos por volta da metade do século XVIII (Barcelos et al., 2001). Para o grupo de origem Nigéria os dados observados no estudo morfológico, são semelhantes aqueles relatados por Maizura et al. (2006), os autores observaram através de marcadores RFLP, que acessos coletados na Nigéria apresentaram maior diversidade alélica intra-populacional. Pela biometria de diásporos, observa-se que os acessos de origem Bahia divergem entre si, mas apresentam certa proximidade com os materiais de origem africana. Segundo Barcelos et al. (2002) este fato pode ser explicado através da ininterrupção do fluxo gênico entre populações do Brasil e da África, cujas trocas gênicas mesmo que pequenas, foram continuadas mesmo após a separação dos continentes e, provavelmente pela ação humana.

A separação observada entre os grupos de origem Deli-Dabou e Costa do Marfim estão de acordo com estudos realizados com isoenzimas e marcadores AFLP

por Purba et al. (2000), evidenciando que há uma distancia significativa entre estas populações. As análises dos padrões morfológicos mostrou também um agrupamento entre acessos africanos de origens diversas. De acordo com Cochard et al. (Cochard et al., 2009), estudos de diversidade sugerem que o germoplasma de *E. guineensis* está estruturado geneticamente em três grupos, sendo o Grupo I formado por populações oriundas da Costa do Marfim, o Grupo II pelas populações do Benin, Nigéria, Camarões, Congo, Angola e outras populações da África Central e o Grupo III, formado pela população de origem Deli, sendo este derivado do Grupo II com resultado de sucessivos ciclos de seleção artificial. A população subespontânea da Bahia/Brasil, diferente do que ocorre com a população Deli, não apresenta estrutura genética distinta das populações africanas, isso porque, diferente da última, não foi submetida ao processo de seleção.

As variações observadas nas médias de peso dos diásporos, número e peso das amêndoas são semelhantes aos resultados descritos por Panyangnoi et al. (1997) sobre a morfologia de sementes de palma de óleo tipo *dura*, onde foram relatados pesos de diásporos variando entre 3,1 e 6,1 g, cerca de 70% destes, contendo mais de uma amêndoa e o peso das amêndoas variou conforme o número de amêndoas/diásporo. Os autores observaram ainda que o peso dos diásporos apresentou média correlação com peso e número de amêndoas e, baixa correlação com a espessura do endocarpo.

De maneira geral, o estudo da diversidade genética empregando marcadores moleculares tipo RAPD associado à caracterização morfológica tem sido utilizado como informações complementares e muito importantes na caracterização de bancos de germoplasma de palmeiras (Araujo et al., 2010, Abdullah et al., 2011), uma vez que o uso de marcadores RAPD evidencia a existência de variabilidade entre os acessos e/ou populações estudados e as análises morfológicas indicam onde especificamente,

encontram-se as variações. As características biométricas dos diásporos tais como, formato e espessura de endocarpo são características qualitativas que, em geral, são monogênicas e pouco influenciadas pelo ambiente o que resulta em maior confiabilidade para a adoção como marcadores morfológicos em estudos de diversidade genética.

5. CONCLUSÕES

A variabilidade genética em espécies de *Elaeis* pode ser avaliada através de caracteres morfológicos de diásporos e amêndoas.

Os acessos *E. oleifera* apresentam variabilidade genética diretamente ligada a sua região de origem.

Em acessos de *E. guineensis* tipo *tenera* os indivíduos se agrupam de acordo com suas características morfológicas, não sendo observada ligação com a região de origem. As diferenças observadas entre os *tenera* e os demais acessos, estão ligadas a espessura de endocarpo e formato dos diásporos.

Em *E. guineensis* tipo *dura* existe variabilidade morfológica entre acessos e destes, para os outros dois grupos pelo peso dos diásporos, número e peso das amêndoas.

6. REFERENCIAS

- Abdullah, N., Yusop, M. R., Ithnin, M., Saleh, G. & Latif, M. A. 2011. Genetic variability of oil palm parental genotypes and performance of its' progenies as revealed by molecular markers and quantitative traits. *Comptes Rendus Biologies*, 334, 290-299.
- Ahmed, M. V. O. M., Bouna, Z. E. O., Lemine, F. M. M., Djeh, T. K. O., Mokhtar, T. & Salem, A. O. M. 2011. Use of multivariate analysis to assess phenotypic diversity of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars. *Scientia Horticulturae*, 127, 367-371.
- Akinoso, R. & Raji, A. O. 2011. Physical properties of fruit, nut and kernel of oil palm. *Internacional Agrophysics*, 25, 85-88.
- Araujo, M. C., Rodrigues, D. P., Astolfi Filho, S. & Clement, C. R. 2010. Genetic variability in the peach palm genebank with RAPD markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 10, 211-217.
- Baldoni, A. B., Carvalho, M. H., Souza, N. L., Nóbrega, M. B. M., Milani, M. & Aragão, F. J. L. 2011. Variability of ricin content in mature seeds of castor bean. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 46, 776-779.
- Barcelos, E., Amblard, P., Berthaud, J. & Seguin, M. 2002. Genetic diversity and relationship in American and African oil palm as revealed by RFLP and AFLP molecular markers *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 37, 1105-1114.
- Barcelos, E., Cunha, R. N. V. & Nouy, B. 2001. Recursos genéticos de dendê {*Elaeis guineensis* Jacq. e *E. oleifera* Kunth (Cortes)} disponíveis na Embrapa e sua utilização. In: MULLER, A. A. & FURLAN JUNIOR, J. (Eds.) *Agronegócio do dendê: uma alternativa social, econômica e ambiental para o desenvolvimento sustentável da Amazônia*. Belém - PA, Embrapa Amazônia Oriental.
- Castellani, E. D., Damião Filho, C. F., Aguiar, I. B. & Paula, R. C. 2008. Fruit and seed morphology of *Solanum* L forest species. *Revista Brasileira de Sementes*, 30, 102-113.
- Cochard, B. C., Adon, B., Rekima, S., Billotte, N., Chenon, R. D., Koutou, A., Nouy, B., Omoré, A., Purba, A. R. & Glazmann, J. C. 2009. Geographic and genetic structure of African oil palm diversity suggests new approaches to breeding. *Tree Genetics and Genomes*, 5, 493-504.
- Conceição, H. E. O. & Muller, A. A. 2000. Botânica e morfologia do dendezeiro. In: VIÉGAS, I. J. M. & MULLER, A. A. (Eds.) *A Cultura do dendezeiro na Amazônia brasileira*. Belém - PA, Embrapa Amazonia Oriental.
- Corley, R. H. V. 1982. The genus *Elaeis*. In: CORLEY, R. H. V., HARDON, J. J. & WOOD, B. J. (Eds.) *Oil Palm Research*. 2 ed. New York - EUA, Elsevier Scientific Publishing Company Inc.
- Cunha, R. N. V., Lopes, R., Rocha, R. N. C., Lima, W. A. A., Teixeira, P. C., Barcelos, E., Rodrigues, M. R. L. & Rios, S., A. 2012. Domestication and breeding of the American Oil Palm. In: BORÉM, A., LOPES, M. T. G. & CLEMENT, C. R. (Eds.) *Domestication and breeding: Amazon species*. Viçosa, Suprema Editora Ltda.
- Escobar, R. 1981. Preliminary results of the collection and evaluation of the American oil palm (*Elaeis oleifera* HBK Cortes) in Costa Rica. Palm Research Program, 54.

- Ferreira, C. B. B., Lopes, M. T. G., Lopes, R., Cunha, R. N. V., Moreira, D. A., arros, W. S. & Matiello, R. R. 2012. Molecular genetic diversity of oil palm progenies. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 47, 378-384.
- Fondom, N. Y., Etta, C. E. & Mih, A. M. 2010. Breaking seed dormancy: revisiting heat-treatment duration on germination and subsequent seedling growth of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) Progenies. *Journal of Agricultural Science*, 2, 101-110.
- Gusmão, E., Vieira, F. A. & Fonseca Junior, E. M. 2006. Biometria de frutos e endocarpos de murici (*Byrsonima verbascifolia* Rich ex A. Juss.) *Cerme*, 12, 84-91.
- Hayati, A., Wickneswari, R., Maizura, I. & Rajanaidu, N. 2004. Genetic diversity of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) germplasm collections from Africa: implications for improvement and conservation of genetic resources. *Theoretical and Applied Genetics*, 108, 1274-1284.
- Maizura, I., Rajanaidu, N., Zakri, A. H. & Cheah, S. C. 2006. Assessment of genetic diversity in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) using Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53, 187-195.
- Manfio, C. E., Motoike, S. Y., Santos, C. E. M., Pimenta, L. D., Queiroz, V. & Sato, A. Y. 2011. Repeatability in biometric characteristics of macaw palm fruit. *Ciência Rural*, 41, 70-76.
- Martine, B. M., Laurent, K. K., Pierre, B. J., Eugéne, K. K., Hilaire, K. T. & Justin, K. Y. 2009. Effect of storage and heat treatments on the germination of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) seed. *African Journal of Agricultural Research*, 4, 931-937.
- Martins, L. H. P., Miranda, I. P. A. & Nunes, C. D. 2002. Morfologia polínica de populações amazônicas de *Elaeis oleifera*. *Acta Amazonica*, 33, 159-166.
- Mohd Din, A., Rajanaidu, N. & Jalani, B. S. 2000. Performance of *Elaeis oleifera* from Paramá, Costa Rica, Colombia and Honduras in Malaysia. *Journal of Oil Palm Research*, 12, 71-80.
- Moretzsohn, M. C., Ferreira, M. A., Amaral, Z. P. S., Coelho, P. J. A., Grattapaglia, D. & Ferreira, M. E. 2002. Genetic diversity of Brazilian oil palm (*Elaeis oleifera* H.B.K.) germplasm collected in the Amazon Forest. *Euphytica*, 124, 35-45.
- Murugesan, P., Haseela, H., Gopakumar, S. & Shareef, M. V. M. 2011. Fruit and seed development in *Elaeis oleifera* (hBK) Cortes of Surinam origin. *Indian Journal of Horticulture*, 68, 28-30.
- Okwuagwu, C. O., Okoye, M. N., Okolo, E. C., Ataga, C. D. & Uguru, M. I. 2008. Genetic variability of fresh fruit bunch yield in Deli/*dura* x *tenera* breeding populations of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in Nigeria. *Journal of Tropical Agriculture*, 46, 52-57.
- Oliveira, M. S. P., Ferreira, D. F. & Santos, J. B. 2007. Divergência genética entre acessos de açaizeiro fundamentada em descritores morfoagronômicos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 42, 501-506.
- Panyangnoi, K., Srikul, S. & Korawis, C. 1997. Study on morphologies of oil palm seeds. *Thai Agricultural Research Journal*, 15, 185-193.
- Purba, A. R., Noyer, J. L., Baudonin, L., Perrier, X., Hamon, S. & Lagoda, P. J. L. 2000. A new aspects of genetic diversity of Indonesian oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) revealed by isoenzyme and AFLP markers and its consequences for breeding. *Theoretical and Applied Genetics*, 101, 956-961.

- Rajanaidu, N. 1983. *Elaeis oleifera* collection of South and Central America. *Plant Genetic Resources Newsletter*, 56, 42-51.
- Rajanaidu, N. 1987. Collection of oil palm (*Elaeis guineensis*) genetic material in Tanzania and Madagascar. *PORIM Bulletin*, 15, 01-06.
- Rao, G. R., Korwar, G. R., Shanker, A. K. & Romakrishna, Y. S. 2008. Genetic associations, variability and diversity in seed characters, growth, reproductive phenology and yield in *Jatropha curcas* (L.) accessions. *Trees - Structure and Function*, 22, 697-709.
- Rios, S. A., Cunha, R. N. V., Lopes, R., Barcelos, E., Teixeira, P. C., Lima, W. A. A. & Abreu, S. C. 2011. Caracterização fenotípica e diversidade genética em subamostras de Caiaué (*Elaeis oleifera*). *Unimontes Científica*, 13, 49-56.
- Rival, A. & Parveez, G. K. A. 2005. *Elaeis guineensis* Oil Palm. In: LITZ, R. E. (Ed.) *Biotechnology and fruit and nut crops*. Londres, CABI Publishing.
- Silva, R. T. L., Melo, E. C., Andrade, A. C., Oliveira, L. M., Silva, J. E. S. & Oliveira Neto, C. F. 2010. Biometric analysis of fruits of murici {*Byrsonima crassifolia* (L.) Rich.}. *Research Journal of Biological Sciences*, 5, 769-772.
- Sugimura, Y., Itano, M., Salud, C. D., Otsuji, K. & Yamaguchi, H. 1997. Biometric analysis on diversity of coconut palm: cultivar classification by botanical and agronomical traits. *Euphytica*, 98, 29-35.

CAPITULO II

Tolerância de diásporos de palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.) à criopreservação

CAMILLO, J.; LUIS, Z.G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E.

Trabalho publicado na Revista *Pesquisa Agropecuária Brasileira* – PAB

Pesq. agropec. bras., Brasília, v.44, n.2, p.211-215, fev. 2009

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a tolerância de diásporos de palma de óleo (*Elaeis guineensis*) à criopreservação. Cinco genótipos – CM589, C7201, C2528, C2001, C2501 – foram avaliados quanto à exposição ao nitrogênio líquido por sete dias. Os tratamentos foram repetidos três vezes e cada repetição foi formada por dez diásporos. Cortes anatômicos foram realizados para comparação do efeito dos tratamentos nos embriões durante a germinação. A exposição ao nitrogênio líquido acelerou a germinação dos embriões do genótipo CM589 e aumentou o potencial germinativo do genótipo C2528. A exposição ao nitrogênio líquido não teve efeito no genótipo C2501 e reduziu a germinação dos embriões no genótipo C7201. A exposição ao nitrogênio líquido não interferiu na diferenciação e no desenvolvimento dos tecidos embrionários durante a germinação.

Palavras-chave: *Elaeis guineensis*, germinação, micropropagação.

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the oil palm (*Elaeis guineensis*) seed tolerance to cryopreservation. Five genotypes (CM589, C7201, C2528, C2001, and C2501) were evaluated with or without exposure to liquid nitrogen for seven days. Treatments were replicated three times with ten seeds per replicate. Serial anatomical cuts were made to compare the effect of treatments on zygotic embryos. For CM589 and C2528, the exposition to liquid nitrogen accelerated and increased seed germination, respectively. For C2501, liquid nitrogen had no effect. For C7201, liquid nitrogen reduced seed germination (90.7%) compared to control (100%). Anatomically, the liquid nitrogen did not interfere with embryonic tissue differentiation or development during germination.

Keywords: *Elaeis guineensis*, germination, micropropagation.

1. INTRODUÇÃO

Na busca por patamares mais elevados de quantidade de óleo produzida por hectare, têm-se pesquisado espécies potenciais como, por exemplo, a palma de óleo, cujo rendimento pode atingir 6 ton/ha de óleo, o que corresponde a dez vezes a produção de óleo da soja e, caracteriza a espécie como a maior produtora de óleo vegetal do mundo. A espécie ainda tem a vantagem de poder ser explorada por um período aproximado de 25 anos, sem a necessidade de replantio (Miragaya, 2005).

Em razão desse potencial, programas de melhoramento dessa espécie têm sido implementados, com ênfase na introdução, seleção, clonagem e melhoramento genético de materiais com características agronômicas de interesse. Embora o cultivo restrinja-se quase que exclusivamente à espécie *Elaeis guineensis*, originária do continente africano, a espécie *E. oleifera*, originária do continente americano, conhecida no Brasil como Caiuaé, tem sido incorporada nos programas de melhoramento genético. Apresenta importantes características agronômicas como: porte baixo, óleo de boa qualidade e resistência a doenças, inclusive ao amarelecimento fatal, que é o maior problema de cultivos na América, e à fusariose, que é o maior problema de cultivos da África (Bergamin Filho et al., 1998).

Nos anos 80, a Embrapa e o *Institut de Recherches pour les Huiles et Oleagineux* (IRHO), da França, implantaram extensivas coleções de germoplasma de *Elaeis oleifera* e *E. guineensis* na Bacia Amazônica, o que constitui valiosa fonte de material genético (Barcelos, 1998, Moretzsohn et al., 2002). A manutenção dessas coleções em campo é dispendiosa, e o desenvolvimento de novas formas de conservação desse material é de fundamental importância para se evitar perdas.

Sementes de palma de óleo são classificadas como intermediárias, quanto ao comportamento no armazenamento, fato que dificulta sua conservação por técnicas convencionais, geralmente realizada em temperaturas sub-zero (-20°C) (Ellis et al., 1991). A criopreservação pode ser uma alternativa, uma vez que permite conservar material por longos períodos em temperaturas extremamente baixas (-196°C). As principais vantagens de se armazenar material vegetal em nitrogênio líquido são o baixo custo de armazenamento – por não necessitar de sistema de refrigeração –, a longevidade da conservação e o espaço físico reduzido.

Por isso, estudos relacionados à conservação e à germinação de sementes dessa espécie são essenciais, para a disponibilização de germoplasmas para os programas de melhoramento genético e para o desenvolvimento de tecnologias favoráveis à produção e à exploração comercial da cultura. O objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade da conservação de germoplasma de palma de óleo em nitrogênio líquido.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material biológico

Foram testados diásporos de cinco genótipos de palma de óleo (*E. guineensis*), sendo os cultivares comerciais CM589, C7201, C2001, C2528 e C2501. Os diásporos foram coletados de acessos de palma de óleo mantidos no Banco Ativo de Germoplasma (BAG-Dendê) da Embrapa Amazônia Ocidental, localizado no Campo Experimental do Rio Urubu (CERU), no município de Rio Preto da Eva, AM.

2.2 Tolerância a criopreservação e germinação *in vitro*

Os diásporos foram divididos em dois sub-lotes: a testemunha, não exposta ao nitrogênio líquido, e o segundo sub-lote imerso em nitrogênio líquido. Os diásporos foram acondicionados em sacos aluminizados trifoliados e expostos ao nitrogênio líquido por meio do congelamento rápido, por um período de sete dias. O descongelamento foi feito em temperatura ambiente ($25\pm 3^{\circ}\text{C}$), por 12 horas. Em seguida, o tegumento foi removido de forma manual, separando-se as amêndoas. Os embriões zigóticos foram extraídos e inoculados, individualmente, em tubos de ensaio contendo meio para germinação MS (Murashige and Skoog, 1962), a 50% da concentração de sais, acrescido de 2 mg L^{-1} de ácido pantotênico, 3% de sacarose e 0,25% de Phytigel (Merck). O pH do meio foi ajustado para $5,7\pm 0,1$ antes da autoclavagem, que foi realizada por 15 minutos, sob temperatura de 121°C e pressão de 1,3 atm. Os embriões acondicionados em tubos de ensaio de $25\times 150\text{ mm}$ foram mantidos no escuro até o início da formação da plúmula – 1 a 2 cm de comprimento –, sendo em seguida expostos à luz branca em sala de crescimento com temperatura de

25±2°C, intensidade luminosa de 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas. Foram realizadas avaliações semanais a partir do 14º dia, considerando-se inicialmente como germinados apenas os embriões com bainha foliar desenvolvida. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado e, devido ao limitado número de diásporos disponíveis, cada tratamento foi repetido três vezes, e cada repetição foi formada por dez diásporos.

2.3 Anatomia comparativa

Para avaliar possíveis alterações anatômicas ocorridas durante a imersão em nitrogênio líquido, embriões zigóticos desse tratamento foram anatomicamente comparados com embriões do tratamento testemunha, após o início da germinação. Para tanto, embriões zigóticos com cerca de 14 dias de cultivo *in vitro* foram imersos em solução fixadora composta de glutaraldeído (2,5%), paraformaldeído (4%) e tampão cacodilato de sódio (0,05 M, pH 7,1), por 24 horas, sob vácuo, e lavados três vezes no mesmo tampão. Subsequentemente, as amostras foram desidratadas em uma série alcoólica crescente, infiltradas e incluídas em historresina (Leica). Cortes seriados longitudinais e transversais (7 e 10 μm) foram obtidos em micrótomo rotatório, corados com azul de Toluidina e montados com Entellan. Os resultados foram registrados em fotomicroscópio Zeiss, modelo Axioskop, acoplado a um sistema digital de captura de imagens (Software ImagePro 4.0).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Germinação *in vitro* de embriões zigóticos de palma de óleo

De maneira geral, os dados de germinação mostraram diferenças significativas entre os tratamentos para os genótipos CM589, C2528 e C7201 (Tabela 1). Nos dois primeiros, as diferenças começaram a ser observadas a partir do 21º dia de cultivo, em que a imersão dos diásporos em nitrogênio líquido aumentou o potencial de germinação dos embriões zigóticos. No 28º dia essa melhora na germinação manteve-se, mas somente no genótipo C2528. Neste período de avaliação, a imersão de diásporos em nitrogênio líquido afetou a germinação apenas no genótipo C7201. Neste caso, apesar de os diásporos expostos ao nitrogênio líquido terem apresentado uma taxa de germinação em torno de 90%, este número foi significativamente inferior ao observado no tratamento testemunha, que foi de 100%. Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos nos demais genótipos (Tabela 1). A germinação iniciou-se por volta do 14º dia após a inoculação e, aos 50 dias em média, observou-se o completo desenvolvimento da planta (Figura 1).

Entre os genótipos, verificou-se que, de maneira geral, as menores taxas de germinação foram observadas no C2528 e no C2501. Neste último, as diferenças em relação aos demais genótipos foram observadas já a partir do 21º dia de cultivo, especialmente quando dos diásporos foram expostas ao nitrogênio líquido, embora no 28º dia a diferença entre os tratamentos tenha desaparecido. Engelmann et al. (1995), ao trabalhar com criopreservação de amêndoas de palma de óleo desprovidas de seu tegumento, obtiveram taxas de germinação de até 65% das amêndoas criopreservadas, após 1 hora de exposição ao nitrogênio líquido e rápida reidratação dos embriões zigóticos, antes da germinação *in vitro*. Além do fator genótipo e da característica do diásporo, a baixa taxa de germinação obtida por esses autores pode estar relacionada à

rápida reidratação realizada logo após o tratamento, o que pode ocasionar substanciais modificações metabólicas nos embriões, com a mobilização de carboidratos e lipídeos, além de poder influenciar negativamente a síntese de proteínas.

No entanto, dependendo do momento da reidratação, ela pode ser altamente desejável, uma vez que pode haver degradação de amido, que é abundante na amêndoa da palma de óleo. Isto permite rápido aumento na concentração de açúcares solúveis, que podem ser determinantes na aquisição da tolerância à dessecação, seja pela substituição da água das membranas celulares ou por induzir a vitrificação intracelular em temperatura ambiente (Ellis et al., 1991, Engelmann et al., 1995).

3.2 Anatomia comparativa

O estudo anatômico comparativo dos embriões revelou que o tratamento com imersão em nitrogênio líquido não interferiu na diferenciação e no desenvolvimento de tecidos embrionários durante a germinação (Figura 2). Verificou-se que o desenvolvimento inicial do embrião ocorreu a partir do sétimo dia da inoculação *in vitro*. Neste estágio, observou-se que a região distal do embrião, denominada haustório, ou o verdadeiro cotilédone das palmeiras (Figura 2 A e B), está conectada ao embrião através de feixes vasculares (Figura 2 A), com a função de dissolver e absorver o endosperma, para promover a germinação e o desenvolvimento inicial do embrião. O meristema apical do caule é o primeiro a se desenvolver com a plúmula, que conta inicialmente com quatro primórdios foliares diferenciados, em que os dois primeiros permanecem apenas no estágio de bainha. As bainhas são as primeiras estruturas a emergir, e sinalizam o início da germinação. Durante a germinação, o meristema

radicular se reorganiza e suas células ficam dispostas em fileiras (Figura 2 C) para, posteriormente, formar o eixo central da radícula (Figura 2 D).

A protusão da raiz primária ocorre após a emergência das primeiras folhas verdadeiras, e o seu deslocamento se dá em direção contrária à plúmula, que por sua vez, com a radícula, desenvolve-se perpendicularmente ao eixo do cotilédone. Neste trabalho, plântulas que apresentaram eófilos e raízes primárias bem desenvolvidas foram observadas aos 90 dias e, ao final de sete meses de avaliação do crescimento, a incidência de plantas anormais não foi constatada.

Tabela 1. Germinação *in vitro* de embriões zigóticos excisados de amêndoas de cinco genótipos de palma de óleo (Fator A), submetidos (+NL) ou não (TEST) ao tratamento de criopreservação em nitrogênio líquido (Fator B) aos 14, 21 e 28 dias de cultivo.

Genótipos	% Germinação								
	14 Dias			21 Dias			28 Dias		
	Test.	+NL	Médias	Test.	+NL	Médias	Test.	+NL	Médias
CM589	81,1 aA	97,6 aA	89,3 a	86,0 aB	100,0 aA	93,0 a	97,6 abA	100,0 aA	98,8 a
C7201	81,1 aA	80,0 aA	80,5 a	81,1 aA	80,0 abA	80,5 ab	100,0 aA	90,7 abB	95,3 a
C2001	53,3 aA	60,6 aA	56,9 a	67,7 aA	80,0 abA	73,8 ab	100,0 aA	97,6 abA	98,8 a
C2528	60,6 aB	94,9 aA	77,7 a	67,1 aB	100,0 aA	83,5 ab	73,8 bB	100,0 aA	86,9 ab
C2501	60,6 aA	53,3 aA	56,9 a	73,8 aA	67,1 bA	70,4 b	73,8 bA	73,8 bA	73,8 b
Médias (A x B)	67,3 A	77,3 A	–	75,1 B	85,4 A	–	89,0 A	92,4 A	–
F (A):		2,255 ^{ns}			3,626 [*]			8,417 ^{**}	
F (B):		1,834 ^{ns}			7,707 [*]			0,592 ^{ns}	
F (AxB):		0,829 ^{ns}			2,863 [*]			5,993 ^{**}	
CV (%)		28,4			17,8			12,1	

Médias seguidas de mesma letra, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. ^{ns} Não significativo; ^{*} e ^{**} significativo a 5 e 1% de probabilidade pelo teste F.

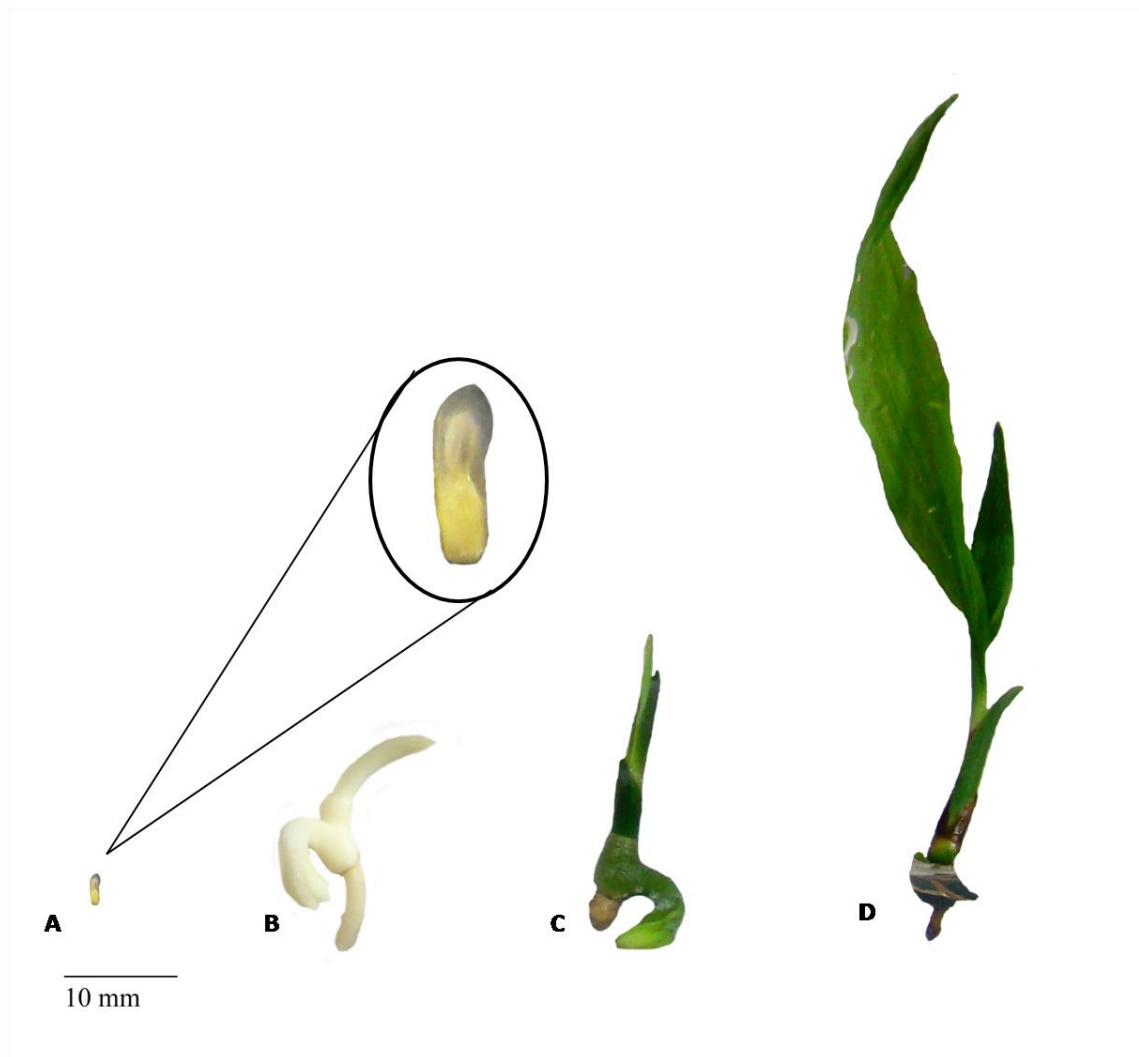


Figura 1. Seqüência do desenvolvimento *in vitro* do embrião zigótico de palma de óleo até a formação da planta completa. O desenvolvimento dos embriões seguiu a mesma descrição tanto para o tratamento testemunha, como após criopreservação. A) embrião recém inoculado (0 dias); B) após 14 dias quando iniciaram as avaliações; C) aos 30 dias e na presença de luz; D) após 50 dias, a planta está totalmente desenvolvida e com emissão da raiz primária.

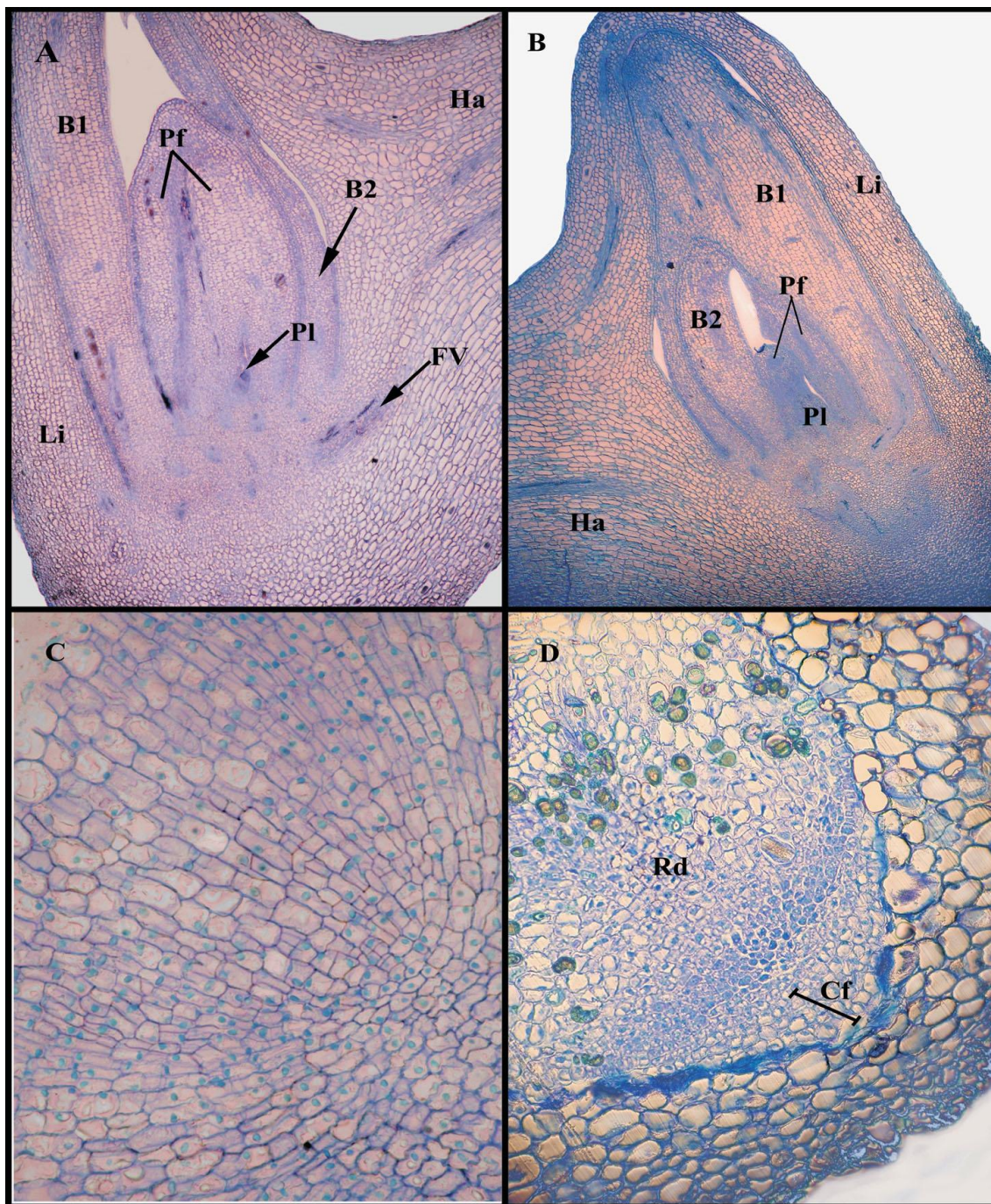


Figura 2. Secção longitudinal (A e B) e do sistema radicular (C e D) de embriões zigóticos de *Elaeis* sp. excisados de amêndoas criopreservadas, aos oito dias após a inoculação *in vitro*. A) embrião zigótico do tratamento testemunha; B) embrião zigótico exposto ao nitrogênio líquido; C) organização do meristema radicular; D) radícula com coifa diferenciada. Pl - plúmula; Pf - primórdios foliares; B1 - primeira bainha; B2 - segunda bainha; Li - lígula; Há - haustório; FV - feixe vascular. Barras: A e B, 200 µm; C, 50 µm; D, 100 µm.

4. CONCLUSÕES

É possível criopreservar germoplasma de palma de óleo a partir de diásporos, sem a necessidade do uso de crioprotetores;

A criopreservação durante sete dias, não influenciou negativamente a viabilidade dos embriões.

5. REFERENCIAS

- Barcelos, E. 1998. Étude de la diversité génétique du genre *Elaeis* (*E. oleifera* Kunth Cortés et *E. guineensis* Jacq.) par marqueurs moléculaires (RFLP et AFLP). 136 p. Tese (Doutorado) - Montpellier, Université de Montpellier.
- Bergamin Filho, A., Amorim, L., Laranjeira, F. F., Berguer, R. D. & Haub, B. 1998. Análise temporal do amarelecimento fatal do dendezeiro como ferramenta para elucidar sua etiologia. *Fitopatologia Brasileira*, 23, 391-396.
- Ellis, R. H., Hong, T. D., Roberts, E. H. & Soetisna, U. 1991. Seed storage behaviour in *Elaeis guineensis*. *Seed Science Research*, 1, 99-104.
- Engelmann, F., Chabrillange, N., Dussert, S. & Duval, Y. 1995. Cryopreservation of zygotic embryos and kernels of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Seed Science Research*, 5, 81-86.
- Miragaya, J. C. G. 2005. Biodiesel: tendencias no mundo e no Brasil. *Informe Agropecuário*, 26, 07-13.
- Moretzsohn, M. C., Ferreira, M. A., Amaral, Z. P. S., Coelho, P. J. A., Grattapaglia, D. & Ferreira, M. E. 2002. Genetic diversity of Brazilian oil palm (*Elaeis oleifera* H.B.K.) germplasm collected in the Amazon Forest. *Euphytica*, 124, 35-45.
- Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia*, 15, 473-497.

CAPITULO III

**Influencia da temperatura e de carboidratos na manutenção *in vitro* de
germoplasma de palma de óleo {*Elaeis guineensis* Jacq. e *E. oleifera* (Kunth)**

Cortés} sob regime de crescimento mínimo

CAMILLO, J.; MATTOS, J.K.A.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.

RESUMO

Os avanços no melhoramento genético da palma de óleo dependem das fontes e da variabilidade do germoplasma disponível, que muitas vezes, necessitam de metodologias específicas para a sua conservação. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de temperaturas e de carboidratos no desenvolvimento de acessos de *Elaeis guineensis* e *E. oleifera*, como subsídio para a implantação de bancos de germoplasma *in vitro*. Embriões zigóticos de acessos das duas espécies foram germinados *in vitro* em meio de cultura de ½MS e as plântulas convertidas foram utilizadas para os estudos de conservação. Para estudar os efeitos da temperatura, plantas foram mantidas em meio de cultura de ½MS, acrescido de 3% de sacarose, sob temperaturas de 20 e 25 ± 2°C. Da mesma forma, para testar o efeito de carboidratos, plantas foram inoculadas em meio de cultura de ½MS, acrescido dos carboidratos: sacarose, manitol e sorbitol em concentrações de 1, 2 e 3%. O experimento foi mantido em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2°C. Após 12 meses, verificou-se que a temperatura de 20°C foi a mais eficiente para a manutenção *in vitro* da palma de óleo por retardar significativamente o crescimento das plantas dos genótipos testados. A sacarose mostrou-se mais adequada para a manutenção da qualidade das plantas conservadas *in vitro*. Observou-se que o manitol promoveu o menor crescimento das plantas, no entanto, a sobrevivência destas foi significativamente reduzida, após 12 meses de conservação.

Palavras-chave: conservação *in vitro*, palma de óleo, caiaué, crescimento mínimo.

ABSTRACT

Advances in genetic improvement of palm oil depends on the sources of variability on available the germplasm, which in turn require specific methodologies for conservation. The objective of this study was to evaluate the influence of temperature and carbohydrates in *Elaeis guineensis* and *E. oleifera* plants growth, as a subsidy for the establishment of *in vitro* germplasm banks. Zygotic embryos from subsamples from both species were germinated *in vitro* in culture medium ½MS and converted seedlings were used for studies of conservation. To study by the effects of temperature, plants were maintained in culture medium ½MS added 3% sucrose, at temperatures of 20 and $25 \pm 2^\circ\text{C}$. For testing the effect of carbohydrates, plants were grown in the culture medium of ½MS supplemented with the carbohydrates: saccharose, mannitol and sorbitol at concentrations of 1, 2 and 3%. The experiment was maintained in a growth room at $25 \pm 2^\circ\text{C}$. After twelve months, it was found that a temperature of 20°C was the most efficient for *in vitro* maintenance of oil palm plants by significantly retarding the growth of the genotypes tested. Among the carbohydrate compared, sucrose was the most suitable for maintaining the quality of *in vitro* preserved plants. Mannitol promoted the growth of these plants, however, survival was reduced after 12 months of storage.

Keywords: *in vitro* conservation, oil palm, caiaué, minimal growth.

1. INTRODUÇÃO

As espécies de palmeiras do gênero *Elaeis* produzem sementes com características intermediárias (Ellis et al., 1991). Portanto, apresentam sérias limitações para a conservação de germoplasma *ex situ* em longo prazo. Nestes casos, a forma rotineira de conservação adotada é a manutenção das coleções em campo. No entanto, exige elevados custos de manutenção, mão de obra especializada e a necessidade de extensas áreas para acomodar os diferentes acessos a serem conservados. Acrescente-se o fato, das coleções estarem sob constante ameaça de perdas ficando expostas a fatores bióticos e abióticos que ameaçam a segurança dos acessos (Engelmann, 2011).

Como alternativa e medida auxiliar à conservação de germoplasma vegetal em campo, estratégias biotecnológicas, baseadas em conceitos da cultura *in vitro* de células, tecidos e de órgãos de plantas têm sido desenvolvidas e aprimoradas. Tais técnicas possuem potencial para superar as limitações, além de facilitar o intercâmbio de germoplasma livre de pragas entre instituições de pesquisa (Scherwinski-Pereira et al, 2010; Silva et al., 2012). Os protocolos de conservação *in vitro* devem preconizar a máxima sobrevivência, estabilidade genética e permitir estender as frequências dos subcultivos do material vegetal (Cid & Carvalho, 2008). Em geral, bancos de germoplasma *in vitro* são mantidos sob condições de crescimento mínimo por diminuição do metabolismo das plantas (Ledo et al., 2007) com redução da temperatura, intensidade luminosa, ou então, pela modificação nos meios de cultura, incluindo a diluição dos elementos minerais, redução da concentração ou natureza de açúcares, uso de reguladores de crescimento ou adição de compostos osmoticamente ativos (Engelmann, 2011, Kanchanapoom & Promsorn, 2012, Yun-peng et al., 2012).

Atualmente, a tecnologia *in vitro* para a conservação de germoplasma de palma de óleo tem focado quase exclusivamente na técnica de criopreservação de embriões zigóticos (Engelmann et al., 1995, Villa et al., 2007), embriões somáticos (Konan et al., 2010) e pólen (Tandon et al., 2007). No entanto, apesar da relativa eficiência nos resultados, a criopreservação necessita estrutura e mão de obra altamente especializada, além de ser uma técnica visando a conservação a longo prazo (Sánchez-Chiang & Jiménez, 2010). Uma alternativa complementar seria a manutenção *in vitro* de plantas inteiras, visando a disponibilidade de germoplasma no curto e médio prazo, livre de contaminações. Mas para que esta técnica seja realmente eficiente, torna-se necessário adequar metodologias, como determinar a melhor formulação de meios de cultura, o número de amostras a serem conservadas, a periodicidade de subcultivos, além de otimizar condições de temperatura e luminosidade mais adequadas para a manutenção de coleções *in vitro* (Scherwinski-Pereira et al., 2010, Sánchez-Chiang & Jiménez, 2010).

Considerando que estudos sobre a conservação *in vitro* de plantas inteiras em palma de óleo são ainda incipientes, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência de diferentes temperaturas e tipos e concentrações de carboidratos no desenvolvimento de plantas de *Elaeis guineensis* e *E. oleifera*, como subsídio para a implantação de bancos de germoplasma *in vitro* do gênero.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília – DF. Os acessos de palma de óleo testados foram coletados no Banco Ativo de Germoplasma (BAG-Dendê) da Embrapa Amazônia Ocidental, localizado no Campo Experimental do Rio Urubu, no município de Rio Preto da Eva, AM, Brasil (Tabela 1).

Tabela 1. Acessos de palma de óleo (*E. guineensis* e *E. oleifera*) utilizados nos diferentes experimentos.

Experimento	Espécies	Acesso	Tipo	Origem	Identificação
Efeito de temperaturas	<i>E. oleifera</i>	A410610	<i>dura</i>	Manic/Democ.	DEM 213 22
		A440320	<i>dura</i>	Moura – E.Cab.	ECA 611 03
		A510726	<i>dura</i>	Autases-NE	NES 241 22
	<i>E. guineensis</i>	A401210	<i>dura</i>	Bahia	Bahia 43
		A442220	<i>dura</i>	Deli-Dabou	D118DxD8D
		A630222	<i>dura</i>	Nigéria	0.150/5789D
		A442003	<i>tenera</i>	Yangambi	L2431DxL916P
		A544029	<i>tenera</i>	Pobé	P2452TxP3322T
	A630920	<i>tenera</i>	Congo	0.233/5T	
	Efeito de carboidratos	<i>E. oleifera</i>	A410610	<i>dura</i>	Manic/Democ.
<i>E. guineensis</i>		A630920	<i>tenera</i>	Congo	0.233/5T

2.2 Germinação *in vitro* dos embriões zigóticos

A germinação *in vitro* dos embriões zigóticos foi realizada com base no protocolo descrito por Camillo et al. (2009a). Inicialmente, o endocarpo dos diásporos

foi removido com o auxílio de um torno mecânico para a obtenção das amêndoas. Posteriormente, em capela de fluxo laminar, as amêndoas foram imersas em etanol 70% por 3 minutos, seguido de 20 minutos hipoclorito de sódio comercial (2,0 a 2,5% de cloro ativo). Em seguida foram efetuados três enxágües com água destilada e autoclavada para a remoção do excesso de alvejante. Os embriões zigóticos foram então removidos das amêndoas com o auxílio de pinça e bisturi, realizando-se dois cortes num ângulo aproximado de 45° em direções opostas ao embrião. Após a extração, os embriões zigóticos foram inoculados em meio de cultura ½MS (Murashige and Skoog, 1962), acrescido de biotina e ácido pantotênico, 3% de sacarose e 0,25% de Phytigel®.

Os tubos de ensaio foram acondicionados no escuro, em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C até o início da formação dos primórdios foliares (de 1 a 2 cm de comprimento), quando então foram colocadas para se desenvolver sob condição adequada de luminosidade ($30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas). Após três meses da inoculação dos embriões, as plantas desenvolvidas foram utilizadas como fontes de explantes para os experimentos descritos na seqüência (Figura 1A).

2.3 Efeito da temperatura na conservação *in vitro* de germoplasma de palma de óleo

Para estudar os efeitos da temperatura na conservação *in vitro* de plantas de palma de óleo foram testados três acessos de *Elaeis oleifera* (A410610, A440320 e A510726), três de *E. guineensis* tipo *dura* (A401210, A442220 e A630222) e três de *E. guineensis* tipo *tenera* (A442003, A544029 e A630920) (Tabela 1).

As plantas foram selecionadas preconizando-se aquelas com altura semelhante (aproximadamente 10 ± 1 cm) e iguais números de folhas e raízes (1 a 2 raízes e de 2 a 3 folhas expandidas). Uma vez selecionadas, as plantas tiveram suas raízes e folhas

cortadas em aproximadamente 2/3 do comprimento (Figura 1B), sendo que a altura inicial do explante foi considerada após a poda de limpeza das plantas (altura média inicial (4 ± 1 cm)). Uma vez uniformizadas quanto a altura, número de folhas e raízes, as plantas foram inoculados em meio de cultura de 1/2MS, acrescido de 3% de sacarose e 0,25 % de Phytigel (Sigma[®]). O experimento foi mantido simultaneamente em salas de crescimento com temperaturas de 20 e $25 \pm 2^\circ\text{C}$, intensidade luminosa de $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 12 horas.

2.4 Efeito de diferentes carboidratos e concentrações na conservação *in vitro* de germoplasma de palma de óleo

Para testar o efeito dos diferentes carboidratos e concentrações foram utilizadas plantas de dois acessos de palma de óleo, um de *Elaeis oleifera* (A410610) e um de *E. guineensis* tipo *tenera* (A630920) (Tabela 1), escolhidos em função do número de plantas disponíveis e uniformidade das mesmas. As plantas selecionadas também tiveram suas raízes e folhas cortadas em aproximadamente 2/3 do comprimento, conforme descrito no experimento anterior (Figura 1B). Uma vez uniformizadas, as plantas foram inoculados em meio de cultura composto por sais de 1/2MS acrescido de 0,25 % de Phytigel (Sigma[®]) e dos carboidratos: sacarose, manitol e sorbitol nas concentrações de 1, 2 e 3%. O experimento foi mantido em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, intensidade luminosa de $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 12 horas.

Para ambos experimentos, as plantas foram inoculadas em tubos de ensaio de 25 x 250 mm, contendo 15 ml de meio de cultura. O pH dos meios foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$, e a esterilização foi realizada por autoclavagem a 121°C por 20 minutos, sob 1,2

atm de pressão. Uma vez estabelecidas as plantas no meio de cultura, os tubos de ensaio foram selados com papel alumínio e filme transparente de PVC.

Igualmente, para ambos experimentos (temperatura e carboidratos), o delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, composto por dez repetições por tratamento, sendo cada repetição formada por um tubo de ensaio com uma planta. As avaliações foram feitas durante 12 meses para os seguintes itens: percentagem de sobrevivência, comprimento da parte aérea, percentual de crescimento e coloração (aspecto) das folhas. Para a variável aspecto das folhas foi atribuída a seguinte escala de notas: 1- folhas verde-escuras (Figura 1C); 2- folhas verde-claras (Figura 1D), e 3- folhas amareladas parcial ou completamente necrosadas (Figura 1E). O percentual de crescimento foi calculado com base na variação da altura inicial das plantas e altura ao final dos 12 meses, de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ Cresc.} = (Af - Ai/Ai) \times 100$$

Onde:

Ai corresponde à altura inicial da planta no dia em que foi inoculada e Af é a altura observada ao final dos 12 meses de cultivo.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e a comparação de médias foi realizada pelo teste Tukey em nível de 5% de probabilidade em programa estatístico SANEST (Zonta & Machado, 1984).

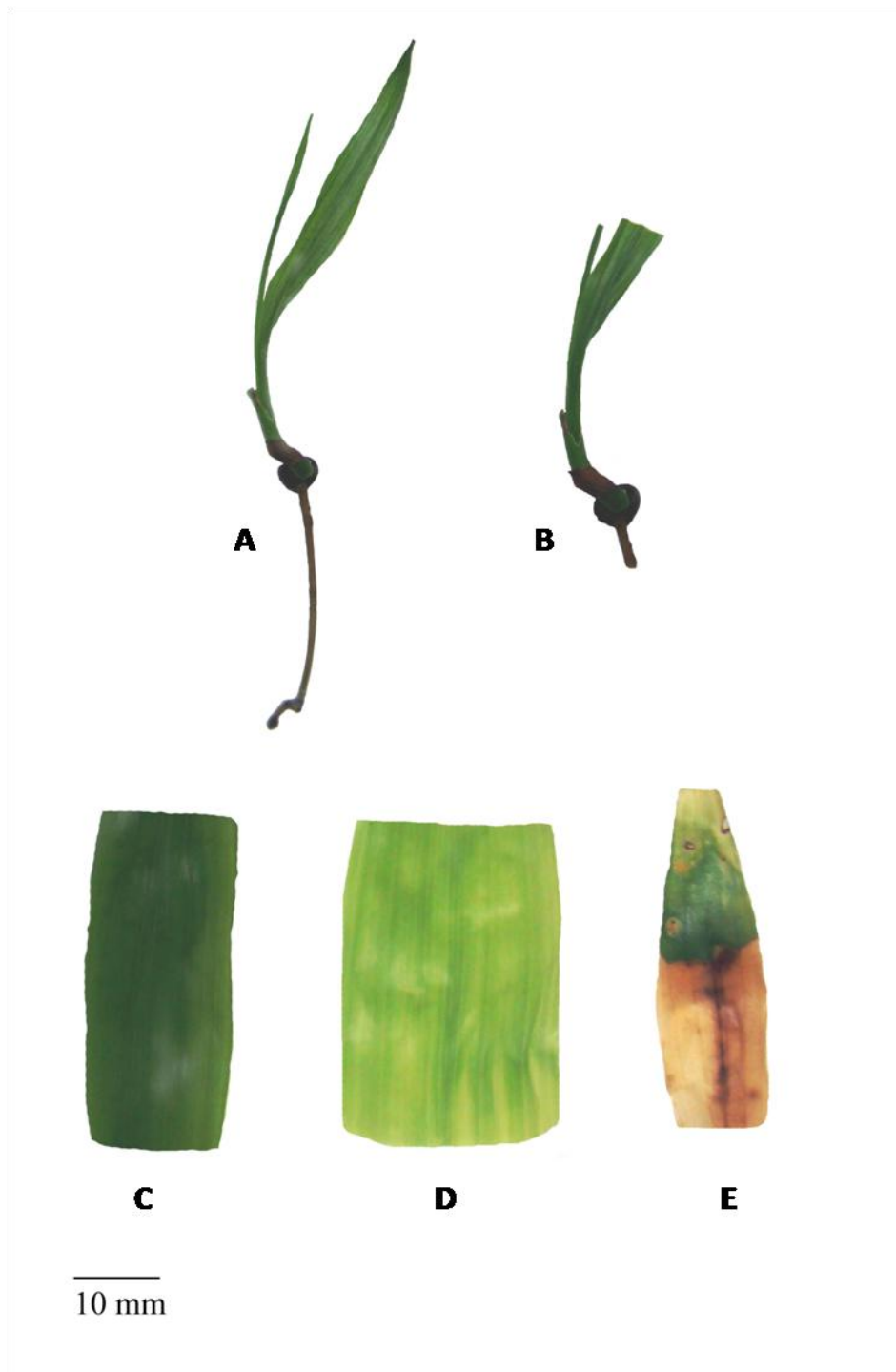


Figura 1. Aspectos considerados para a uniformização dos explantes e parâmetros para a determinação do aspecto das plantas de palma de óleo mantidas *in vitro*. A) Planta de palma de óleo com 90 dias de idade; B) planta após a remoção da raiz e 2/3 do comprimento foliar. Diferentes colorações de folhas que foram utilizadas como parâmetro para determinação do *aspecto das folhas* durante o período de conservação *in vitro*, sendo considerado: C) folha verde escura; D) folha verde clara; E) folha parcial ou totalmente necrosada.

3. RESULTADOS

3.1 Efeito da temperatura na conservação *in vitro* de germoplasma de palma de óleo

Não foi observado efeito significativo na interação entre acessos e as temperaturas, sendo as diferenças observadas apenas nas médias dos tratamentos estudados (Tabela 2). Assim, na média, a temperatura influenciou a altura e o percentual de crescimento das plantas, mas não afetou a sobrevivência e o aspecto das mesmas. Entre os acessos, observaram-se diferenças significativas apenas para a média do crescimento (%), para as demais variáveis não houve diferenças significativas.

A média de sobrevivência das plantas em ambas temperaturas testadas (20 e 25°C), após 12 meses de manutenção *in vitro*, foi de 98,9%, indicando que independente do acesso mantido, a temperatura não afetou o percentual de sobrevivência.

Quanto à altura, observou-se que sob temperatura de 20°C as plantas apresentaram tamanho médio de 15,4 cm, significando um percentual de crescimento de 217,3% em relação ao tamanho. Esse valor é significativamente menor quando comparado àquele observado nas plantas mantidas à 25°C, com média de altura de 20,4 cm, ou seja, 320,8% superior ao início do experimento (Figura 2). Entre os acessos, a menor altura de planta foi observada em *E. oleifera* e na temperatura de 20°C, com média de 14,6 cm e crescimento médio de 269,5% e a maior altura foi observada em *E. guineensis* tipo *tenera* a 25°C com média de 21,1 cm, significando crescimento superior a 287,7% em relação ao tamanho inicial (Tabela 2).

Quanto ao aspecto e coloração das folhas, também não foram observadas significativas diferenças entre os tratamentos. Na comparação entre plantas mantidas a 20°C e a 25°C, a média geral para a variável aspecto foi de 1,8 e 1,7, respectivamente.

Estes valores significam que, independentemente da temperatura onde foram mantidas, as plantas apresentaram coloração entre verde-escura e verde-clara, com pouca ou nenhuma folha necrosada (Figura 2).

3.2 Efeito de diferentes carboidratos e concentrações na conservação *in vitro* de germoplasma de palma de óleo

Na média geral, observaram-se diferenças significativas entre os carboidratos e as respectivas concentrações para os caracteres avaliados. Os acessos apresentaram diferença significativa apenas quanto à altura das plantas, para os demais caracteres, os resultados se mostraram genótipo-independentes (Tabela 3).

Os açúcares utilizados como reguladores osmóticos e fonte de carbono no meio de cultura de conservação, não influenciaram significativamente na sobrevivência dos explantes, exceto para o acesso *E. guineensis* que, em presença de manitol, resultou em percentual de sobrevivência de 79,1%. O maior índice de sobrevivência, independentemente do carboidrato utilizado, foi observado na concentração de 3%, com média de 100,0% das plantas vivas. No entanto, apesar do manitol proporcionar índices mais baixos de sobrevivência nas concentrações de 1% e 2% (75,0% e 62,5%, respectivamente), para o acesso *E. guineensis*, quando utilizado no meio de cultura na concentração de 3%, não foram observadas diferenças significativas entre manitol, sorbitol e sacarose, com média de 100% de plantas vivas (Tabela 3).

Na média geral observou-se que nas concentrações de 1 e 2% as plantas apresentaram porte menor, com médias de 10,3 e 11,6 cm, respectivamente, quando comparadas à concentração de 3% (Tabela 3). Para a variável altura de planta, entre os acessos verificaram-se comportamentos diferenciados, de acordo com o carboidrato e as

concentrações testadas; apenas o manitol não proporcionou diferença significativa, com média geral de 7,3 cm de altura para ambos acessos testados. Na média geral, *E. oleifera* apresentou maior altura de plantas quando cultivado em meio contendo sacarose, independente da concentração do carboidrato, contrastando com *E. guineensis* que resultou em plantas de tamanhos significativamente maiores quando cultivado em meio de cultura contendo sorbitol.

O percentual final de crescimento das plantas, na média geral, não foi afetado significativamente pela concentração dos carboidratos no meio de cultura, porém, o tipo de carboidrato utilizado influenciou. No meio de cultura contendo sacarose, observou-se diferença significativa na resposta dos acessos; isto é, *E. oleifera* apresentou crescimento de 332,4 %, enquanto *E. guineensis* cresceu 287,1%, em relação ao explante inicial.

Na avaliação do aspecto das plantas, o melhor resultado para *E. oleifera* foi observado quando as plantas foram cultivadas em meio contendo sacarose, com média de 1,90. Para *E. guineensis*, o melhor aspecto de plantas foi obtido quando estas foram cultivadas em sorbitol, com média de 1,8 (Tabela 3). Assim, em ambos os casos a maioria das plantas apresentou folhas totalmente verdes (verde escuro a verde claro), ausência de necrose e emissão contínua de novas folhas (Figuras 3B e 3C). Já os piores índices para essa variável foram verificados nas plantas cultivadas em meio de cultura contendo manitol (2,6 e 2,8). Nesta condição observou-se que a maioria das plantas apresentou folhas com coloração amareladas, parcialmente necrosadas e paralisação da emissão de folhas novas (Figura 3A).

Tabela 2. Valores para a sobrevivência, altura, percentual de crescimento e aspecto das plantas de palma de óleo mantidas *in vitro* em razão de diferentes temperaturas, após 12 meses.

Espécies	Acesso	Sobrevivência (%)			Altura (cm)			Crescimento (%)			Aspecto		
		20	25	Média	20	25	Média	Temperatura (°C)			20	25	Média
								20	25	Média			
<i>E. guineensis</i> tipo <i>Tenera</i>	A442003	100,0	100,0		11,8	22,9		134,9	306,7		2,2	1,5	
	A544029	100,0	100,0	100,0 a	15,5	19,3	18,6 a	167,1	215,8	235,1 c	1,5	1,7	1,5 a
	A630920	100,0	100,0		21,0	20,9		245,3	340,7		1,2	1,2	
Médias		100,0	100,0		16,1	21,1		182,4	287,7		1,6	1,5	
<i>E. guineensis</i> tipo <i>dura</i>	A401210	100,0	100,0		15,6	21,3		229,9	360,2		1,9	1,6	
	A442220	100,0	100,0	100,0 a	18,2	20,2	17,4 a	200,3	305,9	249,7 b	1,9	1,8	1,9 a
	A630222	100,0	100,0		12,7	16,1		169,6	232,3		1,8	2,2	
Médias		100,0	100,0		15,5	19,2		199,9	299,5		1,9	1,9	
<i>E. oleifera</i>	A410610	90,0	90,0		13,7	20,5		261,1	375,0		2,0	1,8	
	A440320	100,0	100,0	96,7 a	19,2	21,8	17,8 a	279,3	319,1	322,7 a	1,7	1,5	1,7 a
	A510726	100,0	100,0		10,7	20,5		268,2	431,8		1,8	1,5	
Médias		96,7	96,7		14,6	20,9		269,5	375,3		1,8	1,6	
Média geral		98,9 A	98,9 A		15,4 B	20,4 A		217,3 B	320,8 A		1,8 A	1,7 A	
CV%			10,7			31,5			47,2			38,8	

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Letras minúsculas comparam as médias entre os acessos (*tenera*, *dura* e *oleifera*) e as letras maiúsculas comparam as médias entre as temperaturas (20 e 25°C), dentro de cada variável avaliada.

Tabela 3. Valores para a sobrevivência, altura, percentual de crescimento e aspecto das plantas de palma de óleo mantidas *in vitro* sob temperatura de 25°C em função das diferentes concentrações de carboidratos, após 12 meses.

Acesso	Carboidratos/ Concentrações	Sobrevivência (%)				Altura (cm)				Crescimento (%)				Aspecto			
		1%	2%	3%	Média	1%	2%	3%	Média	1%	2%	3%	Média	1%	2%	3%	Média
<i>E. oleifera</i>	Sorbitol	90,0	80,0	100,0	90,0 a	10,5 bA	11,0 bA	12,0 cA	11,2 c	238,2	245,2	220,6	234,7 b	2,6	2,3	1,7	2,20 b
	Manitol	90,0	90,0	100,0	93,3 a	7,8 bA	7,7 cA	6,3 dA	7,3 d	103,2	111,2	113,8	109,4 c	2,7	2,7	2,5	2,60 a
	Sacarose	100,0	100,0	100,0	100,0 a	11,9 aA	14,2 aA	14,4 bA	13,5 b	273,3	315,1	408,8	332,4 a	2,1	1,9	1,7	1,90 c
<i>E. guineensis</i>	Sorbitol	100,0	100,0	100,0	100,0 a	14,6 aB	16,2 aB	19,7 aA	16,9 a	236,2	260,1	329,7	275,4 b	1,9	2,0	1,5	1,8 c
	Manitol	75,0	62,5	100,0	79,1 b	7,5 bA	6,7 cA	7,6 dA	7,3 d	122,5	105,5	80,6	102,9 c	2,6	3,0	2,9	2,8 a
	Sacarose	87,5	100,0	100,0	95,8 a	9,7 bC	13,9 aB	18,2 aA	13,9 b	205,2	303,2	352,7	287,1 b	2,1	2,2	2,1	2,2 b
	Média	90,7 B	88,9 B	100,0 A		10,3 B	11,6 B	12,8 A		197,4 A	223,4 A	250,7 A		2,3 A	2,3 A	2,0 B	
	CV(%)	26,10				32,70				49,60				25,60			

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Letras minúsculas comparam as médias entre os acessos (*tenera* e *oleifera*) e as letras maiúsculas comparam as médias entre os tratamentos com os diferentes carboidratos (1, 2 e 3%), dentro de cada variável avaliada.



Figura 2. Aspecto das plantas de palma de óleo após 12 meses de manutenção *in vitro* sob diferentes temperaturas. As figuras A (*E. guineensis* tipo *tenera*), B (*E. guineensis* tipo *dura*) e C (*E. oleifera*) mostram plantas de palma de óleo mantidas a temperatura de 20°C e na mesma seqüência de identificação, as Figuras D, E e F mostram as plantas mantidas sob temperatura de 25°C.

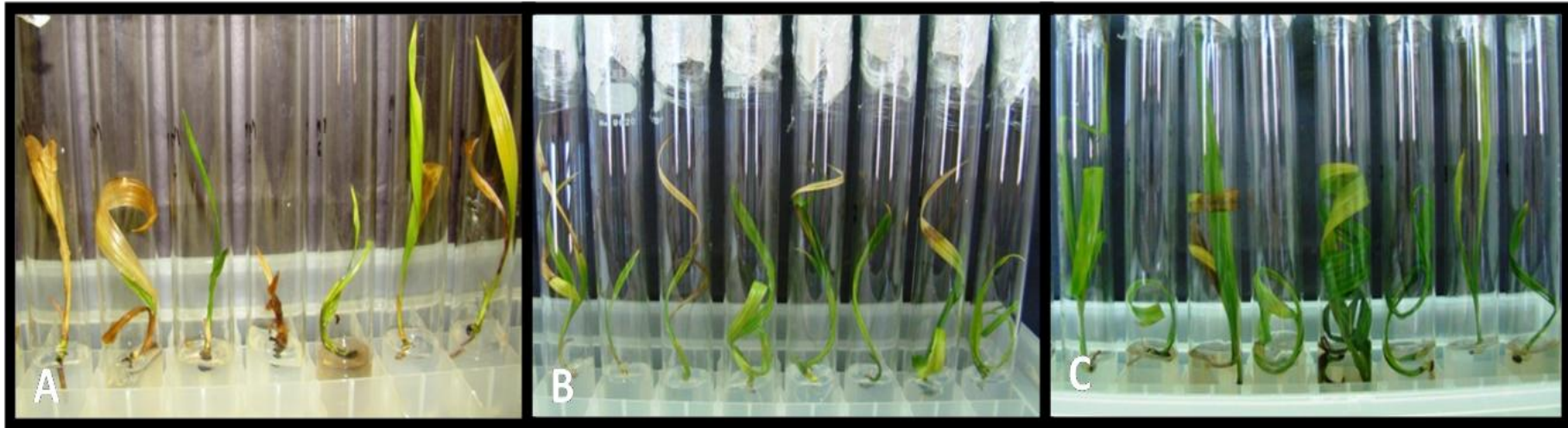


Figura 3. Aspecto das plantas de palma de óleo após 12 meses de manutenção *in vitro* sob diferentes concentrações de carboidratos: manitol (A), sorbitol (B) e sacarose (C).

4. DISCUSSÃO

4.1 Efeito da temperatura na conservação *in vitro* de germoplasma de palma de óleo

Os resultados obtidos na conservação *in vitro* de palma de óleo são semelhantes aqueles relatados na bibliografia para a conservação de germoplasma de espécies tropicais, em que a temperatura mais favorável para a manutenção destas espécies em regime de crescimento mínimo deve ser entre 15 a 20°C, variando conforme a sensibilidade de cada espécie (Engelmann, 2011) e, desta forma, proporcionando uma redução da atividade metabólica e, conseqüentemente, menor crescimento (Sánchez-Chiang & Jiménez, 2010).

A temperatura de 20°C mostrou-se mais adequada para a manutenção *in vitro* das plantas de palma de óleo, uma vez que pela redução significativa do crescimento foi possível a manutenção dos materiais durante 12 meses, sem a necessidade de subcultivos. Anteriormente, Corbineau et al. (1990) haviam relatado que a temperatura de 20°C é a mais favorável para a manutenção *in vitro* dos aglomerados de células embrionárias de *E. guineensis*, pois sob estas condições os aglomerados permaneceram viáveis por um período superior a 30 semanas.

A manutenção de germoplasma em temperatura de 20°C também se mostrou eficiente na conservação *in vitro* de genótipos de videira (*Vitis spp.*) (Silva et al., 2012) e de espécies nativas da flora brasileira como o algodão-do-campo {*Cochlospermum regium* (Mart ex Schrank) Pilger} (Camillo et al., 2009b) e algumas piperáceas. Silva & Scherwinski-Pereira (2011) relatam que culturas *in vitro* de pimenta-longa (*Piper aduncum* L. e *P. hispidinervum* C.DC.), mantidas a 20°C em meio de MS apresentam 100% de sobrevivência, após 180 dias. Em condições semelhantes, plantas de

amendoim (*Arachis burchellii* Krapov & W.C. Greg), apresentaram eficiência de regeneração superior a 80%, após 12 meses de armazenamento (Pacheco et al., 2009).

Nas diferentes temperaturas, o percentual de sobrevivência dos explantes de palma de óleo permaneceu elevado (>95%), independente da temperatura testada, após 12 meses. Da mesma forma, não foi observada diferença no aspecto das plantas conservadas. Resultados semelhantes foram relatados em côco (*Cocos nucifera* L.), com percentual de sobrevivência de 75% (García et al., 2008) e 100% (Ledo et al., 2007) após 18 e 12 meses de cultivo, respectivamente.

Em palma de óleo, Rohani & Paranjothy (1995) demonstraram que foi possível a manutenção de explantes radiculares em condições *in vitro* em longo prazo. No entanto, foi observado um declínio acentuado no vigor dos explantes causado pelos sucessivos subcultivos. Em contraste com estes dados, o presente trabalho demonstrou a viabilidade da manutenção de plantas inteiras *in vitro* apenas submetendo as plantas à redução de temperatura. Além de diminuir significativamente os custos com mão de obra com os sucessivos subcultivos, a manutenção das plantas em meio de MS sólido e em temperatura de 20°C requer apenas um sub-cultivo a cada 12 meses, reduzindo a exposição das plantas aos agentes externos e mantendo constante o vigor das mesmas.

O uso de baixas temperaturas na manutenção de germoplasma *in vitro* de espécies de palmeiras foi relatado anteriormente em tamareira (*Phoenix dactylifera* L.) (Bekheet et al., 2002). Para esta espécie, uma combinação entre temperatura de 4°C e escuro pode aumentar o intervalo entre subcultivos de 12 meses para até quatro anos (Bekheet, 2011).

4.2 Efeito de diferentes carboidratos e concentrações na conservação *in vitro* de germoplasma de palma de óleo

No geral, meios contendo sacarose na concentração de 3% favoreceram o desenvolvimento normal dos explantes conservados e resultaram em plantas de melhor aspecto, com predomínio de folhas com coloração verdes escuras uniformes durante todo o processo de armazenamento, comparativamente aos meios com manitol e sorbitol. Estes dados corroboram com aqueles obtidos por Faria et al. (2006) na conservação *in vitro* de maracujazeiro, onde a coloração das folhas das plantas mantidas em sacarose foram superiores às mantidas em meios contendo sorbitol. Em sempre-viva (*Singonanthus mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis*), a melhor condição para a conservação *in vitro* de plantas se dá, sob temperatura de 18°C em presença de sacarose (Lima-Brito, et al., 2011).

A adição de sacarose ao meio de cultura da palma de óleo favoreceu dois fatores fundamentais para a manutenção de germoplasma *in vitro*; são eles: a sobrevivência e o aspecto das plantas conservadas. Os benefícios da utilização da sacarose como fonte de carbono na cultura de tecidos vegetais haviam sido descritos por Grattapaglia & Machado (1998). Esta é a fonte de carbono mais utilizada nos protocolos de cultivo *in vitro*, sendo considerada a melhor fonte para a diferenciação celular e o desenvolvimento dos explantes. Em geral, a concentração de 30 g.L⁻¹ sustenta o desenvolvimento de brotações para a grande maioria das espécies já estabelecidas *in vitro* (Murashige, 1974, Paiva Neto & Otoni, 2003).

Após um ano de cultivo das plantas de palma de óleo, o maior retardo no crescimento foi observado nos meios de cultura contendo manitol. Apesar do resultado positivo na redução do crescimento das plantas, fator importante para o processo de

conservação *in vitro*, a utilização do manitol não se mostrou adequada para atender os objetivos propostos, uma vez que esse carboidrato proporcionou necrose acentuada nas plantas, com conseqüente redução da sobrevivência.

Efeitos tóxicos do manitol sobre os explantes na conservação *in vitro* foram reportados por Sá et al. (2011) em micro-estacas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). Nesse trabalho, os autores observaram que após 90 dias de cultivo *in vitro* houve senescência total das micro-estacas. Em explantes de batata (*Solanum tuberosum* L.), Fortes & Scherwinski-Pereira (2001) observaram que, embora a presença de manitol no meio de cultura tenha reduzido mais efetivamente o crescimento das hastes, somente 37% dos explantes sobreviveram após três meses de cultivo. Em plântulas de côco (*Cocos nucifera*) Ledo et al. (2007) relataram que a adição de manitol nas concentrações de 0,3 ou 0,4 M promoveram um menor crescimento da parte aérea e da raiz, no entanto, resultaram nos menores percentuais de sobrevivência das plantas. Em cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*), explantes provenientes de tratamentos com baixas concentrações de sacarose (1%), combinadas com manitol ou sorbitol, consumiram as reservas do meio mais rapidamente, apresentando, assim, menor desenvolvimento e interferindo na viabilidade dos explantes (Lemos et al., 2002).

Além do maior retardo no crescimento, observou-se que plantas de palma de óleo cultivadas em meios contendo 3% de manitol apresentaram ao final do período de 12 meses folhas cloróticas, enroladas ou com crescimento desproporcional. Embora em menor intensidade, os tratamentos contendo sorbitol também apresentaram plantas nas mesmas condições. Estes mesmo sintomas foram descritos por Montalvo-Peniche et al. (2007) na conservação de pimenta habanero (*Capsicum chinensis* Jacq.); embora as plantas mantidas em presença de manitol e sorbitol resultassem em crescimento reduzido, os autores relatam a ocorrência de alterações anatômicas e fisiológicas que

comprometeram a qualidade das plantas produzidas. Lata et al. (2010) observaram que a presença de manitol e sorbitol nos meios de cultura impactaram negativamente a regeneração dos explantes de *Podophyllum peltatum* L. mantidos *in vitro*.

Em palma de óleo, observou-se efeito genótipo-dependente sobre os valores das variáveis: altura, percentual de crescimento e aspecto das plantas conservadas. Tais efeitos também foram relatados em outras culturas mantidas sob regime de crescimento mínimo, como a batata (*Solanum tuberosum*) (Gopal & Iwama, 2007), o café (*Coffea arabica* L.) (Bertrand-Desbrunais et al., 1994) e a pereira (*Pyrus spp.*) (Ahmed et al., 2010).

O uso do sorbitol como regulador osmótico produziu resultados intermediários, porém, próximos daqueles obtidos quando as plantas de palma de óleo foram cultivadas em sacarose, com elevada sobrevivência de explantes e com predomínio de folhas verdes claras e com pouca incidência de necrose. Fletcher (1994) relata que plantas de aspargo (*Asparagus officinalis* L.) conservadas *in vitro*, em meios de cultura contendo sorbitol e sacarose, apresentaram resultados semelhantes quanto a redução do crescimento. No entanto, Bekheet (2007) relata não ser possível diferenciar claramente entre manitol e sorbitol, quanto aos seus efeitos na sobrevivência de culturas armazenadas.

Segundo Withers (1991) o método comumente utilizado para manter plantas sob regime de crescimento mínimo é a diminuição da temperatura, que no caso de plantas tropicais deve ficar entre 15 e 25°C. Nos casos em que a exposição à baixa temperatura não for eficiente para conter o crescimento ou, onde não houver um sistema de câmaras frias suficientes para manter os materiais, pode-se recorrer ao uso de inibidores osmóticos como o manitol e o sorbitol, ou ainda, uma combinação entre os dois fatores: temperatura baixa e um inibidor osmótico. No entanto, o método mais adequado é

aquele capaz de ser reproduzido, com resultados semelhantes, em diferentes culturas ou para diferentes acessos de uma mesma cultura.

Desta forma e, visando atender os pressupostos acima, os dados obtidos no presente trabalho demonstraram que as plantas de palma de óleo podem ser mantidas sob crescimento mínimo apenas reduzindo-se a temperatura da sala de crescimento de 25 para 20°C. Este método, além de eficiência, proporciona maior estabilidade aos materiais conservados, uma vez que a ocorrência de estresse durante o período de conservação é um dos fatores que podem induzir variação somaclonal. De acordo com Bairu et al. (2011) as análises de seqüências de DNA repetitivo em espécies vegetais mantidas *in vitro* mostraram que os genótipos respondem de forma diferente aos estresses induzidos durante a cultura de tecidos. Os autores relatam ainda, que durante o processo a incidência de variação somaclonal pode ocorrer pela adição de osmorreguladores, tipo de metodologia de propagação *in vitro*, tipo de tecido utilizado, uso de reguladores de crescimento, além do número e duração dos subcultivos.

5. CONCLUSÕES

Plantas de palma de óleo podem ser mantidas *in vitro*, em regime de crescimento mínimo sob temperatura de 20°C, durante 12 meses sem a necessidade de subcultivos intermediários.

A sacarose foi o carboidrato mais adequado para a manutenção da qualidade das plantas conservadas *in vitro*.

O uso de reguladores osmóticos no meio de cultivo não se mostra um método eficiente para manter sob conservação plantas inteiras de palma de óleo.

6. REFERENCIAS

- Ahmed, M. M., Anjum, M. A., Shah, A. H. & Hamid, A. 2010. *In vitro* preservation of *Pyrus* germplasm with minimal growth using different temperature regimes. *Pakistan Botanical Society*, 42, 1639-1650.
- Bairu, M. W., Aremu, A. O. & Staden, J. V. 2011. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regulators*, 63, 147-173.
- Bekheet, S. A., Taha, H. S. & Saker, M. M. 2002. *In vitro* long-term storage of date palm. *Biologia Plantarum*, 45, 121-124.
- Bekheet, S. A. 2007. *In vitro* preservation of globe artichoke germplasm. *Plant Tissue Culture & Biotechnology*, 17, 01-09.
- Bekheet, S. A. 2011. *In vitro* Conservation of date palm germplasm. *Date Palm Biotechnology*, 3, 337-360.
- Bertrand-Desbrunais, A., Noirot, M. & Charrier, A. 1994. Slow growth *in vitro* conservation of coffee (*Coffea spp.*). *Plan cell, tissue and organ culture*, 31, 105-110.
- Camillo, J., Luis, Z. G. & Scherwinski-Pereira, J. E. 2009a. Oil palm seeds tolerance to cryopreservation. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 44, 211-215.
- Camillo, J., Scherwinski-Pereira, J. E., Vieira, R. F. & Peixoto, J. R. 2009b. Conservação *in vitro* de *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg.-Cochlospermaceae sob regime de crescimento mínimo. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 11(2), 184-189.
- Cid, L. P. B. & Carvalho, L. L. C. B. 2008. Importancia del ácido abscísico (ABA) en la conservación *in vitro* de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz). *Chilean Journal of Agricultural Research*, 68, 304-308.
- Corbineau, F., Engelmann, F. & Côme, D. 1990. Ethylene production as an indicator of chilling injury in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryos. *Plant Science*, 71, 29-34.
- Ellis, R. H., Hong, T. D., Roberts, E. H. & Soetisna, U. 1991. Seed storage behaviour in *Elaeis guineensis*. *Seed Science Research*, 1, 99-104.
- Engelmann, F. 2011. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cell Developmente and Biology*, 47, 5-16.
- Engelmann, F., Chabrillange, N., Dussert, S. & Duval, Y. 1995. Cryopreservation of zygotic embryos and kernels of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Seed Science Research*, 5, 81-86.
- Faria, G. M., Costa, M. A. P. C., Junghans, T. G., Ledo, C. A. S. & Souza, A. S. 2006. Efeito da sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* de *Passiflora giberti* N.E. Bronw. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 28, 267-270.
- Fletcher, P. J. 1994. *In vitro* long-term storage of asparagus. *Journal of Crop and Horticultural Science*, 22, 351-359.
- Fortes, G. R. L. & Scherwinski-Pereira, J. E. 2001. Preservação *in vitro* de batata com ácido acetilsalicílico e duas fontes de carboidratos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 36, 1261-1264.
- García, M. B., Malaurie, B., Viltres, S. P. & Campos, D. C. 2008. Efecto de las distintas concentraciones de sacarosa en la conservación *in vitro* de côco (*Cocos nucifera*). *Revista Colombiana de Biotecnología*, X, 111-119.
- Gopal, J. & Iwama, K. 2007. *In vitro* screening of potato against water-stress mediated through sorbitol and polyethylene glycol. *Plant Cell Reports*, 26, 693-700.

- Grattapaglia, D. & Machado, M. A. 1998. Micropropagação. In: TORRES, A. C., CALDAS, L. S. & BUSO, J. A. (Eds.) *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília - DF.
- Kanchanapoom, K. & Promsorn, N. 2012. Micropropagation and *in vitro* germplasm conservation of endangered *Musa balbisiana* "Kluai Hin" (BBB group). *African Journal of Biotechnology*, 11, 6464 - 6469.
- Konan, E. K., Durand-Gasselín, T., Kouadio, Y. J., Flori, A., Rival, A., Duval, Y. & Pannetier, C. 2010. *In vitro* conservation of oil palm somatic embryos for 20 years on a hormone-free culture medium: characteristics of the embryogenic cultures, derived plantlets and adult palms. *Plant Cell Reports*, 29, 1-13.
- Lata, H., Moraes, R. M., Bertoni, B. & Pereira, A. M. S. 2010. *In vitro* germplasm conservation of *Podophyllum peltatum* L. under slow growth conditions. *In Vitro Cell Developmental Biology Plant*, 46, 22-27.
- Lemos, E. E. P., Ferreira, M. S., Alencar, L. C., Ramalho Neto, C. E. & Albuquerque, M. M. 2002. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 37, 1359-1364.
- Lima-Brito, A., Albuquerque, M. M. S., Alvim, B. F. M., Resende, S. V., Bellintani, M. C. & Santana, J. R. F. 2011. Osmotic agents and temperature on *in vitro* conservation of sempre-viva. *Ciencia Rural*, 41, 1354-1361.
- Ledo, A. S., Cunha, A. O., Aragão, W. M. & Tupinambá, E. A. 2007. Efeito da sacarose e do manitol na conservação *in vitro* por crescimento lento de coqueiro anão. *Magistra*, 19, 346-351.
- Montalvo-Peniche, M. C., Iglesias-Andreu, L. G., Mijangos-Cortés, J. O., Nahuat-Dzib, S. L., Barahona-Pérez, F., Canto, A. & Santana-Buzzy, N. 2007. *In vitro* germplasm conservation of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *Hortscience*, 42, 1247-1252.
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. *Annals Reviews Plant Physiology*, 25, 135-166.
- Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia*, 15, 473-497.
- Pacheco, G., Gagliardi, R. F., Valls, J. F. M. & Mansur, E. 2009. Micropropagation and *in vitro* conservation of wild *Arachis* species. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 99, 239-249.
- Paiva Neto, V. B. & Otoni, W. C. 2003. Carbon sources and their osmotic potential in plant tissue culture: does it matter? *Scientia Horticulturae*, 97, 193-202.
- Rohani, O. & Paranjothy, K. 1995. Long-term *in vitro* maintenance of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) clones through axenic root cultures. *Elaeis*, 7, 1-9.
- Scherwinski-Pereira, J. E., Costa, F. H. S., Camillo, J., Silva, D. B., Alves, R. B. N. & Vieira, R. F. 2010. Tissue culture storage of brazilian medicinal plants germplasm. *Acta Horticulturae*, 860, 211-214.
- Silva, R. C., Luis, Z., G. & Scherwinski-Pereira, J. E. 2012. Short-term storage *in vitro* and large-scale propagation on grapevine genotypes. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 47, 344-350.
- Silva, T. L. & Scherwinski-Pereira, J. E. 2011. *In vitro* conservation of *Piper aduncum* and *Piper hispidinervum* under slow-growth conditions. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 46, 384-389.
- Sá, A. J., Ledo, A. S. & Ledo, C. A. S. 2011. *In vitro* conservation of mangaba tree in Northeast Brazil. *Ciencia Rural*, 41, 57-62.

- Sánchez-Chiang, N. & Jiménez, V. M. 2010. Técnicas de conservación *in vitro* para el establecimiento de bancos de germoplasma en cultivos tropicales. *Agronomía Mesoamericana*, 21, 193-205.
- Tandon, R., Chaudhury, R. & Shivanna, K. R. 2007. Cryopreservation of oil palm pollen. *Current Science*, 92, 182-183.
- Villa, A. L., Jiménez, P. E., Valbuena, R. I., Bastidas, S. & Núñez, V. M. 2007. Preliminary study of the establishment of cryoconservation protocol for oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Agronomia Colombiana*, 25, 215-223.
- Withers, L. A. 1991. *In vitro* conservation. *Biological Journal of Linnean Society*, 43, 31-42.
- Yun-peng, D., Wen-yuan, L., Ming-fang, Z., Heng-bin, H. & Gui-xia, J. 2012. The establishment of a slow-growth conservations system *in vitro* for two lily species. *Africal Journal of Biotechnology*, 11, 1981-1990.
- Zonta, E. P. & Machado, A. A. 1984. SANEST – Sistema de Análise Estatística para Microcomputadores. Pelotas, UFPel. 138p.

CAPÍTULO IV

Reavaliação do tamanho do genoma de *Elaeis guineensis* Jacq., *E. oleifera* (Kunth)

Cortés e seus híbridos interespecíficos

CAMILLO, J.; LEÃO, A.P.; ALVES, A.A.; FORMIGHIERI, E.F.; AZEVEDO, A.L.;

NUNES, J.D., CAPDEVILLE, G.; MATTOS, J.K.; SOUZA JUNIOR, M.T.

RESUMO

Com o objetivo de gerar um abrangente banco de dados genômicos sobre *Elaeis spp.*, estão sendo conduzidas ações de pesquisa e desenvolvimento em *Elaeis guineensis* Jacq. e *E. oleifera* (Kunth) Cortés e uma delas, visa o seqüenciamento completo do genoma de *E. oleifera*. Informações referentes ao tamanho do genoma são primordiais para planejar a estratégia de seqüenciamento e as estimativas atualmente disponíveis para estas espécies, indicam diferenças substanciais entre os genomas dos parentais e do híbrido interespecífico. Havendo a necessidade de se obter dados de alta qualidade, decidiu-se reavaliar o tamanho de genoma de *Elaeis spp.*, por considerar o assunto não elucidado. Os resultados indicaram que, para a estimativa do tamanho do genoma em espécies de *Elaeis* utilizando-se a soja como padrão interno de referência, os resultados são mais confiáveis. As estimativas indicam que, em média, o tamanho do genoma de *E. guineensis* é de $4,32 \pm 0,173$ pg, enquanto que em *E. oleifera* é de $4,43 \pm 0,180$ pg. Isso indica que ambos os genomas são semelhantes em tamanho, e como esperado, o tamanho do genoma do híbrido é próximo da média dos dois genomas parentais, com $4,40 \pm 0,016$ pg. Com base nos resultados observados, pode-se dizer que a soja deve ser utilizada preferencialmente como padrão de referência interno na quantificação de DNA em *Elaeis*. Visto que, os resultados observados contrastam completamente com os dados disponíveis referentes ao tamanho do genoma de *Elaeis spp.*, pode-se considerar que o tamanho real do genoma das espécies *Elaeis* é de aproximadamente 4 pg, e que *E. oleifera* possui um genoma maior do que *E. guineensis*.

Palavras-chave: palma de óleo; caiaué; citometria de fluxo; seqüenciamento de DNA

ABSTRACT

Aiming at generating a comprehensive genomic database of with *Elaeis guineensis* Jacq. and *E. oleifera* (Kunth) Cortés, one of these initiatives intends to perform the whole-genome sequencing of the *E. oleifera*. Knowledge on genome size is essential to correctly plan the sequencing strategy to obtain the genome sequence draft. Genome size estimates currently available for this genus are however controversial, as it indicates that *E. oleifera* genome is about half of the size of the oil palm genome, and that the genome of the interspecific hybrid is far bigger than both parental species. Since it was needed high-quality data on that respect, we decided to revisit a theme that we consider unresolved, the genome size of *Elaeis* spp. The results indicate that for estimation of the genome size of *Elaeis* species, soybean, used as internal pattern yielded, gives more reliable results. Our estimates indicate that, the genome size of *E. guineensis* is 4.32 ± 0.173 pg, while *E. oleifera* genome is 4.43 ± 0.180 pg. This indicates that both genomes are close in size, and *E. oleifera* is in fact bigger, contrary to previously reported. As expected, the hybrid genome size is around the average of the two parental genomes, $4,40 \pm 0,016$ pg. We propose that soybean should be preferably used for *Elaeis* DNA quantification as an internal reference standard. As our results completely contradicts the currently available data on *Elaeis* spp. genome sizes, we propose that the actual genome size of the *Elaeis* species is around 4 pg, and that *E. oleifera* possess a larger genome than *E. guineensis*.

Keywords: oil palm; caiaué; FCM – flow cytometry; DNA sequencing

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Elaeis* compreende três espécies: *Elaeis guineensis* Jacq., *Elaeis oleifera* (Kunth) Cortés e *Elaeis odora* Trail. A espécie *E. guineensis* é nativa da África, podendo ser encontrada em populações espontâneas ou cultivada nas regiões tropicais da África, sudeste asiático, América do sul e Central. Já o *E. oleifera* é endêmico da zona tropical úmida da América Latina, ocorrendo em populações espontâneas desde o sul do México até as áreas amazônicas do Brasil e Colômbia. Por fim, o *E. odora* é nativa do continente americano, porém pouco conhecida. Dentre essas espécies, somente *E. guineensis* e *E. oleifera* possuem interesse comercial, principalmente para a produção de óleos e gorduras. O óleo produzido apresenta grande versatilidade, podendo ser empregado desde a fabricação de cosméticos até a produção de biocombustíveis (Corley, 1982, Conceição & Muller, 2000, Cunha et al., 2009).

O mercado mundial de óleos e gorduras cresce a cada ano e apenas a palma de óleo, soja e a canola respondem por cerca de 60% desta demanda (Basiron, 2007). Dentre estas culturas, a palma de óleo é a que apresenta maior rentabilidade, uma vez que os estudos comparativos de produtividade demonstram que a soja produz em média 0,46 ton/ha/ano de óleo, enquanto que a palma pode produzir 4 a 6 ton/ha/ano (Chia et al., 2009). Os dados de produção indicam que a soja ocupa cerca de 42% da área mundial plantada com espécies oleaginosas, enquanto a palma de óleo ocupa apenas 4,2%, embora as duas espécies produzam aproximadamente a mesma quantidade de óleo, ou seja, 33 milhões de toneladas/ano. Esta vantagem da palma sobre outras espécies oleaginosas se deve principalmente, pela maior capacidade fotossintética da espécie e produção contínua de frutos (Basiron, 2007, Wahid et al., 2004). Atualmente, os maiores produtores mundiais de óleo de palma são a Indonésia, Malásia, Tailândia,

Colômbia e Nigéria, sendo que, Indonésia e Malásia juntas, respondem por mais de 90% da produção mundial total. No ranking mundial dos países produtores, o Brasil ocupa a 9ª colocação com uma produção de aproximadamente 280.000 toneladas/ano de óleo de palma (USDA, 2012). A produção brasileira de óleo de palma está concentrada no estado do Pará, com cerca de 80% dos plantios. Embora o mercado de biocombustíveis esteja em franca ascensão, a produção nacional é quase toda destinada à indústria de alimentos (Brasil, 2009, Chia et al., 2009).

A expansão das plantações de palma de óleo no Brasil, bem como em outras partes do continente americano, têm sido, prejudicada pela ocorrência de uma doença conhecida como Amarelecimento Fatal (AF), de etiologia desconhecida o que dificulta seu controle. Uma das estratégias utilizadas para deter o avanço do AF, é a utilização de híbridos interespecíficos entre *E. guineensis* e *E. oleifera*, uma vez que este tem se mostrado tolerante a doença. As duas espécies se hibridizam com facilidade, produzindo descendentes férteis e assim, variedades híbridas podem ser facilmente desenvolvidas e lançadas como uma alternativa às cultivares de palma de óleo tradicionais. Atualmente, os híbridos são plantados no Brasil apenas nas áreas de ocorrência do AF, visto que apresentam alguns problemas que limitam sua ampla adoção (Barcelos et al., 2000, Veiga et al., 2001), como por exemplo: (i) produção do óleo mais baixa quando comparada ao híbrido de palma de óleo var. *tenera*, (ii) a ocorrência de anormalidades em inflorescências do sexo masculino; (iii) menor quantidade de pólen, necessitando, portanto, a implementação de polinização assistida como uma prática de manejo (Cunha et al., 2009). Mas apesar das limitações, o *E. oleifera* representa uma importante fonte de genes para o programa de melhoramento da palma de óleo (Barcelos et al., 2000).

Devido à demanda cada vez maior por biodiesel no Brasil (Osaki & Batalha, 2011) e dado o fato de que a produção de óleo de palma por hectare é muito maior do

que aquela obtida pela soja (que atualmente fornecem mais de 85% do óleo utilizado para produção de biodiesel no Brasil), os pesquisadores decidiram centrar esforços no desenvolvimento de híbridos interespecíficos. A estratégia de reprodução atual se baseia na geração e avaliação de híbridos interespecíficos F1, seguido pela seleção dos melhores para serem utilizados como pais em campos de produção de sementes, ou em esquemas de retrocruzamento com *E. guineensis* (Chia et al., 2009). A propagação clonal dos melhores genótipos também está sendo considerado como uma ação estratégica. Em apoio a isso e visando à geração de um banco de dados genômicos abrangente sobre *Elaeis spp.*, estão sendo incentivadas diversas iniciativas em genética e genômica da palma de óleo, e uma dessas iniciativas é o seqüenciamento de todo o genoma do *E. oleifera*. O tamanho do genoma, é portanto, uma informação fundamental, pois permite a definição da melhor estratégia de seqüenciamento para o genoma do *E. oleifera*.

No entanto, algumas inconsistências nos estudos relacionados ao tamanho do genoma em *Elaeis spp.* publicados anteriormente tornam difícil tirar conclusões definitivas sobre o tamanho real do genoma. As estimativas atualmente disponíveis para *Elaeis spp.* indicam, por exemplo, que o tamanho do genoma do *E. oleifera* é cerca de metade do genoma de *E. guineensis* e que o genoma do híbrido interespecífico é muito maior do que o genoma de ambas as espécies parentais (Rival et al., 1997, Madon et al., 2008). Estas informações são intrigantes, pois a relação estreita entre *E. guineensis* e *E. oleifera*, especialmente o fato de que ambas as espécies hibridizam com facilidade, sugerem que seu genoma não seria tão distinto em tamanho. Além disso, o tamanho do genoma esperado para o híbrido interespecífico seria a média do genoma dos pais.

Devido a necessidade de se saber com certeza o tamanho do genoma de *E. oleifera* antes de iniciar um projeto de sequenciamento do genoma completo desta

espécie, optou-se por revisitar o tema considerado até então não elucidado: o tamanho do genoma das duas espécies mais importantes do genero *Elaeis* e seus híbridos inter-especificos. O objetivo deste trabalho foi, então, a reestimativa, através do uso de citometria de fluxo, do tamanho do genoma de *E. guineensis*, *E. oleifera* e dos híbridos inter-especificos, de modo a poder estabelecer a estratégia mais adequada para o seqüenciamento do genoma *E. oleifera*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material biológico

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Gado Leite, em Juiz de Fora, MG (Brasil). Como fonte de amostras, utilizou-se folhas jovens de plantas mantidas em condições *in vitro*. Foram estudados 10 acessos, sendo: três de *Elaeis guineensis* (Eg2301, Eg1210, Eg0920), cinco de *E. oleifera* (Eo0507, Eo0726, Eo0312, Eo0213, Eo0610) e dois híbridos interespecíficos (H1619 e H413). Os acessos foram coletados no Banco Ativo de Germoplasma (BAG-Dendê) mantido pela Embrapa Amazônia Ocidental – Manaus/AM (Brasil).

2.2 Estimativa do tamanho do genoma de *E. guineensis*, *E. oleifera* e do híbrido interespecífico através de citometria de fluxo

Como padrão de referência interno e externo foram utilizadas folhas jovens de *Glycine max* cv. "Polanka" (soja) e *Solanum lycopersicum* L. "Stupické polní rané" (tomate). As amostras foram trituradas em placas de Petri com 800µl de tampão LB01 gelado, para a extração da suspensão nuclear, que foi então aspirada com pipeta de Pasteur através de duas camadas de gaze e posteriormente, filtrada em malha 42µm. À suspensão nuclear foi adicionado 25µl de iodeto de propídio e 25µl de RNase. Para cada amostra foram analisadas pelo menos 10 mil núcleos, tanto na escala linear como logarítmica (Dolezel et al., 2007b). As análises foram feitas em citômetro FacScalibur (Becton Dickinson), os histogramas foram gerados e analisados em software Cell Quest WinMDI versão 2.9 (<http://facs.scripps.edu/software.html>).

Para aumentar a confiabilidade dos resultados, apenas histogramas com coeficiente de variação inferior a 3% foram utilizados. A quantidade de DNA nuclear das plantas foi estimado em picogramas (pg), comparando-se os picos G1 da amostra com picos G1 dos padrões, tanto internos como externos. O tamanho médio do genoma (2C) do tomate equivale a 1,96 pg de DNA e da soja a 2,50 pg (Dolezel et al., 1992, Greilhuber et al., 2007). A calibração do equipamento foi realizada comparando-se os padrões da seguinte forma: *G. max* x *S. lycopersicum* (padrão primário) e *S. lycopersicum* x *G. max* (padrão primário). Os valores obtidos na calibração para *S. lycopersicum* e *G. max* foram de 1.96 pg e 2.41 pg, respectivamente. Os valores estão de acordo com os padrões descritos por Dolezel et al. (2007b) e Praça-Fontes et al. (2011).

2.3 Delineamento experimental e análise dos dados

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, composto por dez tratamentos {três acessos de *E. guineensis* (Eg2301, Eg1210 e Eg0920); cinco de *E. oleifera* (Eo0507, Eo0726, Eo0312, Eo0213 e E00610) e dois híbridos interespecíficos (H1619 e H413)}, três repetições/tratamento e quatro replicatas, sendo que cada repetição experimental consistiu de uma folha tenra. As medias dos tratamentos foram comparadas com base em diferentes padrões de referência conhecidos, avaliando-se ainda diferentes combinações de análises (soja e tomate, padrão interno e externo, escala logarítmica e linear), através da análise de variância (ANOVA), com $p \leq 0,05$. As medias para o tamanho do genoma das duas espécies e do híbrido interespecífico foram diferenciadas com base no teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$). Para esclarecer a ocorrência de alguma diferença significativa entre o uso de padrão externo ou interno, medição dos dados em escala

linear ou logarítmica, as medias obtidas foram comparadas também através do teste t ($p \leq 0,05$) (por exemplo: tamanho do genoma estimado para Eg2301, com base no padrão externo tomate e medido em escala linear, versus, tamanho do genoma estimado para Eg2301, com base no padrão externo tomate e medido na escala logarítmica).

3. RESULTADOS

3.1 Escolha do padrão

De acordo com a disponibilidade de padrões de referência (Praça-Fontes et al., 2011), optou-se por testar soja e tomate como padrões na quantificação do conteúdo de DNA nuclear de *E. guineensis*, *E. oleifera* e seu híbrido interespecífico. Como pode ser observado na Figura 1, o genoma da soja é maior do que o genoma do tomate e, mais importante, de tamanho mais próximo às espécies de *Elaeis*. Esta figura mostra picos bem definidos a partir de núcleos isolados em G1 de tomate (amarelo), soja (azul) e amostra (vermelho), ou seja, *E. guineensis*, *E. oleifera* ou amostra do híbrido, podem ser combinadas em uma única imagem. Em princípio, o uso de um padrão de referência, cujo genoma é de tamanho mais próximo ao genoma da amostra, deve resultar estimativas mais precisas (Dolezel et al., 2007b). De fato, foram encontradas diferenças nos resultados. Ao estimar o tamanho do genoma de *E. guineensis* e *E. oleifera*, os valores médios de C (C-valor) foram maiores com a soja como padrão de referência em relação ao tomate (Tabela 1). Esta diferença era esperada e pode potencialmente indicar que, sendo o genoma da soja de tamanho mais próximo ao genoma da palma de óleo, deve ser preferencialmente utilizada como padrão de referência.

Também foi testado a existência ou não de diferenças nos resultados quando se utiliza padrão de referência interno ou externo. Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que a soja e o tomate se comportam de maneira diferente quando utilizados como padrões de referência internos ou externos. Diferenças significativas no tamanho do genoma das espécies foram sistematicamente observadas (ou seja, as diferenças ocorreram em todas os acessos avaliados) quando a soja e o tomate foram utilizados como padrões internos (Tabela 2). Por outro lado, quando estas mesmas

plantas foram utilizadas como padrões externos, observou-se diferenças significativas entre o tamanho do genoma apenas em dois acessos (*E. guineensis* - Eg2301 e *E. oleifera* - Eo0610) (Tabela 2). Este resultado pode eventualmente estar relacionado ao fato de que o uso de padrão externo parece ser menos preciso do que padrão interno. Isso também pode ser facilmente observado pelo desvio padrão mais elevado nas médias dos tamanhos de genoma obtidas por padrões externos (Tabela 1). Isto indica claramente que uma amostra de referência interna é mais sensível do que uma amostra de referência externa, independentemente da espécie (soja ou tomate) utilizada. O uso do padrão de referência interno parece ser então a melhor estratégia para estimar corretamente o tamanho do genoma das espécies de *Elaeis* e seus híbridos, uma vez que observou-se um nível de precisão mais elevado.

Em estudos de citometria de fluxo, atualmente são adotados para a quantificação do tamanho do genoma, histogramas plotados utilizando-se escala linear em vez de escala logarítmica. Para efeito de comparação, no presente estudo foram observadas também as possíveis diferenças que poderiam surgir dependendo da escala em que as leituras foram geradas, ou seja, utilizando escala linear ou logarítmica. Pode-se notar com base nas Tabelas 1 e 2 que, quando a soja foi utilizada como padrão de referência externo, não houve diferença significativa entre os tamanhos do genoma estimados usando-se escalas lineares ou logarítmicas. No restante dos casos, os resultados parecem ser genótipo-dependentes (Tabela 2). Em geral, observou-se uma ligeira tendência para escala logarítmica em apresentar genomas de tamanhos maiores (Tabela 1) e uma melhor distinção dos genótipos de acordo com a espécie a que pertence.

3.2 Tamanho do genoma das espécies de *Elaeis* e do híbrido interespecífico

Em geral, os resultados indicaram que o tamanho do genoma das duas espécies são muito próximos (cerca de 4 pg, em média), e que o genoma do híbrido é de tamanho intermediário (Tabela 1). Dado o elevado desvio padrão produzido quando se utilizou padrões externos, independentemente da espécie (soja ou tomate) usada como referência e da escala de leitura, não foram encontradas diferenças significativas entre os tamanhos do genoma estimado para os três grupos (*E. guineensis*, *E. oleifera* e híbridos interespecíficos). Por outro lado, de acordo com a indicação de que os padrões internos superam os padrões externos, diferenças significativas foram encontradas entre os tamanhos do genoma para os três grupos analisados, tanto para as escalas lineares como logarítmica, quando considerado o padrão interno (Tabela 1). Em geral, pode-se notar que nos casos em que houve diferenças significativas entre os três grupos, os acessos de *E. oleifera* apresentaram tamanho de genoma com médias maiores, enquanto que as de *E. guineensis* e híbridos interespecíficos apresentaram genomas menores (Tabela 1). Este fato é mais facilmente observado na escala logarítmica que permite uma melhor diferenciação dos tamanhos do genoma de acordo com o grupo ao qual pertence cada acesso. Outro fato a ser considerado, é que os picos afilados exibido em todos os histogramas (Figura 2) indicam boa qualidade dos dados e como consequência, alta confiabilidade dos resultados relatados aqui. Este valor, em contraste com a Figura 1, ilustra os resultados reais obtidos quando a soja e tomate foram usados como padrão de referência interno e externo para a avaliação da amostra.

Em relação especificamente ao tamanho do genoma de *E. guineensis*, *E. oleifera* e seus híbridos interespecíficos e, assumindo que a combinação do padrão soja interno é o mais adequada para a quantificação do conteúdo de DNA de *Elaeis spp.* (como

indicado pelos resultados iniciais), em média, o tamanho do genoma de *E. guineensis* é $4,32 \pm 0,173$ pg, enquanto que o genoma de *E. oleifera* é $4,43 \pm 0,180$ pg. Como esperado, o genoma do híbrido apresenta tamanho intermediário, considerando os dois genomas parentais, com média de $4,40 \pm 0,016$ pg. Esse resultado contrasta completamente com os dados atualmente disponíveis na bibliografia consultada.

Tabela 1. Resultados do teste de Tukey para a quantificação de DNA nuclear (pg) para os acessos de *Elaeis guineensis* (Eg), *E. oleifera* (Eo) e seu híbrido interespecífico (H) demonstrando a inexistência de padrões específicos de agrupamento.

Acessos	Conteúdo de DNA 2C (médias ± desvio padrão)							
	SE Lin	SE Log	SI Lin	SI Log	TE Lin	TE Log	TI Lin	TI Log
H1619	4.019 ± 0.259 a	3.955 ± 0.259 a	4.390 ± 0.013 abc	4.438 ± 0.086 de	3.793 ± 0.029 a	3.876 ± 0.104 a	3.916 ± 0.051 b	4.006 ± 0.038 abc
H413	3.883 ± 0.164 a	4.199 ± 0.335 a	4.414 ± 0.008 ab	4.547 ± 0.072 cd	3.890 ± 0.079 a	4.007 ± 0.084 a	3.915 ± 0.058 b	4.051 ± 0.080 abc
Eg2301	4.073 ± 0.079 a	4.008 ± 0.265 a	4.261 ± 0.029 bcd	4.363 ± 0.049 e	3.889 ± 0.046 a	3.923 ± 0.184 a	3.898 ± 0.039 b	3.900 ± 0.176 bc
Eg1210	3.965 ± 0.208 a	4.135 ± 0.187 a	4.156 ± 0.022 a	4.353 ± 0.029 e	3.842 ± 0.154 a	4.007 ± 0.175 a	3.876 ± 0.053 b	3.863 ± 0.089 c
Eg0920	3.908 ± 0.197 a	4.058 ± 0.304 a	4.194 ± 0.069 cd	4.388 ± 0.051 e	3.951 ± 0.175 a	3.952 ± 0.111 a	3.875 ± 0.088 b	3.939 ± 0.057 abc
Eo0507	4.032 ± 0.218 a	4.333 ± 0.316 a	4.544 ± 0.029 a	4.686 ± 0.059 ab	3.839 ± 0.111 a	4.223 ± 0.274 a	3.983 ± 0.058 ab	4.124 ± 0.025 a
Eo0726	4.022 ± 0.403 a	4.329 ± 0.278 a	4.533 ± 0.063 a	4.758 ± 0.035 a	3.886 ± 0.139 a	4.191 ± 0.115 a	4.060 ± 0.043 a	4.099 ± 0.053 ab
Eo0312	3.848 ± 0.105 a	4.196 ± 0.288 a	4.361 ± 0.244 abcd	4.575 ± 0.054 bc	3.781 ± 0.149 a	4.030 ± 0.311 a	3.975 ± 0.036 ab	4.090 ± 0.117 ab
Eo0213	4.077 ± 0.352 a	4.411 ± 0.464 a	4.561 ± 0.058 a	4.670 ± 0.044 abc	3.743 ± 0.269 a	4.293 ± 0.219 a	4.086 ± 0.038 a	4.080 ± 0.031 ab
Eo0610	4.213 ± 0.274 a	4.203 ± 0.163 a	4.530 ± 0.062 a	4.714 ± 0.041 a	3.757 ± 0.014 a	4.064 ± 0.150 a	3.974 ± 0.065 ab	4.107 ± 0.067 a

Médias na mesma coluna seguidas de letras diferentes são consideradas significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). Padrões: *Glycine max* cv. "Polanka" 2C = 2,50 pg; *Solanum lycopersicum* L. "Stupické polní rané" 2C = 1,96 pg; SE = Soja Externa; SI – Soja Interna; TE – Tomate Externo; TI – Tomate Interno; Escala: Lin – Linear; Log – Logaritmica.

Tabela 2. Resultado do teste t demonstrando que as estimativas para o tamanho do genoma de *Elaeis spp.* obtidas através de ctoimetria de fluxo, são dependentes do tipo de padrão de referência a seu utilizado (por exemplo: tomate vs soja; padrão interno vs externo; escala logaritmica vs linear).

Comparações	Acessos									
	H1619	H413	Eg2301	Eg1210	Eg0920	Eo0507	Eo0726	Eo0312	Eo0213	Eo0610
TI Log x SI Log	0.000659*	0.000098*	0.010284*	0.000747*	0.000025*	0.000058*	0.000003*	0.001358*	0.000002*	0.000021*
TE Log x SE Log	0.601495	0.339884	0.619082	0.357502	0.549129	0.618983	0.412731	0.463939	0.666777	0.256415
TI Lin x SI Lin	0.000172*	0.000340*	0.000011*	0.000602*	0.001494*	0.000031*	0.000082*	0.048873*	0.000027*	0.000017*
TE Lin x SE Lin	0.179866	0.942835	0.010976*	0.383935	0.757525	0.184519	0.562531	0.491574	0.185901	0.044824*
TI Log x TE Log	0.082531	0.484956	0.858306	0.208082	0.850087	0.520570	0.214994	0.737210	0.146199	0.626609
SI Log x SE Log	0.027796*	0.128113	0.073304	0.101710	0.116738	0.110345	0.052298	0.076037	0.347001	0.006235*
TI Lin x TE Lin	0.009818*	0.635097	0.789899	0.696997	0.476712	0.076298	0.082865	0.076737	0.082748	0.005698*
SI Lin x SE Lin	0.064433	0.0074188*	0.012378*	0.162868	0.056907	0.017326*	0.082649	0.017440*	0.068929	0.101045
TI Log x TI Lin	0.033100*	0.036858*	0.985485	0.799902	0.270413	0.010607*	0.292730	0.141620	0.806982	0.029244*
TE Log x TE Lin	0.213535	0.088742	0.741616	0.207705	0.993592	0.060984	0.015528*	0.216437	0.020492*	0.025854*
SI Log x SI Lin	0.345195	0.033804*	0.016748*	0.000061*	0.003385*	0.010435*	0.003157*	0.177638	0.025836*	0.003796*
SE Log x SE Lin	0.737943	0.160012	0.670204	0.269967	0.444839	0.173605	0.261382	0.089561	0.297511	0.952695

Asteriscos indicam medias significativamente diferentes de acordo com o teste t ($p < 0,05$); T – tomate; S – soja; I – padrão interno; E – padrão externo; Log – escala logaritmica; Lin – escala linear; H – hibrido; Eo – *Elaeis oleifera* e Eg – *Elaeis guineensis*.

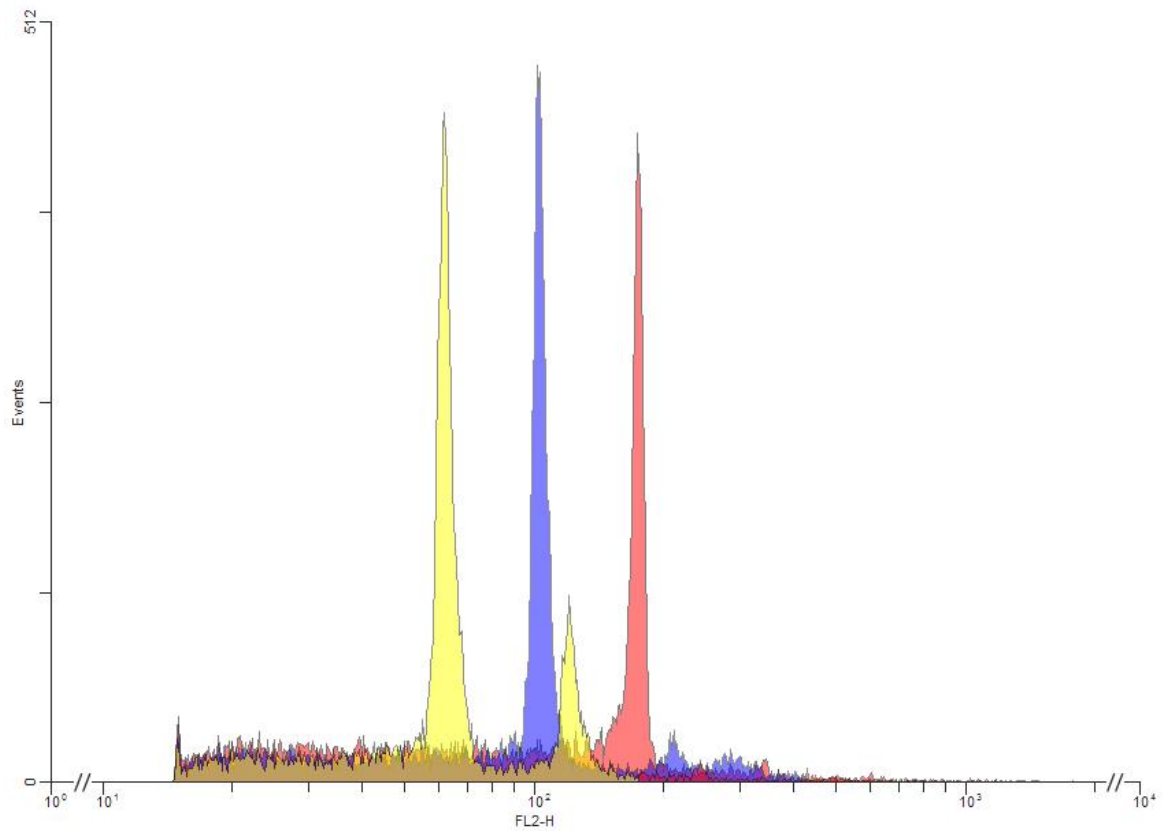


Figura 1. Representação esquemática da quantificação de DNA nuclear em *Elaeis sp.* através da citometria de fluxo. Histogramas de intensidade de fluorescência foram gerados para cada espécie separadamente, em seguida, os picos foram diferencialmente coloridos (usando amarelo para tomate, azul para soja e vermelho para a amostra *Elaeis sp.*) e sobrepostos. A transparência dos picos foi padronizada para 50%. No eixo X é mostrado a fluorescência relativa (número de canal), enquanto no eixo Y é mostrado o número de núcleos avaliados (cerca de 10.000).

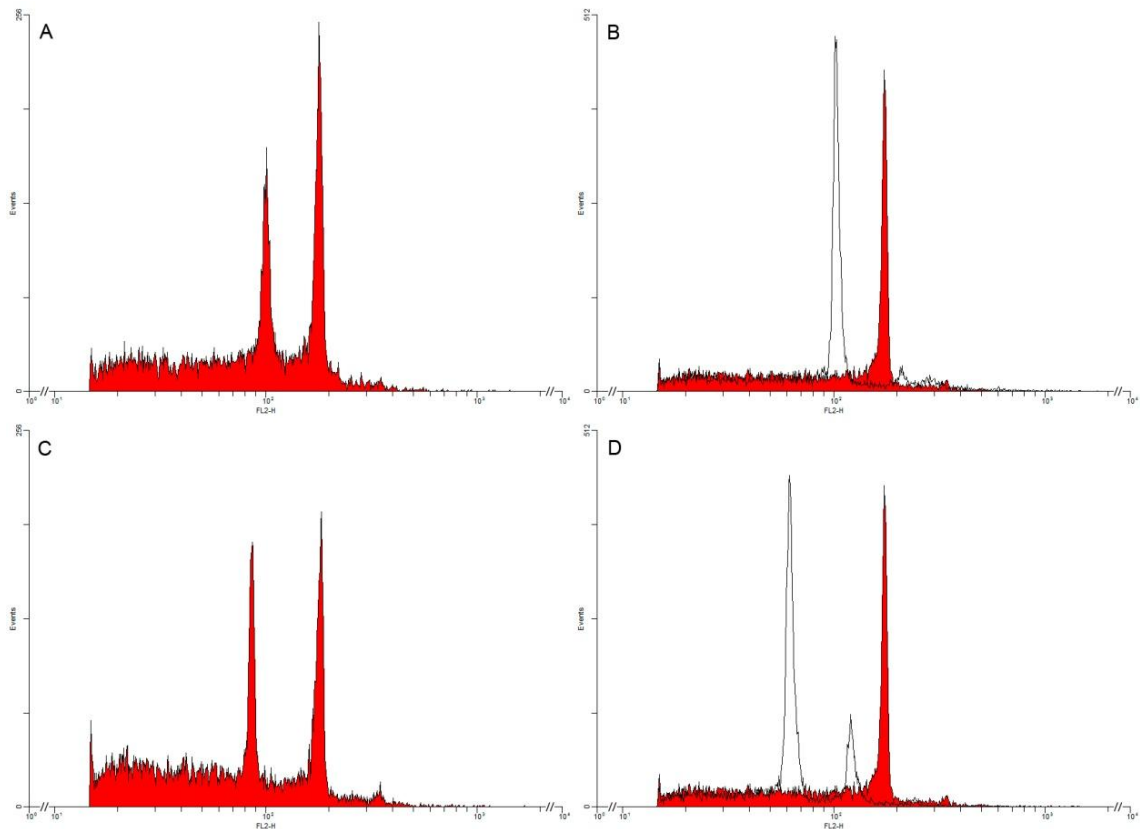


Figura 2. Exemplos de histogramas de intensidade de fluorescência utilizados atualmente para avaliação do tamanho do genoma da amostra. A. Soja (interno) + amostra; B. Soja (externo, incolor) + amostra (vermelho); C. Tomate (interno) + amostra; D. Tomate (externo, incolor) + amostra (vermelho). No eixo X é mostrado a fluorescência relativa (número de canal), enquanto no eixo Y é mostrado o número de núcleos avaliados (cerca de 10.000).

4. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram a alta confiabilidade das estimativas do tamanho do genoma de *Elaeis guineensis*, *E. oleifera* e seus híbridos interespecíficos. As estimativas obtidas são muito diferentes daquelas atualmente disponíveis na bibliografia científica (Madon et al., 2008, Rival et al., 1997, Srisawat et al., 2005). O diferencial destes resultados provavelmente esteja no emprego de uma estratégia metódica, onde primeiramente foi determinado o padrão de referência mais adequado para ser utilizado nos estudos da citometria de fluxo em *Elaeis spp.*, e somente depois, foi realizada a estimativa do tamanho do genoma. Na sequência, serão discutidas as razões que explicam a confiabilidade das estimativas do tamanho do genoma para *Elaeis spp.*, e como estas novas estimativas impactarão o plano inicial do projeto genoma de *E. oleifera*.

4.1 A escolha do padrão de referência influencia as estimativas do tamanho do genoma de *Elaeis spp.* realizadas por citometria de fluxo

Como mencionado anteriormente, é imperativo, em estudos de citometria de fluxo, selecionar o padrão de referência mais adequado. Existem diversas espécies vegetais que podem ser empregadas como padrão de referência (Praça-Fontes et al., 2011) e é preciso optar pela melhor. Atualmente, cerca de 6.000 espécies de plantas já possuem valor de 2C (2C-valor) determinado (Bennett et al., 2000, Bennett & Leitch, 1995, 1997, 2005, 2011, Bennett an& Smith, 1976, Bennett et al., 1982, Zonneveld et al., 2005). A maioria das estimativas (84.5%) foi obtida através de citometria de fluxo pelo método de Feulgen. Recentemente Praça-Fontes et al. (2011) utilizando citometria

de imagem, reavaliou o 2C-valor de oito espécies de plantas amplamente utilizadas como padrões de referência na quantificação de DNA nuclear, partindo de *Arabidopsis thaliana* e avaliando *Raphanus sativus*, *Solanum lycopersicum*, *Glycine max*, *Zea mays*, *Pisum sativum*, *Vicia faba*, *Allium cepa*. Os autores não apenas propuseram uma média de 2C-valor para cada uma das oito espécies, como também, com base em comparações estatísticas, observaram que *Glycine max* cv. "Polanka" foi o padrão primário mais adequado. No entanto, os autores também destacam que, além de possuir inúmeras características interessantes, os pesquisadores devem considerar se a soja é realmente o melhor padrão de referência, levando em consideração que o valor de 2C do padrão deve ser próximo ao da amostra (Dolezel & Bartos, 2005).

No presente trabalho, optou-se por testar tanto a soja como o tomate como padrões antes da definição do tamanho do genoma de *E. guineensis*, *E. oleifera* e seus híbridos interespecíficos, objetivando obter estimativas de 2C sem vieses, além de também considerar o uso de padrões externos ou internos. Muitos dados atualmente indicam que, os padrões internos superam os padrões externos (Loureiro et al., 2007, Leitch & Bennet, 2007). A primeira consideração é relacionada à diferença na precisão dos padrões internos ou externos. No presente trabalho, os resultados para padrão externo são claramente menos preciso do que os internos (Tabela 1), bem como o desvio padrão para o padrão externo é cerca de 2 a 5 vezes maior do que aquele observado para o padrão interno. Estes dados corroboram com outros trabalhos, confirmando o fato de que o uso de padrões internos supera os padrões externos. De fato, diferenças significativas nas estimativas do tamanho do genoma foram encontradas quando a soja e o tomate foram empregados somente como padrões internos (Tabela 2). Em flagrante contraste, poucas diferenças foram encontradas entre os acessos quando

foi empregado padrão externo, indicando que o padrão interno é mais sensível e deve ser utilizado para estimar o tamanho do genoma do *Elaeis spp.* e híbridos.

Não havendo mais dúvidas de que os padrões internos foram mais adequados para estimar o valor de 2C, avançou-se para determinar se a soja foi de fato a espécie mais indicada para ser usada como padrão de referência, conforme indicado por Praça-Fontes et al. (2011). Em estudos de citometria de fluxo, é recomendável que o genoma do padrão tenha entre 0,4 a 2,5 vezes o tamanho do genoma da amostra desconhecida (Voglmayr, 2007), e neste intervalo estão incluídas tanto a soja *Glycine max* 'Polanka' with 2C = 2.50 pg (Barow & Meister, 2002, Meister & Barow, 2007, Dolezel et al., 2007a) como o tomate, *Solanum lycopersicum* L. 'Stupicke' polni' rane'', 2C=1,96 pg (Dolezel et al., 2007a).

Apesar de realmente não terem sido encontradas diferenças significativas em termos de precisão (medida pelo desvio-padrão) na comparação entre soja e tomate (Tabela 1), a Figura 1 mostra que o pico de soja está mais próximo ao pico da amostra em relação ao tomate. De acordo com Dolezel et al. (2007b), quanto mais distantes os picos do padrão e da amostra, maiores as chances de ocorrer erro na estimativa de valores 2C por problemas de linearidade. Tais problemas, podem ser atribuídos ao fato de que, quanto maior a distância entre padrão e amostra, maior poderá ser o erro de extrapolação. Esta pode não ser a única razão, por isso assume-se que algum outro tipo de viés poderá ser incluído nas estimativas. Na verdade, a ocorrência de viés quando se utiliza padrões de referência diferentes pode ser facilmente notada pelas diferenças encontradas entre os valores de 2C estimados para *Elaeis spp.*, ao utilizar a soja e o tomate como padrões. Estimativas obtidas com base em tomate foram bastante subestimadas, quando comparadas àquelas obtidas com base em soja (Tabela 1).

Para minimizar o problema de linearidade, as amostras de referência devem ser escolhidas de forma que seu genoma seja o mais próximo possível do genoma da amostra investigada, não havendo sobreposição dos picos. Desta forma, devido à maior proximidade entre os picos, estimativas mais precisas deverão ser obtidas quando a soja é usada como padrão de referência, em vez de tomate (Figura 1). Além do tamanho do genoma, a soja tem sido relatada como, de fato, o padrão mais estável e apropriado para a análises de citometria de fluxo, principalmente quando comparada a outras espécies, tais como *Raphanus sativus* L. 'Saxa', *Solanum lycopersicum* L. 'Stupické polní rané', *Zea mays* L. 'CE-777', *Pisum sativum* L. 'Ctirad', *Vicia faba* L. 'Inovec', *Allium cepa* L. 'Alice' 'Inovec' e *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh 'Columbia' (Praça-Fontes et al., 2011). Também é interessante notar que esse mesmo genótipo de soja ('Polanka") foi recentemente utilizado para obter o tamanho do genoma de macaúba (*Acrocomia aculeata*) (Abreu et al., 2011), uma outra espécie de Arecaceae promissora para a produção de biodiesel.

Determinado que a soja foi então o padrão mais estável e apropriado para as análises de citometria de fluxo em *Elaeis spp.*, que deve ser utilizado como padrão interno para minimizar os problemas de precisão, o próximo passo foi comparar os resultados obtidos com a soja como padrão interno nas escalas linear e logarítmica. Com relação a isso, observamos que houve uma tendência da escala logarítmica em gerar estimativas um pouco maiores do que na escalas linear. Em média, o desvio padrão observado quando se utilizou a soja como padrão interno e analisando-se os resultados em escala log ou linear, foi muito semelhante. No entanto, em um dos casos, o desvio padrão produzido pela escala linear, que em média foi de 0,060, apresentou-se inesperadamente elevado (Eo0312 - 0,244), enquanto que o valor máximo para o desvio padrão na escala log foi de 0,088 para Eg0920 (a média dos desvios-padrão na escala

log foi de 0,052). Além do fato de que as escalas log geram estimativas menos tendenciosas, observou-se que houve uma ligeira tendência para a escala log em proporcionar uma melhor diferenciação entre espécies/híbridos. Esta é uma característica bem-vinda, pois torna possível a clara distinção entre *E. guineensis*, *E. oleifera* e também as espécies parentais do híbrido interespecífico, via citometria de fluxo.

4.2 Novas estimativas do tamanho do genoma contrastam os dados atualmente publicados

Na literatura consultada e até onde se tem informação, apenas alguns estudos (Madon et al., 2008, Rival et al., 1997, Srisawat et al., 2005) foram conduzidos utilizando citometria de fluxo para determinar o tamanho do genoma em *Elaeis guineensis*, *Elaeis oleifera* e híbridos interespecíficos. Pelas estimativas atualmente disponíveis, o tamanho do genoma de *Elaeis spp.* é controverso, uma vez que indicam que o genoma do *E. oleifera* possui aproximadamente metade do tamanho do genoma da *E. guineensis* e que o genoma do híbrido interespecífico é muito maior do que o genoma de ambas espécies parentais (Madon et al., 2008, Rival et al., 1997). Acredita-se que uma série de razões podem explicar as inconsistências detectadas, incluindo desde o tipo de padrão utilizado pelos autores até fatores intrínsecos das espécies utilizadas para determinar o tamanho do genoma através da citometria de fluxo.

O primeiro estudo objetivando a determinação do tamanho do genoma em *Elaeis guineensis* foi conduzido por Rival et al. (1997). Os autores, utilizando petúnia híbrida como padrão de referência, reportaram um valor de 2C de 3.76 ± 0.09 pg para plantas mantidas *in vitro*. Outro estudo objetivando determinar o tamanho do genoma em *Elaeis*

guineensis var. *dura*, *pisifera* e *tenera* foi conduzido por Srisawat et al. (2005). Os autores reportaram para *Elaeis guineensis* var. *dura*, *pisifera* e *tenera* valores de 2C de 3.46 ± 0.02 ; 3.24 ± 0.01 e 3.76 ± 0.02 pg, respectivamente. Por último, Madon et al. (2008), utilizando procedimentos similares, ou seja, citometria de fluxo utilizando a soja como padrão externo, estimaram o valor de 2C de $4,10 \pm 0,02$; $3,64 \pm 0,28$ e $3,83 \pm 0,31$ pg para *dura*, *pisifera* e *tenera*, respectivamente. Observa-se que os valores de 2C obtidos por Rival et al. (1997), Srisawat et al. (2005) e Madon et al. (2008) são semelhantes, embora os resultados apresentados por Madon et al. (2008) sejam relativamente maiores. Madon et al. (2008) também realizou a primeira estimativa dos valores de 2C dos genomas de *E. oleifera* e do híbrido interespecífico. As estimativas de 2C foram de $2,08 \pm 0,04$ para *E. oleifera* (Suriname) e $4,16 \pm 0,32$ para o híbrido interespecífico. Srisawat et al. (2005) também testou o tomate como padrão de referência. Neste caso, os autores reportaram para *E. guineensis* o valor de 2C de $4,25 \pm 0,09$ pg. No entanto, os valores encontrados foram consideravelmente maiores do que quando se utilizou soja ($3,77 \pm 0,09$ pg) (Srisawat et al., 2005) e petúnia híbrida ($3,76 \pm 0,09$ pg) (Rival et al., 1997) como referência. Srisawat et al. (2005) então argumentou que os valores não eram confiáveis. O mesmo problema foi detectado quando Srisawat et al. (2005) utilizou milho como padrão de referência, neste caso os valores de 2C foram considerados superestimados ($4.72 \pm 0,23$ pg).

As estimativas obtidas por Rival et al. (1997), Srisawat et al. (2005) e Madon et al. (2008) têm sido amplamente adotadas pela comunidade de pesquisa de palma de óleo. No entanto, esta comunidade concentra a pesquisa em *Elaeis guineensis*. Para esta espécie, as estimativas dos tamanhos do genoma parece ser adequada. Contudo, quando se trata de *E. oleifera*, os resultados para a citometria de fluxo são bastante controversos. As diferenças relatadas anteriormente são intrigantes, uma vez que há

uma relação estreita entre *E. guineensis* e *E. oleifera*, em especial o fato de que ambas espécies são hibridizadas com facilidade, o que sugere que seus genomas não seriam tão distintos em tamanho. Além disso, é esperado que o tamanho do genoma do híbrido seja a média do genoma dos pais. Este fato permaneceu despercebido por muito tempo, principalmente porque a comunidade de pesquisa da palma de óleo, até recentemente, não tinha interesse na pesquisa do *E. oleifera*. O interesse pela espécie foi despertado, especialmente no Brasil, quando da ocorrência dos primeiros casos de amarelecimento fatal (Barcelos et al., 2000, Veiga et al., 2001) e porque tem sido considerada a melhor fonte de tolerância/resistência disponíveis atualmente.

Sendo necessária a obtenção de dados de alta qualidade com relação ao tamanho do genoma, em especial do *E. oleifera*, foi difícil tirar conclusões definitivas sobre o tamanho real dos genomas e por isso optou-se por realizar uma reestimativa através da citometria de fluxo. Desta forma, utilizando-se a soja como padrão interno e gerando os dados em escala logarítmica, foi possível determinar que o tamanho médio do genoma de *E. guineensis* é $4,32 \pm 0,173$ pg, enquanto que para *E. oleifera* é $4,43 \pm 0,180$ pg. Comparando-se os dados obtidos com aqueles publicados por Rival et al. (1997), Srisawat et al. (2005) e Madon et al. (2008), fica claro que o uso de um padrão de referência adequado implica em resultados diferentes. Todos os trabalhos citados anteriormente utilizaram padrões externos, sendo que, os dados da literatura indicam que este método é menos preciso do que os padrões internos. Outra fato interessante é que, considerando apenas *E. guineensis*, as estimativas de tamanho do genoma apresentadas no presente trabalho são maiores. Isso pode ser atribuído a questões metodológicas, anteriormente abordados, ou, alternativamente, devido às variações de tamanho do genoma entre plantas de diferentes origens ou ainda, variações devido ao tipo de tecido utilizado bem como seu estágio de desenvolvimento. Tem sido

demonstrado que, o tipo de tecido, órgão da planta (*in vitro*, semente ou plântula) e o estágio de desenvolvimento, podem influenciar em grande parte os resultados da citometria de fluxo (Dolezel et al., 2007b).

No entanto, o mais intrigante e controverso é a comparação dos resultados obtidos para *E. oleifera* e o híbrido com os resultados obtidos por Madon et al. (2008). As estimativas aqui obtidas para o genoma do *E. oleifera* são em média de 4.57 pg, enquanto que Madon et al. (2008) estimou em 2,08 pg, ou seja, os dados obtidos no presente trabalho para o genoma de *E. oleifera* são 105% maior. Sabe-se, com base em estudos de diversidade (Moretzsohn et al., 2002), que *E. guineensis* e *E. oleifera* são parentes próximos e que os membros da família Arecaceae possuem genomas grandes. De forma semelhante, Abreu et al. (2011) determinaram o tamanho do genoma da macaúba (*Acrocomia aculeata*), cujo valor correspondeu a $2C = 5.81$ pg. Assim, os valores de $2C$ de 2.08 pg apresentados por Madon et al. (2008) demonstram inconsistência. Talvez, Madon et al. (2008) tenha determinado o valor de $2C$ de um indivíduo haplóide espontâneo, como tem sido demonstrado que este tipo de indivíduo ocorre de maneira natural em populações de palma de óleo (Dunwell et al., 2010).

Outro fato discrepante em relação ao trabalho publicado por Madon et al. (2008) foi o tamanho do genoma do híbrido interespecífico. Conforme esperado, dado o tamanho do genoma dos parentais, foi relatado que o tamanho do genoma do híbrido situa-se na média dos dois genomas dos pais, ou seja, $4,40 \pm 0,016$ pg. Madon et al. (2008), por outro lado, relatou que o genoma do híbrido correspondeu a 4,16 pg, sendo que o genoma de *E. guineensis* foi de aproximadamente 4,0 pg e de *E. oleifera* 2,08 pg. Os resultados aqui apresentados estão de acordo com o que é esperado baseado nos mecanismos meióticos amplamente conhecidos. Este comportamento dos híbridos em relação aos seus pais, também foi descrito e confirmado em trabalhos anteriores com

Alstroemeria (Buittendijk et al., 1997) e *Cirsium* (Bures et al., 2004). Desta forma, propõe-se que os valores aqui apresentados sejam amplamente adotados pela comunidade de pesquisa de palma de óleo.

5. CONCLUSÕES

Para a estimativa do tamanho do genoma em espécies de *Elaeis*, a utilização da soja como padrão interno de referência, parece ser a condição mais adequada para a obtenção de resultados confiáveis.

Para as condições deste experimento, dados gerados em escala logaritmica tenderam a uma melhor discriminação entre os acessos.

As estimativas médias para o tamanho do genoma de *E. guineensis* indicam semelhança entre as espécies, demonstrado pelo tamanho do genoma dos híbridos interespecíficos.

6. REFERÊNCIAS

- Abreu, I. S., Carvalho, C. R., Carvalho, G. M. A. & Motoike, S. Y. 2011. First karyotype, DNA C-value and AT/GC base composition of macaw palm (*Acrocomia aculeata*, Arecaceae) – a promising plant for biodiesel production. *Australian Journal of Botany*, 59, 149-155.
- Barcelos, E., Nunes, C. D. M. & Cunha, R. N. V. 2000. Melhoramento genético e produção de sementes comerciais de dendezeiro. In: VIÉGAS, I. J. & MULLER, A. A. (Eds.) *A cultura do dendezeiro na Amazônia brasileira*. Belém - PA, Embrapa Amazonia Oriental/Embrapa Amazonia Ocidental.
- Barow, M. & Meister, A. 2002. Lack of correlation between AT frequency and genome size in higher plants and the effect of nonrandomness of base sequences on dye binding. *Cytometry Part A*, 47, 1-7.
- Basiron, Y. 2007. Palm oil production through sustainable plantations. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109, 289-295.
- Bennett, M. D., Bhandol, P. & Leitch, I. J. 2000. Nuclear DNA amounts in angiosperms and their modern uses-807 new estimates. *Annals of Botany*, 86, 859-909.
- Bennett, M. D. & Leitch, I. J. 1995. Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Annals of Botany*, 76, 113-176.
- Bennett, M. D. & Leitch, I. J. 1997. Nuclear DNA amounts in angiosperms-583 new estimates. *Annals of Botany*, 80, 169-196.
- Bennett, M. D. & Leitch, I. J. 2005. Plant genome size research: a field in focus. *Annals of Botany*, 95, 1-6.
- Bennett, M. D. & Leitch, I. J. 2011. Nuclear DNA amounts in angiosperms: targets, trends and tomorrow. *Annals of Botany*, 107, 467-590.
- Bennett, M. D. & Smith, J. B. 1976. Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Philosophical Transactions of the Royal Society London B: Biological Sciences*, 274, 228-274.
- Bennett, M. D., Smith, J. B. & Heslop-Harrison, J. S. 1982. Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Philosophical Transactions of the Royal Society London B: Biological Sciences*, 216, 179-199.
- Brasil 2009. *Anuário Estatístico da Agroenergia*. In: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Ed.) Brasília, MAPA/ACS.
- Buittendijk, J., Boon, E. J. & Romanna, M. S. 1997. Nuclear DNA content in twelve species of *Alstroemeria* L. and some of their hybrids. *Annals of Botany*, 79, 343-353.
- Bures, P., Wang, Y. F., Horivá, L. & Suda, J. 2004. Genome size variation in central European species of *Cirsium* (Compositae) and their natural hybrids. *Annals of Botany*, 94, 353-363.
- Chia, G. S., Lopes, R., Cunha, R. N. V., Rocha, R. N. C. & Lopes, M. T. G. 2009. Repetibilidade da produção de cachos de híbridos interespecíficos entre caiaué e dendezeiro. *Acta Amazonica*, 39, 249-254.
- Conceição, H. E. O. & Muller, A. A. 2000. Botânica e morfologia do dendezeiro. In: VIÉGAS, I. J. M. & MULLER, A. A. (Eds.) *A Cultura do dendezeiro na Amazônia brasileira*. Belém - PA, Embrapa Amazonia Oriental.
- Corley, R. H. V. 1982. The genus *Elaeis*. In: CORLEY, R. H. V., HARDON, J. J. & WOOD, B. J. (Eds.) *Oil Palm Research*. 2 ed. New York - EUA, Elsevier Scientific Publishing Company Inc.

- Cunha, R. N. V., Lopes, R. & Barcelos, E. 2009. Domesticação e melhoramento de caiaué. In: BOREM, A., LOPES, M. T. G. & CLEMENT, C. R. (Eds.) *Domesticação e melhoramento: espécies amazônicas*. Viçosa - MG, Editora Universidade Federal de Viçosa.
- Dolezel, J. & Bartos, J. 2005. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany*, 95, 99-110.
- Dolezel, J., Greilhuber, J. & Suda, J. 2007a. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature Protocols*, 2, 2233-2244.
- Dolezel, J., Greilhuber, J. & Suda, J. 2007b. Flow cytometry with plants: an overview. In: DOLEZEL, J., GREILHUBER, J. & SUDA, J. (Eds.) *Flow cytometry with plant cells: analysis of genes, chromosomes and genomes*. Alemanha, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.
- Dolezel, J., Sgorbatti, S. & Lucretti, S. 1992. Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometry estimation of nuclear DNA content in plants. *Physiologia Plantarum*, 85, 625-631.
- Dunwell, J. M., Wilkinson, M. J., Nelson, S., Wening, S., Sitorus, A. C., Mienanti, D., Alfiko, Y., Croxford, A. E., Ford, C. S., Forsters, B. P. & Caligari, P. D. S. 2010. Production of haploids and doubled haploids in oil palm. *BMC Plant Biology*, 10, 01-25.
- Greilhuber, J., Tensch, E. M. & Loureiro, J. C. M. 2007. Nuclear DNA content measurement. In: DOLEZEL, J., GREILHUBER, J. & SUDA, J. (Eds.) *Flow cytometry with plant cells - analysis of genes, chromosomes and genomes*. Alemanha, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Leitch, I. J. & Bennet, M. D. 2007. Genome size and its uses: the impact of flow cytometry. In: DOLEZEL, J., GREILHUBER, J. & SUDA, J. (Eds.) *Flow cytometry with plant cells*. Czech Republic, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.
- Loureiro, J., Suda, J., Dolezel, J. & Santos, C. 2007. Flower: a plant DNA cytometry database. In: DOLEZEL, J., GREILHUBER, J. & SUDA, J. (Eds.) *Flow cytometry with plant cells*. Czech Republic, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.
- Madon, M., Phoon, L. Q., Clyde, M. M. & Mohd Din, A. 2008. Application of flow cytometry for estimation of nuclear DNA content in *Elaeis*. *Journal of Oil Palm Research*, 20, 447-452.
- Meister, A. & Barow, M. 2007. DNA base composition of plant genomes. In: DOLEZEL, J., GREILHUBER, J. & SUDA, J. (Eds.) *Flow cytometry with plant cells*. Weinheim, Germany, Wiley-VCH.
- Moretzsohn, M. C., Ferreira, M. A., Amaral, Z. P. S., Coelho, P. J. A., Grattapaglia, D. & Ferreira, M. E. 2002. Genetic diversity of Brazilian oil palm (*Elaeis oleifera* HBK) germplasm collected in the Amazon Forest. *Euphytica*, 124, 35-45.
- Osaki, M. & Batalha, M. O. 2011. Produção de biodiesel e óleo vegetal no Brasil: realidade e desafio. *Organizações Rurais & Agroindustriais*, 13, 227-242.
- Praça-Fontes, M. M., Carvalho, C. R. & Clarindo, W. R. 2011. C-value reassessment of plant standards: an image cytometry approach. *Plant Cell Reports*, 30(12), 2303-2312 .
- Rival, A., Beule, T., Barre, P., Hamon, S., Duval, Y. & Noirot, M. 1997. Comparative flow cytometry estimation of nuclear DNA content in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq) tissue cultures and seed-derived plants. *Plant Cell Reports*, 16, 884-887.
- Srisawat, T., Kanchanapoom, K., Pattanapanyasat, K., Srikul, S. & Chuthammathat, W. 2005. Flow cytometry analysis of oil palm: a preliminary analysis for

- cultivars and genomic DNA alteration. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 27, 645-652.
- USDA - United States Department of Agriculture. Acessado em: 15/10/2012. Disponível em: <http://www.fas.usda.gov>.
- Veiga, A. S., Furlan Junior, J. & Kaltner, F. J. 2001. Situação atual e perspectivas futuras da dendeicultura nas principais regiões produtoras: a experiência do Brasil. In: MULLER, A. A. & FURLAN JUNIOR, J. (Eds.) *Agronegócio do dendê: uma alternativa social, econômica e ambiental para o desenvolvimento sustentável da Amazônia*. Belém - PA, Embrapa Amazonia Oriental.
- Voglmayr, H. 2007. DNA flow cytometry in non-vascular plants. In: DOLEZEL, J., GREILHUBER, J. & SUDA, J. (Eds.) *Flow cytometry with plant cells: analysis of genes, chromosomes and genomes*. Alemanha, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Wahid, M. B., Abdullah, S. N. A. & Henson, I. E. 2004. Oil palm -achievements and potential.) *4th International Crop Science Congress*. Brisbane, Australia.
- Zonneveld, B. J. M., Leitch, I. J. & Bennett, M. D. 2005. First nuclear DNA amounts in more than 300 angiosperms. *Annals of Botany*, 96, 229-244.