



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Botânica

**Embriogênese somática e regeneração de plantas de
dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) a partir do uso de meios de
consistência líquida e de cultivos em suspensão**

Tatiane Rosa Monteiro

Brasília – DF
Dezembro/2013

Embriogênese somática e regeneração de plantas de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) a partir do uso de meios de consistência líquida e de cultivos em suspensão

Dissertação apresentada ao Departamento de Botânica, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília – UnB, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Botânica.

Aluna: Tatiane Rosa Monteiro

Orientador: Jonny Everson Scherwinski Pereira

Brasília – DF

Dezembro/2013

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade de
Brasília. Acervo 1013901.

M775e Monteiro, Tatiane Rosa.
Embriogênese somática e regeneração de plantas de
dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) a partir do uso de meios
de consistência líquida e de cultivos em suspensão / Tatiane
Rosa Monteiro. -- 2013.
86 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) - Universidade de Brasília,
Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de
Botânica, Programa de Pós-Graduação em Botânica, 2013.
Inclui bibliografia.

Orientação: Jonny Everson Scherwinski Pereira.

1. Dendezeiro. 2. Embriogênese somática. 3. Suspensão
(Química). 4. Citometria. I. Scherwinski-Pereira, Jonny
Everson. II. Título.

CDU 581.16

**Embriogênese somática e regeneração de plantas de
dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) a partir do uso de meios de
consistência líquida e de cultivos em suspensão**

Tatiane Rosa Monteiro

Esta dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Botânica.

Banca Examinadora:

Dr. Jonny Everson Scherwinski Pereira
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Departamento de Botânica, UnB
(Presidente)

Dra. Conceição Eneida dos Santos Silveira
Departamento de Botânica, UnB
(Membro titular)

Dra. Gabriela Ferreira Nogueira
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
(Membro titular)

À minha família e amigos,
sempre presentes em todos os momentos de minha vida.

Ofereço

À minha mãe, Maria do Socorro Rosa Monteiro por todo amor, carinho, pelos ensinamentos, dedicação e incentivos. Ao meu orientador Jonny Everson Scherwinski Pereira, pela orientação e apoio, sem o qual não teria sido possível a conclusão deste trabalho.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Maria do Socorro Rosa Monteiro, e irmãos, Marcelle Rosa Pereira, Thales Rosa Monteiro e Thiago Rosa Monteiro, muito obrigada pelo amor, incentivo e apoio.

À Universidade de Brasília, especialmente ao Programa de Pós – graduação em Botânica e a todo o corpo docente pela oportunidade concedida para minha formação profissional.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), em especial ao Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, pela oportunidade de estudos e utilização das instalações para a realização dos experimentos.

Ao meu orientador, Jonny Everson Scherwinski Pereira, pela orientação, confiança depositada durante a realização dos trabalhos e paciência.

Aos colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos II da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Emília Saleh, Hugo Teixeira, Julcéia Camillo, Jaqueline Vasconcelos, Leandro Gomes, Luanna Pena, Marcus Parede, Marilda, Nero Carlos, Patrícia Monah, Rayssa Archeti, Zanderluce Gomes, pela troca de conhecimentos e convivência.

Ao André Xavier e Gabriela Nogueira por me auxiliarem na análise de Citometria de Fluxo.

À Elinea de Oliveira Freitas por me auxiliar ao longo de todos os experimentos abordados nessa dissertação, troca de conhecimentos, momentos de descontração e pela amizade.

À amiga e comadre Jessíka Paula Silva Vieira por me auxiliar na anatomia e pela amizade.

Aos meus amigos Altemir Marcos Berghetti, Carolina Dantas, Carolina Carvalho, Mariana Lopes, Paula Silva, Suzi Santana pela amizade e pelos momentos compartilhados.

Em especial a Brenda de Paiva Linhares, por ter me apoiado, pela amizade, pelos momentos compartilhados e incentivos.

A CAPES e CNPq pela concessão de bolsa de estudos durante a realização dos meus trabalhos de dissertação.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

“A maior recompensa pelo esforço de uma
pessoa não é o que ela ganha com isso,
mas o que ela se torna através dele.”

John Ruskin

RESUMO

O presente trabalho objetivou avaliar aspectos morfo-fisiológicos envolvidos na embriogênese somática e regeneração de plantas de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) a partir do uso de meios de consistência líquida e de cultivos em suspensão. Embriões zigóticos obtidos das variedades C 2501, C 2528 e C 7201 foram induzidos em meio de MS com 450 μM de Picloram, 30 g.L^{-1} de sacarose, 0,5 g.L^{-1} de glutamina, 2,5 g.L^{-1} de carvão ativado e 2,5 g.L^{-1} de Phytigel, sendo subcultivados ou não a cada 30 dias. Foi avaliado o efeito da passagem de calos embriogênicos por meios de cultura líquido e o estabelecimento de cultivos em suspensão sobre o processo de embriogênese somática e regeneração de plantas, porções embriogênicas foram transferidas para dois meios líquido: MeA (MS com 5 μM de Picloram) e MeB (MS com 5 μM de 2,4-D). Nessa fase foi possível separar dois tipos de propágulos: aqueles que não desagregaram completamente e aqueles considerados estabelecidos em suspensão. Num primeiro experimento, porções embriogênicas não desagregadas em meio líquido sob agitação (calos embriogênicos) foram transferidas para três meios de diferenciação: M1: $\frac{1}{2}$ MS; M2: MS com 40 μM de Picloram e; M3: MS com 12,3 μM de 2iP e 0,6 μM de ANA. A partir dos embriões somáticos diferenciados, a regeneração de plantas foi realizada em meio de MS desprovido de reguladores de crescimento. Posteriormente, as plantas foram individualizadas e transferidas para meio de MS dupla-fase com 57 μM de AIB para induzir a formação de raízes, antes de serem aclimatizadas e transferidas para casa de vegetação. As plantas foram analisadas por citometria de fluxo para verificar possíveis alterações no conteúdo genômico. Os resultados revelaram que a condição de subcultivar a cada 30 dias foi determinante para estimular a formação de calos embriogênicos (20,8%). Verificou-se que a passagem de calos embriogênicos por meio líquido na presença de 2,4-D (MeB) proporcionou aumentos significativos na percentagem de calos com embriões somáticos diferenciados. Entre os meios testados, o M1 foi o que proporcionou os melhores resultados, com até 58,2% dos calos com embriões somáticos diferenciados. A variedade C 2528 no meio M3 apresentou os maiores índices de calos com embriões somáticos (80,2%), embora tenha sido no meio M1 que essa variedade

apresentou o maior número de embriões tipo torpedo por calo (8,3). Embriões somáticos oriundos dos meios M1 e M3 também foram os que apresentaram as maiores frequências de regeneração, com 29,5% e 31,7% respectivamente. Na fase de aclimatização a percentagem de sobrevivência das mudas foi de 95,2%, ao final de 90 dias. Nas plantas regeneradas, a citometria de fluxo não evidenciou diferenças significativas no conteúdo médio de DNA nuclear quando comparadas com as plantas controle, tendo sido observado valores na ordem de $2C = 3,89 \pm 0,16$ pg. Num segundo experimento, calos embriogênicos da variedade C 2528, estabelecidos e multiplicados em meio líquido MeB por um período de 210 dias, sob forma de agregados celulares, foram utilizados para diferenciação de embriões somáticos. Para tanto, os agregados foram transferidos para meio líquido de MS com $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D onde permaneceram por 0, 30 e 60 dias. Após os respectivos tempos, os agregados foram plaqueados em meio semissólido com a mesma constituição do meio anterior e acondicionados na ausência e presença de luz por até 90 dias. Para avaliar a influência do tamanho dos agregados na formação de embriões somáticos e regeneração de plantas durante o plaqueamento, os agregados foram divididos em duas classes: classe 1 e classe 2 (2 mm e 4 mm, respectivamente). Após 120 dias em meio semissólido, embriões somáticos foram transferidos para meio de MS para regeneração de plantas. Neste experimento, análises anatômicas foram realizadas para caracterizar e descrever as etapas envolvidas na diferenciação dos agregados celulares. Verificou-se que acima de 90% de ambas as classes de propágulos produzidos progrediram após serem plaqueados em meio semissólido. Quanto a taxa de embriões somáticos diferenciados, não foram observadas diferenças significativas entre as classes 1 e classe 2 de agregados (18,8% e 13,1%, respectivamente). No entanto, quando se avaliou agregados da classe 1, após 30 dias de diferenciação em meio sob suspensão, verificou-se que até 33,3% dos explantes apresentaram diferenciação de embriões somáticos, com a maior quantidade de embriões somáticos no estágio torpedo (8,3 por explante).

Palavras-chave: *Elaeis guineensis*, embriogênese somática, meio líquido, culturas em suspensão, citometria de fluxo.

ABSTRACT

The aim of this study is to evaluate morpho-physiological aspects involved in somatic embryogenesis and plant regeneration of the African oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) based on the use of liquid consistency media and cultures in suspension. Zygotic embryos of the varieties C 2501, C 2528 and C 7201 were induced in an MS medium with 450 μM Picloram, 30 g.L^{-1} sucrose, 0.5 g.L^{-1} glutamine, 2.5 g.L^{-1} activated charcoal and 2.5 g.L^{-1} Phytigel, being subcultured (or not) every 30 days. The effect of the passage of embryogenic calluses through a liquid culture media and the establishment of cultures in suspension on the processes of somatic embryogenesis and plant regeneration was evaluated. The embryogenic portions were transferred to two liquid media: MeA (MS with 5 μM Picloram) and MeB (MS with 5 μM 2,4-D). In this stage it was possible to separate two types of propagules: those that did not completely disaggregate and those considered as established in suspension. In the first experiment, embryogenic portions that were not disaggregated in a liquid medium under agitation (embryogenic callus) were transferred to three differentiation media: M1 - $\frac{1}{2}$ MS; M2 - MS with 40 μM Picloram and; M3 - MS with 12.3 μM 2iP and 0.6 μM NAA. Based on the differentiated somatic embryos, plant regeneration was performed in an MS medium devoid of growth regulators. Subsequently, the plants were individualized and transferred to a double-phase MS medium with 57 μM IBA to induce rooting, before being acclimatized and transferred to greenhouse. The plants were analyzed by flow cytometry to verify changes in genomic content. The results showed that the condition of subculturing every 30 days was a determining factor to stimulate the formation of embryogenic callus (20.8%). It was found that the passage of embryogenic calluses through a liquid medium in the presence of 2,4-D (MeB) provided significant increases in the percentage of calluses with differentiated somatic embryos. Among the media tested, M1 was the one that provided the best results, with up to 58.2% of the calluses with differentiated somatic embryos. The C 2528 variety in M3 medium showed the highest rates of calluses with somatic embryos (80.2%), although it was in the M1 medium that this variety exhibited the highest number of embryos per torpedo-shaped callus (8.3). Somatic embryos originating from M1 and M3 media were also the ones

that showed the highest frequency of regeneration, with 29.5% and 31.7% respectively. During the acclimatization phase, the seedling survival percentage was 95.2% at the end of 90 days. In regenerated plants, flow cytometry showed no significant differences in the average nuclear DNA content when compared with control plants; values in the range of $2C = 3.89 \pm 0.16$ pg were observed. In the second experiment, calluses of the C 2528 variety, established and multiplied in MeB liquid medium for a period of 210 days, in the form of cell aggregates, were used for the differentiation of somatic embryos. For both, the aggregates were transferred to liquid MS medium with 0.1 mg.L^{-1} 2,4-D, where they remained for 0, 30 and 60 days. After the respective periods, the aggregates were plated in a semi-solid medium with the same constitution as the previous medium and placed in the absence and presence of light for up to 90 days. To assess the influence of the size of the aggregates on the formation of somatic embryos and regeneration of plants during plating, the aggregates were divided into two classes: Class 1 and Class 2 (2 mm and 4 mm, respectively). After 120 days in a semi-solid medium, the somatic embryos were transferred to an MS medium for plant regeneration. In this experiment, anatomical analyses were performed to characterize and describe the steps involved in the differentiation of the cell aggregates. It was found that over 90% of both classes of propagules produced progressed after being plated in a semi-solid medium. Regarding the rate of differentiated somatic embryos, no significant differences were observed between class 1 and class 2 of aggregates (18.8% and 13.1%, respectively). However, when the class 1 aggregates were evaluated, after 30 days of differentiation in a medium under suspension, it was found that 33.3% of the explants displayed differentiation of somatic embryos, with the highest number of embryos in the torpedo stage (8.3 per explant).

Keywords: *Elaeis guineensis*, somatic embryogenesis, liquid medium, suspension cultures, flow cytometry.

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo I

- Figura 1.** Esquema ilustrativo do processo de indução da embriogênese somática a partir de embriões zigóticos (EZ) obtidos de frutos maduros de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.): da desinfestação das amêndoas e extração dos EZ até a formação de calos embriogênicos.....36
- Figura 2.** Esquema ilustrativo do estabelecimento e multiplicação de agregados celulares de dendezeiro em meio líquido, a partir de calos multigranulares embriogênicos.....38
- Figura 3.** Esquema ilustrativo da diferenciação e maturação dos calos de dendezeiro cultivados em meio líquido, a partir de calos multigranulares embriogênicos.....40
- Figura 4.** Aspecto da indução da embriogênese somática em dendezeiro a partir de embriões zigóticos, variedade C 2528.....45
- Figura 5.** Passagem de calos embriogênicos em meio de cultura de consistência líquida: diferenciação, regeneração e aclimatização das plantas.....51
- Figura 6.** Histogramas obtidos pela análise de citometria de fluxo em plantas de dendezeiro regeneradas por embriogênese somática, variedade C2528. O pico à esquerda de cada histograma corresponde ao G1 das amostras do controle (A) e dos clones regenerados (B) e os picos à direita ao padrão externo de referência, a ervilha (*Pisum sativum*).....52

Capítulo II

- Figura 1.** Diferenciação, regeneração e aclimatização das plantas originadas de embriões somáticos de agregados celulares estabelecidos em suspensão.....77
- Figura 2.** Secções de agregados de *Elaeis guineensis* Jacq., variedade C 2528, classe 1 e classe 2 (apresentando diâmetro médio de 2 mm e 4 mm, respectivamente) retirados com 0, 30 e 60 dias de cultivo em meio de cultura de consistência líquida para diferenciação de embriões somáticos.....79

ÍNDICE DE TABELAS

Capítulo I

- Tabela 1.** Influência da condição de cultivo (com ou sem subcultivo a cada 30 dias) na fase de indução de calos sobre a percentagem de formação de calo primário e calo embriogênico em embriões zigótico de dendezeiro, variedades C 2501, C 2528 e C 7201, após 150 dias de cultivo.....43
- Tabela 2.** Influência da consistência do meio (líquido ou semissólido padrão) sobre a percentagem de calos com embriões somáticos diferenciados em dendezeiro, variedades C 2501, C 2528 e C 7201.....47
- Tabela 3.** Influência da auxina e do tipo de meio de cultura de diferenciação sobre o número de embriões torpedos formado por calo e a frequência de regeneração dos embriões somáticos diferenciados (%), por um período de 12 meses.....49
- Tabela 4.** Conteúdo médio de DNA nuclear (pg) estimado em *Elaeis guineensis* Jacq., variedade C 2528, a partir de clones regenerados e plantas germinadas de embriões zigóticos *in vitro*.....53
- Tabela 5.** Conteúdo médio de DNA nuclear (pg) estimado de clones regenerados de *Elaeis guineensis* Jacq., variedade C 2528, obtidas de embriões somáticos de calos que passaram por meio de cultura de consistência líquida.....54

Capítulo II

- Tabela 1.** Influência do tempo (dias) de diferenciação em suspensão, condição de cultivo (presença e ausência de luz) e diâmetro do agregado celular (classe 1 e classe 2) sobre a percentagem de formação de calo, percentagem de calos com embriões somáticos diferenciados e o número de embriões torpedos por calo por um período de 120 dias de cultivo.....75

SÍMBOLOS E ABREVIações

μM – Micromolar

$^{\circ}\text{C}$ – Graus Celsius

2,4-D – Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

2iP – 2-isopentenil-adenina

AIB – Ácido indol butírico

ANA – Ácido naftalenoacético

Atm – atmosfera

Dicamba – Ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico

ES – Embriogênese somática

et al. – Expressão latina que significa “e outros”

EZ – Embrião zigótico

FAA – Formaldeído, ácido acético glacial e álcool etílico

g – O grama (unidade de medida de massa)

L – Litro (unidade de medida de volume)

mL – Mililitro (unidade de medida de volume)

MS – Meio de cultura formulado por Murashige e Skoog, 1962

Picloram – Ácido 4 amino - 3,5,6- tricloropicolínico

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Aspectos botânicos do dendezeiro.....	4
2.2. Embriogênese somática.....	7
2.2.1. Meio de cultura.....	9
2.2.2. Oxidação dos explantes	10
2.2.3. Diferenciação e maturação dos embriões somáticos	11
2.3. Culturas em suspensão.....	12
2.4. Aclimatização	13
2.5. Análise por Citometria de Fluxo	13
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16

CAPÍTULO I

Influência da passagem de calos embriogênicos por meios de consistência líquida sobre a embriogênese somática e regeneração de plantas em dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.)

RESUMO.....	29
ABSTRACT	33
1. INTRODUÇÃO	33
2. MATERIAL E MÉTODOS	35
2.1. Local de condução dos experimentos	35
2.2. Materiais vegetais utilizados.....	35
2.3. Indução da embriogênese somática.....	35
2.4. Influência dos subcultivos na indução da embriogênese somática	35

2.5. Estabelecimento e multiplicação de agregados celulares em meio líquido	37
2.6. Diferenciação de embriões somáticos de calos cultivados e não cultivados em meio líquido.....	38
2.7. Regeneração, enraizamento e aclimatização das plantas	41
2.8. Análise dos regenerantes por citometria de fluxo.....	42
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
3.1. Indução da embriogênese somática.....	43
3.2. Diferenciação, regeneração e aclimatização das plantas	45
3.3. Análise dos regenerantes por citometria de fluxo.....	51
4. CONCLUSÕES	51
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

CAPÍTULO II

Diferenciação e regeneração de plantas de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) por embriogênese somática a partir de agregados celulares: influência de condições de cultivo e do tamanho de propágulos

RESUMO.....	63
ABSTRACT	65
1. INTRODUÇÃO	67
2. MATERIAL E MÉTODOS	69
2.1. Obtenção de calos embriogênicos	69
2.2. Estabelecimento de cultivos de agregados em suspensão	69
2.3. Diferenciação de embriões somáticos a partir de diferentes classes de agregados celulares.....	70
2.4. Regeneração e aclimatização de plantas oriundas de agregados	71
2.5. Análises anatômicas	72
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	73

3.1. Diferenciação, regeneração e aclimatização de plantas oriundas de agregados celulares.....	73
3.2. Análises anatômicas	78
4. CONCLUSÕES	82
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

1. INTRODUÇÃO GERAL

Nos últimos anos surgiu uma tendência mundial de se buscar fontes combustíveis mais limpas e renováveis, em substituição ao modelo baseado unicamente no petróleo. Neste contexto, o governo brasileiro lançou o Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB), criado pelo Decreto de 23 de dezembro de 2003, que tem como principal meta, desenvolver a tecnologia de produção do biodiesel, visando diminuir a dependência do petróleo, reduzir a emissão de gases causadores do efeito estufa e gerar emprego e renda, principalmente pelo estímulo da agricultura familiar (Miragaya, 2005; Ramos e Wilhelm, 2005).

O biodiesel é uma denominação genérica para combustíveis e aditivos derivados de fontes renováveis, como os óleos de soja e dendê. Entre as plantas oleaginosas potenciais, o dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) apresenta grande destaque, por ser uma cultura com elevada produtividade de óleo vegetal (5 a 7 ton/ha/ano) em comparação a outras espécies (Rajesh *et al.*, 2003; Deore e Johnson, 2008). Atualmente, a Malásia é o maior produtor e exportador de óleo de dendê, com cerca de 17,73 milhões de toneladas de óleo de palma produzido, representando cerca de 40% da produção mundial (MPOB, 2013). No Brasil, os plantios comerciais estão localizados principalmente na região Norte e Nordeste, com grande potencial de expansão. Contudo, a quase totalidade dos plantios se encontra hoje na região Norte, com destaque ao Estado do Pará com cerca de 80% dos plantios comerciais (Chia *et al.*, 2009).

O dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) é uma monocotiledônea oleaginosa, perene e alógama, pertencente à família Arecaceae originária da Costa Ocidental da África (Golfo da Guiné). Foi introduzida no Brasil ainda no século XVII por escravos. Essa palmeira está bem adaptada à região Norte do Brasil, onde encontra condições de alta temperatura, intensidade luminosa e chuvas durante todo o ano, necessários ao bom desenvolvimento da cultura (Boari, 2008). A cultura é propagada convencionalmente por sementes, que requer um período relativamente longo até que novas mudas sejam formadas, além de apresentar formação de plantios com alta variabilidade, promovendo

dessa forma a desuniformidade na produção e dificuldades nas práticas de manejo. Já os métodos de propagação vegetativa, apesar de altamente desejáveis para o desenvolvimento do setor produtivo desta cultura, ainda têm sido estudados e não são plenamente dominados. Estudos sobre a propagação vegetativa de indivíduos com alto potencial de produção poderiam contribuir para que genótipos com produtividades de óleo superiores àqueles observados convencionalmente pudessem ser alcançadas (Viégas e Müller, 2000; Lorenzi *et al.*, 2004; Konan *et al.*, 2010).

A cultura de tecidos vegetais, por meio de técnicas de micropropagação via embriogênese somática, é uma das únicas alternativas para propagar vegetativamente o dendezeiro. No Brasil, embora a técnica de cultura de tecidos já tenha proporcionado bons resultados para algumas palmeiras, como açazeiro (Ledo *et al.*, 2002; Scherwinski-Pereira *et al.*, 2012) e pupunheira (Scherwinski-Pereira *et al.*, 2007; Steinmacher *et al.*, 2007a; Steinmacher *et al.*, 2011), para o dendezeiro são ainda reduzidos os resultados capazes de serem usados para a clonagem de materiais elite em larga escala, muito embora em alguns países, como a França e Malásia, os trabalhos sobre clonagem do dendezeiro já sejam relatados há mais de duas décadas, com a produção de milhares de plantas (Durand-Gasselin *et al.*, 1990; Rival *et al.*, 1998; Jaligot *et al.*, 2000; Konan *et al.*, 2010; Soh *et al.*, 2011).

A embriogênese somática é processo pelo qual células haploides ou somáticas desenvolvem-se por meio de diferentes estádios embriogênicos, dando origem a uma planta sem que ocorra a fusão de gametas (Guerra *et al.*, 1999). Esta técnica, uma vez dominada convencionalmente, é caminho para que trabalhos de suspensão de células e/ou agregados celulares sejam desenvolvidos, constituindo-se como uma técnica de grande aplicabilidade quando se pensa na obtenção de grandes quantidades de mudas com baixo custo de produção (Touchet *et al.*, 1991; Teixeira *et al.*, 1995; Kanchanapoom e Chourykaew, 1998; Matsumoto e Silva Neto, 2003; Sané *et al.*, 2006; Roowi *et al.*, 2010; Palanyandy *et al.*, 2013).

Neste contexto, há um consenso entre os pesquisadores que trabalham com a clonagem do dendezeiro que os trabalhos realizados até o momento, com o uso de meios de consistência semissólida, são tecnicamente inviáveis

para a clonagem em larga escala (Duval *et al.*, 1995; Tarmizi *et al.*, 2004; Tarmizi e Zaiton, 2007). Nesses meios de consistência semissólida, a taxa de regeneração máxima obtida está na ordem de $10^2 - 10^4$ clones/por ano, sendo, contudo, poucos os genótipos responsivos e capazes de proporcionarem esta taxa anual, mesmo considerando-se todas as etapas do processo de um programa de propagação clonal dominadas. Outro aspecto importante e diretamente relacionado ao uso de meios semissólidos são os custos de produção por unidade de material vegetal *in vitro*, levando-se em conta genótipos e taxas de regeneração, que podem ser de quatro a seis vezes superiores ao valor de uma semente híbrida (Duval *et al.*, 1995).

Embora a técnica de propagação vegetativa por cultura de tecidos seja apontada como uma metodologia relativamente segura de propagação, a ocorrência de variações genéticas no material regenerado tem sido constatada (Jaligot *et al.*, 2000; Kubis *et al.*, 2003; Rival *et al.*, 2009). Desta forma, é recomendável que avaliações referentes à fidelidade genômica de materiais clonados, por meio de métodos rápidos e ao mesmo tempo precisos, como por exemplo, a análise por citometria de fluxo, seja realizada. A citometria de fluxo tem sido utilizada de maneira crescente no meio científico como um primeiro indicador para avaliar a estabilidade genômica de plantas micropropagadas (Kubis *et al.*, 2003; Srisawat *et al.*, 2005; Rival *et al.*, 2009). Em trabalhos de embriogênese somática, por exemplo, a citometria de fluxo possui diversas aplicações, incluindo a determinação do nível de ploidia e a avaliação do conteúdo de DNA (Dolezel *et al.*, 1997; Rival *et al.*, 1997; Jaligot *et al.*, 2000; Madon *et al.*, 2012). A técnica é também utilizada como um bom indicador da atividade de divisão celular (Srisawat *et al.*, 2005).

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar aspectos morfo-fisiológicos envolvidos durante a embriogênese somática e regeneração de plantas em dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.), a partir do uso de meios de consistência líquida e de cultivos em suspensão. O trabalho propôs também avaliar aspectos anatômicos para elucidar etapas do processo, além de verificar a estabilidade genômica de plantas regeneradas a partir de análises por citometria de fluxo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos botânicos do dendezeiro

O dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) é uma monocotiledônea oleaginosa, também conhecida como palma africana, pertencente à família Arecaceae, sendo constituída por cerca de 2.700 espécies reunidas em mais de 240 gêneros (Lorenzi *et al.*, 2010). A denominação da espécie foi proposta pelo botânico Nicholas Joseph Jacquin (1763), sendo *Elaeis* derivado da palavra grega *elaion*, que significa óleo, e o nome específico *guineensis* demonstra que Jacquin atribuía sua origem à Costa da Guiné (Tan *et al.*, 2009). É cultivado principalmente na Ásia, na África e nas Américas Central e do Sul. No Brasil, os plantios comerciais estão localizados principalmente nas regiões Norte e, em menor quantidade, no Nordeste, sendo a região Norte a responsável pela maior produção nacional de dendê, com destaque para o Estado do Pará (Gomes *et al.*, 2009).

O dendezeiro é uma palmeira monocaule que pode atingir de 25 a 30 m de altura. Na parte superior possui uma coroa de folhas formadas pelo meristema ou gema apical. Uma planta adulta possui entre 30 e 45 folhas funcionais, composta de um pecíolo de aproximadamente 1,5 m de comprimento inserido no estipe, e que apresenta uma seção triangular com espinhos regularmente dispostos sobre as arestas laterais e uma raque, mais longa e afilada, com 5 a 7 m de comprimento, que possui de 250 a 350 folíolos repartidos dos dois lados da raque em ângulo variável de inserção. É uma planta monóica, mas alternadamente, ou seja, em ciclos sexuais. Como as inflorescências são emitidas em ciclos sucessivos e o período de maturidade sexual de uma inflorescência não se sobrepõe ao de outra, a reprodução ocorre por fecundação cruzada, o que define a espécie como alógama (Hartley, 1988).

O sistema radicular do dendezeiro é do tipo fasciculado, composto de raízes primárias, secundárias, terciárias e quaternárias. Em plantas adultas, milhares de raízes emergem do bulbo radicular, órgão volumoso hemisférico de aproximadamente 80 cm de diâmetro, que penetra cerca de 40 a 50 cm no

solo, formado a partir de entrenós da base do estipe (Hartley, 1988; Conceição e Muller, 2000; Adan *et al.*, 2005).

O fruto é do tipo drupa séssil, com formato ovóide, medindo de 2 a 5 cm de comprimento e pesando de 3 a 30 gramas. O exocarpo é brilhante, liso, encimado pelo estigma lenhoso persistente. O fruto imaturo possui coloração que varia de violeta-escura a preta e a metade inferior é marfim. A metade superior apresenta cor marrom durante o amadurecimento, podendo variar com o grupo (Conceição e Muller, 2000; Gonçalves, 2001).

Segundo Surre e Ziller (1969), o corte do fruto permite distinguir seus componentes, da superfície para o interior. O exocarpo ou epiderme é cutinizado, liso, brilhante e fino. O mesocarpo (polpa) tem coloração amarela ou alaranjada, é oleoso e contém estreitas fileiras de fibras cujos feixes se tornam mais compactos à medida que estão mais próximos do centro do fruto. É do mesocarpo que se extrai o óleo de palma (40 a 60% da massa fresca do fruto). O endocarpo (diásporo) é esclerificado, duro, de cor escura, envolvido por fibras aderentes, enquanto que o endosperma (amêndoa) tem forma geralmente ovóide e ocupa toda cavidade do endocarpo, sendo composto de tegumento, albume e embrião. O tegumento é fino e aderente ao albume, que é cartilaginoso e rico em óleo (de onde se retira o óleo de palmiste), em cujo centro há uma fenda ou cavidade central. O embrião tem de 4 a 5 mm de comprimento, ficando alojado em uma pequena cavidade do albume (Conceição e Muller, 2000).

Existe também uma classificação baseada na presença e espessura do endocarpo, uma característica monogênica, ou seja, controlada por apenas um *loco* genético, distinguindo-se os seguintes tipos (Conceição e Muller, 2000; Cunha *et al.*, 2009):

a) *Dura*: planta que produz frutos que apresentam endocarpo com espessura de 2 a 8 mm, às vezes menos, 35 a 65% de mesocarpo/fruto e não apresenta anel de fibra quando se observa o fruto após um corte transversal.

b) *Tenera*: planta que produz frutos que apresentam endocarpo com espessura de 0,5 a 4 mm, 55 a 96% de mesocarpo/fruto e anel de fibras presente no mesocarpo. Esta é um híbrido obtido do cruzamento de *Dura* x *Pisifera*, usado em plantios comerciais.

c) *Pisifera*: planta que produz frutos que não apresentam endocarpo e as flores femininas na maioria das vezes são estéreis.

No gênero *Elaeis*, três espécies são citadas: *E. guineensis*, *E. oleifera* e *E. odora*. A *Elaeis guineensis* é a mais comum para produção econômica de óleo; o caiaué (*E. oleifera*), apesar de não ser um bom produtor quantitativo de óleo, apresenta características desejáveis para programas de melhoramento genético como menor taxa de crescimento em relação ao dendezeiro africano, óleo da polpa com elevado teor de ácidos graxos insaturados e consequente redução da gordura, que podem ser transferidas para híbridos interespecíficos oriundos do cruzamento entre as duas espécies. Apenas essas duas espécies são de interesse agrônomico e econômico, uma vez que *E. odora* não é cultivada e pouco se sabe botânica e fisiologicamente sobre a espécie (Valois, 1997; Cunha *et al.*, 2009).

O dendezeiro apresenta seu melhor desenvolvimento nas regiões tropicais, tornando-se perfeitamente adaptável ao clima equatorial quente e úmido, com elevada precipitação pluviométrica, bem distribuída ao longo do ano (Carvalho *et al.*, 2001). Exibe variação tanto inerente ao germoplasma quanto aos fatores ambientais. O clima é um desses fatores ambientais que mais influenciam os processos produtivos desta palmeira. As variações associadas ao clima são mais complexas, pois geralmente ocasionam eventos em cadeia, manifestados por meio dos processos fisiológicos da planta, que provocam respostas variadas, quer seja na produção do fruto, ou na produção do óleo (Duran e Ortiz, 1995; Alvarado, 1998).

Atualmente o dendezeiro é propagado preferencialmente por sementes e os métodos de propagação vegetativa, ainda têm sido estudados e não são plenamente dominados (Lorenzi *et al.*, 2004; Konan *et al.*, 2010). Deste modo, mesmo quando se utilizam híbridos selecionados, as plantas apresentam alta variabilidade, constituindo-se um dos principais fatores da baixa produtividade e desuniformidade da maioria das plantações comerciais. Assim, a clonagem de indivíduos com alto potencial de produção pode contribuir para que produtividades mais elevadas de óleo de dendê/ha/ano possam ser alcançadas (Konan *et al.*, 2010; Soh *et al.*, 2011).

Em razão da crescente demanda por produtos desta cultura, a biotecnologia agrícola surge como uma ferramenta na busca de novas técnicas que possibilitem a multiplicação de genótipos elite em larga escala. A cultura de tecidos de plantas *in vitro* ou micropropagação oferece vantagens significantes em comparação à propagação convencional, que é feita exclusivamente pela via sexuada (sementes) (Viéguas e Müller, 2000; Soh *et al.*, 2011). E uma vez dominada, a micropropagação pode permitir a produção de quantidades apreciáveis de mudas, com a vantagem de poder manter a identidade genética do material propagado e poder ser direcionada para as espécies de alto valor agrônômico ou comercial, onde os outros processos de propagação são menos vantajosos (Durand-Gasselin *et al.*, 1990; Konan *et al.*, 2010).

2.2. Embriogênese somática

A cultura de tecidos de plantas envolve um conjunto de técnicas, mediante as quais um explante (fragmento de tecido vivo) é isolado e cultivado assepticamente em um meio nutritivo previamente definido, sob condições controladas de temperatura e luminosidade. O fundamento básico da cultura de tecidos é a totipotência celular, segundo a qual, qualquer célula viva no organismo vegetal contém toda a informação genética necessária à regeneração de uma planta completa (Féher *et al.*, 2003; Verdeil *et al.*, 2007).

Dentre as diversas técnicas da cultura de tecidos destaca-se a embriogênese somática, adventícia ou assexual, processo pelo qual células haploides ou somáticas desenvolvem-se por meio de diferentes estádios embriogênicos, dando origem a uma planta sem que ocorra a fusão de gametas (Guerra *et al.*, 1999).

A embriogênese somática pode apresentar dois padrões básicos de desenvolvimento de embriões. A embriogênese somática direta ocorre a partir do explante inicial, o qual possui células programadas para a diferenciação e formação de embriões somáticos, sem que ocorra a formação de estádios intermediários de calo. Já na embriogênese somática indireta, a formação dos embriões somáticos ocorre a partir da desdiferenciação celular, da proliferação de calos e da diferenciação de células embriogênicas necessitando,

geralmente, de reguladores de crescimento para que as células induzidas entrem em mitose e determinem o estado embriogênico dos calos (Sharp *et al.*, 1980). Em ambos os padrões, o embrião somático segue a mesma sequência de desenvolvimento do zigótico, ou seja, a passagem pelos estádios globular, torpedo e cotiledonar, em monocotiledôneas (Guerra *et al.*, 1999).

A fase de indução da embriogênese somática em plantas é normalmente dependente da adição de auxinas, como o 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), Picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico) e o Dicamba (ácido 2-metóxi-3,6-diclorobenzóico) ao meio de cultura (Guerra *et al.*, 1999; Féher *et al.*, 2003). Durante essa fase, células somáticas diferenciadas adquirem competência embriogênica e proliferam como células embriogênicas (Namasivayam, 2007).

Protocolos de embriogênese somática já foram relatados com sucesso para algumas espécies de palmeiras, incluindo o dendezeiro, nas quais se utilizou como fonte de explantes embriões zigóticos (Teixeira *et al.*, 1993; Huong *et al.*, 1999; Ledo *et al.*, 2002; Steinmacher *et al.*, 2007b; Thuzar *et al.*, 2011; Balzon *et al.*, 2013) e folhas e inflorescências imaturas (Teixeira *et al.*, 1994; Guerra e Handro, 1998; Karun *et al.*, 2004; Konan *et al.*, 2010; Scherwinski-Pereira *et al.*, 2010; Guedes *et al.*, 2011). A utilização de embriões zigóticos como fonte de explante para a indução da embriogênese somática, possui diversas vantagens, tais como: a grande disponibilidade de frutos; a maior facilidade a expressão da sua totipotencialidade em razão de tratar-se de tecidos jovens; podem ser transportados por longas distâncias e, possuem uniformidade fisiológica (Teixeira *et al.*, 1993). Por essas características, os embriões zigóticos são considerados importantes fontes de explantes para trabalhos experimentais iniciais e visando aperfeiçoar protocolos com propósitos de uso futuro com outros explantes, como por exemplo, folhas e inflorescências imaturas.

No entanto, alguns fatores podem afetar a indução da embriogênese somática, tais como o genótipo, a origem do explante, a composição do meio de cultura e, particularmente, os reguladores de crescimento (Silva *et al.*, 2012; Balzon *et al.*, 2013). É importante destacar que a seleção do estágio específico de desenvolvimento do explante, as transferências sequenciais e as condições

apropriadas de cultivo, como temperatura e luz são importantes para o sucesso da técnica, especialmente no que se refere à aquisição de competência embriogênica (Torres *et al.*, 1998).

Já a multiplicação de culturas embriogênicas consiste geralmente da redução nos níveis dos reguladores de crescimento do meio de cultura. Essa redução permite ciclos repetitivos de divisão celular e o controle dos processos de diferenciação (Guerra *et al.*, 1999). É geralmente nessa fase que suspensões celulares são estabelecidas (Gorret *et al.*, 2004).

2.2.1. Meio de cultura

Entre as várias formulações salinas, a de MS (Murashige e Skoog, 1962) é a mais frequentemente utilizada na grande maioria das espécies estudadas. Contudo, a elevada concentração salina do referido meio de cultura mostra a necessidade de se estudar modificações na composição basal de sais orgânicos e inorgânicos, proporcionando dessa forma, maior adaptação de cultivos *in vitro*. Os meios nutritivos precisam fornecer as substâncias fundamentais para o crescimento das culturas. Assim, os meios de cultura geralmente são compostos por macro e micronutrientes em diferentes proporções, vitaminas, aminoácidos, fontes de carbono e reguladores de crescimento, além de outras substâncias como inositol e ágar ou Phytigel. A composição do meio de cultura baseia-se na demanda nutricional das plantas quanto aos nutrientes minerais, com modificações para atender as necessidades específicas *in vitro* (Torres *et al.*, 1998).

Na micropropagação o meio de cultura de consistência semissólido é o mais utilizado, composto por água, macro e micronutrientes e um agente solidificante que pode ser ágar, Phytigel, ou algum derivado de amido ou algas. Esses agentes solidificantes conferem ao cultivo: suporte para o sistema radicular das plantas *in vitro*; favorecimento de trocas gasosas no sistema radicular, assim como entre o meio de cultura e o interior do frasco de cultivo, além de favorecer o controle osmótico do meio sobre o explante cultivado, evitando a vitrificação por excesso de umidade (Caldas *et al.*, 1998).

No entanto, existem fatores limitantes para o cultivo em meio de cultura de consistência semissólido: o elevado custo do gel; alta demanda por mão-de-obra, devido à elevada frequência de subcultivos; formação de um gradiente de nutrientes à medida que o tecido absorve o nutriente; acúmulo de substâncias fitoalelopáticas e de exsudados radiculares que podem prejudicar a absorção de nutrientes e o desenvolvimento e crescimento dos explantes (Levin *et al.*, 1997; Cid *et al.*, 2002; Teixeira, 2002). Plantas e mudas micropropagadas em meio de cultura semissólido têm maior custo, pelo preço do agente solidificante e pela limitação da área de cultivo dentro do frasco (Ziv, 1995; Levin *et al.*, 1997; Cid *et al.*, 2002).

O cultivo de explantes em meio de cultura de consistência líquida é semelhante ao cultivo em meio de cultura semissólido, exceto geralmente pela necessidade de oxigenação do meio de cultura para prevenção da morte de células por falta de oxigenação. No cultivo em meio líquido, deve-se tomar cuidados para evitar hipoxia (baixas concentrações de O₂) que estão associadas com a vitrificação ou hiperhidratação do tecido. As principais vantagens dos meios de cultura líquidos são: o melhor contato físico entre o explante e o meio de cultivo; queda na restrição de trocas gasosas; melhor controle da composição do meio e de trocas gasosas; além do crescimento das plantas ser mais homogêneo. A principal desvantagem do cultivo em meio líquido resulta da baixa pressão osmótica do meio, em que a planta tende a absorver mais líquidos, reduzindo assim as trocas gasosas. Esse problema pode ser solucionado adicionando-se um sistema de oxigenação (Grattapaglia e Machado, 1998; Teixeira, 2002; Tarmizi *et al.*, 2004; Choi *et al.*, 2008).

2.2.2. Oxidação dos explantes

A oxidação dos explantes é um dos aspectos mais sérios relacionados com a cultura de palmeiras. Por isso, o carvão ativado é geralmente acrescentado ao meio para a adsorção de substâncias inibidoras liberadas pelo tecido (fenóis) e pelo meio, após sua passagem pelo autoclave. Em alguns casos também pode-se adicionar outros antioxidantes como o ácido ascórbico

e polivinilpirrolidona, além do carvão ativado para prevenir o escurecimento do tecido (Van Winkle *et al.*, 2003).

Diversos trabalhos mostram a utilização do carvão ativado como agente anti-oxidante (Saldanha *et al.*, 2006; Moura *et al.*, 2009; Scherwinski-Pereira *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2012; Balzon *et al.*, 2013). O carvão ativado apresenta cargas residuais que são capazes de adsorver substâncias fenólicas ou seus produtos da oxidação, as quinonas, evitando com isso o desencadeamento do processo oxidativo. Entretanto, o aumento da concentração de carvão ativado pode ser prejudicial ao meio de cultura, pois o uso de carvão ativado pode adsorver outras substâncias do meio nutritivo como, por exemplo, os reguladores de crescimento, acarretando efeitos indesejáveis ao cultivo *in vitro* (Teixeira *et al.*, 1993; Thomas, 2008).

Segundo Hu e Ferreira (1998) o escurecimento dos explantes é, em geral, uma dificuldade nos estudos de cultura *in vitro* em palmeiras. Porém a oxidação fenólica é altamente dependente do genótipo. A oxidação fenólica depende igualmente do tipo de explante utilizado, sendo que explantes jovens, em geral, oxidam menos que os mais velhos.

O escurecimento e a eventual morte dos tecidos é um problema frequentemente encontrado durante os estádios iniciais de cultivo *in vitro* e ocorre devido à produção excessiva de polifenóis, possivelmente pela ativação de reações de defesa. Aos polifenóis atribuem-se propriedades inibidoras que devem ser evitadas ou eliminadas do ambiente de cultivo *in vitro*. Diversos métodos de prevenção ao surgimento dos fenóis têm sido propostos, sendo mais amplamente utilizada, a transferência dos explantes para um novo meio de cultura (Pan e Staden, 1998).

2.2.3. Diferenciação e maturação dos embriões somáticos

Na fase de diferenciação celular e maturação dos embriões somáticos é necessário fornecer estímulos fisiológicos, bioquímicos e ambientais para interromper os ciclos repetitivos de divisão celular e induzir o início da diferenciação e obtenção de embriões somáticos maduros (Guerra *et al.*,

1999). Após obtenção desses embriões, a germinação é usualmente realizada em meio de cultura livre de reguladores de crescimento (Swati *et al.*, 2001).

2.3. Culturas em suspensão

O cultivo em suspensão consiste na multiplicação e manutenção de células e/ou agregados em forma de suspensão em meio líquido. Trata-se de uma ferramenta útil para a micropropagação, melhoramento genético e conservação de recursos genéticos. Assim, a cultura de células e/ou agregados e a regeneração destes, via embriogênese somática, constitui-se como uma técnica de grande aplicabilidade por poder permitir a obtenção de grandes quantidades de mudas qualificadas com baixo custo de produção (Touchet *et al.*, 1991; Teixeira *et al.*, 1995; Kanchanapoom e Chourykaew, 1998; Sané *et al.*, 2006; Roowi *et al.*, 2010; Palanyandy *et al.*, 2013).

Neste contexto, a primeira etapa de um trabalho de suspensão de células e/ou agregados celulares inclui a indução de calos embriogênicos, sendo calo uma massa compacta de células desorganizadas e parcialmente indiferenciadas que variam quanto ao tipo, ao tamanho, ao conteúdo celular e à espessura da parede celular (Narayanaswamy, 1977). Calos com aspecto friável, que se desprendem facilmente quando manipulados, podem ser mais facilmente induzidos por uma alta relação auxina/citocinina. Portanto, quando subcultivados em meio líquido e sob agitação constante, se desagregam com maior facilidade, permitindo a liberação das células para o meio mais rapidamente do que calos compactos (Cid, 1998).

Protocolos para cultura de células e agregados em suspensão e a regeneração destas já foram relatados para o dendezeiro, embora as diferentes etapas do processo ainda não estejam completamente dominadas (Touchet *et al.*, 1991; Teixeira *et al.*, 1995; Kanchanapoom e Chourykaew, 1998; Roowi *et al.*, 2010; Palanyandy *et al.*, 2013).

2.4. Aclimatização

A aclimatização é definida como a transferência de uma planta para novo ambiente, sendo todo o processo realizado artificialmente. É considerada como uma das etapas mais críticas da micropropagação, pois durante esse período pode ocorrer morte das plantas, causando grandes prejuízos (Torres *et al.*, 1998, Moreira *et al.*, 2006; Ledo *et al.*, 2007). Tais perdas na fase de aclimatização podem ocorrer, pois as plantas não suportam drásticas mudanças ambientais proporcionadas pelo transplântio, ou seja, de um meio totalmente controlado para um ambiente hostil com elevados níveis de estresse (baixa umidade, luminosidade e temperaturas elevadas, doenças, etc.). Durante o transplântio cuidados devem ser tomados visando assegurar a sobrevivência e o desenvolvimento satisfatório das plantas micropropagadas, como as condições ambientais, os substratos, as condições fitossanitárias, a irrigação e os recipientes (Hazarika, 2003; Moreira *et al.*, 2006).

2.5. Análise por Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica que surgiu 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 (Dolezel *et al.*, 1994; Rival *et al.*, 1997; Dolezel *et al.*, 1997; Rival *et al.*, 1998; Madon *et al.*, 2008). 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 e Santos, 2002). Além de suas aplicações convencionais, esta técnica também tem sido utilizada para avaliar e indicar precocemente a estabilidade genômica de plantas micropropagadas (Kubis *et al.*, 2003; Rival *et al.*, 2009). Em trabalhos de embriogênese somática, por exemplo, a citometria de fluxo possui diversas aplicações, incluindo a determinação do nível de ploidia e a avaliação do conteúdo de DNA. Acrescenta-se ainda, que a citometria de fluxo pode ser um bom indicador da atividade de divisão celular (Srisawat *et al.*, 2005).

Entre algumas vantagens da citometria de fluxo destacam-se: a pequena quantidade de tecido vegetal necessária, o que facilita a aplicação da técnica em plantas de tamanho reduzido sem destruí-las; o menor tempo para analisar grande quantidade de amostras, além de pode ser aplicada a qualquer tecido da planta (Dolezel *et al.*, 1994; Dolezel *et al.*, 1997).

Nas técnicas da cultura de tecidos, existe um risco de ocorrer variação genética nas células ou nas plantas regeneradas. O risco de variação genética ou somaclonal é maior quando as plantas são adventícias, ou seja, originam-se por meio de calo, de suspensão celular, de protoplastos e de embriogênese somática. Vários são os mecanismos causadores da variação somaclonal, como variações cromossômicas, a ativação de transposons, mutações em um único gene, metilações do DNA, a poliploidia e as mutações nucleares e citoplasmáticas (Jaligot *et al.*, 2000; Srisawat *et al.*, 2005; Rival *et al.*, 2009; Madon *et al.*, 2012).

Variações somaclonais têm sido constatadas em palmeiras como *Elaeis guineensis* Jacq., como anormalidades no desenvolvimento floral podendo resultar em parcial ou completa esterilidade da flor. Em dendezeiro até 5% das plantas micropropagadas via embriogênese somática podem apresentar anomalias em seu desenvolvimento, afetando diretamente sua produtividade de óleo (Jaligot *et al.*, 2000; Kubis *et al.*, 2003; Rival *et al.*, 2009).

A fim de investigar a relação entre variação somaclonal e possíveis alterações na taxa de metilação do DNA genômico em dendezeiro, Jaligot *et al.*, 2000 realizou a quantificação relativa de 5-metil-desoxicidina que mostrou que a metilação de DNA em folha de regenerantes anormais é de $0,5 \pm 2,5\%$ inferior à de normais (20,8% e 22%, respectivamente), sendo que ao comparar calos esta redução foi de até 4,5%. Este trabalho demonstrou que existe uma correlação entre hipometilação do DNA genômico e variação somaclonal em dendezeiro, utilizando dois diferentes materiais (calos e folhas). Flutuações de metilação do DNA têm mostrado estar envolvidas na regulação de genes ao nível da transcrição, em particular durante a diferenciação/desdiferenciação e como uma resposta a tensões ambientais. Srisawat *et al.* (2005) relatam a aplicação da citometria de fluxo no gênero *Elaeis*, utilizando como padrão de referência a soja (*Glycine max* cv. Polanka), determinando assim o conteúdo

relativo de DNA nuclear e verificando as alterações no genoma a partir de células em suspensão e tecidos de calo, além de plantas regeneradas.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, H.; JOUANNIC, S.; ESCOUTE, J.; DUVAL, Y.; VERDEIL, J. L.; TREGGAR, J. W. Reproductive developmental complexity in the African oil palm (*Elaeis guineensis*, Arecaceae). *American Journal of Botany*, v. 92, n. 11, p. 1836–1852, 2005.

ALVORADO, A.; STERLING, F. Seasonal Variation in the Oil Extraction Rate in Oil Palm. *ASD Oil Palm Papers*, n.17, p.20-30, 1998.

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

BOARI, A. J. Estudos Realizados sobre o Amarelecimento Fatal do Dendzeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) no Brasil. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 348, p. 13-14, 2008.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C., CALDAS, L. S., BUSO, J. A. (Eds). *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*, Brasília: EMBRAPA, v. 2, p. 87-132, 1998.

CARVALHO, A. R. V. de; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M. O Dendê (*Elaeis guineensis* Jacq.). Seropédica: Embrapa Agrobiologia. Documentos, 138, p. 25, 2001.

CHIA, G. S.; LOPES, R.; CUNHA, R. N. V.; ROCHA, R. N. C.; LOPES, M. T. G. Repetibilidade da produção de cachos de híbridos interespecíficos entre caiaué e dendzeiro. *Acta Amazonica*, v. 39, p. 249-254, 2009.

CHOI, D; ANDRADE, M. H. C.; WILLIS, L. B.; CHO, C.; SCHOENHEIT, J.; BOCCAZZI, P.; SAMBANTHAMURTHI, R. SINSKEY, A. J.; RHA, C. Effect of agitation and aeration on yield optimization of oil palm suspension culture. *Journal of Oil Palm Research Special Issue on Malaysia-MIT Biotechnology Partnership Programme*, v. 1, p. 23-34, 2008.

CID, L. P. B. Suspensão celular. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Embrapa-SPI/CNPq, Brasília, v.1, p. 331-353, 1998.

CID, L. P. B.; CRUZ, A. R. R.; TEIXEIRA, J. M. Biorreatores de Imersão Permanente. *Biotecnologia – Ciência e Desenvolvimento*. Ano 4, n. 2, p. 50-53, 2002.

CONCEIÇÃO, H. E. O.; MULLER, A. A. Botânica e morfologia do dendezeiro. In: VIÉGAS, I. J. M.; MULLER, A. A. (Eds.). *A cultura do dendezeiro na Amazônia brasileira*. Belém – PA, Embrapa Amazônia Oriental, 2000.

CUNHA, R. N. V.; LOPES, R.; BARCELOS, E. 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, 2009.

DEORE, A. J.; JOHNSON, T. S. High frequency plant regeneration from leaf-disc cultures of *Jatropha curcas* L.: an important biodiesel crop, *Plant Biotechnology Report*, v. 2, p. 7-11, 2008.

DOLEZEL, J.; DOLEZELOVÁ, M.; NOVÁK, F. J. Flow cytometric estimation of nuclear DNA amount in diploid bananas (*Musa acuminata* and *M. balbisiana*). *Biologia Plantarum*, v. 36, n. 3, p. 351-357, 1994.

DOLEZEL, J.; LYSÁK, M. A.; HOUWE, I. V.; DOLEZELOVÁ, M.; ROUX, N. Use flow cytometry for rapid ploidy determination in *Musa* species. *Infomusa*, v. 6, n.1, p. 6-9, 1997.

DURAND-GASSELIN, T.; GUEN, V. L.; KONAN, E.; DUVAL, Y. Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) plantations in Côte d'Ivoire obtained through *in vitro* culture – first results. *Oléagineux*, v. 45, p. 1-11, 1990.

DURAN, N.; ORTIZ, R. A. Efeito de algumas propriedades físicas do solo e da precipitação sobre a produção de dendê. *Agronomia Mesoamérica*, v. 6, p. 7-14, 1995.

DUVAL, Y.; ENGELMANN, F.; DURAND-GASSELIN, T. Somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). In: Bajaj YPS (Ed.) Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I, *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, v. 30, p. 335–352, 1995.

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

GOMES, M.; BIONDI A.; BRIANEZI, T.; GLASS, V. O Brasil dos agrocombustíveis: Impactos das Lavouras sobre a Terra, o Meio e a Sociedade - Gordura Animal, Dendê, Algodão, Pinhão-Manso, Girassol e Canola. Centro de Monitoramento dos Agrocombustíveis, p. 69, 2009.

GONÇALVES, A. C. R. Dendzeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.). In: CASTRO, P. R. C.; KLUGE, R. A. (Coord). *Ecofisiologia de culturas extrativas: cana-de-açúcar, seringueira, coqueiro, dendzeiro e oliveira*. Cosmópolis: Stoller do Brasil, p. 95- 112, 2001.

GORRET, N.; ROSLI, S. K. B.; OPPENHEIM, S. F.; WILLIS, L. B.; LESSARD, P.A.; RHA, C.; SINSKEY, A. J. Bioreactor culture of oil palm (*Elaeis guineensis*) and effects of nitrogen source, inoculums size, and conditioned medium on biomass production. *Journal of Biotechnology*, v. 108, p. 253-263, 2004.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.C., CALDAS, L. S., BUSO, J. A. (Eds.). *Culturas de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Brasília, Embrapa-CBAB, v. 1, p. 183-260, 1998.

GUEDES, R. S.; SILVA, T. L.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Initial requirements for embryogenic calluses initiation in thin cell layers explants from immature female oil palm inflorescences. *African Journal of Biotechnology*, v. 10, p. 10774-10780, 2011.

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

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Brasília: EMBRAPA, v. 2, p. 533-568, 1999.

HAZARIKA, B. N. Acclimatization of tissue-cultured plants. *Current Science*, Bangalore, v. 85, n. 12, p. 1704-1712, 2003.

HARTLEY, C. W. S. The oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). 3^o ed. Singapore: Longman, p. 761, 1988.

HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. Cultura de embriões. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, v. 2, p. 371-393, 1998.

HUONG, L. T.; BALOCCO, M.; HUY, B. P.; MEZZETTE, B.; SANTILOCCHI, R.; ROSATTI, P. Somatic embryogenesis in Canary Island date palm. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 56; p. 1-7, 1999.

JALIGOT, E.; RIVAL, A.; BEULÉ, T.; DUSSERT, S.; VERDEIL, J. Somaclonal variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.): the DNA methylation hypothesis. *Plant Cell Reports*, v. 19, p. 684-690, 2000.

KANCHANAPOOM, K.; CHOURYKAEW, B. Somatic embryogenesis from cell suspension cultures of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Journal of Science Society of Thailand*, p. 241-250, 1998.

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

KONAN, K. E.; DURANT-GASSELIN, T.; KOUADIO, Y. J.; FLORI, A.; RIVAL, A.; DUVAL, Y.; PANNETIER, C. *In vitro* conservation of oil palm somatic embryo for 20 years on a hormone-free culture medium: characteristics of the embryogenic cultures, derived plantlets and adult palms. *Plant Cell Reports*, v. 29, n. 1, p. 1-13, 2010.

KUBIS, S. E.; CASTILHO, A. M.; VERSHININ, A. V.; HESLOP-HARRISON, J.S. Retroelements, transposons and methylation status in the genome of oil palm (*Elaeis guineensis*) and the relationship to somaclonal variation. *Plant Molecular Biology*, v. 52, p. 69–79, 2003.

LEDO, A. S.; LAMEIRA, O. A.; BENBADIS, A. K.; MENEZES, I. C.; OLIVEIRA, M. S. P.; FILHO, S. M. Somatic embryogenesis from zygotic embryos of *Euterpe oleracea* Mart. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 24, n. 3, p. 601-603, 2002.

LEDO, A.S.; GOMES, K. K. P.; BARBOZA, S. B. S. C.; VIEIRA, G. S. S.; TUPINAMBÁ, E. A. E ARAGÃO, W. M. Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos e aclimação de plântulas de coqueiro-anão. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 42, n. 2, p. 147-154, 2007.

LEVIN, R.; ALPER, Y.; STAV, R.; WATAD, A. Methods and apparatus for liquid media and semiautomated micropropagation. *Acta Horticulturae*, v. 447, p. 659-663, 1997.

LORENZI, H.; SOUZA, H.; COSTA, J. T. M.; CERQUEIRA, L. S. C.; FERREIRA, E. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa, SP: *Instituto Plantarum*, p. 432, 2004.

LORENZI, H.; NOBLICK, L. R.; KAHN, F.; FERREIRA, E. *Flora Brasileira Lorenzi: Arecaceae (Palmeiras)*. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2010.

LOUREIRO, J.; SANTOS, C. Aplicação da citometria de fluxo ao estudo do genoma vegetal. *Boletim de Biotecnologia*, p. 18-29, 2002.

MADON, M.; PHOON, L. Q.; CLYDE, M. M.; MOHD DIN, A. Application of flow cytometry for estimation of nuclear DNA content in *Elaeis*. *Journal of Oil Palm Research*, v. 20, p. 447-452, 2008.

MADON, M.; HESLOP-HARRISON, J. S.; SCHWARZACHER, T.; HASHIM, A. T. Analysis of oil palm calli and regenerants using flow and image cytometry and 18S-25S ribosomal DNA fluorescence *in situ* hybridization (fish). *Journal of Oil Palm Research*, v. 24, p. 1318-1329, 2012.

MATSUMOTO, K.; SILVA NETO, S. P. Micropropagation of Bananas. In: Jain, S.M. and Ishii, K. (Eds). *Micropropagation of wood trees and fruits*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, p. 353-380. 2003.

Malaysian Palm Oil Board Statistics (MPOB). The World's Largest Palm Oil Exporter 2013. Disponível em:

<http://www.mpoc.org.my/Malaysian_Palm_Oil_Industry.aspx> acesso em: 09/11/2013, 17h20.

MIRAGAYA, J. C. G. Biodiesel: tendências no mundo e no Brasil. *Informe Agropecuário*, v. 26, p. 7-13, 2005.

MOREIRA, M. A.; CARVALHO, J. B.; PASQUAL, M.; FRÁGUAS, C. B.; SILVA, A. B. Efeito de substratos na aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Pérola. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 30, n. 5, p. 875-879, 2006.

MOURA, E. F.; MOTOIKE, S. Y.; VENTRELLA, M. C.; SÁJÚNIOR, A. Q.; FERREIRA, M. C.; CARVALHO, M. Somatic embryogenesis in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from zygotic embryos. *Scientia Horticulturae*, v. 119, p. 447-454, 2009.

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

NARAYANASWAMY, S. Regeneration of plants from tissue cultures. In: REINERT, J., BAJAJ, Y. P. S. *Applied and fundamental aspects of plant cell tissue and organ culture*. Berlin: Springer Verlag, p. 179-248, 1977.

NAMASIVAYAM, P. Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 90, p. 1-8. 2007.

PALANYANDY, S. R.; SURANTHRAN P.; GANTAIT, S.; SINNIH, U. R.; SUBRAMANIAM, S.; AZIZ, M. A.; ALWEE, S. S. R. S.; ROOWI, S. H. *In vitro* developmental study of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) polyembryoids from cell suspension using scanning electron microscopy, *Acta Physiol Plant*, v. 35, p.1727–1733, 2013.

PAN, M. J.; STADEN, J. V. The use of charcoal in *in vitro* culture: a review. *Plant Growth Regulation*, v. 26, p. 155-163, 1998.

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

RAMOS, L. P.; WILHELM, H. M. Current status of biodiesel development in Brazil. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, p. 121-124, 2005.

RIVAL, A.; BEULE, T.; BARRE, P.; HAMON, S.; DUVAL, Y.; NOIROT, M. Comparative flow cytometry estimation of nuclear DNA content in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq) tissue cultures and seed-derived plants. *Plant Cell Reports*, v. 16, p. 884-887, 1997.

RIVAL, A.; BERTRAND, L.; BEULÉ, T.; TROUSLOT, P.; LASHERMES, P. Suitability of RAPD analysis for the detection of somaclonal variants in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Plant Breeding*, v. 117, n. 1, p. 73-76, 1998.

RIVAL, A.; JALIGOT, E.; BEULÉ, T.; TREGGAR, J. W.; FINNEGAN, J. The oil palm "mantled" somaclonal variation: a model for epigenetic studies in higher plants. *Acta Horticulturae*, v. 829, p. 177-182, 2009.

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

SALDANHA, C. W.; MARTINS-CORDER, M. P.; STEINMACHER, D. A.; GUERRA, M. P. *In vitro* morphogenesis in zygotic embryos and leaf sheaths of *Euterpe edulis* M. (Arecaceae). *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v. 6, p. 228–235, 2006.

SANÉ, D.; ABERLENC-BERTOSSI, F.; GASSAMA-DIA, Y. K.; SAGNA, M.; TROUSLOT, M. F.; DUVAL, Y.; BORGEL, A. Histocytological analysis of callogenesis and somatic embryogenesis from cell suspensions of date palm (*Phoenix dactylifera*). *Annals of Botany*, v. 98, p. 301–308, 2006.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; MACIEL, S. DE A.; FERMINO JÚNIOR, P. C. P. Indução da embriogênese somática em pupunheira (*Bactris gasipaes* H. B. K.) a partir de embriões zigóticos imaturos. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*, v. 1, p. 849-852, 2007.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; GUEDES, R. S.; SILVA T. L.; FERMINO, J. R. P. C. P.; COSTA, F. H. S. Somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm using thin cell layer technique. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, v. 46, n. 4, p. 378-385, 2010.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; GUEDES, R. S.; SILVA, R. A.; FERMINO, P. C. P.; LUIS, Z. G.; FREITAS, E. O. Somatic embryogenesis and plant regeneration in açai palm (*Euterpe oleracea*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 109, p. 501-508, 2012.

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

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

SOH, A. C.; WONG, G.; TAN, C. C.; CHEW, P. S.; CHONG, S. P.; HO, Y. W.; WONG, C. K.; CHOO, C. N.; NOR AZURA, H.; KUMAR, K. Commercial-scale propagation and planting of elite oil palm clones: research and development towards realization. *Journal of Oil Palm Research*, v. 23, p.935-952, 2011.

SRISAWAT, T.; KANCHANAPOOM, K.; PATTANAPANYASAT, K.; SRIKUL, S.; CHUTHAMMATHAT, W. Flow cytometric analysis of oil palm: A preliminary analysis for cultivars and genomic DNA alteration. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, v. 27, n. 3, p. 645-652, 2005.

STEINMACHER, D. A.; KROHN, N. G.; DANTAS, A. C. M.; STEFENON, V. M.; CLEMENT, C. R.; GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis in peach palm using the thin cell layer technique: Induction, morpho-histological aspects and AFLP analysis of somaclonal variation. *Annals of Botany*, p. 1-11, 2007a.

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

STEINMACHER, D. A.; GUERRA, M. P., SAARE-SURMINSKI, K.; LIEBEREI, R. A temporary immersion system improves *in vitro* regeneration of peach palm through secondary somatic embryogenesis. *Annals of Botany*, v. 108, p. 1463–1475, 2011.

SURRE, C.; ZILLER, R. *La palmera de aceite*. Barcelona: Ed. Blume, p. 11-28, 1969.

SWATI, J.; ALOK, V; KOTHARY, S. L.; JAIN, S.; VARSHINEY, A. *Cereal Research Communications*, v. 19, p. 230-231, 2001.

TAN, C.; GHAZALI, H. M.; KUNTOM, A.; TAN, C.; ARIFFIN, A. A. Extraction and physicochemical properties of low free fatty acid crude palm oil, *Journal of Food Engineering*, v.113, p.645-650, 2009.

TARMIZI, A. H.; NORJIHAN, M. A.; ZAITON, R. Multiplication of oil palm suspension cultures in a bench-top (2-litre) bioreactor. *Journal of Oil Palm Research*, v. 16, p. 44-49, n. 2, 2004.

TARMIZI, A. H.; ZAITON, R. Development of the MPOB fast transfer technique (MoFaTT) system for maintenance and maturation of oil palm culture aggregates. *Journal of Oil Palm Research*, v. 19, p. 435-439, 2007.

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

TEIXEIRA, J. B.; SONDAHL, M. R.; KIRBY, E. G. Somatic embryogenesis from immature inflorescences of oil palm. *Plant Cell Reports*, v. 13, p. 247–250. 1994.

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

TEIXEIRA, J.B. Biorreatores. *Biotecnologia – Ciência e Desenvolvimento*. Ano 4, n. 24, p. 36-41, 2002.

THOMAS, T. D. The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnol Advances*, v. 26, p. 618-631, 2008.

THUZAR, M.; VANAVICHIT, A.; TRAGOONRUNG, S.; JANTASURIYARAT, C. Efficient and rapid plant regeneration of oil palm zygotic embryos cv. 'Tenera' through somatic embryogenesis. *Acta Physiologia Plantarum*, n. 33, p. 123-128, 2011.

TITON, M.; XAVIER, A.; OTONI, W. C.; MOTOIKE, S. Y. Efeito dos reguladores de crescimento dicamba e picloram na embriogênese somática em *Eucalyptus grandis*. *Revista Árvore*, v. 13, 2007.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas. Brasília: EMBRAPA, v. 1, p. 509, 1998.

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

VALOIS, A. C. C. *Possibilidades da cultura do dendê na Amazônia*. Brasília: Embrapa-Cenargen. Comunicado Técnico, n. 19, p. 7, 1997.

VAN WINKLE, S. C.; VAN; JOHNSON, S.; PULLMAN, G. S. The impact of gelrite and active carbon on the elemental composition of two conifer embryogenic tissue initiation media. *Plant Cell Reports*, v. 21, p. 1175-1182, 2003.

VERDEIL, J. L.; ALEMANN, L.; NIEMENAK, N.; TRANBARGER, T. J. Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? *TRENDS in Plant Science*, v. 12, n. 6, p. 245-252, 2007.

VIÉGAS, I. J. M.; MÜLLER, A. A. *A cultura do dendzeiro na Amazônia Brasileira*. Belém: EMBRAPA/CPATU, p. 374, 2000.

ZIV, M. The control of bioreactor environment for plant propagation in liquid culture. *Acta Horticulturae*, Wageningen, v. 393, p. 25-38, 1995.

CAPÍTULO I

INFLUÊNCIA DA PASSAGEM DE CALOS EMBRIOGÊNICOS POR MEIOS DE CONSISTÊNCIA LÍQUIDA SOBRE A EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E REGENERAÇÃO DE PLANTAS EM DENDEZEIRO (*Elaeis guineensis* Jacq.)

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da passagem de calos embriogênicos por meios de consistência líquida sobre a embriogênese somática e regeneração de plantas em dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.). Na indução da embriogênese somática foram utilizados embriões zigóticos obtidos de frutos maduros das variedades C 2501, C 2528 e C 7201. Inicialmente, calos foram induzidos em meio de MS semissólido suplementado com 450 μM de Picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico), 30 g.L^{-1} de sacarose, 0,5 g.L^{-1} de glutamina, 2,5 g.L^{-1} de carvão ativado e 2,5 g.L^{-1} do solidificante Phytigel. Durante o período de indução, além da avaliação genotípica nas respostas, também verificou-se a influência de subcultivar ou não os explantes para meios de cultura frescos a cada 30 dias. Num segundo momento, parte dos calos embriogênicos formados em meio de indução foram transferidos para meios de cultura de consistência líquida, de igual composição em sais e vitaminas do meio de indução, mas com concentrações reduzidas de auxinas, denominados: MeA (MS com 5 μM de Picloram) e MeB (MS com 5 μM de 2,4-D - ácido 2,4-diclorofenoxiacético). Após 210 dias da inoculação do material em meio líquido foi possível separar dois tipos de agregados: aqueles que não desagregaram completamente e aqueles considerados estabelecidos que foram mantidos em meio de cultura líquido para multiplicação. A partir de calos não desagregados em meio líquido sob agitação, porções foram transferidas para meios de cultura de consistência sólida para a diferenciação de embriões somáticos, assim denominados: M1: $\frac{1}{2}$ MS; M2: MS com 40 μM de Picloram e M3: MS com 12,3 μM de 2iP (2-isopentenil-adenina) e 0,6 μM de ANA (Ácido naftalenoacético). Para a etapa de regeneração e desenvolvimento de plantas, os embriões somáticos diferenciados nos respectivos meios de cultura de diferenciação foram transferidos para meio de MS desprovido de reguladores de crescimento, suplementado com 30 g.L^{-1} de sacarose, 2,5 g.L^{-1} de carvão ativado e 2,5 g.L^{-1} de Phytigel. Posteriormente, as plantas foram individualizadas e transferidas para tubos de ensaio preenchidos com meio de MS dupla-fase (5 mL de meio líquido sobre 10 mL de meio semissólido), suplementado com 57 μM de AIB para induzir a formação de raízes e

completarem seu desenvolvimento. Uma vez enraizadas e com altura entre 10 e 14 cm, as plantas foram acondicionadas em substrato comercial e pré-aclimatizadas em câmara de crescimento, onde permaneceram por até duas semanas até serem transferidas para casa de vegetação. Por fim, as plantas regeneradas foram analisadas por citometria de fluxo para avaliar possíveis alterações no conteúdo genômico. Verificou-se que a condição de subcultivar os explantes a cada 30 dias na fase de indução foi determinante para estimular a formação de calos embriogênicos (20,8%). De maneira geral, verificou-se que a passagem de calos embriogênicos por meio líquido na presença de 2,4-D (MeB) aumentou significativamente a porcentagem de calos com embriões somáticos diferenciados. Entre os meios de cultura testados na fase de diferenciação, observou-se que o meio M1 foi o que proporcionou os melhores resultados, uma vez que 58,2% dos calos cultivados nesse meio de cultura diferenciaram embriões somáticos. Em meio de diferenciação M3 a variedade C 2528 apresentou os maiores índices de calos com embriões somáticos diferenciados (80,2%), embora tenha sido no meio M1 que essa variedade apresentou o maior número de embriões tipo torpedo diferenciados (8,3 embriões torpedo por calo). Quanto à frequência de regeneração de embriões somáticos, verificou-se que aqueles oriundos dos meios de diferenciação M1 e M3 foram o que apresentaram os melhores índices de regeneração (29,5% e 31,7%, respectivamente). Na fase de aclimatização a porcentagem de sobrevivência das mudas, ao final de 90 dias em casa de vegetação, foi de 95,2%. Por fim, não foram evidenciadas diferenças significativas no conteúdo médio de DNA nuclear entre as plantas regeneradas por embriogênese somática e plantas controle quando estas foram avaliadas por citometria de fluxo, tendo sido observado valores na ordem de $2C = 3,89 \pm 0,16$ pg.

Palavras-chave: *Elaeis guineensis*, embriogênese somática, meio líquido, regeneração, citometria de fluxo.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the influence of the passage of embryogenic calluses through a liquid medium on somatic embryogenesis and plant regeneration in African oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). In the induction of somatic embryogenesis, zygotic embryos obtained from mature fruits of the varieties C 2501, C 2528 and C 7201 were used. Initially, calluses were induced in a semi-solid MS medium supplemented with 450 μM Picloram (4-amino - 3,5,6- trichloropicolinic acid), 30 g.L^{-1} sucrose, 0.5 g.L^{-1} glutamine, 2.5 g.L^{-1} activated charcoal and 2.5 g.L^{-1} Phytigel solidifying agent. During the induction period, in addition to the genotypic assessment in the responses, it was verified the influence of subculturing the explants (or not) to fresh culture media every 30 days. At a later time, part of the embryogenic calluses formed on the induction medium were transferred to liquid culture medium, with equal composition of salts and vitamins of the induction medium, but with reduced concentrations of auxins, called: MeA (MS with 5 μM Picloram), and MeB (MS with 5 μM 2,4 -D - 2,4-dichlorophenoxyacetic acid). After 210 days of inoculation of the material in a liquid medium, it was possible to separate two types of aggregates: those that did not completely disaggregate and those considered as established that were maintained in liquid culture for multiplication. Based on the calluses not disaggregated in liquid medium under agitation, portions were transferred to solid culture media for differentiation of somatic embryos, named as follows: M1 - $\frac{1}{2}$ MS; M2 - MS with 40 μM Picloram, and M3 - MS with 12.3 μM 2iP (2-isopentenyladenine) and 0.6 μM NAA (naphthaleneacetic acid). For the stage of regeneration and development of plants, the somatic embryos differentiated in the respective differentiation culture media were transferred to MS medium devoid of growth regulators, supplemented with 30 g.L^{-1} sucrose, 2.5 g.L^{-1} charcoal activated and 2.5 g.L^{-1} Phytigel. Subsequently, the plants were individualized and transferred to test tubes filled with a double-phase MS medium (5 mL liquid medium on 10 mL of semi-solid medium) supplemented with 57 μM IBA to induce root formation and complete their development. Once the plants had rooted, at a height between 10 and 14 cm, they were placed in pre-acclimatized commercial substrate and in a growth chamber, where they

remained for up to two weeks before being transferred to the greenhouse. Finally, the regenerated plants were analyzed by flow cytometry to evaluate possible changes in genomic content. It was found that the condition of the subculturing the explants every 30 days in the induction phase was a determining factor to stimulate the formation of embryogenic calluses (20.8%). In general, it was found that the passage of embryogenic callus through a liquid medium in the presence of 2,4-D (MeB) significantly increased the percentage of calluses with differentiated somatic embryos. Among the culture media tested in the differentiation phase, it was observed that the M1 medium was the one that provided the best results, as 58.2% of the calluses cultivated in culture medium differentiated somatic embryos. In the M3 differentiation medium, the C 2528 variety showed the highest rates of calluses with differentiated somatic embryos (80.2%), although it was in the M1 medium that this variety had the highest number of torpedo-shaped differentiated embryos (8.3 torpedo-shaped embryos per callus). Regarding the frequency of regeneration of somatic embryos, it was found that those coming from the M1 and M3 differentiating media were the ones that showed the best regeneration rates (29.5% and 31.7%, respectively). During the acclimatization phase, the plantlets survival percentage, after 90 days in the greenhouse, was 95.2%. Finally, no significant differences were found in the average nuclear DNA content among plants regenerated by somatic embryogenesis and the control plants when evaluated by flow cytometry; values on the order of $2C = 3.89 \pm 0.16$ pg were observed.

Keywords: *Elaeis guineensis*, somatic embryogenesis, liquid medium, regeneration, flow cytometry.

1. INTRODUÇÃO

O dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) é uma palmeira monocotiledônea perene, monóica, oleaginosa e de origem africana. É cultivado extensivamente na Ásia, onde se encontra atualmente os maiores produtores (Malásia e Indonésia), na África e nas Américas Central e do Sul. No Brasil, os plantios comerciais estão localizados principalmente nas Regiões Norte e Nordeste, com destaque para a o Estado do Pará com cerca de 80% dos plantios comerciais (Chia *et al.*, 2009).

Atualmente, a maioria das variedades comerciais plantadas são híbridos F1 tipo *tenera*, resultantes do cruzamento entre os tipos *Dura* x *Pisifera* (D x P). E mesmo apresentado alto rendimento em óleo, os híbridos podem apresentar variações de produtividade entre plantas de até 40% (Rajesh *et al.*, 2003; Low *et al.*, 2008). Estudos sobre a propagação vegetativa de indivíduos com alto potencial de produção poderiam contribuir para que genótipos com produtividades de óleo superiores pudessem ser alcançadas (Rajesh *et al.*, 2003; Konan *et al.*, 2010; Soh *et al.*, 2011). Assim, a cultura de tecidos constitui-se como uma alternativa promissora para a propagação clonal desta espécie e, uma vez dominada, pode possibilitar a produção clonal de um elevado número de plantas em uma área física bastante reduzida (Soh *et al.*, 2011). Entre as diversas técnicas da cultura de tecidos, a embriogênese somática é a mais promissora por ser um processo pelo qual células haploides ou somáticas desenvolvem-se por meio de diferentes estádios embriogênicos, dando origem a uma planta completa, sem que ocorra a fusão de gametas (Sharp *et al.*, 1980).

Mas apesar de ser uma técnica promissora, o uso da embriogênese somática para algumas espécies, como o dendezeiro, ainda não é completamente dominada e, portanto, sua aplicação apresenta limitações principalmente em função da constante manipulação dos cultivos nas diferentes fases e dos custos laboratoriais, como a mão-de obra especializada e agentes gelificantes, o que refletem no valor final das muda produzidas. Entre os pesquisadores que trabalham com a clonagem desta cultura há um consenso que os trabalhos realizados até o momento, com o uso de meios de

consistência semissólida são tecnicamente inviáveis quando se pensa em clonagem em larga escala (Duval *et al.*, 1995; Tarmizi *et al.*, 2004; Tarmizi e Zaiton, 2007).

O uso de meios de consistência líquida pode ser uma alternativa para o cultivo do dendezeiro *in vitro*. Entre outras vantagens, meios de consistência líquida geralmente possibilitam melhor contato físico entre os explantes e o meio de cultura, fato que pode propiciar o favorecimento da taxa de assimilação de nutrientes e água, em relação ao meio de cultura semissólido. Além disso, meios líquidos são mais fáceis de serem preparados e manipulados (Tarmizi e Zaiton, 2007; Choi *et al.*, 2008; Scherwinski-Pereira *et al.*, 2012; Palanyandy *et al.*, 2013).

Neste contexto, é possível afirmar que os protocolos publicados para a maioria das palmeiras, incluindo o dendezeiro, ainda apresenta diversas limitações, além de em alguns casos, haver a ocorrência de variações somaclonais em mudas micropropagadas, as quais geralmente são influenciadas pelo uso de reguladores de crescimento no meio de cultivo (Jones *et al.*, 1995; Eeuwens *et al.*, 2002). Portanto, é imperativo que se avancem nas pesquisas sobre a clonagem do gênero *Elaeis*, utilizando-se para isso meio de cultura de consistência líquida e a avaliação da fidelidade genômica de materiais clonados, com técnicas rápidas, como por exemplo, a citometria de fluxo.

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a influência da passagem de calos embriogênicos por meios de consistência líquida sobre a embriogênese somática e regeneração de plantas em dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.), além de analisar a influência de subcultivos sobre a formação inicial de calos embriogênicos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local de condução dos experimentos

Os estudos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos II da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), Brasília-DF.

2.2. Materiais vegetais utilizados

Nos experimentos de embriogênese somática foram utilizados como explantes iniciais embriões zigóticos obtidos de frutos maduros de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.), variedades C 2501, C 2528 e C 7201. O material foi proveniente do Campo Experimental do Rio Urubu, em Rio Preto da Eva (AM), pertencente ao Programa de Melhoramento Genético de Dendezeiro desenvolvido pela Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus (AM).

2.3. Indução da embriogênese somática

A indução da embriogênese somática seguiu metodologia ajusta por Balzon *et al.* (2013), com algumas modificações. Inicialmente, o endocarpo das sementes foi removido com o auxílio de um torno mecânico para a obtenção das amêndoas. No laboratório e em condições assépticas, as amêndoas foram submetidas a um processo de desinfestação pela imersão em álcool 70% durante 3 minutos em câmara de fluxo laminar, seguida de outra imersão, de 20 minutos, em solução de hipoclorito de sódio a 2,0 - 2,5% (solução de alvejante comercial a 100%). Posteriormente foram efetuados três enxágues com água destilada e autoclavada para a remoção residual dos agentes desinfestantes usados.

A extração dos embriões zigóticos foi realizada com o auxílio de pinças, bisturis, placas de Petri e papéis filtros esterilizados. Após a extração, os embriões zigóticos foram imediatamente inoculados em placas de Petri (15 x 90 mm) contendo aproximadamente 20 mL de meio de MS modificado (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com 450 μM de Picloram, 30 g.L^{-1} de sacarose, 0,5 g.L^{-1} de glutamina, 2,5 g.L^{-1} de carvão ativado e 2,5 g.L^{-1} do

solidificante Phytigel (Sigma®). O pH do meio de cultura foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$ antes da esterilização em autoclave à 121°C e $1,5$ atm por 20 minutos.

Uma vez os embriões inoculados, as placas de Petri foram seladas com filme transparente de PVC e acondicionadas no escuro, em sala de crescimento, com temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ até o aparecimento dos calos embriogênicos (aproximadamente 5 meses de cultivo).

O esquema ilustrativo do processo de desinfestação, extração e indução de calos embriogênicos a partir de embriões zigóticos pode ser observado na Figura 1.

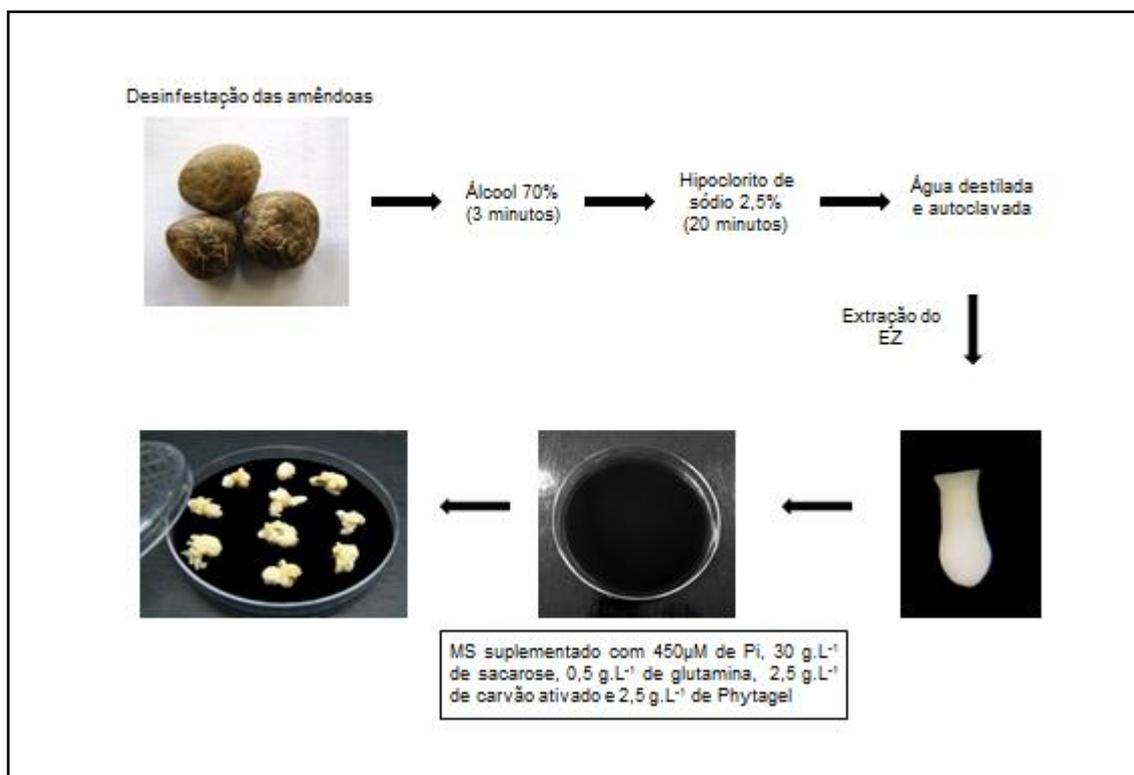


Figura 1. Esquema ilustrativo do processo de indução da embriogênese somática a partir de embriões zigóticos (EZ) obtidos de frutos maduros de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.): da desinfestação das amêndoas e extração dos EZ até a formação de calos embriogênicos.

2.3.1. Influência dos subcultivos na indução da embriogênese somática

Durante o período de indução da embriogênese somática, além da avaliação genotípica nas respostas, também se avaliou a influência de subcultivar ou não os explantes para meios de cultura frescos a cada 30 dias.

As variáveis analisadas foram percentagem de calos primários e calos multigranulares com estrutura embriogênica.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com dois tratamentos quanto ao tipo de subcultivo (subcultivar ou não subcultivar os explantes a cada 30 dias de cultivo) e três variedades de dendezeiro (C 2501, C 2528 e C 7201). Para a formação de calos os explantes foram avaliados e subcultivados por até 5 meses de cultivo. Cada tratamento foi constituído de 10 repetições, contendo 5 embriões zigóticos por parcela.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância com as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, sendo analisados com o emprego do programa de análises estatísticas Sanest (Zonta e Machado, 1984). Dados expressos em percentagem foram transformados segundo arco seno $(x/100)^{0,5}$.

2.4. Estabelecimento e multiplicação de agregados celulares em meio líquido

Após o processo de indução, parte dos calos multigranulares embriogênicos obtidos foram individualizados por raspagem, com o auxílio de uma espátula, e transferidos para dois diferentes meios de cultura de consistência líquida para o estabelecimento e multiplicação de agregados celulares, denominados: MeA (MS suplementado com 5 μM de Picloram, 30 g.L^{-1} de sacarose, 0,5 g.L^{-1} de glutamina e 0,2 g.L^{-1} de ácido ascórbico) e; MeB (MS suplementado com 5 μM de 2,4-D, 30 g.L^{-1} de sacarose, 0,5 g.L^{-1} de glutamina, 0,2 g.L^{-1} de ácido ascórbico). O pH de ambos os meios de cultura foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$ antes da esterilização em autoclave à 121°C e 1,5 atm por 20 minutos.

Os meios de cultura líquido foram depositados em erlenmeyers de 125 mL de capacidade com 30 mL de meio, sendo estes acondicionados sob agitação (100 rpm), em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e radiação luminosa de $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas-fria. Os meios de cultura foram renovados a cada duas semanas até a obtenção dos agregados celulares por um período

de 210 dias. Nesta etapa, o trabalho foi composto por pelo menos 5 repetições, com aproximadamente 500 mg de calos multigranulares embriogênicos.

O esquema ilustrativo do estabelecimento e multiplicação de agregados celulares em meio líquido, a partir de calos multigranulares embriogênicos pode ser observado na Figura 2.

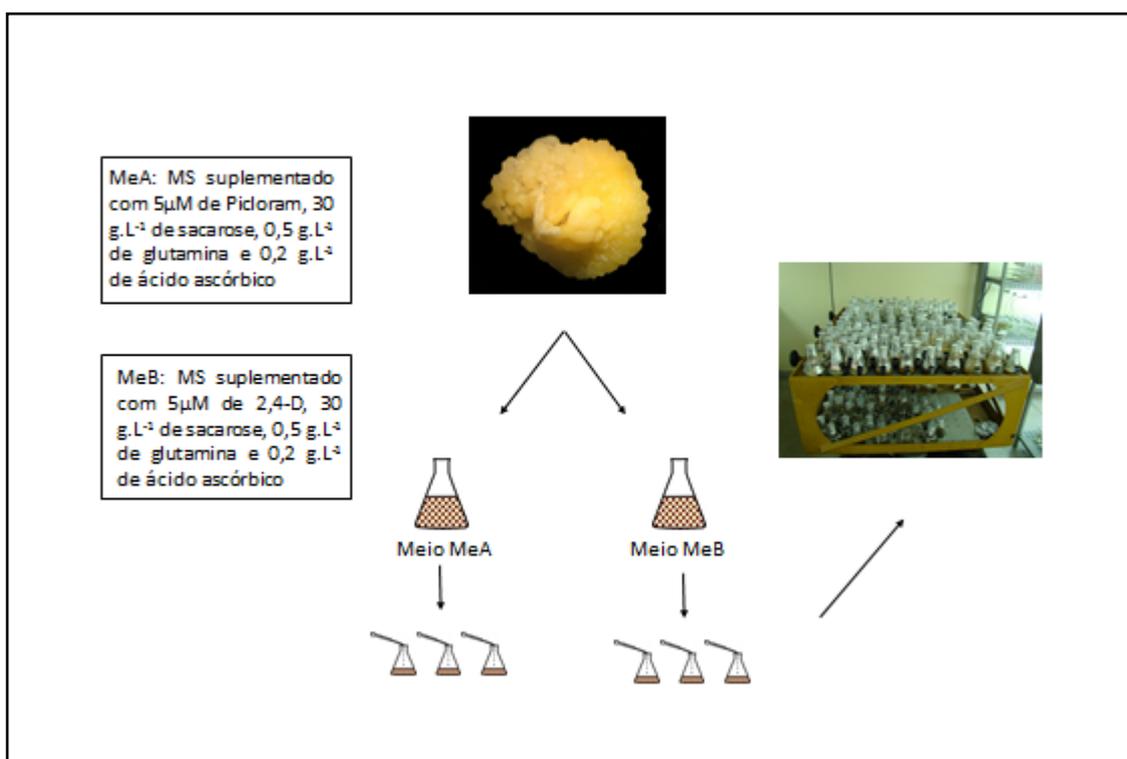


Figura 2. Esquema ilustrativo do estabelecimento e multiplicação de agregados celulares de dendezeiro em meio líquido, a partir de calos multigranulares embriogênicos.

2.5. Diferenciação de embriões somáticos de calos cultivados e não cultivados em meio líquido

Do material inoculado em meio líquido foi possível separar dois tipos de agregados: aqueles que não desagregaram completamente e cresceram no meio de cultura, e aqueles considerados estabelecidos, que foram mantidos em meio de cultura líquido para multiplicação.

Nesse trabalho, priorizou-se em se utilizar os agregados maiores, ou seja, aqueles que não desagregaram e cresceram em meio de cultura líquido sob agitação. Assim, uma vez isolados do meio líquido, os calos foram

transferidos para três diferentes meios de cultura semissólidos para avaliar o efeito da passagem dos calos por meio de consistência líquida na diferenciação de embriões somáticos, como segue: M1: $\frac{1}{2}$ MS suplementado de 30 g.L^{-1} de sacarose, $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de glutamina, $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ carvão ativado; M2: MS suplementado com $40 \text{ }\mu\text{M}$ de Picloram, 30 g.L^{-1} de sacarose, $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de glutamina, $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ carvão ativado e; M3: suplementado com $12,3 \text{ }\mu\text{M}$ de 2iP, $0,6 \text{ }\mu\text{M}$ de ANA, 30 g.L^{-1} de sacarose, $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de glutamina e $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ carvão ativado.

Todos os meios de cultura foram solidificados com $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ de Phytigel e tiveram o pH ajustado para $5,8 \pm 0,1$ antes da esterilização por autoclavagem à 121°C e $1,5 \text{ atm}$ por 20 minutos. Os calos que não passaram por meio líquido (tratamento controle) foram transferidos para os meios de cultura semissólido M2 e M3, de acordo com o protocolo de Silva *et al.* (2012) (Figura 3).

O esquema ilustrativo dos tratamentos de diferenciação e maturação dos agregados celulares em meio líquido, a partir de calos multigranulares embriogênicos pode ser observado na Figura 3.

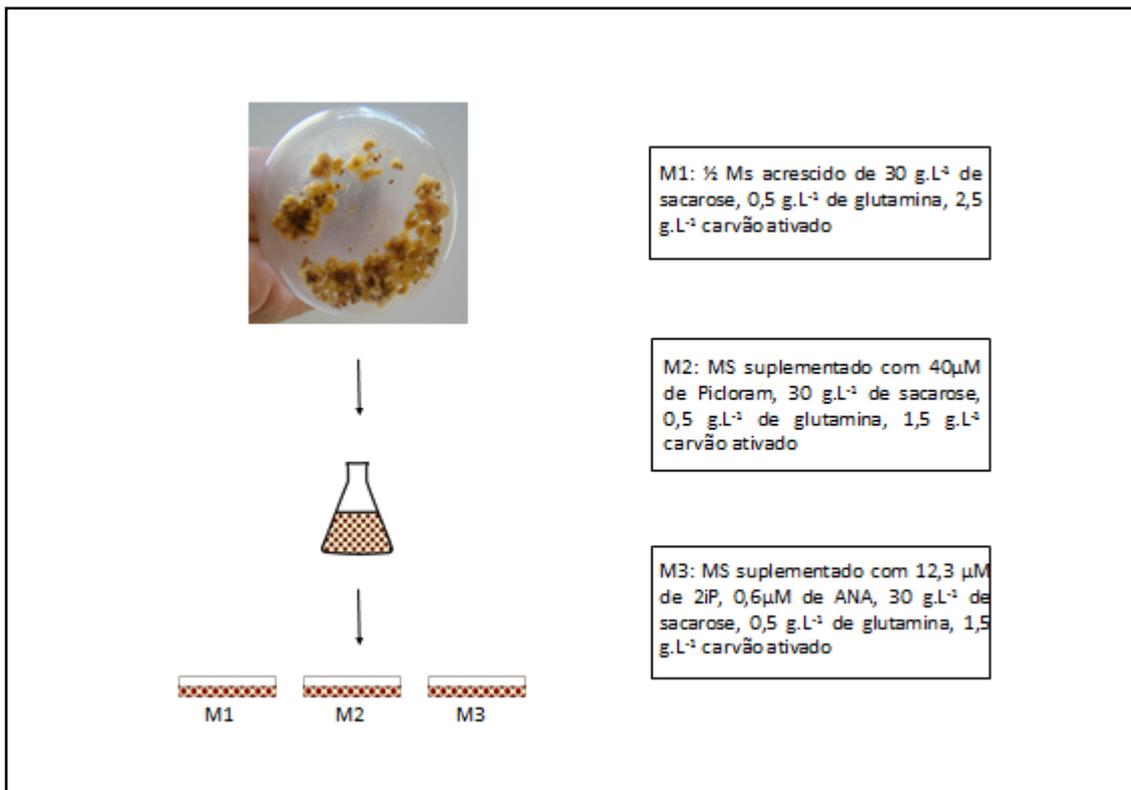


Figura 3. Esquema ilustrativo da diferenciação e maturação dos calos de dendezeiro cultivados em meio líquido, a partir de calos multigranulares embriogênicos

O material vegetal sob diferenciação nas diferentes composições em meio de cultura semissólido foi acondicionado em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e radiação luminosa de $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas-fria. As avaliações foram realizadas a cada três meses de cultivo por até 12 meses e as variáveis analisadas foram: percentagem de agregados com embriões somáticos, número embriões no estágio torpedo por agregado e frequência de regeneração. A frequência de regeneração foi obtida dividindo-se o número de plantas regeneradas pelo número total de embriões somáticos por calo, sendo o resultado multiplicado por 100.

O delineamento experimental utilizado neste experimento foi inteiramente casualizado. Cada tratamento foi constituído por 10 repetições, com pelo menos 3 calos por parcela.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância com as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Para as análises

utilizou-se o programa de análises estatísticas Sanest (Zonta e Machado, 1984). Dados expressos em percentagem foram transformados segundo arco seno $(x/100)^{0,5}$.

2.6. Regeneração, enraizamento e aclimatização das plantas

Os embriões somáticos diferenciados nos três meios de cultura testados foram transferidos para meio de MS desprovido de reguladores de crescimento, com 30 g.L⁻¹ de sacarose, 2,5 g.L⁻¹ de carvão ativado e 2,5 g.L⁻¹ do solidificante Phytigel (Sigma®) para regeneração e desenvolvimento das plantas. O pH do meio de cultura foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$ antes da esterilização em autoclave à 121°C e 1,5 atm por 20 minutos.

Após regeneradas, as plantas originadas de embriões somáticos de agregados que passaram pelo meio líquido foram individualizadas e, em seguida, transferidas para tubos de ensaio (25 x 150 mm) preenchidos com meio de MS dupla-fase (5 mL de meio líquido sobre 10 mL de meio semissólido), suplementado com 57 µM de AIB (ácido indol butírico) e 30 g.L⁻¹ de sacarose para induzir a formação de raízes, de acordo com metodologia proposta por Gomes *et al.* (2011).

A otimização do enraizamento das plantas foi realizado em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e radiação luminosa de 30 µmol.m⁻².s⁻¹ fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas-fria.

Uma vez enraizadas, as plantas foram retiradas dos tubos de ensaio e submetidas à lavagem de suas raízes em água corrente para eliminar o excesso de meio de cultura. Em seguida, foram plantadas em copos descartáveis (250 mL de capacidade), preenchidos com Bioplant® e areia lavada (3:1 v/v), e posteriormente, sendo cobertos com saco plástico transparente furado. As plantas foram colocadas sob condições de BOD, a uma temperatura de 25°C, durante duas semanas. Por fim, as plantas foram mantidas sob condições de casa de vegetação. Já em casa de vegetação, a cada 30 dias de cultivo foi avaliada a percentagem de sobrevivência das mudas, por um período de até 90 dias. Depois de decorrido esse tempo, as

mudas foram transplantadas para recipientes maiores, sendo transferidas para viveiro.

2.7. Análise dos regenerantes por citometria de fluxo

Foram amostrados clones regenerados da variedade C 2528 e plantas germinadas *in vitro* a partir de embriões zigóticos, a fim de comparação. A amostragem dos clones regenerados foi realizada no tratamento que promoveu os melhores resultados quanto à regeneração dos embriões somáticos.

Para obtenção da suspensão de núcleos, o material vegetal (aproximadamente 50 mg de folhas jovens dos clones regenerados e plantas germinadas) foram inicialmente triturados em 1,0 mL de tampão *Marie* (Marie e Brown, 1993), já adicionado à placa de Petri na presença de gelo. Em seguida, o tecido triturado em suspensão foi aspirado através de pipeta de *Pasteur* e, posteriormente, filtrado em malha de 42 µm (Millipore®) para filtragem das partículas. Por fim, a suspensão de núcleos foi corada com 25 µL de uma solução de iodeto de propídeo (1 mg/1 mL).

As análises foram realizadas em Citômetro de Fluxo Accuri C6 (Becton Dickinson®) com a leitura da emissão de fluorescência de pelo menos 50 mil núcleos e os histogramas gerados foram analisados no software *BD Accuri Cflow Plus*. As quantidades relativas de DNA, em picogramas (pg), foram obtidas por meio da equação:

$$\text{Quantidade de DNA (pg)} = (\text{posição do pico G1 da amostra/posição do pico G1 do padrão de referência}) \times \text{DNA do padrão.}$$

Neste trabalho foi utilizado como padrão externo de referência a ervilha (*Pisum sativum*) contendo 9,09 pg de DNA nuclear.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, composto por 10 plantas regeneradas (plantas provenientes de 3 calos selecionados aleatoriamente, sendo 3 repetições por planta) e 10 repetições de plantas germinadas a partir de embriões zigótico. A quantidade de DNA passou por análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância, utilizando-se o programa Sanest (Zonta e Machado, 1984).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Indução da embriogênese somática

Uma vez os embriões zigóticos estabelecidos *in vitro* (Figura 4A), o aparecimento de calos primários teve início a partir de 30 dias de cultivo em meio de indução, principalmente na região distal do embrião zigótico, o que corresponde à região cotiledonar (Figura 4B). Aos 60 dias de cultivo, em todos os tratamentos houve formação de calo primário (Figura 4C). Durante o cultivo, progressivamente, os calos aumentaram em tamanho e forma (Figura 4D,E-F) e, após 150 dias de cultivo em meio de indução da embriogênese somática, verificaram-se diferenças significativas entre as condições de cultivo avaliadas quanto a subcultivar ou não os explantes a cada 30 dias de cultivo. Na Tabela 1 é possível observar a influência da condição de cultivo em meio de indução sobre a formação de calos primários e embriogênicos. De maneira geral, a condição de subcultivar a cada 30 dias foi determinante para melhorar a taxa de formação de calos embriogênicos (20,8%), com o aspecto nodular e coloração amarelada (Figura 4E-F).

Tabela 1. Influência da condição de cultivo (com ou sem subcultivo a cada 30 dias) na fase de indução de calos sobre a percentagem de formação de calo primário e calo embriogênico em embriões zigótico de dendzeiro, variedades C 2501, C 2528 e C 7201.

Variedade	Calo primário (%)		Média Variedade	Calo embriogênico (%)		Média Variedade
	Sem subcultivo	Com subcultivo		Sem subcultivo	Com subcultivo	
C 2501	66,4aA	70,4aA	68,4a	1,7aB	13,1aA	7,4a
C 2528	67,3aA	81,1aA	74,2a	0,4aB	29,5aA	14,9a
C 7201	80,9aA	69,3aA	75,1a	0,4aB	19,8aA	10,1a
Média Subcultivo	71,5A	73,6A		0,8B	20,8A	

*Médias seguidas por letras distintas, dentro de cada item, minúscula na vertical (entre genótipos dentro de cada tipo de subcultivo) e maiúscula na horizontal (entre os tipos de subcultivos, dentro de cada genótipo), diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Parar a variável formação de calo primário não foram observadas diferenças significativas entre as variedades C 2501, C 2528 e C 7201 estudadas, sendo que na média, os valores observados para os explantes não subcultivados e subcultivados a cada 30 dias foram de 71,5% e 73,6%, respectivamente. Porém, na avaliação de formação de calos embriogênicos, verificaram-se diferenças significativas para o tratamento onde os explantes foram subcultivados a cada 30 dias para meio de cultura fresco. Nesse tratamento, independentemente da variedade, os valores alcançaram até 29,5% de explantes com formação de estruturas embriogênicas.

Os resultados obtidos corroboram com os de Silva *et al.* (2012) em um trabalho com nove variedades brasileiras de dendezeiro, que observaram a formação de calos primários compactos em embriões zigóticos a partir de 60 dias de cultivo. Além disso, esses autores conseguiram classificar as variedades em dois grupos de acordo com as diferentes respostas quanto a formação de calo primário, que variou entre 10% e 80%, sugerindo que respostas diferenciadas podem ocorrer em função do genótipo, mesmo que as condições de cultivo sejam idênticas.

De acordo com protocolos descritos para a maioria das palmeiras, a embriogênese somática requer geralmente que os meios de cultura de indução sejam constituídos por altas concentrações de auxinas, como o 2,4-D ou Picloram (Guerra e Handro, 1998; Pérez-Núñez *et al.*, 2006; Sáenz *et al.*, 2006; Titon *et al.*, 2007; Scherwinski-Pereira *et al.*, 2012). Essa classe de regulador de crescimento está envolvida na ativação e regulação da divisão e diferenciação celular (Namasivayam, 2007). O Picloram é uma auxina sintética derivada do ácido picolínico e tem sido empregada em algumas espécies de palmeiras com sucesso na obtenção de culturas embriogênicas, como nos casos de *Euterpe oleracea* (Scherwinski-Pereira *et al.*, 2012), *Elaeis guineensis* (Teixeira *et al.*, 1995; Scherwinski-Pereira *et al.*, 2010; Balzon *et al.*, 2013) e *Bactris gasipaes* (Steinmacher *et al.*, 2007; Steinmacher *et al.*, 2011).

O contato constante das células com concentrações elevadas de auxina mantém a capacidade embriogênica, enquanto que a diminuição ou retirada da auxina do meio de cultura induz as células a se diferenciarem (Komanine *et al.*, 1992). Outro fator de importância na composição do meio de indução da

embriogênese é a adição de carvão ativado, que além de diminuir as taxas de oxidação dos tecidos, também diminui a pronta disponibilidade de auxina aos cultivos, o que provavelmente contribui para a formação de estruturas embriogênicas, especialmente na etapa de formação de calos. A adição do carvão ativado é comum na cultura de palmeiras (Sáenz *et al.*, 2006; Pérez-Núñez *et al.*, 2006; Moura *et al.*, 2009; Scherwinski-Pereira *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2012; Balzon *et al.*, 2013), muito embora ainda não se conheçam os exatos mecanismos, primários ou secundários, da ação do carvão ativado sobre os cultivos.

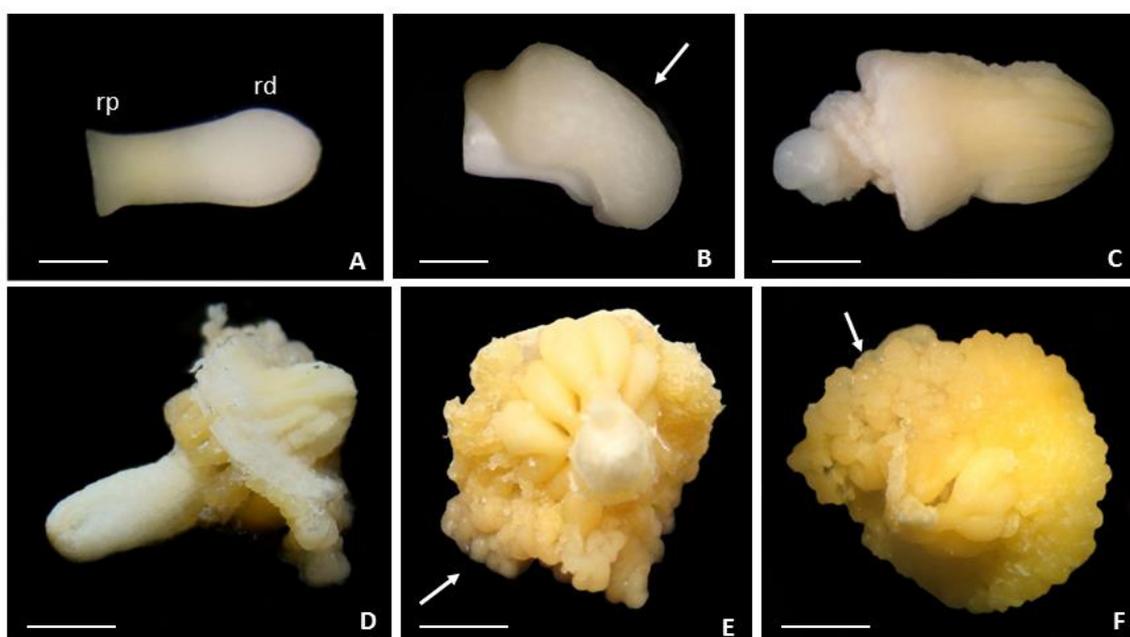


Figura 4. Aspecto da indução da embriogênese somática em dendezeiro a partir de embriões zigóticos, variedade C 2528. A. Embrião zigótico (região proximal - rp, região distal - rd; barra: 1 mm). B. Início da formação de calo primário aos 30 dias a partir da região distal (seta) (Barra: 1 mm). C. Início da formação de calo primário aos 60 dias (Barra: 3 mm). D. Calo primário aos 90 dias (Barra: 5 mm). E. Calo com estrutura multigranular embriogênica aos 120 dias (seta) (Barra: 5 mm). F. Calo com estrutura multigranular embriogênica aos 150 dias (seta) (Barra: 5 mm).

3.2. Diferenciação, regeneração e aclimatização das plantas

Após o processo de indução e visando o estabelecimento de cultivos em suspensão, por um período de 6 meses de cultivo, porções de calos não desagregados em meio líquido MeA (MS suplementado com 5 μ M de Picloram)

e MeB (MS suplementado com 5 μ M de 2,4-D) sob agitação, foram transferidos para meios de cultura para a diferenciação de embriões somáticos. Na Tabela 2 é possível observar a influência da consistência do meio líquido ou semissólido na diferenciação de embriões somáticos. De maneira geral, a passagem de calos embriogênicos por meio de cultura líquido, na presença da auxina 2,4-D, aumentou a porcentagem de calos com embriões somáticos diferenciados. Na média da consistência de meio de cultura, independentemente da variedade, cerca de 52,4% dos calos que passaram por meio líquido na presença de 2,4-D apresentaram diferenciação de embriões somáticos, contra apenas 16,2% quando a auxina utilizada em meio líquido foi o Picloram e 14,0% no tratamento controle, ou seja, quando os calos foram diferenciados em meio semissólido padrão (controle).

Entre os meios de cultura testados (M1, M2 e M3), o meio M1 foi o que, na média, proporcionou os melhores resultados para a diferenciação de embriões somáticos (58,2%), quando cultivados anteriormente em 2,4-D. Na análise individual dos genótipos, verificou-se que o C 2528 no meio de diferenciação M3, tendo passado pelo meio líquido acrescido da auxina 2,4-D, foi o que apresentou os maiores índices de calos com embriões somáticos diferenciados (80,2%).

Tabela 2. Influência da consistência do meio (líquido ou semissólido padrão) sobre a porcentagem de calos com embriões somáticos diferenciados em dendezeiro, variedades C 2501, C 2528 e C 7201.

Consistência do meio	Auxina	Meio de diferenciação	Calo com embriões somáticos (%)			Média tratamento	Média consistência
			C 2501	C 2528	C 7201		
Líquido	2,4-D	M1	32,1ab	77,2a	65,4a	58,2a	52,4
		M2	66,2a	50,0ab	41,5ab	52,6ab	
		M3	16,5ab	80,2a	42,2ab	46,3abc	
Líquido	Picloram	M1	2,6b	20,6ab	34,5ab	19,2bcd	16,2
		M2	1,0b	12,4b	35,2ab	16,2cd	
		M3	0,0b	34,5ab	5,4b	13,3d	
Semissólido (Controle)		M1	N.D.	N.D.	N.D.		14,0
		M2	6,7b	12,0b	10,9ab	9,9d	
		M3	6,7b	12,9b	34,7ab	18,1bcd	
				***		***	N.D

* Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical, diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. *** Altamente significativo ($p < 1\%$). N.D: Não determinado. M1: $\frac{1}{2}$ MS acrescido de 30 g.L^{-1} de sacarose, $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de glutamina, $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ carvão ativado; M2: MS suplementado com $40 \mu\text{M}$ de Picloram, 30 g.L^{-1} de sacarose, $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de glutamina, $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ carvão ativado e M3: suplementado com $12,3 \mu\text{M}$ de 2iP, $0,6 \mu\text{M}$ de ANA, 30 g.L^{-1} de sacarose, $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de glutamina e $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ carvão ativado. Semissólido controle: calos embriogênicos que não passaram por meio líquido.

A fase de diferenciação de culturas embriogênicas consiste em interromper os ciclos repetitivos de divisão celular e fornecer os estímulos fisiológicos, bioquímicos e ambientais para a diferenciação celular, dando assim origem a um grande número de embriões somáticos aptos a se converterem em plantas (Guerra *et al.*, 1999). Segundo Xu e Bewley (1992), as auxinas são extremamente importantes na indução da calogênese e formação de células embriogênicas, e uma vez removidas ou reduzidas do meio de cultura, promovem as células embriogênicas à formação de embriões somáticos. Esse fato corrobora com os resultados obtidos nesse trabalho, uma vez que na média, os meios de cultura desprovidos de auxina, ou então, com as concentrações reduzidas promoveram a diferenciação de embriões somáticos.

Nesse trabalho, a passagem dos calos embriogênicos por meio de cultura líquido respondeu mais efetivamente na percentagem de calos com embriões somáticos diferenciados. Scherwinski-Pereira e Fortes (2003) e Scherwinski-Pereira *et al.* (2012) relatam que é no meio de cultura líquido que ocorre maior contato dos explantes com o mesmo, fato este que pode propiciar o aumento de absorção de água e nutrientes pelos explantes, quando comparado à meios de consistência semissólida. Adicionalmente, os meios líquidos também proporcionam melhor diluição de exsudatos oriundos do explante, evitando, desta forma, o acúmulo de compostos tóxicos aos explantes em cultivo (Ferreira *et al.*, 2001). No entanto, na maioria dos casos, é necessário que meios com essa consistência recebam algum tipo de agitação ou aeração para proporcionar condições ideais para a oxigenação dos explantes (Ziv, 1995; Levin *et al.*, 1997; Teixeira, 2002; Choi *et al.*, 2008). Em tamareira, Daguin e Letouze (1988) mostraram que a passagem de calos em meio de consistência líquida constituiu uma etapa importante na maturação de embriões somáticos.

Na Tabela 3 é possível observar o efeito da auxina e do tipo de meio de cultura de diferenciação sobre o número de embriões torpedos formado por calo e a frequência de regeneração dos embriões somáticos diferenciados. Na análise individual das variedades nos meios de cultura de diferenciação, verificou-se que em meio M1, que consistiu na passagem de calos por meio líquido na presença da auxina 2,4-D, a variedade C 2528 foi o que apresentou a maior quantidade de embriões somáticos (estádio torpedo) por calo (8,3). Já para as demais variedades estudadas não foram observadas diferenças estatísticas significativas quanto ao número de embriões somáticos (estádio torpedo) diferenciados nos diferentes meios de cultura testados, com exceção dos calos da variedade C 2501 cultivados em meio líquido com Picloram que em meio de diferenciação M3 não diferenciaram nenhum embrião somático.

Tabela 3. Influência da auxina e do tipo de meio de cultura de diferenciação sobre o número de embriões torpedos formado por calo e a frequência de regeneração dos embriões somáticos diferenciados (%), por um período de 12 meses.

Tratamento/meio de cultura	Auxina	Meio de diferenciação	Nº de embriões torpedo por calo				Média Auxina	Frequência de regeneração (%)				Média Auxina
			C 2501	C 2528	C 7201	Média		C 2501	C 2528	C 7201	Média	
Líquido	2,4-D	M1	2,6a	8,3a	1,2a	4,0a	2,9	8,9a	29,5ab	50,0a	29,5a	21,4
		M2	4,4a	1,6c	1,8a	2,6abc		4,5a	0,0c	4,3bc	2,9b	
		M3	2,5a	2,6bc	1,2a	2,1bc		5,3a	55,2a	34,5ab	31,7a	
Líquido	Picloram	M1	2,5a	2,0bc	2,4a	2,3abc	2,4	0,7a	0,0c	2,4c	1,0b	2,2
		M2	2,7a	3,7b	3,0a	3,1ab		0,5a	0,3c	0,6c	0,5b	
		M3	0,0b	2,5bc	2,7a	1,7c		0,0a	11,5bc	3,4bc	5,0b	
Significância ($p>f$)				***		***	N.D		**		***	

* Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical, diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.** Significativo ($p<5\%$).

*** Altamente significativo ($p<1\%$). N.D: Não determinado. M1: $\frac{1}{2}$ MS acrescido de 30 g.L⁻¹ de sacarose, 0,5 g.L⁻¹ de glutamina, 2,5 g.L⁻¹ carvão ativado; M2: MS suplementado com 40 µM de Picloram, 30 g.L⁻¹ de sacarose, 0,5 g.L⁻¹ de glutamina, 1,5 g.L⁻¹ carvão ativado e M3: suplementado com 12,3 µM de 2iP, 0,6 µM de ANA, 30 g.L⁻¹ de sacarose, 0,5 g.L⁻¹ de glutamina e 1,5 g.L⁻¹ carvão ativado.

Em um trabalho utilizando meios de cultura de diferenciação semelhantes ao utilizado nesse trabalho, Silva *et al.* (2012) observaram que variedades de dendê responderam mais eficientemente quanto ao número de embriões somáticos quando os meios de cultura de diferenciação foram constituídos de reguladores de crescimento em baixas concentrações

Um aspecto importante a ser ressaltado nesse trabalho foi a formação assincrônica de embriões somáticos, ou seja, a formação de embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento (globular e torpeda), e a ocorrência da embriogênese somática secundária (dados não apresentados), onde foi possível se observar a formação de novos embriões somáticos a partir de embriões somáticos já diferenciados. Tais ocorrências também já foram observadas em outros trabalhos com palmeiras (Ledo *et al.*, 2002; Steinmacher *et al.*, 2007; Scherwinski-Pereira *et al.*, 2010; Balzon *et al.*, 2013).

No presente trabalho, verificaram-se respostas diferenciadas quanto à frequência de regeneração dos embriões somáticos em meio desprovido de reguladores de crescimento. Embriões somáticos oriundos dos meios de diferenciação M1 e M3 foram o que apresentaram os melhores índices de regeneração (29,5% e 31,7%, respectivamente). Acrescente-se o fato que na regeneração dos embriões somáticos, a velocidade de respostas nesta fase foi heterogênea, uma vez que alguns tipos de embriões são mais rápidos do que outros para emitirem as primeiras folhas e desenvolverem-se em plantas completas. Muito possivelmente, esse fato esteja relacionado com a assincronia dos tipos de embriões somáticos diferenciados, como citado anteriormente e já observado em outros trabalhos com dendê (Konan *et al.*, 2010; Balzon *et al.*, 2013).

Os embriões somáticos germinaram em plantas com vigoroso desenvolvimento da parte aérea, embora a maioria delas desprovidas de raízes (Figura 5E-F). Assim como descrito por Gomes *et al.* (2011), nesse trabalho também foi necessário uma etapa suplementar para otimizar a formação de raízes nas plantas regeneradas para serem submetidas à aclimatização (Figura 5G-H). E uma vez enraizadas, as plantas aclimatizadas apresentaram percentagem de sobrevivência de 95,2% ao final de 90 dias (Figura 5I,J-K).

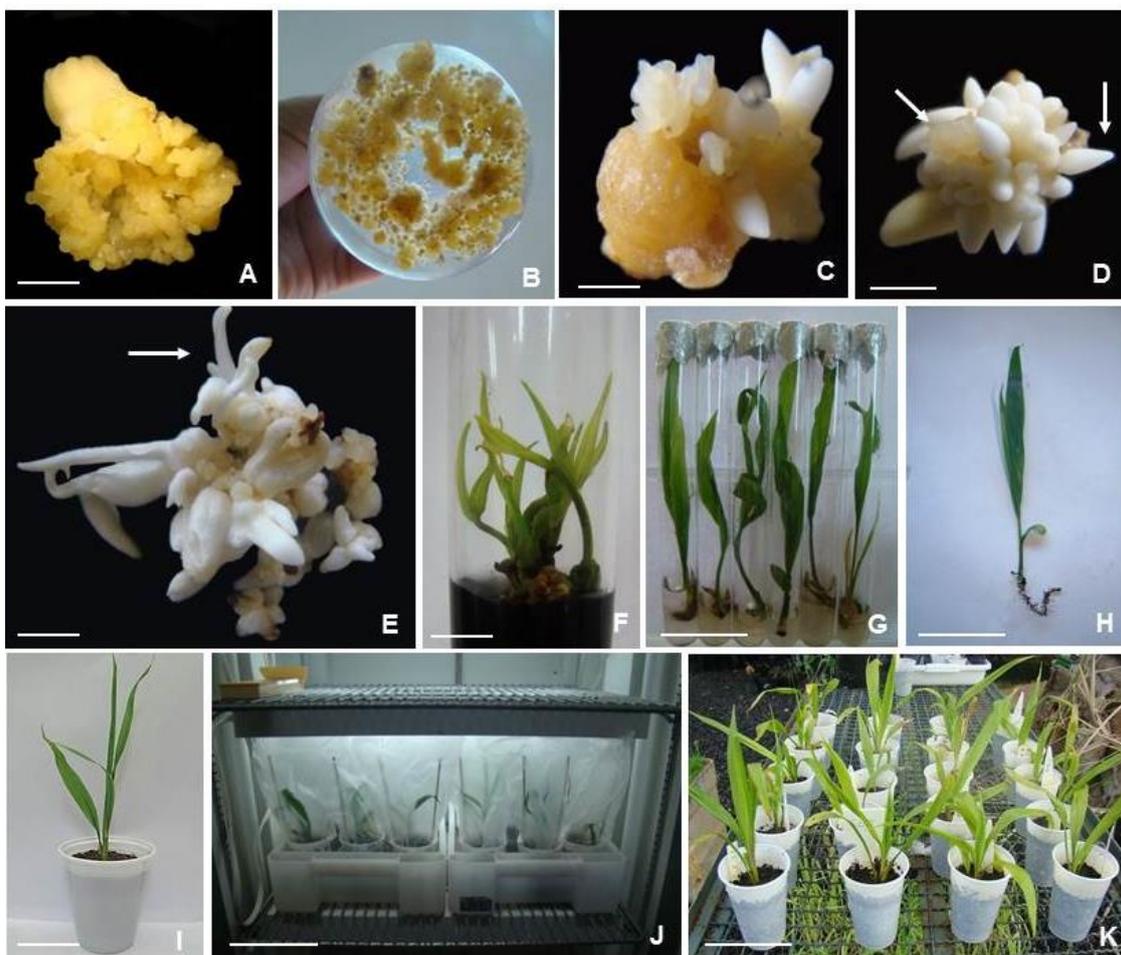


Figura 5. Passagem de calos embriogênicos em meio de cultura de consistência líquida: diferenciação, regeneração e aclimatização das plantas. A. Calo embriogênico (Barra: 5 mm). B. Aspectos dos cultivos em meio líquido sob agitação. C. Formação de embriões somáticos diferenciados (Barra: 5 mm). D. Calo com embriões somáticos em estágio globular e torpedo (setas) (Barra: 5 mm). E. Calos com embriões somáticos em regeneração (seta) (Barra: 5 mm). F. Plantas regeneradas (Barra: 5 cm). G. Plantas regeneradas desprovidas de raízes (Barra: 5 cm). H. Plantas regeneradas com raízes (Barra: 5 cm). I. Planta regenerada em copo descartável, preenchido com Bioplant® e areia lavada (Barra: 5 cm). J. Plantas regeneradas em BOD (Barra: 5 cm). K. Plantas em casa de vegetação (Barra: 5 cm).

3.3. Análise dos regenerantes por citometria de fluxo

Em *Elaeis guineensis* o tamanho do genoma estimado por citometria de fluxo reconhecido na literatura internacional é de $2C = 3,76$ pg (Rival *et al.*, 1997). Neste estudo, os histogramas obtidos de *Elaeis guineensis* Jacq., pelas análises de citometria de fluxo do controle (plantas germinadas de embriões zigóticos *in vitro*) e dos clones regenerados de embriões somáticos de calos

que passaram por meio de cultura de consistência líquida, geraram picos de núcleos correspondentes a fase G1 da interfase. O primeiro pico refere-se à quantidade relativa de DNA nuclear das amostras de *E. guineensis* e o segundo ao padrão externo de referência, no caso, a ervilha (*Pisum sativum*) (Figura 6). De maneira geral, os picos afilados exibidos nos histogramas indicam boa qualidade e confiabilidade dos resultados obtidos nesta análise.

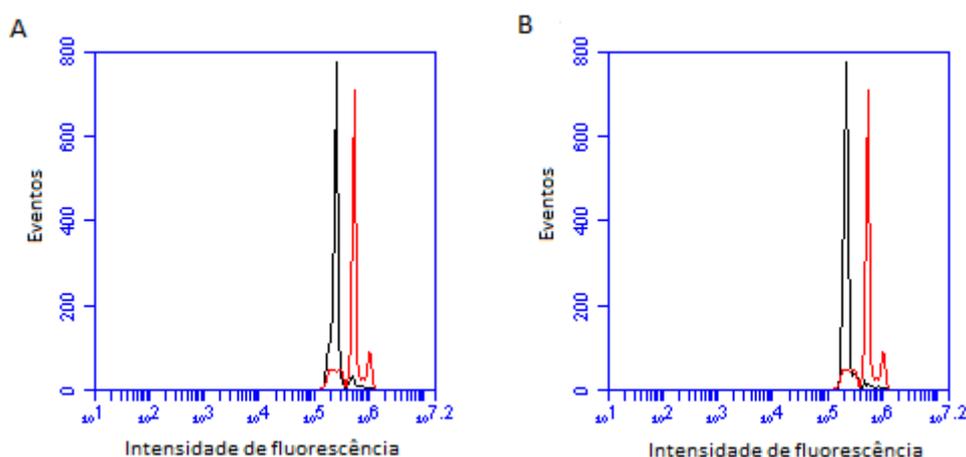


Figura 6. Histogramas obtidos pela análise de citometria de fluxo em plantas de dendezeiro regeneradas por embriogênese somática, variedade C 2528. O pico à esquerda de cada histograma corresponde ao G1 das amostras do controle (A) e dos clones regenerados (B) e os picos à direita ao padrão externo de referência, a ervilha (*Pisum sativum*).

Os coeficientes de variação (CV) encontrados para os picos variaram entre 4,2 e 4,6% para o controle e os clones, respectivamente (Tabela 4), e de 4,1 a 5,0% para os clones regenerados (Tabela 5). De acordo com Dolezel e Bartos (2005), valores de CV inferiores a 5% são considerados adequados para análises citométricas.

A partir das análises dos histogramas, evidenciou-se que o conteúdo médio de DNA nuclear de *E. guineensis*, variedade C 2528 é equivalente a $2C = 3,98 \pm 0,22$ pg para o controle (embriões zigóticos germinados *in vitro*), e de $2C = 3,80 \pm 0,11$ pg para clones regenerados, após a passagem em meio de cultura de consistência líquida, não sendo observadas diferenças estatísticas entre as plantas (Tabela 4). As estimativas obtidas do tamanho do genoma são muito próximas as atualmente disponíveis na bibliografia científica. Rival *et al.*

(1997) reportaram um valor de 2C de $3,76 \pm 0,09$ pg para plantas mantidas *in vitro* de *Elaeis guineensis*, utilizando *Petunia hybrida* como padrão de referência. Srisawat *et al.* (2005) em estudos para determinar o tamanho do genoma em *E. guineensis* tipos *dura*, *pisifera* e *tenera*, reportaram valores de 2C de $3,46 \pm 0,02$; $3,24 \pm 0,01$ e $3,76 \pm 0,02$ pg, respectivamente, utilizando como padrão de referência a soja (*Glycine max* cv. Polanka; 2C de 2,5 pg). Madon *et al.* (2008) estimaram o valor de 2C de $4,10 \pm 0,02$; $3,64 \pm 0,28$ e $3,83 \pm 0,31$ pg para os tipos *dura*, *pisifera* e *tenera*, respectivamente, utilizando também a soja como padrão externo. As pequenas discrepâncias com relação ao conteúdo de DNA de óleo de palma podem ser devido às diferenças entre as técnicas e tipos de padrão de referência utilizados.

Tabela 4. Conteúdo médio de DNA nuclear (pg) estimado em *Elaeis guineensis* Jacq., variedade C 2528, a partir de clones regenerados e plantas germinadas de embriões zigóticos *in vitro*.

Plantas	Média do pico	Conteúdo de DNA (pg/2C)	Genoma 1C (Mpb)	CV(%)
Controle	$247,26 \pm 14,57^X$	$3,98 \pm 0,22 a^Y$	$1946,22^Z$	$4,22^V$
Clones	$2,35 \pm 7,41$	$3,80 \pm 0,11 a$	1858,2	4,65

^X Média do pico G0/G1 de *Elaeis guineensis* em relação ao padrão de referência externo *Pisum sativum* acrescido do desvio padrão médio; ^Y Médias seguidas por mesma letra, pertencem ao mesmo grupo, pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade; ^Z Média do tamanho do genoma 1C, onde 1 pg DNA = 978 Mpb (Dolezel *et al.*, 2003); ^V Média do coeficiente de variação do pico G0/G1

Na Tabela 5 é possível observar que o conteúdo médio de DNA nuclear de *E. guineensis*, variedade C 2528, para os clones dentro de cada calo e os clones entre os calos não apresentaram diferenças significativas. Esses resultados são importantes uma vez que geram confiabilidade nas estimativas de conteúdo de DNA nuclear obtidos, concluindo-se que não existe instabilidade genômica nas plantas obtidas a partir da embriogênese somática de agregados celulares que passaram por meio de cultura de consistência líquida.

Tabela 5. Conteúdo médio de DNA nuclear (pg) estimado de clones regenerados de *Elaeis guineensis* Jacq., variedade C 2528, obtidas de embriões somáticos de calos que passaram por meio de cultura de consistência líquida.

Calo	Plantas	Média do pico	Conteúdo de DNA (pg/2C)	Genoma 1C (Mpb)	CV(%)
1	Clone 1	228,85 ± 12,67 ^x	3,74 ± 0,19 a ^y	1828,86 ^z	4,12 ^v
	Clone 2	237,22 ± 2,78	3,83 ± 0,03 a	1872,87	4,75
	Clone 3	238,53 ± 4,48	3,83 ± 0,05 a	1872,87	4,73
	Clone 4	223,08 ± 4,96	3,63 ± 0,09 a	1775,07	4,76
2	Clone 5	228,65 ± 4,81	3,71 ± 0,82 a	1814,19	4,56
	Clone 6	235,08 ± 6,77	3,80 ± 0,09 a	1858,2	4,08
	Clone 7	233,61 ± 3,83	3,79 ± 0,06 a	1853,31	4,46
3	Clone 8	239,05 ± 2,08	3,88 ± 0,02 a	1897,32	4,85
	Clone 9	237,37 ± 5,65	3,85 ± 0,09 a	1882,65	4,90
	Clone 10	250,82 ± 7,65	3,97 ± 0,07 a	1941,33	5,00

^x Média do pico G0/G1 de *Elaeis guineensis* Jacq. em relação ao padrão de referência externo *Pisum sativum* acrescido do desvio padrão médio; ^y Médias seguidas por mesma letra, pertencem ao mesmo grupo, pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade; ^z Média do tamanho do genoma 1C, onde 1 pg DNA = 978 Mpb (Dolezel *et al.*, 2003); ^v Média do coeficiente de variação do pico G0/G1

4. Conclusões

- A condição de subcultivar explantes formados por embriões zigóticos a cada 30 dias para um meio de cultura fresco, é determinante para melhorar a taxa de formação de calos embriogênicos em dendezeiro;
- A passagem de calos embriogênicos de dendezeiro por meio de cultura líquido na presença de 2,4-D promove a diferenciação de embriões somáticos;
- Após passagem de calos por meios líquidos, meios de cultura na fase de diferenciação devem ser desprovidos ou com baixas concentrações de regulador de crescimento para melhorar a diferenciação de embriões somáticos em dendezeiro;
- Embriões somáticos de dendezeiros, oriundos de cultivos em meio líquido e de meios de diferenciação desprovidos ou com baixas concentrações de regulador de crescimento, apresentam melhores índices de regeneração;
- O conteúdo médio de DNA nuclear entre as plantas regeneradas por embriogênese somática em meios líquidos e plantas controle não apresentam diferenças significativas, valores na ordem de $2C = 3,89 \pm 0,16$ pg.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

CHIA, G. S.; LOPES, R.; CUNHA, R. N. V.; ROCHA, R. N. C.; LOPES, M. T. G. Repetibilidade da produção de cachos de híbridos interespecíficos entre caiaué e dendezeiro. *Acta Amazonica*, v. 39, p. 249-254, 2009.

CHOI, D; ANDRADE, M. H. C.; WILLIS, L. B.; CHO, C.; SCHOENHEIT, J.; BOCCAZZI, P.; SAMBANTHAMURTHI, R. SINSKEY, A. J.; RHA, C. Effect of agitation and aeration on yield optimization of oil palm suspension culture. *Journal of Oil Palm Research Special Issue on Malaysia-MIT Biotechnology Partnership Programme*, v. 1, p. 23-34, 2008.

DAGUIN, F.; LETOUZE, R. Régénération du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) par embryogenèse somatique: amélioration de l'efficacité par passage en milieu liquide agité, *Fruits*, v. 43, n. 3, p. 191-194, 1998.

DOLEZEL, J.; BARTOS, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany*, v. 95, p. 99–110, 2005.

DUVAL, Y.; ENGELMANN, F.; DURAND-GASSELIN, T. Somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). In: Bajaj YPS (Ed.) Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I, *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, v. 30, p. 335–352, 1995.

EEUWENS C.J.; LORD, S.; DONOUGH, C.R.; RAO, V.; VALLEJO, G.; NELSON, S. Effects of tissue culture conditions during embryoid multiplication on the incidence of “mantled” flowering in clonally propagated oil palm. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 70, n. 3, p. 311- 323, 2002.

GOMES, H. T.; BARTOS, P. M. C.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. Otimização do enraizamento de plantas de dendzeiro (*Elaeis guineensis*) produzidas por embriogênese somática. In: V Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, Joinville. *Anais*. Lavras: SBCTP, v. 1, p. 39-39, 2011.

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

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; (Eds.). *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Brasília: EMBRAPA, v. 2, p. 533-568, 1999.

JONES, L. H.; HANKE, D. E.; EEWENS, C. J. An evaluation of the role of cytokinins in the development of abnormal inflorescences in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) regenerated from tissue culture. *Plant Growth Regul*, v. 14, p.135-142, 1995.

KOMANINE, A.; KAWAHARA R.; MATSUMOTO, S.; SUNABORI, S.; TOYA, T.; FUJIWARA, A.; TSUKAHARA, M.; SMITH, J.; ITO, M.; FUKUDA, H.; NOMURA, K.; FUJIMURA, T. Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures: physiology, biochemistry and molecular biology. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, v. 28, p. 11-14, 1992.

KONAN, K. E.; DURANT-GASSELIN, T.; KOUADIO, Y. J.; FLORI, A.; RIVAL, A.; DUVAL, Y.; PANNETIER, C. *In vitro* conservation of oil palm somatic embryo for 20 years on a hormone-free culture medium: characteristics of the embryogenic cultures, derived plantlets and adult palms. *Plant Cell Reports*, v. 29, n. 1, p. 1-13, 2010.

LEDO, A. S.; LAMEIRA, O. A.; BENBADIS, A. K.; MENEZES, I. C.; OLIVEIRA, M. S. P.; FILHO, S. M. Somatic embryogenesis from zygotic embryos of *Euterpe oleracea* Mart. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 24, n. 3, p. 601-603, 2002.

LEVIN, R.; ALPER, Y.; STAV, R.; WATAD, A. Methods and apparatus for liquid media and semiautomated micropropagation. *Acta Horticulturae*, v. 447, p. 659-663, 1997.

LOW, E. L.; ALIAS, H.; BOON, S.; SHARIFF, E. M.; TAN, C. A.; OOI, L. C. L.; CHEAH, S. RAHA, A.; WAN, K.; SINGH, R. Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) tissue culture ESTs: Identifying genes associated with callogenesis and embryogenesis. *BMC Plant Biology*, v. 8, n. 62, p. 1-19, 2008.

MADON, M.; PHOON, L. Q.; CLYDE, M. M.; MOHD DIN, A. Application of flow cytometry for estimation of nuclear DNA content in *Elaeis*. *Journal of Oil Palm Research*, v. 20, p. 447-452, 2008.

MARIE, D.; BROWN, S. C. A cytometric exercise in plant DNA histograms with 2C values for 70 species. *Biology of the Cell*, v. 78, n. 1-2, p. 41-51, 1993.

MOURA, E. F.; MOTOIKE, S. Y.; VENTRELLA, M. C.; SÁ JÚNIOR, A. Q.; FERREIRA, M. C.; CARVALHO, M. Somatic embryogenesis in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from zygotic embryos. *Scientia Horticulturae*, v. 119, p. 447-454, 2009.

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

NAMASIVAYAM, P. Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 90, p. 1-8, 2007.

PALANYANDY, S. R.; SURANTHRAN P.; GANTAIT, S.; SINNIH, U. R.; SUBRAMANIAM, S.; AZIZ, M. A.; ALWEE, S. S. R. S.; ROOWI, S. H. *In vitro* developmental study of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) polyembryoids from cell suspension using scanning electron microscopy, *Acta Physiol Plant*, v. 35, p.1727–1733, 2013.

PEREZ-NÚÑEZ, M. T.; CHAN, J. L.; SAENZ, L.; GONZALEZ, T.; VERDEIL, J. L.; OROPEZA, C. Improved somatic embryogenesis from *Cocos nucifera* (L.) plumule explants. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, v. 42, p. 37-43, 2006.

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

RIVAL, A., BEULE, T., BARRE, P., HAMON, S., DUVAL, Y. e NOIROT, M. Comparative flow cytometry estimation of nuclear DNA content in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq) tissue cultures and seed-derived plants. *Plant Cell Reports*, v. 16, p. 884-887, 1997.

SÁENZ, L.; AZPEITIA, A.; CHUC-ARMENDARIZ, B.; CHAN, J. L.; VERDEIL J. L.; HOCHER, V.; OROPEZA, C. Morphological and histological changes during somatic embryo formation from coconut plumule explants. *In Vitro Cellular Developmental Biology—Plant*, v. 42, p. 19–25, 2006.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; FORTES, G. R. L. Protocolo para produção de material propagativo de batata em meio líquido. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília/DF, v. 38, n. 9, p. 1035-1043, 2003.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E; GUEDES, R. S.; SILVA T. L.; FERMINO, J. R. P. C. P; COSTA, F. H. S. Somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm using thin cell layer technique. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, v. 46, n. 4, p. 378-385, 2010.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; ARARUNA, E. C.; SILVA, T. L.; MESQUITA, A. G. G.; MACIEL, S. A.; COSTA, F. H. S. Double-phase culture system for large scale production of pineapple. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 109, p. 263-269, 2012.

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

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

SOH, A. C.; WONG, G.; TAN, C. C.; CHEW, P. S.; CHONG, S. P.; HO, Y. W.; WONG, C. K.; CHOO, C. N.; NOR AZURA, H.; KUMAR, K. Commercial-scale propagation and planting of elite oil palm clones: research and development towards realization. *Journal of Oil Palm Research*, v. 23, p.935-952, 2011.

SRISAWAT, T.; KANCHANAPOOM, K.; PATTANAPANYASAT, K.; SRIKUL, S.; CHUTHAMMATHAT, W. Flow cytometric analysis of oil palm: A preliminary analysis for cultivars and genomic DNA alteration. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, v. 27, n. 3, p. 645-652, 2005.

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

STEINMACHER, D. A.; GUERRA, M. P., SAARE-SURMINSKI, K.; LIEBEREI, R. A temporary immersion system improves *in vitro* regeneration of peach palm through secondary somatic embryogenesis. *Annals of Botany*, v. 108, p. 1463–1475, 2011.

TARMIZI, A. H.; ZAITON, R. Development of the MPOB fast transfer technique (MoFaTT) system for maintenance and maturation of oil palm culture aggregates. *Journal of Oil Palm Research*, v. 19, p. 435-439, 2007.

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

TEIXEIRA, J.B. Biorreatores. *Biotecnologia – Ciência e Desenvolvimento*. Ano 4, n. 24, p. 36-41, 2002.

TITON, M.; XAVIER, A.; OTONI, W. C.; MOTOIKE, S. Y. Efeito dos reguladores de crescimento dicamba e picloram na embriogênese somática em *Eucalyptus grandis*. *Revista Árvore*, v. 13, 2007.

XU, N.; BEWLEY, J. D. Contracting pattern of somatic and zygotic embryo development in alfafa (*Medicago sativa* L.) as revealed by scanning electron microscopy. *Plant Cell Reports*, v. 11, p. 279-284, 1992.

ZIV, M. The control of bioreactor environment for plant propagation in liquid culture. *Acta Horticulturae*, Wageningen, v. 393, p. 25-38, 1995.

ZONTA, E. P. e MACHADO, A. A. *SANEST - Sistema de Análise Estatística para Microcomputadores*. Registrado na Secretaria Especial de Informática sob nº 066060 - categoria A. Pelotas, RS: Universidade Federal de Pelotas, 1984.

CAPÍTULO II

**DIFERENCIAÇÃO E REGENERAÇÃO DE PLANTAS DE DENZEIRO
(*Elaeis guineensis* Jacq.) POR EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA A PARTIR DE
AGREGADOS CELULARES: INFLUÊNCIA DE CONDIÇÕES DE CULTIVO E
DO TAMANHO DE PROPÁGULOS**

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência das condições de cultivo e dos tamanhos dos propágulos sobre a diferenciação e regeneração de plantas de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) por embriogênese somática a partir de agregados celulares estabelecidos em meio de cultura de consistência líquida. Num primeiro experimento, calos multigranulares embriogênicos obtidos de embriões zigóticos maduros de dendezeiro foram utilizados para o estabelecimento e multiplicação de agregados celulares em meio líquido. A indução da embriogênese somática foi realizada em meio de cultura de MS, suplementado com 450 μM de Picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico), 30 g.L^{-1} de sacarose, 0,5 g.L^{-1} de glutamina, 2,5 g.L^{-1} de carvão ativado e solidificado com 2,5 g.L^{-1} de Phytigel. Os explantes foram mantidos por 150 dias, sob condições de escuro e subcultivados a cada 30 dias, até a obtenção das linhagens embriogênicas. O estabelecimento e multiplicação de agregados celulares foi realizado por até 210 dias em meio líquido de multiplicação MeB (MS suplementado com 5 μM de 2,4-D - ácido 2,4-diclorofenoxiacético, 30 g.L^{-1} de sacarose, 0,5 g.L^{-1} de glutamina e 0,2 g.L^{-1} de ácido ascórbico). Para diferenciação, os agregados foram transferidos para meio de cultura líquido de MS, com 0,1 mg.L^{-1} de 2,4-D e 30 g.L^{-1} de sacarose, onde permaneceram por 0, 30 e 60 dias. Após os respectivos tempos em meio líquido de diferenciação, os agregados foram plaqueados em meio semissólido para diferenciação de embriões somáticos, com a mesma constituição do meio anterior, sendo acondicionados em sala de crescimento, na ausência e presença de luz por 90 dias, quando então foram transferidos para condições de luminosidade. Para avaliar a influência do tamanho dos agregados na formação de embriões somáticos e regeneração de plantas durante o plaqueamento, os agregados diferenciados em meio líquido foram divididos em duas classes quanto ao tamanho: classe 1 (com diâmetro 2 mm) e classe 2 (com diâmetro de 4 mm). Após até 120 dias em meio semissólido, embriões somáticos diferenciados foram transferidos para meio de regeneração, constituído pelo meio de MS suplementado com 30 g.L^{-1} de sacarose, 2,5 g.L^{-1} de carvão ativado e 2,5 g.L^{-1} de Phytigel, para completar o desenvolvimento. Análises anatômicas foram

realizadas para descrever as etapas envolvidas na diferenciação dos agregados celulares. De maneira geral, verificou-se que ambos os tipos de classes de propágulos apresentaram taxas de progressão acima de 90% na formação de calos embriogênicos quando plaqueados em meio de consistência semissólida. Contudo, independentemente do tempo de diferenciação e da condição de cultivo, na média, agregados da classe 2 foram os que apresentaram as maiores percentagens de formação e progressão de calos embriogênicos (98,8%) quanto comparados àqueles da classe 1 (94,4%). Na média, não foram observadas diferenças significativas quanto a taxa de formação de calos com embriões somáticos diferenciados (18,8% e 13,1%) entre as classes de agregados. No entanto, quando se avalia agregados da classe 1, após 30 dias de diferenciação em suspensão, verificou-se que cerca de 33,3% dos calos apresentarem diferenciação de embriões somáticos, com a maior quantidade de embriões somáticos diferenciados no estágio torpedo por calo (8,3). Os calos com embriões somáticos diferenciados foram transferidos para meio de consistência semissólida desprovido de reguladores de crescimento e com carvão ativado que, após germinados, foram individualizadas e transferidas para novo meio de cultura com a mesma consistência para completar o desenvolvimento, antes de serem aclimatizados.

Palavras-chave: *Elaeis guineensis*, embriogênese somática, meio líquido, agregados celulares, anatomia.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the influence of culture conditions and propagule size on the differentiation and plant regeneration of the African oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) by somatic embryogenesis based on cell aggregates established in a liquid culture medium. In the first experiment, multigranular embryogenic calluses obtained from mature zygotic embryos of African oil palm were used for establishment and multiplication of cell aggregates in a liquid medium. The induction of somatic embryogenesis was carried out in an MS culture medium supplemented with 450 μM Picloram (4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid), 30 g.L^{-1} sucrose, 0.5 g.L^{-1} glutamine, 2.5 g.L^{-1} activated charcoal and solidified with 2.5 g.L^{-1} Phytigel. The explants were maintained for 150 days under conditions of darkness and subcultured every 30 days until the obtainment of embryogenic lineages. The establishment and multiplication of cell aggregates was carried out for up to 210 days in an MeB liquid multiplication medium (MS supplemented with 5 μM 2,4-D - 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 30 g.L^{-1} sucrose, 0.5 g.L^{-1} glutamine and 0.2 g.L^{-1} ascorbic acid). For differentiation, the aggregates were transferred to an MS liquid culture medium with 0.1 mg.L^{-1} 2,4-D and 30 g.L^{-1} sucrose, where they remained for 0, 30 and 60 days. After the respective periods in the liquid differentiation medium, the aggregates were plated in a semi-solid medium for differentiation of somatic embryos, with the same constitution of the previous medium, being placed in a growth chamber in the absence and presence of light for 90 days, at which time they were transferred to lighting conditions. To assess the influence of the aggregate size on the formation of somatic embryos and regeneration of plants during plating, the aggregates differentiated in liquid medium were divided into two classes according to size: Class 1 (diameter of 2 mm) and Class 2 (diameter of 4 mm). After 120 days in a semi-solid medium, differentiated somatic embryos were transferred to regeneration medium consisting of the MS medium supplemented with 30 g.L^{-1} sucrose, 2.5 g.L^{-1} activated charcoal and 2.5 g.L^{-1} Phytigel to complete the development. Anatomical analyses were conducted to describe the steps involved in the differentiation of the cell aggregates. In general, it was found that both classes

of propagules showed progression rates above 90% in the formation of embryogenic calluses when plated in a semi-solid medium. However, regardless of the time of differentiation and culture condition, on average, the aggregates in Class 2 were the ones with the highest percentages of formation and progression of calluses (98.8%) as compared to those in Class 1 (94.4%). On average, no significant differences were observed in the rate of callus formation with differentiated somatic embryos (18.8% and 13.1%) between the classes of aggregates. However, when evaluating the aggregates of class 1, after 30 days of differentiation in suspension, it was found that roughly 33.3% of the calluses presented differentiation of somatic embryos, with the highest number of differentiated somatic embryos in the torpedo stage per callus (8.3). The calluses with differentiated somatic embryos were transferred to a semi-solid medium devoid of growth regulators and with activated charcoal that – after germinated – were individualized and transferred to new culture medium with the same consistency to complete the development, before being acclimatized.

Keywords: *Elaeis guineensis*, somatic embryogenesis, liquid medium, cell aggregates, anatomy.

1. INTRODUÇÃO

O dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) é uma monocotiledônea oleaginosa que tem se destacado economicamente devido a crescente demanda por parte da indústria alimentícia e farmacêutica por óleos vegetais, e pela sua capacidade de produção de combustíveis como fonte de energia alternativa e renovável (Ghassan *et al.*, 2003). O cultivo do dendezeiro é feito em regiões tropicais, como a Ásia, África, América Central e do Sul, constituindo-se como uma das principais fontes de óleo vegetal do mundo, com rendimento entre 5 a 7 toneladas por hectare/ano sob condições favoráveis de desenvolvimento (Rajesh *et al.*, 2003; Deore e Johnson, 2008).

A propagação do dendezeiro ocorre quase que exclusivamente pela via sexuada (sementes) e, mesmo quando se utilizam híbridos selecionados, as plantas podem apresentar variabilidade, constituindo-se num dos principais fatores da baixa produtividade em plantios comerciais. E devido à dificuldade de usar a propagação via sementes, seja para a produção de mudas ou auxiliar programas de melhoramento para fixar ganhos genéticos, a cultura de tecidos surge como uma excelente alternativa para a multiplicação desta espécie (Konan *et al.*, 2006; Tarmizi e Zaiton, 2007; Konan *et al.*, 2010; Balzon *et al.*, 2013).

Apesar dos trabalhos com dendezeiro já terem sido realizados com relativo sucesso utilizando-se a cultura de tecidos (Teixeira *et al.*, 1993; Teixeira *et al.*, 1994; Kanchanapoom e Chourykaew, 1998; Scherwinski-Pereira *et al.*, 2010; Konan *et al.*, 2010; Balzon *et al.*, 2013), observa-se uma demasiada demora no processo de obtenção de plantas pelos processos convencionais de clonagem quando se utiliza meios de consistência semissólida, além da falta de padronização e controle das diferentes etapas envolvidas no processo (Duval *et al.*, 1995).

A cultura de células e/ou agregados em suspensão é uma das técnicas da cultura de tecidos que consiste na obtenção, proliferação e manutenção de células e/ou agregados em meio de cultura líquido, sob condições de agitação, aeração e temperatura controladas. A vantagem do cultivo em meio líquido é a

alta taxa de multiplicação, permitindo assim, a produção de material em escala comercial, sendo este considerado uma solução para a automação e redução dos custos de produção (Touchet *et al.*, 1991; Teixeira *et al.*, 1995; Kanchanapoom e Chourykaew, 1998; Roowi *et al.*, 2010; Palanyandy *et al.*, 2013).

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência das condições de cultivo e dos tamanhos dos propágulos sobre a diferenciação e regeneração de plantas de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) por embriogênese somática, a partir de agregados celulares estabelecidos em meio de cultura de consistência líquida.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção de calos embriogênicos

Para o estabelecimento e multiplicação de agregados celulares em meio líquido foram utilizados calos multigranulares embriogênicos obtidos de embriões zigóticos maduros de dendezeiro variedade C 2528, seguindo a metodologia ajustada por Balzon *et al.* (2013).

A indução da embriogênese somática foi realizada com a inoculação de embriões zigóticos em placas de Petri (15 x 90 mm) contendo meio de cultura composto pelos sais e vitaminas de MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com 450 μM de Picloram, 30 g.L^{-1} de sacarose, 0,5 g.L^{-1} de glutamina, 2,5 g.L^{-1} de carvão ativado e solidificado com 2,5 g.L^{-1} de Phytigel. Sob condições de escuro, os explantes foram mantidos por 150 dias, sendo subcultivados a cada 30 dias para a obtenção de calos embriogênicos, de onde se obteve o material para as etapas posteriores.

2.2. Estabelecimento de cultivos de agregados em suspensão

Uma vez obtidos os calos, setores com porções embriogênicas foram individualizados por raspagem, com o auxílio de uma espátula e transferidos para meio de cultura de consistência líquida para o estabelecimento e multiplicação de agregados celulares. O meio de cultura utilizado nesta fase foi denominado de MeB, constituído de sais e vitaminas de MS, suplementado com 5 μM de 2,4-D, 30 g.L^{-1} de sacarose, 0,5 g.L^{-1} de glutamina e 0,2 g.L^{-1} de ácido ascórbico. O pH foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$ antes da esterilização em autoclave à 121°C e 1,5 atm por 20 minutos.

O meio de cultura foi depositado em frascos erlenmeyers de 125 mL de capacidade com 30 mL de meio, sendo os mesmos acondicionados em agitador orbital (100 rpm), em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 horas e radiação luminosa de 30 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas-fria. O meio de cultura foi renovado a cada

duas semanas por um período de 210 dias até a obtenção de agregados celulares.

2.3. Diferenciação de embriões somáticos de diferentes classes de agregados celulares

Após 210 dias do estabelecimento de porções embriogênicas em meio líquido MeB foram separadas duas classes de agregados celulares quanto ao tamanho: classe 1 e classe 2. Os agregados classe 1 foram caracterizados basicamente por possuírem tamanho médio na ordem de 2 mm de diâmetro. Já os agregados classe 2 foram caracterizados por apresentarem agregados embriogênicos com tamanho médio de 4 mm de diâmetro. Uma vez classificados, os tipos de agregados foram transferidos separadamente para um novo meio de cultura líquido para início de diferenciação de embriões somáticos. Assim como na etapa anterior, o meio de cultura de diferenciação foi o de MS, suplementado de 30 g.L⁻¹ de sacarose, mas com a concentração de 2,4-D reduzida para 0,1 mg.L⁻¹. No meio de cultura de diferenciação líquido, ambas as classes de agregados foram mantidos por períodos de 0, 30 e 60 dias, quando então foram plaqueados em meio de cultura de consistência semissólida, com a mesma constituição do meio de cultura líquido, mas adicionado de 2,5 g.L⁻¹ de Phytigel como solidificante. O pH dos meios de cultura foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$ antes da esterilização em autoclave à 121°C e 1,5 atm de pressão por 20 minutos.

Depois de plaqueado, o material vegetal foi acondicionado em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, na ausência e presença de luz. Após 90 dias de cultivo os agregados celulares mantidos no escuro, foram transferidos para condições de luminosidade em fotoperíodo de 16 horas e radiação luminosa de 30 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas-fria. Nestas condições, os propágulos, devidamente identificados quanto a classe de tamanho, foram mantidos por até 120 dias até a diferenciação de embriões somáticos e desenvolvimento destes até a fase de torpedo. As avaliações foram realizadas mensalmente e as variáveis

analisadas foram: percentagem de formação de calos, percentagem de calos com embriões somáticos diferenciados e número de embriões somáticos no estádio torpedado por calo.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade, com auxílio do programa de análises estatísticas Sisvar (Ferreira, 2011). Dados expressos em percentagem foram previamente transformados segundo arco-seno $(x/100)^{0,5}$.

2.4. Regeneração das plantas oriundas de agregados celulares

Para a regeneração e desenvolvimento de plantas, calos com embriões somáticos diferenciados foram transferidos para meio de cultura de consistência semissólida de MS suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose, 2,5 g.L⁻¹ de carvão ativado e 2,5 g.L⁻¹ do solidificante Phytigel. O pH do meio de cultura foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$ antes da esterilização em autoclave à 121°C e 1,5 atm por 20 minutos.

O material vegetal foi acondicionado em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e radiação luminosa de 30 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas-fria. Nessa fase, pelo menos 14 calos contendo embriões somáticos diferenciados foram avaliados por tratamento por um período de até 90 dias. Após a germinação dos embriões somáticos, as plantas com aproximadamente 5 cm de altura foram isoladas e transferidas para novo meio de cultura semissólido, com a mesma constituição, para promover o desenvolvimento destas.

Uma vez enraizadas, as plantas foram retiradas dos tubos de ensaio e submetidas à lavagem de suas raízes em água corrente para eliminar o excesso de meio de cultura. Em seguida, foram plantadas em copos descartáveis (250 mL de capacidade), preenchidos com Bioplant[®] e areia lavada (3:1 v/v), e posteriormente, sendo cobertos com saco plástico transparente furado. As plantas foram colocadas sob condições de BOD, a uma

temperatura de 25°C, durante duas semanas. Por fim, as plantas foram mantidas sob condições de casa de vegetação.

2.5. Análises anatômicas

Agregados celulares caracterizados como classe 1 e classe 2, apresentando diâmetros médios de 2 mm e 4 mm, respectivamente, foram coletados após 0, 30 e 60 dias de cultivos em meio de diferenciação líquido MS suplementado com 0,1 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 30 g.L⁻¹ de sacarose. O material vegetal foi imerso em solução fixadora FAA 70 (Formaldeído, ácido acético e etanol 70%, em razão de 1:1:18 v/v) (Johansen, 1940), sob vácuo por 24h. Subsequentemente, as amostras foram desidratadas em série alcoólica crescente (70-100%) sob vácuo por 1 hora cada série. A pré-infiltração foi realizada em etanol 100% mais resina líquida na proporção de 1:1, sob vácuo de 6 horas e, posteriormente em resina pura (vácuo por 3 e 6 horas); a infiltração foi realizada em Meio A, que consistiu na mistura de resina líquida e pó ativador (vácuo por 2 a 3 horas), sendo que a polimerização ocorreu em Meio B, que consistiu da mistura do Meio A e Hardener. A inclusão em historresina (Leica®) foi de acordo com as recomendações do fabricante.

Cortes seriados transversais (5 µm de espessura) foram obtidos em micrótomo rotativo manual (Leica modelo RM 2125RT), distendidos e aderidos às lâminas microscópicas em placa aquecida a 40°C. Posteriormente os cortes foram corados com azul de Toluidina (O' Brien *et al.*, 1965), seguido da montagem entre lâmina-lamínula com Entellan. As fotografias foram obtidas em microscópio Leica (DM 500) com câmera fotográfica digital Leica (ICC50), e programa Leica Application Suite EZ.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Diferenciação, regeneração e aclimatização das plantas oriundas de agregados celulares

Na Tabela 1 é possível observar a influência do tempo de cultivo em meio líquido de diferenciação e da condição de cultivo (presença e ausência de luz) sobre a percentagem de formação e progressão de calos, percentagem de calos com embriões somáticos diferenciados e número de embriões torpedos por calo formados nas diferentes classes de agregados celulares estudados, após terem sido plaqueados em meio semissólido de diferenciação. De maneira geral, verificou-se que ambos os tipos de classes de propágulos apresentaram taxas de formação e progressão de calos embriogênicos acima de 90% quando plaqueados em meio de consistência semissólida. Contudo, independentemente do tempo de diferenciação e da condição de cultivo, na média, agregados da classe 2 foram os que apresentaram as maiores percentagens de formação e progressão de calos embriogênicos (98,8%) quanto comparados àqueles da classe 1 (94,4%).

Quanto à diferenciação de embriões somáticos, na média, não foram observadas diferenças significativas entre as classes 1 e 2 de propágulos (18,8% e 13,1%, respectivamente). Monteiro *et al.* (2011) em seu estudo a partir de suspensão celular de bananeira analisaram o efeito do tamanho dos propágulos diferenciados em meio de cultura de consistência líquida (aproximadamente 2,5; 5 e 10 mm em diâmetro) na formação de embriões somáticos diferenciados e na regeneração de plantas. Estes autores observaram que propágulos celulares superiores a 5 mm de diâmetro permitem maior regeneração e diferenciação de embriões somáticos, fato não confirmado nesse trabalho.

Quando se avaliou agregados da classe 1, após 30 dias de diferenciação em suspensão e na condição de cultivo no escuro, verificou-se que cerca de 33,3% dos calos apresentarem diferenciação de embriões somáticos, além de ter sido observado neste tratamento a maior quantidade de

embriões somáticos diferenciados no estágio torpedo por calo (8,3), após 120 dias de cultivo.

Tabela 1. Influência do tempo (dias) de diferenciação em suspensão, condição de cultivo (presença e ausência de luz) e diâmetro do agregado celular (classe 1 e classe 2) sobre a percentagem de formação de calo, percentagem de calos com embriões somáticos diferenciados e o número de embriões torpedos por calo por um período de 120 dias de cultivo.

Tempo (dias) de diferenciação em suspensão	Condição de cultivo	Formação de calo (%)			Calo com embrião somático (%)			Nº de embrião torpedo por calo		
		†Classe 1	†Classe 2	Média	Classe 1	Classe 2	Média	Classe 1	Classe 2	Média
0		100a	95,0a	98,0a	23,3a	15,0a	20,0a	4,0b	4,5a	4,2a
30	Claro	93,3a	100a	96,6a	16,6a	16,6a	16,6a	3,0b	4,6a	3,8a
60		76,6b	96,6a	86,6b	16,6a	10,0a	13,3a	3,0b	1,6a	2,3a
0		100a	100a	100a	10,0b	10,0a	10,0a	2,0b	1,0a	1,5b
30	Escuro	96,6a	100a	98,3a	33,3a	16,0a	25,0a	8,3a	1,3a	4,8a
60		100a	100a	100a	13,3b	10,0a	11,6ab	3,6b	4,0a	3,8a
Média		94,4B	98,8A		18,8A	13,1A		4,0A	2,9A	

Letras distintas minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

† Classe 1 e Classe 2 (agregado celular apresentando diâmetro médio de 2 mm e 4 mm, respectivamente).

A redução da concentração de auxinas, como o 2,4-D no meio de cultura geralmente estimula o desenvolvimento de pró-embriões, levando eventualmente à diferenciação de embriões somáticos (Komanime *et al.*, 1992). Na fase de diferenciação celular e maturação dos embriões somáticos as concentrações e os reguladores de crescimento utilizados podem variar de acordo com a espécie (Guerra *et al.*, 1999). Fki *et al.* (2003) observaram no cultivo de células em suspensão de tamareira (*Phoenix dactylifera* L. cv. Deglet Nour) em meio de diferenciação acrescido de 1 mg.L^{-1} de 2,4-D o desenvolvimento de grande quantidade de embriões somáticos. Assim, como no presente trabalho quantidade relativas de embriões somáticos foram obtidas em meio de cultura de diferenciação com baixa concentração deste regulador de crescimento.

Em dendezeiro, Teixeira *et al.* (1995) utilizaram calos globulares primários a partir de embriões zigóticos imaturos e calos embriogênicos friáveis provenientes de embriões zigóticos maduros para estabelecer cultura em suspensão de dendezeiro. O estabelecimento de células em suspensão a partir de tecido embriogênico friável levou dois meses, já suspensões obtidas a partir de calos globulares primários levaram de 3-5 meses para estabelecer. A diferenciação de embriões somáticos foi observada somente em suspensões de células derivada de calos embriogênicos friável após plaqueamento de alíquotas em meio de regeneração. No presente estudo, agregados celulares em suspensão foram obtidos a partir de calos multigranulares embriogênicos provenientes de embriões zigóticos maduros, num período de 6 meses de cultivo.

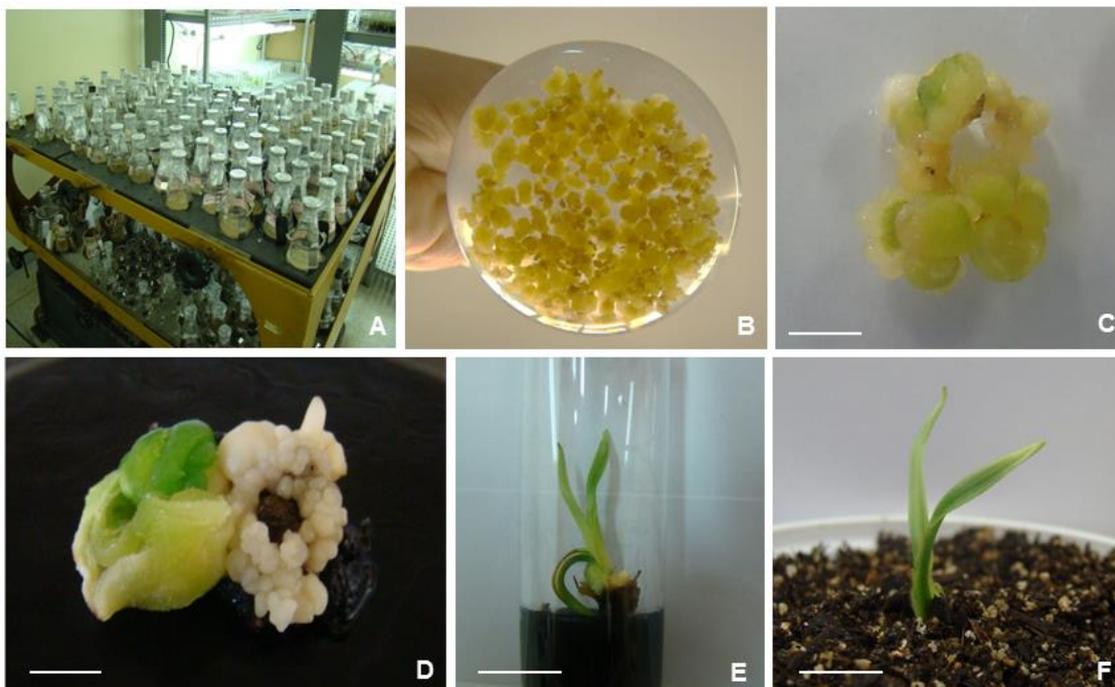


Figura 1. Diferenciação, regeneração e aclimatização das plantas originadas de embriões somáticos de agregados celulares estabelecidos em suspensão. A. Condição dos cultivos em erlenmeyers sob agitação. B. Aspecto dos agregados celulares em meio de cultura líquido. C. Formação de calo (Barra: 2 mm). D. Calo com embriões somáticos diferenciados (Barra: 5 mm). E. Planta regenerada *in vitro* (Barra: 2 cm). F. Planta regenerada em copo descartável, preenchido com Bioplant® e areia lavada (Barra: 2 cm).

Na regeneração dos embriões somáticos, a velocidade de resposta foi heterogênea, uma vez que alguns tipos de embriões foram mais rápidos do que outros para emitirem as primeiras folhas e desenvolverem-se em plantas completas. Além disso, o tempo para regeneração foi lento, possivelmente em razão da assincronia dos tipos de embriões somáticos diferenciados. A germinação dos embriões somáticos diferenciados, a isolamento e transferência das plantas para meio de cultura fresco é necessária para que a planta conclua seu desenvolvimento (Konan *et al.*, 2010; Balzon *et al.*, 2013).

O uso de meio de cultura desprovido de reguladores de crescimento tem sido citado em vários trabalhos com palmeiras. Scherwinski-Pereira *et al.* (2012) e Balzon *et al.* (2013) obtiveram sucesso na germinação de embriões somáticos em trabalhos realizados com as palmeiras *Euterpe oleraceae* e *Elaeis guineensis* Jacq., respectivamente, ao utilizarem meio de cultura de

consistência semissólida sem adição de reguladores de crescimento e contendo carvão ativado.

3.2. Análises anatômicas

De maneira geral, verificou-se em ambas as classes de agregados (classe 1 e classe 2), independente do tempo de diferenciação em meio de consistência líquida, agrupamentos de células pequenas, isodiamétricas, de citoplasma denso, com alta relação núcleo/citoplasma e núcleo evidente, constituindo, assim, a formação de regiões meristemáticas (Figura 2). Nessas regiões meristemáticas foram observadas diversas células apresentando dois núcleos em um mesmo citoplasma, evidenciando assim, a citocinese ainda não concluída no processo de divisão celular. Essas características também foram observadas por Moura *et al.* (2008) e Silva *et al.* (2012), em trabalhos realizados com as palmeiras *Acrocomia aculeata* e *Elaeis guineensis*, respectivamente.

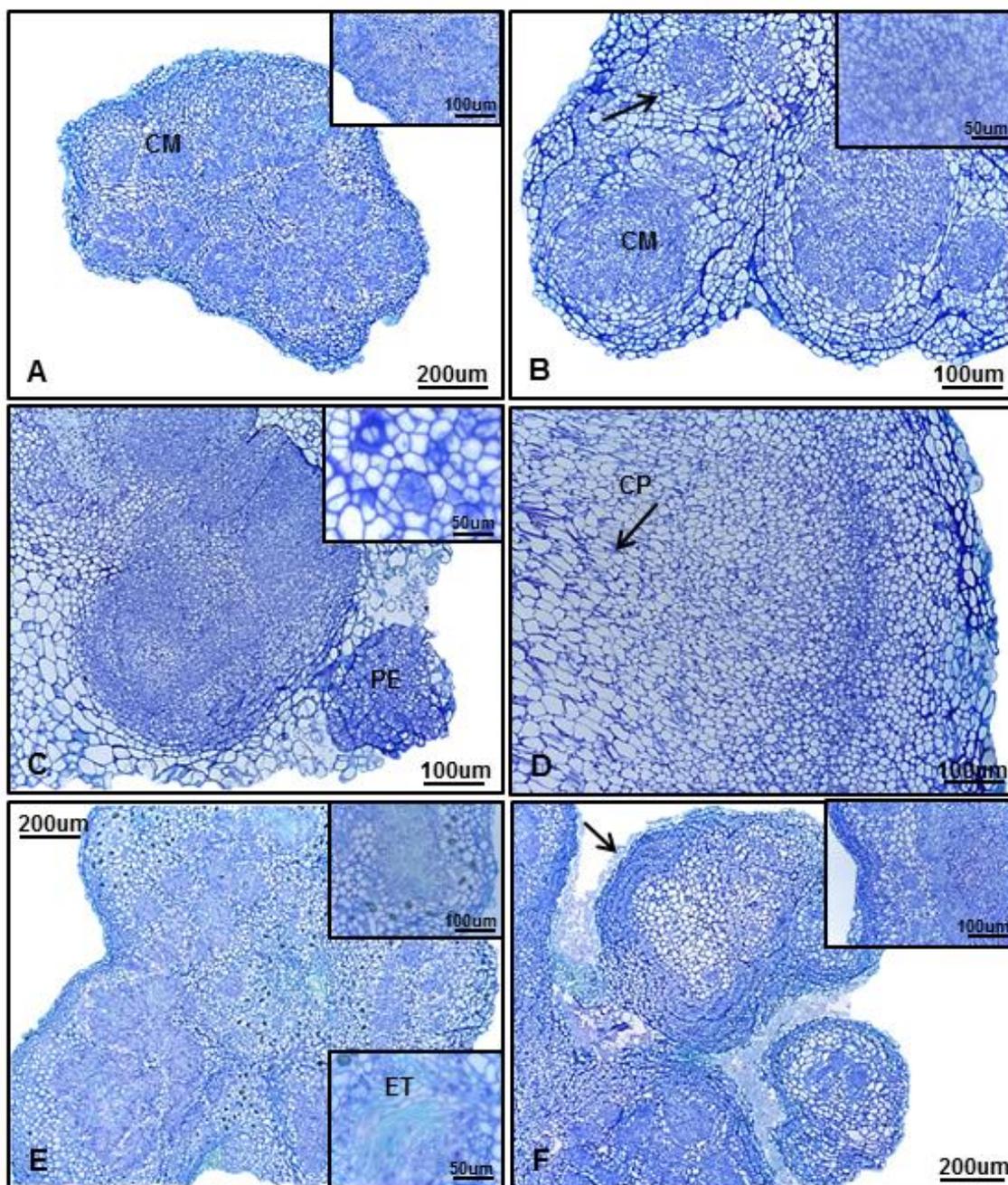


Figura 2. Secções de agregados de *Elaeis guineensis* Jacq., variedade C 2528, classe 1 e classe 2 (apresentando diâmetro médio de 2 mm e 4 mm, respectivamente) retirados com 0, 30 e 60 dias de cultivo em meio de cultura de consistência líquida para diferenciação de embriões somáticos. A. Agregado celular classe 1 (0 dias de diferenciação). B. Agregado celular classe 2 (0 dias de diferenciação). C. Agregado celular classe 1 (30 dias de diferenciação). D. Agregado celular classe 2 (30 dias de diferenciação). E. Agregado celular classe 1 (60 dias de diferenciação). F. Agregado celular classe 2 (60 dias de diferenciação). CM: células meristemáticas; PE: pró-embrião; CP: células meristemáticas; ET: elementos traqueais.

Nos estágio inicial (0 dias de cultivo em meio de diferenciação), ambos os tipos de agregados estudados (classe 1 e classe 2), caracterizavam-se por apresentar agrupamentos de células meristemáticas, células estas pequenas, isodiamétricas, com citoplasma denso e núcleo evidente (Figura 2A-B). Ao redor dos agrupamentos de células meristemáticas observou-se células parenquimáticas grandes e vacuoladas (Figura 2B).

Aos 30 dias de cultivo em meio de diferenciação, nos agregados celulares classe 1 foi possível observar a formação de agrupamentos de células em meio ou ao redor das células meristemáticas, caracterizados como o início da formação de pró-embriões. Os pró-embriões apresentavam-se individualizados por um espessamento de parede, provavelmente pela dissolução da lamela média (Figura 2C). Verdeil *et al.* (2001) e Sané *et al.* (2006), estudando a aquisição da competência embriogênica em *Cocos nucifera* e *Phoenix dactylifera*, respectivamente, observaram o isolamento dos pró-embriões pelo espessamento da parede exterior.

Em dendezeiro, Balzon *et al.* (2013) e Silva *et al.* (2012) também observaram na fase de indução da embriogênese somática regiões meristemáticas, com intensas divisões celulares, que posteriormente evoluíram para agrupamentos de células com pró-embriões em fase semelhante ao globular. Através dos cortes histológicos também foram observadas células parenquimáticas grandes e vacuoladas com espaços intercelulares reduzidos e parede celular mais espessa do que nas demais células dos agregados (Figura 2D-F).

Aos 60 dias de cultivo de diferenciação, nos agregados classe 1 as células apresentaram diferenciação de elementos traqueais, dispostos em vários planos no explante, os quais apresentavam paredes espessadas de forma espiralada, indicado pela coloração esverdeada de suas paredes. A ocorrência de elementos traqueais entre as estruturas globulares confirma a sua origem procambial (Figura 2E). Já no bordo do agregado celular classe 2, as células eram menores, apresentando divisão celular, parede celular espessa, núcleo evidente e citoplasma denso, constituindo células meristemáticas. Já as células do interior do agregado eram maiores, com

paredes celulares delgadas, núcleo bastante reduzido e vacúolo bem desenvolvido, constituindo assim células parenquimáticas (Figura 2F).

Em estudos com *Acrocomia aculeata*, Moura *et al.* (2008) também observaram a formação de elementos traqueais dispostos em vários planos do calo. Esses elementos traqueais diferenciados apresentavam espessamento de parede do tipo escalariforme, evidenciado pela coloração verde obtido com o corante de azul de toluidina.

4. Conclusões

- Os tipos de classes de propágulos estudados (2 e 4 mm de diâmetro) em dendezeiro durante a passagem em meio líquido apresentam taxas de progressão embriogênicas acima de 90% após serem plaqueados em meio semissólido;
- Entre as classes de agregados testados não há diferenças significativas quanto à taxa de formação de calos com embriões somáticos diferenciados;
- Em dendezeiro, propágulos de dendezeiro de até 2 mm de diâmetro, após 30 dias de diferenciação em meio em suspensão, melhoram a diferenciação de embriões somáticos no estágio torpedo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

DEORE, A. J.; JOHNSON, T. S. High frequency plant regeneration from leaf-disc cultures of *Jatropha curcas* L.: an important biodiesel crop, *Plant Biotechnology Report*, v. 2, p. 7-11, 2008.

DUVAL, Y.; ENGELMANN, F.; DURAND-GASSELIN, T. Somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). In: Bajaj YPS (Ed.) Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I, *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, v. 30, p. 335-352, 1995.

FKI, L.; MASMOUDI, R.; DRIRA, N.; RIVAL, A. An optimized protocol for plant regeneration from embryogenic suspension cultures of date palm, *Phoenix dactylifera* L., cv. Deglet Nour. *Plant Cell Reports*, v. 21, p. 517-524, 2003.

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

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; (Eds.). *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Brasília: EMBRAPA, v. 2, p. 533-568, 1999.

JOHANSEN, D. A. *Plant microtechnique*. New York, McGraw-Hill Book Co. Inc., p. 523, 1940.

KANCHANAPOOM, K.; CHOURYKAEW, B. Somatic embryogenesis from cell suspension cultures of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Journal of Science Society of Thailand*, p. 241-250, 1998.

KONAN, K. E.; DURAND-GASSELIN, T.; KOUADIO, Y. J.; RIVAL, A. A modeling approach of the *in vitro* conversion of palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 84, p. 99-112, 2006.

KONAN, K. E.; DURANT-GASSELIN, T.; KOUADIO, Y. J.; FLORI, A.; RIVAL, A.; DUVAL, Y.; PANNETIER, C. *In vitro* conservation of oil palm somatic embryo for 20 years on a hormone-free culture medium: characteristics of the embryogenic cultures, derived plantlets and adult palms. *Plant Cell Reports*, v. 29, n. 1, p. 1-13, 2010.

KOMANINE, A.; KAWAHARA R.; MATSUMOTO, S.; SUNABORI, S.; TOYA, T.; FUJIWARA, A.; TSUKAHARA, M.; SMITH, J.; ITO, M.; FUKUDA, H.; NOMURA, K.; FUJIMURA, T. Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures: physiology, biochemistry and molecular biology. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, v. 28, p. 11-14, 1992.

MOURA, E. F.; VENTRELLA, M. C.; MOTOIKE, S. Y.; SÁ JÚNIOR, A. Q.; CARVALHO, M.; MANFIO, C. E. Histological study of somatic embryogenesis induction on zygotic embryos of macaw palm (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Martius). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 95, n. 2, p. 175-184, 2008.

MONTEIRO, T. R.; LUIS, Z. G.; FREITAS, E. O.; MATSUMOTO, K.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Diluição celular, características do meio de cultura e biorreatores de imersão temporária na diferenciação e regeneração de células em suspensão de bananeira. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal - SP, Volume Especial, E. 213-221, 2011.

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

O' BRIEN, T. P., FEDER, N., MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma*, v. 59, n. 2, p. 368-373, 1965.

PALANYANDY, S. R.; SURANTHRAN P.; GANTAIT, S.; SINNIHAH, U. R.; SUBRAMANIAM, S.; AZIZ, M. A.; ALWEE, S. S. R. S.; ROOWI, S. H. *In vitro* developmental study of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) polyembryoids from cell suspension using scanning electron microscopy, *Acta Physiol Plant*, v. 35, p.1727-1733, 2013.

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

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

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; GUEDES, R. S.; SILVA T. L.; FERMINO, J. R. P. C. P; COSTA, F. H. S. Somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm using thin cell layer technique. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, v. 46, n. 4, p. 378-385, 2010.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; GUEDES, R. S.; SILVA, R. A.; FERMINO, J. R.; LUIS, Z. G.; FREITAS, E. O. Somatic embryogenesis and plant regeneration in açai palm (*Euterpe oleracea*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 109, p. 501-508, 2012.

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

SANÉ, D.; ABERLENC-BERTOSI, F.; GASSAMA-DIA, Y. K.; SAGNA, M.; TROUSLOT, M. F.; DUVAL, Y.; BORGEL, A. Histocytological analysis of callogenesis and somatic embryogenesis from cell suspensions of date palm (*Phoenix dactylifera*). *Annals of Botany*, v. 98, p. 301-308, 2006.

TARMIZI, A. H.; ZAITON, R. Development of the MPOB fast transfer technique (MoFaTT) system for maintenance and maturation of oil palm culture aggregates. *Journal of Oil Palm Research*, v. 19, p. 435-439, 2007.

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

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

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

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

VERDEIL, J. P.; HOCHER, V.; HUET, C.; GROSDÉMANGE, F.; ESCOUTE, J.; FERRIERE, N.; NICOLE, M. Ultrastructural changes in coconut calli associated with the acquisition of embryogenic competence. *Annals of Botany*, v. 88, p. 9-18, 2001.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.