

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOTECNOLOGIA

ONTOGÊNESE, DIVERSIDADE GENOTÍPICA DE RESPOSTAS E
ANÁLISE PROTEÔMICA DE ETAPAS ENVOLVIDAS NA
EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE DENDEZEIRO (*Elaeis*
guineensis JACQ.).

RAFAEL DE CARVALHO SILVA

MANAUS
2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOTECNOLOGIA

RAFAEL DE CARVALHO SILVA

ONTOGÊNESE, DIVERSIDADE GENOTÍPICA DE RESPOSTAS E
ANÁLISE PROTEÔMICA DE ETAPAS ENVOLVIDAS NA
EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE DENDEZEIRO (*Elaeis
guineensis* JACQ.)

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração Agroflorestal.

Orientador: Prof. Dr. Jonny Everson Scherwinski-Pereira

Coorientadora: Dr. Ângela Mehta

MANAUS
2011

RAFAEL DE CARVALHO SILVA

ONTOGÊNESE, DIVERSIDADE GENOTÍPICA DE RESPOSTAS E ANÁLISE
PROTEÔMICA DE ETAPAS ENVOLVIDAS NA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE
DENDEZEIRO (*Elaeis guineensis* JACQ.).

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração Agroflorestal.

Aprovada em 24 de fevereiro de 2011

BANCA EXAMINADORA

Jonny Everson Scherwinsk Pereira(Presidente)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Eva Maria Alves Cavalcanti Atroch
Universidade Federal do Amazonas

Edmar Vaz de Andrade
Universidade Federal do Amazonas

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Silva, Rafael de Carvalho

S586e Expressão genotípica, ontogênese e análise proteômica de etapas envolvidas na embriogênese somática de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) / Rafael de Carvalho Silva. - Manaus: UFAM, 2011.
127 f.; il. color.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) — Universidade Federal do Amazonas, 2011.

Orientador: Prof. Dr. Jonny Everson Scherwinski-Pereira
Co-orientadora: Prof^a. Dra. Ângela Mehta

1. *Elaeis guineensis* 2. Micropropagação 3. Embriogênese somática I. Scherwinski-Pereira, Jonny Everson II. Mehta, Ângela III. Universidade Federal do Amazonas IV. Título

CDU 581.3(043.3)

*À meus pais Valeriano e Marizete,
por todo amor e carinho!!!!!!*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À minha família: Valeriano, Marizete, Rogério, Rodrigo, Michelle e Guilherme, por todo amor e incentivo.

Ao meu orientador Jonny Everson, pelo auxílio neste trabalho.

À minha co-orientadora Angela Mehta, que muito me auxiliou durante esse percurso.

À Zan por ter me acompanhando em todos os momentos desse trabalho, pelo amor, incentivo, ensinamentos, alegrias e brigas.

Ao pesquisador Luciano, pelo grande auxílio nas análises no MADI-TOF.

Aos colegas e amigos do LCT: Tatiane, Elinea, Tatiane Loureiro, Aline, Mayra, Thiago, Luciene, Talita, Renata, Julceia, Patricia, Hugo, Andre, Marcos e Leandro, por todo esse tempo de convivência, conversas científicas e momentos de descontração na mesa do bar.

Aos amigos do Laboratório de Proteômica: Gabriela, Leandro, Gabriela Villet, Lilian, Roberta e Sâmia.

Aos meus amigos: Carlos, Fernanda, Henryck, Rafael, Uiara, Rayane, Pâmela, Manu, Luciana, dentre outros.

Agradeço também ao CNPq, pelo apoio financeiro.

Aos médicos que mantiveram minha saúde física e mental.

À república babilônia e os anexos: Raphael, Aldi, Sissi, Nubiane, Elzimar, Janderson, e todos que compartilharam de momentos alegres.

Às secretárias da PPGBIOTEC, pela amizade e auxílio nesses dois anos.

Aos meus primos Dário e Suzi, pela ajuda com moradia no início do curso.

À Universidade Federal do Amazonas, e aos professores que integram ao programa de pós-graduação.

"Todo o futuro da nossa espécie, todo o governo das sociedades, toda a prosperidade moral e material das nações dependem da ciência, como a vida do homem depende do ar. Ora, a ciência é toda observação, toda exatidão, toda verificação experimental. Perceber os fenômenos, discernir as relações, comparar as analogias e as dessemelhanças, classificar as realidades, e induzir as leis, eis à ciência; eis, portanto, o alvo que a educação deve ter em mira. Despertar na inteligência nascente as faculdades cujo concurso se requer nesses processos de descobrir e assimilar a verdade."

Rui Barbosa.

Sumário

ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS.....	i
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iv
RESUMO GERAL.....	v
ABSTRACT.....	vii
1- INTRODUÇÃO GERAL.....	01
2- REVISÃO DE LITERATURA.....	04
2.1 – Aspectos gerais do dendezeiro.....	04
2.2 – Importância econômica.....	06
2.3 – Cultura de Tecidos.....	08
2.4– Embriogênese somática.....	11
2.4.1 -Indução da embriogênese somática.....	13
2.4.2 – Multiplicação de culturas embriogênicas.....	14
2.4.3 – Maturação dos embriões somáticos.....	15
2.4.4 – Germinação dos embriões somáticos.....	16
2.5 – Propagação <i>in vitro</i> de palmeiras.....	16
2.6 - Estudos anatômicos.....	18
2.7 – Proteômica.....	19
3 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21

CAPÍTULO 1

RESPOSTAS GENOTÍPICAS DE DENDEZEIROS (*Elaeis guineensis* JACQ.) À EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS.

RESUMO.....	31
ABSTRACT.....	32
1 – INTRODUÇÃO.....	33
2 – MATERIAL E MÉTODOS.....	35
2.1 -Indução da embriogênese somática.....	36
2.2 – Diferenciação e maturação dos embriões somáticos.....	37
2.3 – Regeneração dos embriões somáticos.....	38
2.4 – Varredura.....	38
3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38

3.1 -Indução da embriogênese somática.....	47
3.2 - Diferenciação, maturação e regeneração dos embriões somáticos.....	55
4 – CONCLUSÕES.....	55
5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

CAPÍTULO 2

ONTOGENIA DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE DENDEZEIRO (*Elaeis guineensis* JACQ.) A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS MATUROS

RESUMO.....	61
ABSTRACT.....	62
1 – INTRODUÇÃO.....	63
2 – MATERIAL E MÉTODOS.....	66
2.1 – Material vegetal.....	66
2.2 - Análise anatômica e histoquímica.....	67
2.3 – Varredura.....	68
3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68
4 – CONCLUSÕES.....	89
5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89

CAPÍTULO 3

ANÁLISE PROTEÔMICA DE ETAPAS ENVOLVIDAS NA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE DENDEZEIRO (*Elaeis guineensis* JACQ.) A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS.

RESUMO.....	96
ABSTRACT.....	97
1 – INTRODUÇÃO.....	98
2 – MATERIAL E MÉTODOS.....	100
2.1 – Material vegetal.....	100
2.2 - Extração de proteínas.....	100
2.3 – Eletroforese bidimensional (2-DE).....	101
2.4 – Digestão <i>in gel</i> das proteínas.....	102
2.5 – Identificação das proteínas por espectrometria de massa.....	102
3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	103

3.1 – Resposta ao estresse.....	105
3.2 – Proliferação celular.....	107
3.3 – Acúmulo de amido.....	108
3.4 – Metabolismo energético.....	109
3.5 – Metabolismo do nitrogênio.....	110
3.6 – Processamento de proteínas.....	111
3.7 – Proteínas do embrião zigótico.....	112
4 –CONCLUSÕES.....	117
5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	117
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	125
ANEXO.....	126

ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1- Aspectos gerais da planta do dendezeiro <i>Elaeis guineensis</i> Jacq.....	05
---	----

CAPÍTULO 1

RESPOSTAS DE GENÓTIPOS BRASILEIROS DE DENDEZEIROS (*Elaeis guineensis* JACQ.) À EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS.

Figura 1: Respostas genotípicas de dendezeiros (<i>E. guineensis</i>) na percentagem de calos induzidos, durante a embriogênese somática, e em razão do período de cultivo em dias.....	43
Figura 2: Respostas genotípicas de calos de dendezeiros quanto ao incremento da massa fresca (mg), em razão do período de cultivo em dias.	46
Figura 3: Respostas genotípicas de dendezeiros quanto à massa fresca dos explantes, em razão do meio cultivo após 90 dias. MTD-2 = 40µM de picloran; MTD-1 = 12,6 µM de 2iP e 0,6 µM de ANA. CV(%): 21,7.....	48
Figura 4: Frequência de calos com embriões somáticos em genótipos de dendezeiro em razão do meio de cultura de diferenciação/maturação (MTD-1 ou MTD-2), após três meses de cultivo em meio de regeneração.....	50
Figura 5: Estágios morfogênicos de genótipos brasileiros de dendezeiros (<i>Elaeis guineensis</i> Jacq.) à embriogênese somática.....	54
Figura 6: Secções do embrião somático de <i>Elaeis guineensis</i> Jacq. aos 30 (A, B, C e D) e 90 (E, F e G) dias no meio de cultura de regeneração	55
Figura 7: Plântula regenerada a partir do embrião somático.....	56

TABELA

Tabela 1. Influência do genótipo e do meio de diferenciação e maturação sobre o número médio de embriões somáticos formados em estágio globular e/ou torpedo (G+T) por calo apresentando embriões somáticos diferenciados,	
---	--

CAPÍTULO 2

ONTOGENIA DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE DENDEZEIRO (*Elaeis guineensis* JACQ.) A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS MATUROS.

Figura 1: Explante utilizado para a indução da embriogênese somática de <i>Elaeis guineensis</i> Jacq.	79
Figura 2: Embrião zigótico de <i>Elaeis guineensis</i> Jacq. aos 14 dias de cultivo em meio de cultura para a indução da embriogênese somática (450µM de picloram)..	80
Figura 3: Embrião zigótico de <i>Elaeis guineensis</i> Jacq. aos 21 e 30 dias de cultivo em meio de cultura de indução da embriogênese somática.	81
Figura 4: Embrião zigótico de <i>Elaeis guineensis</i> Jacq. aos 45 dias de cultivo em meio de cultura para a indução da embriogênese somática.....	82
Figura 5: Secções de explante de <i>Elaeis guineensis</i> Jacq. aos 60 (A, B e C) e 90 (D, E, F e G) dias de cultivo em meio para indução da embriogênese somática.....	83
Figura 6: Secções de explante de <i>Elaeis guineensis</i> Jacq. aos 135 dias de cultivo em meio para indução da embriogênese somática.....	84
Figura 7: Secções de explante de <i>Elaeis guineensis</i> Jacq. aos 150 dias de cultivo em meio para indução da embriogênese somática.	85
Figura 8: Secções de explante de <i>Elaeis guineensis</i> Jacq. aos 60 dias de cultivo em meio de diferenciação e maturação de embriões somáticos.....	86
Figura 9: Secções do embrião somático de <i>Elaeis guineensis</i> Jacq. aos 30 (A, B, C e D) e 90 (E, F e G) dias no meio de cultura de regeneração	87

CAPÍTULO 3

ANÁLISE PROTEÔMICA DE ETAPAS ENVOLVIDAS COM A INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM DENDEZEIRO (*Elaeis guineensis* JACQ.) A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS

Figura 1: Número de proteínas exclusivas e comuns em diferentes estágios (E1: embrião zigótico; E2: explante com 14 dias em meio de indução (início da proliferação celular); E3: calo primário com 60 dias e E4: calo pró-

embriogênico com 150 dias) durante a aquisição de competência embriogênica em *Elaeis guineensis*..... 104

Figura 2: Perfil bidimensional de proteínas durante a aquisição de competência embriogênica em *Elaeis guineenses*..... 113

TABELA

Tabela 1: Proteínas da aquisição de competência embriogênica em *Elaeis guineensis*, identificados por eletroforese bidimensional (2D-PAGE) associado à espectrometria de massa (MALDI-ToF/ToF)..... 114

LISTA DE ABREVIATURAS

2ip	2-isopenteniladenina
ANA	Ácido naftalenacético
MS	Meio de cultura desenvolvido por Murashige & Skoog (1962)
AIA	Ácido indol acético
ABA	Ácido abscísico
BAP	6-Benzilaminopurina
2,4D	Ácido 2,4-. Diclorofenoxiacético
SERK	Receptor quinase da embriogênese somática
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
DTT	Ditiotreitol
RPM	Rotações por minuto
IPG	Gradiente imobilizando de <i>pH</i>
TRIS	Tris-hidroximetilaminoetano
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida
TFA	Ácido trifluoracético
LEA	Proteínas abundantes ao final da embriogênese (<i>late embryogenesis abundante</i>).
kDa	kilodalton
pI	Ponto isoelétrico
MALDI-TOF	Espectrometria de massa por desorção e ionização a laser assistida por matriz (<i>matrix-assisted laser desorption/ionization-time of light</i>)
MS/MS	Espectrometria de massa em sequencia (<i>tandem mass spectrometry</i>)

RESUMO GERAL

Este trabalho tem como objetivo avaliar respostas genótípicas durante a embriogênese somática a partir de embriões zigóticos de dendezeiros (*Elaeis guineensis* Jacq.), bem como avaliar a ontogênese e identificar proteínas diferencialmente expressas durante as diferentes etapas do processo embriogênico. Foram utilizados embriões zigóticos de nove genótipos: C2001, C2328, C2301, C3701, CM1115, C7201, C2528, C2501 e CN1637. Inicialmente, os embriões zigóticos foram inoculados em meio de cultura para a indução de calos (450 μM de Picloram), com subcultivos a cada 30 dias. Após 150 dias, os calos foram transferidos para dois meios de cultura visando à diferenciação e maturação de embriões somáticos: MTD -1 (0,6 μM de ANA e 12,3 μM de 2-iP) e MTD-2 (40 μM de Picloram). Após 90 dias, os calos com embriões somáticos foram transferidos para o meio de regeneração, desprovido de reguladores de crescimento. Em todas as etapas os explantes foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$ e sob condições de escuro. A análise morfo-anatômica foi realizada durante todo o processo embriogênico. Já a análise proteômica foi coletada amostras dos embriões zigóticos (E1), explantes intumescidos com 14 dias (E2) em meio de indução, calo primário (E3) e calo pró-embriogênico (E4). Verificou-se que os genótipos testados apresentam diferentes respostas morfogênicas *in vitro*. Na fase de indução, os genótipos C2501, C2001, C7201, C2528, C2328 e C3701 apresentaram os melhores resultados na formação de calos embriogênicos, com valores entre 90 e 100%. Após 90 dias de regeneração, os genótipos que apresentaram os melhores resultados para formação e regeneração de embriões somáticos foram o C2328 e CM1115. As análises anatômicas permitiram observar aos 14 dias em meio de indução a formação das primeiras divisões nas células procâmbiais e perivasculares. Essa região progrediu para a formação de massas meristemáticas, após 21 dias, indicando sua origem procambial e perivascular. Calos primários surgiram após 45 dias de cultura, seguido da progressão para calos embriogênicos aos 90 dias. A formação de proembriões, a partir das células meristemáticas, ocorreu após 135 de cultivo. Os proembriões apresentavam-se isolados do tecido de origem, pelo leve espessamento da parede celular, indicando sua origem unicelular. Quando transferidos para fase de maturação, nos meios de cultura MTD -1 (0,6 μM de ANA e 12,3 μM 2-iP) e MTD-2 (40 μM picloran), observou-se a regeneração de embriões somáticos em diferentes estágios de desenvolvimento (globular-torpedo). Os embriões diferenciados apresentaram protoderme, cordões de procâmbio e plúmula. Em seguida foram transferidos para o meio de cultura isento de reguladores de crescimento (fase de regeneração de plantas), no qual foi observada a conversão dos embriões somáticos em plantas. O acúmulo de amido durante o processo de

embriogênese somática concentrou-se próximos aos centros de intensa divisão celular, e no córtex dos calos primários e embriogênicos. No entanto, nos diferentes estágios de embriões somáticos não foi observado o acúmulo de amido. Já a análise proteômica identificou proteínas envolvidas no processo de aquisição da competência embriogênica. As proteínas foram categorizadas em sete grupos de acordo com sua função biológica, bem como pela participação em vias metabólicas distintas: 1) proteínas expressas em condições de estresse; 2) proteínas envolvidas no ciclo celular; 3) proteínas envolvidas no acúmulo de amido; 4) proteínas do metabolismo energético; 5) proteína do metabolismo do nitrogênio; 6) processamento das proteínas; e 7) proteínas do embrião zigótico. O conhecimento da reconstituição *in vitro* dos eventos, fisiológicos, genotípicos, ontogênicos e bioquímicos, que envolvem o processo de embriogênese somática em *E. guineenses*, permitiu um maior entendimento da clonagem da espécie, seja para a produção de mudas em escala, seja para acelerar programas de melhoramento genético da cultura

Palavras-chave: *Elaeis guineenses*, embriogênese somática, efeito genotípico, micropropagação, ontogêneses, acúmulo de amido e proteômica.

ABSTRACT

This study aims to evaluate genotypic responses during somatic embryogenesis from zygotic embryos of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) as well as to evaluate the ontogeny and identify proteins differentially expressed during different stages of embryogenesis. Zygotic embryos were used in nine genotypes: C2001, C2328, C2301, C3701, CM1115, C7201, C2528, C2501 and CN1637. Initially, the zygotic embryos were inoculated in culture medium for callus induction (450 μ M Picloram), with subcultures every 30 days. After 150 days, callus were transferred to two culture media in order to differentiation and maturation of somatic embryos: MTD -1 (0.6 μ M NAA and 12.3 μ M 2-iP) and MTD-2 (40 μ M Picloram). After 90 days, the callus with somatic embryos were transferred to regeneration medium devoid of growth regulators. At all stages the explants were kept in growth room with temperature $25 \pm 2^\circ$ C and dark conditions. The analysis was performed anatomical mold during the embryogenic process. Since the proteomic samples were collected from zygotic embryos (E1), with swollen explants 14 days (E2) in induction medium, primary callus (E3) and callus pro-embryogenic (E4). It was found that the genotypes have different morphogenic responses *in vitro*. In the induction phase, genotypes C2501, C2001, C7201, C2528, C2328 and C3701 showed better results in the formation of embryogenic callus, with values between 90 and 100%. After 90 days of regeneration, the genotypes that showed the best results in the formation and regeneration of somatic embryos were C2328 and CM1115. The anatomical analysis allowed notice to 14 days in induction medium the formation of the first divisions procambium cells and perivascular. This region has progressed to the formation of meristematic masses after 21 days, indicating their procambial and perivascular. Primary callus appeared after 45 days of culture, followed by progression to embryogenic callus at 90 days. The formation of proembryons from meristematic cells, occurred after 135 of cultivation. The proembryons presented themselves isolated from the tissue of origin, by thickening the cell wall, indicating their unicellular origin. When transferred to the maturation phase in culture MTD -1 (0.6 μ M NAA and 12.3 μ M 2-iP) and MTD-2 (40 μ M picloram), we observed the regeneration of somatic embryos at different stages development (globular-torpedo). The embryos were differentiated protoderm, strands of procambium and plumule. They were then transferred to culture medium free of growth regulators (regeneration phase plants), which was observed in the conversion of embryos into plants. The accumulation of starch during the process of somatic embryogenesis was concentrated near the centers of intense cell division, and the cortex of primary and embryogenic callus. However, in different

stages of somatic embryos was not observed the accumulation of starch. Already proteomic analysis has identified proteins involved in the acquisition of embryogenic competence. Proteins were categorized into seven groups according to their biological function as well as by participating in different metabolic pathways: 1) proteins expressed in stress conditions, 2) proteins involved in cell cycle, 3) proteins involved in the accumulation of starch, 4) energy metabolism proteins, 5) protein of nitrogen metabolism, 6) processing of proteins and 7) proteins of zygotic embryo. Knowledge of the *in vitro* reconstitution of the events, physiological, genotypic ontogenetic and biochemical factors involved in somatic embryogenesis in *E. guineensis* enable a greater understanding of the kind of cloning, whether for the production of seedlings in scale, is to accelerate breeding programs of culture.

Keywords: *Elaeis guineensis*, somatic embryogenesis, genotypic effect, micropropagation, ontogeny, accumulation of starch and proteomics.

1- Introdução Geral

Mudanças climáticas e impactos de gases de efeito estufa, associados à instabilidade de preços dos combustíveis fósseis, têm contribuído para uma maior consciência e atitude quanto às mudanças na matriz energética mundial para a energia renovável, proveniente de biomassa (Conti, 2005). Neste cenário, o Brasil ganha destaque mundial na produção de bicompostíveis, pois possui mais de 20% de área agricultável do planeta e cerca de 200 espécies vegetais com potencial para a produção de óleo (Beltrão, 2005). Devido isso, o Brasil lançou o Plano Nacional de Agroenergia, com o intuito de estabelecer patamares mais elevados na produção de óleo vegetal, proporcionando competitividade crescente ao biodiesel e promovendo a segurança energética nacional (MAPA, 2006).

Para atender esses patamares mais elevados, espécies perenes como o dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) vem ganhando espaço, por possui a maior produtividade de óleo em comparação a outras espécies oleaginosas, com um rendimento entre 5 a 7 toneladas de óleo por hectare (Rajesh *et al.*, 2003). Os constituintes do óleo de dendê de maior importância para a produção de biodiesel são os ácidos oléicos (52 %) e linoléicos (11%), pois estes são responsáveis por até 80% da composição do petróleo (Miranda *et al.*, 2000; Deore & Johnson, 2008).

Em razão desse potencial econômico do biodiesel diversos programas de melhoramento do dendezeiro têm surgido pelo mundo, com destaque à Instituições sediadas em países do Continente Asiático e da América Latina . O programa conduzido pelo Brasil baseia-se fundamentalmente na coleção de germoplasma na Bacia do Rio Amazonas (Embrapa Amazônia Ocidental) introduzido em razão de parcerias entre a Embrapa e Cirad (França) (Pandolfo, 1981) em meados dos anos 80. Apesar de mais de 20 anos de trabalhos, ainda é baixo o número de materiais selecionados, melhorados e lançados convencionalmente,

em razão do longo ciclo da cultura (Low *et al.*, 2008). Assim, uma preocupação observada nos programas de melhoramento da espécie refere-se à multiplicação dos genótipos selecionados, visto que a principal forma de propagação é via sementes (Lorenzi *et al.*, 2004). Este método convencional de multiplicação requer um período relativamente longo até que novas mudas sejam formadas, além de apresentar formação de plantas heterogêneas, acarretando plantios desuniformes (Viegas & Muller, 2000).

Um das formas de sanar esse problema e acelerar os programas de melhoramento da espécie seria o desenvolvimento de protocolos para a propagação clonal. No entanto, assim como em outras palmeiras, o dendezeiro é formado por um único ápice crescente, com o agravante de não formar perfilhos, fato que agrava os problemas de se conseguir mudas por métodos vegetativos convencionais (Valois, 1997). Assim, técnicas biotecnológicas modernas, em especial a cultura de tecidos de plantas, poderiam constituir-se como importantes ferramentas auxiliares nos programas de melhoramento genético da espécie, bem como na clonagem de materiais selecionados.

Dentre as diferentes técnicas de propagação *in vitro*, a embriogênese somática é sem dúvida a mais indicada para a clonagem de palmeiras. Esta técnica envolve a regeneração de plantas por meio de embriões a partir de tecidos somáticos (Guerra *et al.*, 1999), desde que condições especiais de crescimento, como meios de cultura, reguladores de crescimento e condições ambientais sejam fornecidos adequadamente aos cultivos. Protocolos de embriogênese somática já foram descritos para algumas espécies de palmeiras, utilizando como explante embriões zigóticos (Teixeira *et al.*, 1993; Ledo *et al.*, 2002) folhas e inflorescências imaturas (Schwendiman *et al.*, 1988; Teixeira *et al.*, 1994; Karun *et al.*, 2004; Guerra & Handro, 1998) e ovários não fertilizados (Pereira *et al.*, 2007).

Existem vários fatores a considerar na escolha do explante, incluindo o tamanho, a facilidade de esterilização, o estágio de desenvolvimento do tecido, o estado fisiológico e

nutricional do explante e o genótipo (Fiuk & Rybczynski, 2008). Segundo (Teixeira *et al.*, 1993), a utilização de embriões zigóticos como fonte de explante, visando a propagação clonal *in vitro*, possui vantagens, tais como: a) a grande disponibilidade de frutos; b) são tecidos jovens e respondem com mais facilidade a expressão da sua totipotencialidade; c) podem ser transportados por longas distâncias e; d) possuem uniformidade fisiológica.

Este trabalho tem como objetivo avaliar respostas genótípicas durante a embriogênese somática a partir de embriões zigóticos de dendezeiros (*Elaeis guineensis* Jacq.), bem como avaliar a ontogênese e identificar proteínas diferencialmente expressas durante as diferentes etapas do processo embriogênico.

2- Revisão de literatura

2.1 – Aspectos gerais do dendezeiro

A família Arecaceae (Palmae) agrupa cerca de 190 gêneros e 2364 espécies (Golvaerts & Dransfield, 2005), sendo que no Brasil ocorrem cerca de 40 gêneros e 200 espécies (Souza & Lorenzi, 2005). O gênero *Elaeis* destaca-se por possuir duas espécies de interesse genético na produção de óleo: o caiaué (*Elaeis oleifera* HBK.) e o dendê (*Elaeis guineensis* Jacq.) (Surre & Ziller, 1969).

O dendezeiro é uma espécie de origem africana, provavelmente do Golfo da Guiné e encontra-se naturalmente dispersa desde o Senegal até Angola, sendo que, as populações mais densas são encontradas na Costa do Marfim, Camarões e Zaire (Zeven, 1964). É uma monocotiledônea perene, que possui caule estipe, cilíndrico com um único ápice crescente. Na fase adulta apresenta uma coroa de 30 a 40 folhas com nervuras paralelinervadas. É uma planta monóica com ciclos sucessivos de inflorescências masculinas e femininas, o que faz com que o modo de reprodução seja através de polinização cruzada (Valois, 1997) (Figura 1).

Os frutos de *E. guineensis* ocorrem de três formas e podem ser classificadas segundo a espessura do endocarpo que é governada por um gene denominado *Sh*. *Elaeis guineensis* Jacq. var. *dura* Becc., possui genótipo homozigoto com genes Sh^+/Sh^+ , e endocarpo com espessura entre 2 a 6 mm. *Elaeis guineensis* Jacq. var. *pisifera* Becc., de genótipo homozigoto com genes Sh^-/Sh^- , possui endocarpo reduzido ou até mesmo ausente. Já o *Elaeis guineensis* Jacq. var. *tenera* Becc., é um híbrido resultado do cruzamento das variedades *pisifera* e *dura*, possuindo genótipo heterozigoto com genes Sh^+/Sh^- , com espessura entre 0,5 e 4 mm (Billotte *et al*, 1999).



Figura 1- Aspectos gerais da planta do dendezeiro *Elaeis guineensis* Jacq. A) Planta adulta de dendezeiro; B) Inflorescência masculina (lado esquerdo) e feminina; C) Frutos das variedades Dura, Tenera e Pisifera de *E. guineensis* (Setas pretas), caiaué (*Elaeis oleifera*) (Seta amarela), e frutos do cruzamento de *E. guineensis* com *E. oleifera*. Fotos: Jonny Everson Scherwinski-Pereira.

Esta palmeira apresenta seu melhor desenvolvimento nas regiões tropicais, tornando-se perfeitamente adaptável ao clima equatorial quente e úmido com grande precipitação pluviométrica bem distribuída ao longo do ano (Carvalho *et al.* 2001). A água tem uma importância vital no desenvolvimento do dendezeiro. Segundo Surre & Ziller (1969), e Dufour *et al.* (1988) o déficit hídrico pode alterar a taxa de emissão das inflorescências femininas e, conseqüentemente, diminuir a produção de cachos, além de aumentar o fenômeno do abortamento das inflorescências.

No Brasil, as primeiras plantações industriais de dendzeiro são do início da década de 1960, na Bahia, e logo após, no Pará, Amazônia (Veiga *et al.* 2000). Na região Norte, a introdução aconteceu em 1951 através do antigo Instituto Agrônômico do Norte - IAN (atualmente Embrapa Amazônia Oriental) que importou algumas linhagens do Instituto de Recherches pour les Huilles et Oleagineux (IRHO/França), para avaliar o desempenho dessa cultura nas condições edafoclimáticas da Amazônia Brasileira (Pandolfo, 1981).

2.2 – Importância econômica

Visando incentivar a produção de biodiesel no país, em janeiro de 2005 foi aprovada a Lei Federal nº 11.097, no qual estabeleceu que a partir de janeiro de 2008, em todo território nacional, a obrigatoriedade da mistura de 2% de biodiesel e 98% de diesel de petróleo, denominada B2. Até janeiro de 2013, essa obrigatoriedade passará para 5% (B5), havendo, ainda, possibilidade de empregar percentuais de mistura mais elevados e até mesmo o biodiesel puro (B100) mediante autorização da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP). Juntamente, foi aprovado a Lei Federal nº 11.116 que prevê a redução parcial ou total de tributos federais incidentes sobre a comercialização de biodiesel.

Para contribuir no crescimento da produção dos biocombustíveis, visando diminuir a dependência do petróleo, além de reduções dos tributos federais e obrigatoriedade das misturas B2 e B5, são necessários investimentos no desenvolvimento de tecnologias de produção do biodiesel. Devido a isso, em 2006 foi lançado o Plano Nacional de Agroenergia, que tem como principal meta desenvolver as tecnologias necessárias para aumentar essa produção. A expectativa do governo brasileiro é chegar a uma produção de 3,34 bilhões de litros ano até 2011, sendo que, atualmente são produzidos aproximadamente 840 milhões de litros ao ano (MAPA, 2006).

O biodiesel produzido a partir do óleo de dendê na região Norte ganha vantagem nessa corrida, pois a lei prevê uma redução de 100% dos impostos federais incidentes sobre o biocombustível produzido por agricultores famílias, ou, redução de 32% dos tributos federais se os agricultores não forem familiares (Rodrigues & Accarini, 2004).

A importância em se trabalhar com o dendezeiro é que a cultura possui a maior produtividade de óleo entre todas as oleaginosas, com um rendimento entre 4 a 6 t de óleo por hectare correspondendo a 10 vezes a produtividade do óleo de soja (Suframa, 2003). Segundo Miranda *et al.* (2000), o óleo de dendê é formado predominantemente por ésteres produtos da condensação entre glicerol e ácidos graxos, chamados triglicerídeos. Aproximadamente 98% do óleo de dendê bruto é formado pelos ácidos graxos saturados (palmítico com 32 a 45% e esteárico com 2 a 7%) e insaturados (oléico com 38 a 52 % e linoléico com 5 a 11%). Os ácidos oléico e linoléico são responsáveis por até 80% da composição do petróleo (Deore & Johnson, 2008).

Atualmente a Malásia é o maior produtor e exportador de óleo e derivados do dendê com cerca de 13,3 milhões de toneladas, representando 47% da produção mundial (MPOB, 2009). No Brasil, o Pará é grande produtor nacional, com 90% da produção interna, o que corresponde a 78 mil toneladas (Lima *et al.* 2000). De acordo com estudos da Suframa (2003), a Região Amazônica brasileira possui cerca de 70 milhões de hectares propícios para o aumento de cultivo desta espécie distribuídos nos municípios de Tefé, Coari, Manicoré, Barcelos, Itacoatiara, Rio Preto da Eva, Iranduba, Manacapuru e Presidente Figueiredo, por possuir adequadas condições edafo-climáticas. Essas áreas atenderiam toda a demanda interna e externa, tornando o Brasil um dos maiores produtores mundiais.

Os benefícios ambientais da cultura do dendê também são relevantes, visto que o dendezeiro possui extraordinária capacidade de retenção de carbono nocivo à atmosfera, com a relação de 13 t de carbono absorvidos para cada hectare plantado (Junior & Muller, 2004).

Essa retenção de CO₂ pode gerar vantagens econômicas para o país, pois, o Brasil poderia enquadrar o biodiesel no acordo estabelecido no protocolo de Kyoto e nas diretrizes do Mecanismo do Desenvolvimento Limpo –MDL. Existe, então, a possibilidade de vendas de cotas de carbono por meio do Fundo Protótipo de Carbono – PCF, pela redução de emissões de gases poluentes, e também de créditos de seqüestro de carbono, por meio do Fundo Bio de Carbono- CBF, administrado pelo Banco Mundial (Lima, 2005).

Na tentativa de atender a demanda crescente dos produtos e serviços desta cultura, a biotecnologia agrícola surge como um promissor ramo na busca de novas técnicas que possibilitem a multiplicação clonal de genótipos elite selecionados em larga escala, sendo que a cultura de tecidos *in vitro* do dendezeiro oferece vantagens significantes, em comparação à propagação convencional, uma vez que a propagação do dendê é exclusivamente pela via sexuada (sementes), apresentando formação de plantas heterogêneas, fato que pode causar desuniformidade na produção e dificuldade o manejo da cultural (Viegas & Muller, 2000).

2.3 – Cultura de Tecidos de Plantas

A cultura de tecidos de plantas envolve diferentes técnicas, as quais um explante (célula, tecido ou órgão) é cultivado de forma asséptica em um meio nutritivo, e sob condições controladas de temperatura e luminosidade (Souza *et al.*, 2006). O princípio básico da cultura de tecidos de plantas é a totipotencialidade das células, ou seja, a capacidade de qualquer célula vegetal poder originar um novo indivíduo, em razão de a célula conter toda a informação genética necessária para a regeneração completa de outra planta, teoria proposta por Schleiden, em 1838, e Schawann, em 1839 (Gautherete, 1983). Porém, somente em 1902 é que o botânico alemão Haberlandt mostrou a aplicação prática desta teoria *in vitro*,

culminando com a formulação do conceito de cultura asséptica de células ao cultivar células de tecidos somáticos de plantas em solução nutritiva (Krikorian & Berquam, 1969).

As técnicas de cultura de tecidos de plantas tem sido aplicadas, de modo geral, para eliminar vírus e outros patógenos, sistêmicos ou não, na conservação e intercâmbio de germoplasma (Pasqual *et al.*, 1997), e na propagação vegetativa, viabilizando a clonagem rápida de várias espécies e genótipos superiores, permitindo a formação de indivíduos geneticamente idênticos (Grattapaglia & Machado, 1998).

A propagação vegetativa *in vitro* é uma técnica que pode ser indicada para espécies cuja propagação é feita exclusivamente via sexuada e que tenha custo elevado, como no caso das palmeiras e para espécies que produzem poucas sementes (Higashi *et al.*, 2000).

A principal vantagem da propagação vegetativa *in vitro* se constitui na produção de um elevado número de plantas num curto espaço de tempo e ocupando uma área física bastante reduzida, se comparada com os métodos convencionais de multiplicação (Souza *et al.*, 2006). Outra vantagem nesse processo é a retirada dos explantes sem a destruição da planta matriz, um fator de considerável importância em se tratando da raridade da planta.

Para que ocorra a propagação vegetativa é necessário que ocorra diferenciação celular do explante utilizado. Desse modo, as células devem apresentar competência para responder a um determinado estímulo específico, processo intimamente ligado a reguladores da atividade gênica (kerbauy, 1999). Os reguladores de crescimento exercem sua ação por reconhecimento de receptores específicos presentes em células responsivas, traduzindo os sinais hormonais em eventos bioquímicos e fisiológicos (Guerra *et al.*, 1999).

Outro fator limitante para a capacidade das células em se diferenciar e rediferenciar, podem ser impostas pelos componentes orgânicos e inorgânicos dos meios de cultura (Wareing & Phillips, 1982). Em se tratando de palmeiras, os meios de cultura mais utilizados são o de MS (Murashige & Skoog (1962) e o Y3 (Eeuwens, 1976). O meio Y3, possui uma

composição e sais minerais semelhantes ao do meio de MS, diferindo apenas nas concentrações mais reduzidas de nitrogênio.

O nitrogênio sob forma de nitrato de amônio é um elemento chave no meio de cultura de MS. Este componente afeta numerosas respostas *in vitro*, sendo determinante no sucesso da embriogênese somática (Ammirato, 1983; Leljak-Levanic *et al.*, 2004; Elkonin & Pakhomova, 2000; Poddar *et al.*, 1997). Por ser constituinte de várias biomoléculas essenciais como: aminoácidos, ácidos nucleicos, proteínas, enzimas e outros, sua assimilação se dá em diversos processos metabólicos da planta. (Magalhães & Wilcox, 1987). Em meio contendo nitrogênio na forma de nitrato, a adição do aminoácido L-glutamina favorece as respostas *in vitro*, verificado por uma maior produção de embriões somáticos (Higashi *et al.*, 1997).

Segundo Ammirato (1983) a diferenciação celular também é inibida em meio de cultura desprovido de ferro. Este elemento é essencial nas transformações energéticas, e está diretamente implicado no metabolismo de ácidos nucleicos atuando como ativador enzimático (Caldas *et al.*, 1998; Utino *et al.*, 2001). Assim como o potássio, que é absorvido pelas plantas na forma de K^+ e é usualmente o catiônico mais abundante nas células vegetais, seu principal papel é o de ativador de numerosas enzimas (Caldas *et al.*, 1998; Figueiredo *et al.*, 2008)

Além dos compostos inorgânicos, as plantas cultivadas *in vitro* requerem a adição de carboidratos, como a sacarose, para suprir as necessidades metabólicas, seja participando na geração de energia ou como fontes de esqueletos carbônicos para os vários processos biossintéticos implicados na diferenciação e crescimento celular (Leifert *et al.*, 1995).

O processo de diferenciação celular reflete, em última análise, o efeito de pelo menos três grupos de fatores: o fator genético, as características originadas durante a ontogênese e as características cuja expressão depende apenas do ambiente (Kerbauy, 1999). Contudo, a propagação vegetativa *in vitro* pode manifestar sua totipotência, influenciada por diversos fatores, segundo duas rotas alternativas: organogênese e embriogênese somática, e ambos

podem ser desenvolvidos por via direta (sem a formação de calos) ou por via indireta (com a formação de calos) (Pasqual *et al.*, 1997)

2.4– Embriogênese somática

A embriogênese somática direta consiste em uma produção de embriões somáticos a partir de células do explante, ou seja, sem a formação de estágios de calo (Pasqual *et al.*, 1997; Sharp *et al.*, 1980). Em trabalhos desenvolvidos por Guerra & Handro (1998), foram utilizados embriões zigóticos e inflorescência imatura de *Euterpe edulis* como fonte de explante, submetidos a 100 mg.L⁻¹ de 2,4-D. Esses autores observaram o surgimento de estruturas globulares que correspondiam a embriões somáticos no estágio globular, conferindo um modelo direto.

O segundo padrão corresponde a uma produção indireta de embriões somáticos, decorrente da formação de calo embriogênico, caracterizado por uma massa de células meristemáticas (Grattapaglia & Machado, 1998). Moura *et al.* (2009) constataram na embriogênese somática de macaúba, que após 50 dias de cultivo em meio de indução, o explante havia formado calo, com aspecto nodular, conferindo um modelo indireto. Esses mesmos autores evidenciaram a partir de cortes histológicos, que as massas meristemáticas eram formadas por células pequenas, isodiamétricas, de citoplasma denso e núcleo evidente.

Em ambos os padrões, seja embriogênese somática direta ou indireta, o embrião somático segue a mesma seqüência de desenvolvimento do zigótico, ou seja, a passagem pelos estágios globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar. E as células-mães embriogênicas apresentam um conjunto de características comuns ao comportamento de células embrionárias em divisão ativa: tamanho reduzido, conteúdo citoplasmático denso, núcleos grandes com

nucléolos proeminentes, vacúolos pequenos e presença de grãos de amido (Guerra *et al.*, 1999).

Para a indução de calos, teoricamente qualquer tecido pode ser utilizado como explante tendo em vista a totipotencialidade das células vegetais. Entretanto, procura-se utilizar explantes que contenham maior proporção de tecido meristemático. Os explantes oriundos de tecidos jovens e com maior atividade metabólica são mais adequados para estimular a formação de calo (Grattapaglia & Machado, 1998).

Em palmeiras alguns protocolos de embriogênese somática já foram feitos utilizando-se preferencialmente como explantes embriões zigóticos (Teixeira *et al.*, 1993; Ledo *et al.*, 2002) folhas e inflorescências imaturas (Schwendiman *et al.*, 1988; Teixeira *et al.*, 1994; Karun *et al.*, 2004; Guerra & Handro, 1998) e ovários não fertilizados (Pereira *et al.*, 2007).

As condições para promover a embriogênese somática estão relacionadas com a presença de reguladores de crescimento, estresses osmóticos, alterações de pH, choques térmicos e tratamentos com diferentes substâncias (Guerra *et al.*, 1999). Entretanto, as auxinas são essenciais no processo de indução da embriogênese somática (Fehér *et al.*, 2002).

2.4.1 -Indução da embriogênese somática

Na indução da embriogênese somática são utilizados como fonte de explantes, tecidos embrionários ou juvenis, submetidos a altas concentrações das auxinas ANA, 2,4-D e/ou Picloram (Guerra *et al.*, 1999). Já foram descritos na literatura vários estudos para a indução da embriogênese somática em palmeiras. De modo geral, concentrações elevadas de 2,4-D são utilizadas para a obtenção de culturas embriogênicas, com subsequente formação de embriões somáticos (Guerra e Handro, 1998; Teixeira *et al.*, 1993; Paranjothy *et al.*, 1989; Duval *et al.*, 1988).

A influência do 2,4-D (ácido 2,4- diclorofenoxiacético) na indução da embriogênese somática está bem documentada (Dudits *et al.*, 1995). Fehér *et al.* (2003) propuseram que o 2,4-D, quando acima de uma determinada concentração, possui um duplo efeito nas culturas: como uma auxina (diretamente ou através do metabolismo endógeno), e como um agente de estresse. A ativação simultânea da resposta ao estresse e aos sinais de auxina pode ser um evento chave na adaptação celular, causando reprogramações genéticas, metabólicas e fisiológicas, que resultam na competência embriogênica das células somáticas.

Alguns protocolos já foram descritos para palmeiras utilizando como explante embriões zigóticos e inflorescências imaturas. Texeira *et al.* (1993) trabalhando com embriões zigóticos imaturos de dendê, observaram que na fase de indução os explantes começaram a formar tecidos embriogênicos após duas semanas em meio de cultura suplementado com 500µM de 2,4-D. Guerra & Handro (1998) utilizou embriões zigóticos e inflorescência imatura de *Euterpe edulis* como fonte de explante, submetidos a 100 mg.L⁻¹ de 2,4-D. Esses autores observaram o surgimento de estruturas globulares que correspondiam a embriões somáticos no estágio globular, conferindo um modelo direto.

Na fase de indução também são observados bons resultados com folhas jovens de dendê. Besse *et al.*, (1992) obtiveram formação de calos nodulares compactos e calos friáveis, quando as folhas jovens foram submetidas a concentrações elevadas de 2,4-D.

A utilização do picloram também é bastante citado na indução e obtenção de calos embriogênicos (Titon, *et al.*, 2007). Huong *et al.* (1999) observaram que altas concentrações picloram no meio de cultura foi um pré-requisito para a indução de calos embriogênicos nodulares em *Phoenix canariensis*.

2.4.2 – Multiplicação de culturas embriogênicas

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 nessa fase que geralmente suspensões celulares são estabelecidas (Gorret *et al.*, 2004). Nesse sentido, alguns protocolos já foram descritos para palmeiras, no qual, houve a regeneração de plantas através de suspensões de células embriogênicas, oriundas de calos de folhas de dendê (Touchet *et al.*, 1991; Tarmizi *et al.*, 2004). Já Teixeira *et al.* (1995), obtiveram calos embriogênicos a partir de embriões zigóticos de dendê, submetidos a 250µM de picloram, e estabeleceram suspensões embriogênicas em meio de cultura Y3 suplementando com 10µM de 2,4 – D.

2.4.3 – Maturação dos embriões somáticos

Na fase de diferenciação celular e maturação dos embriões somáticos é necessário fornecer os estímulos fisiológicos para interromper os ciclos repetitivos de divisão celular, para que ocorra o início da diferenciação e obtenção de embriões somáticos maduros (Guerra *et al.*, 1999). As concentrações e os reguladores de crescimento utilizados nessa fase podem variar de acordo com a espécie. Kanchanapoom & Domyoas (1999) utilizaram dois meios de cultura sucessivos para a diferenciação dos embriões somáticos e regeneração de plantas,. O primeiro meio foi o de MS isento de reguladores de crescimento, mas com 0,05% de carvão ativado, e o segundo, continha 0,1 mg.L⁻¹ de BAP e 2,5 mg.L⁻¹ de 2,4-D. Já no protocolo desenvolvido por Guerra & Handro (1998) em *E. edulis*, os calos embriogênicos foram maturados em meio de cultura suplementando com 2,5 mg.L⁻¹ de 2-iP e 0,1mg.L⁻¹ de ANA.

Ledo *et al.* (2002) observaram que o meio de cultura suplementado com ANA e 2iP foi eficiente para a multiplicação e manutenção de calos embriogênicos de *Euterpe oleracea* Mart., além de promover a progressão dos calos em estágios mais avançados dos embriões somáticos, pelos autores observarem um desenvolvimento embriogênico não sincronizado para esta espécie.

2.4.4 – Germinação dos embriões somáticos

Após obtenção dos embriões somáticos maduros, a germinação é usualmente realizada em meio de cultura livre de reguladores de crescimento (Komatsuda *et al.*, 1992; Fernández-Guijarro *et al.*, 1995). Moura *et al.* (2006) estudando a germinação de embriões somáticos na fase cotiledonar de macaúba, em meio de cultura isento de reguladores de crescimento, observou a formação de radícula após 15 dias da inoculação. Hilae & Te-chato (2005), estudaram fontes de carbono na germinação de embriões somáticos de dendê. Esses autores verificaram que a maior porcentagem de germinação foi obtida em meio de MS suplementado com 0,2M de sorbitol. Também observaram que a alta concentração de sacarose ou sorbitol promoveram a formação de raízes.

2.5 – Propagação *in vitro* de palmeiras

Os primeiros estudos *in vitro* com palmeiras foram realizados por Cutter Junior & Wilson (1954), usando embriões zigóticos como fonte de explante de *Cocos nucifera* L. A partir desses resultados foram obtidos avanços consideráveis na propagação vegetativa *in vitro* de palmeiras e, os estudos até agora, têm demonstrado o potencial desta técnica.

Diversos trabalhos são encontrados na literatura com embriogênese somática em palmeiras. Teixeira *et al.* (1995) estabeleceram um protocolo de suspensões celulares em dendezeiro utilizando embriões zigóticos maduros e imaturos como fonte de explantes. Os meios de cultura para a indução de calo foi o de MS e o Y3, contendo diferentes tratamentos de auxinas (475-500 μ M de 2,4-D e 250 μ M de picloram), e suplementando com 0,3% de carvão ativado. Após esse período foram diferenciados calos embriogênicos friáveis e calos globulares em todos os tratamentos. Culturas de suspensão das linhagens celulares foram estabelecidas em meio de cultura Y3, adicionado com 10 μ M de 2,4-D. Nesta fase, a diferenciação dos embriões somáticos só foi observada em suspensões de células oriundas de calo embriogênico friável. As plantas oriundas da germinação dos embriões somáticos cresceram satisfatoriamente em condições de estufa.

Kanchanapoom & Domyoas (1999) utilizaram embriões zigóticos de dendê para estabelecer um protocolo de embriogênese somática. O material vegetal foi inoculado em meio de cultura Y3 suplementando com 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D para a fase de indução. Após oito semanas da inoculação foi iniciada a formação de calos. Em seguida, para a diferenciação dos embriões somáticos e regeneração de plantas, dois meios de cultura sucessivos foram empregados. O primeiro meio foi o de MS isento de reguladores de crescimento, mas com 0,05% de carvão ativado, e o segundo, continha 0,1mg.L⁻¹ de BAP e 2,5mg.L⁻¹ de 2,4-D. As análises histológicas evidenciaram que os calos tiveram origem das células da subepiderme dos explantes.

O protocolo desenvolvido por Touchet *et al.* (1991) utilizou suspensão celular de calos embriogênicos obtidos a partir de segmentos de folhas imaturas de dendezeiro. O meio de cultura para indução da embriogênese somática foi o de MS adicionado de 30 mg.L⁻¹ de BAP, 1,0 mg.L⁻¹ de carvão ativado e quatro concentrações de 2,4-D (80, 100, 150 e 150 mg.L⁻¹). As concentrações de 80 e 100 mg.L⁻¹ de 2,4-D foram consideradas as mais efetivas para

produção de células embriogênicas com características pró-embriônicas. Para a proliferação, os meios de cultura continham 2,4-D nas concentrações de 25, 50 e 100 mg.L⁻¹, sendo que a concentração de 100 mg.L⁻¹ demonstrou manter o potencial embriogênico após 18 semanas de cultivo. O meio de cultura empregado na regeneração foi o de MS sem reguladores de crescimento, dando origem a plantas que depois de enraizadas foram transferidas para casa de vegetação.

O protocolo desenvolvido por Guerra & Handro (1998), utilizou embriões zigóticos de *Euterpe edulis* como fonte de explante, inoculados em meio de cultura de MS suplementando com 3,0g.L⁻¹ de carvão ativado e 100 mg.L⁻¹ de 2,4-D. Os embriões zigóticos apresentaram estruturas granulares translúcidas, que caracterizou os estágios iniciais da embriogênese somática direta, apresentando embriões somáticos globulares. Após esse período, os pró-embriões foram transferidos para o mesmo meio de cultura, porém suplementando com 2,5mg.L⁻¹ de 2-iP e 0,1mg.L⁻¹ de ANA, o que resultou na progressão para um estágio de desenvolvimento bipolar. Em seguida os embriões somáticos na fase madura, foram transferidos para meio de cultura de MS reduzido pela metade das concentrações, sem a presença de reguladores de crescimento. Nesta fase, pode-se observar a conversão em plântulas, apresentando o mesmo padrão da germinação dos embriões zigóticos.

Ammar & Benbadis (1977) observaram o desenvolvimento de calos a partir da bainha cotiledonar de embriões de *Phoenix dactylifera* L. em meio enriquecido com 10⁻⁶M de ANA, 10⁻⁷M de KIN e 15% de água de coco. Karunaratne *et al.* (1985) obtiveram 62% de formação de plântulas em *Cocos nucifera* L., em meio líquido Y3, sendo que a presença de carvão ativado e de altas concentrações de sacarose foram importantes para o crescimento de embriões.

2.6 - Estudos anatômicos

O emprego das técnicas de análise anatômica permite detalhar os eventos que ocorrem quando espécies vegetais são cultivadas *in vitro*. Nessa nova condição em que as células, tecidos e órgãos vegetais são submetidos, podem expressar um potencial morfogênico que não se expressariam *in vivo*. Estudos histológicos podem ser realizados para a verificação e confirmação do desenvolvimento das gemas adventícias (organogênese) ou de embriões somáticos (embriogênese somática) e a definição da origem direta ou indireta (Rodrigues *et al.*, 2004).

As alterações histológicas associadas com a posição e a atividade das células competentes têm sido bastante estudadas durante a embriogênese somática. Moura *et al.* (2009) constataram que a embriogênese somática de macaúba (*Acrocomia aculeata*), obtida a partir de embriões zigóticos, originava-se de células do procâmbio ou de células perivasculares, que proliferavam produzindo massas meristemáticas em meio de indução. A iniciação do desenvolvimento da embriogênese somática do dendezeiro (*Eleais guineensis*) a partir de folhas jovens revelou, pela análise morfológica e anatômica, acentuada divisão nas células perivasculares, sendo o centro de origem das células meristemáticas, seguido de formação de calo (Schwendiman *et al.*, 1988).

Estudos histológicos das culturas embriogênicas oriundas de embriões zigóticos de *Euterpe edulis* evidenciaram que a origem das massas meristemáticas foram a partir de tecidos da subepiderme (Guerra & Handro, 1998). Esses mesmos autores descreveram os pro-embriões e os embriões nos diferentes estágios de maturação. Neste sentido, o acompanhamento e a identificação das estruturas presentes nos diferentes estágios durante a embriogênese somática, bem como os embriões zigóticos de dendezeiro, por meio de estudos

anatômicos são necessários para melhor entendimento dos processos morfogênicos e maximização de protocolos eficientes de clonagem da espécie.

2.7 – Estudos proteômicos

A proteômica refere-se ao conjunto de proteínas expressas pelo genoma de um organismo num dado momento ou condição (Wasinger *et al.*, 1995). Esta técnica permite fazer avaliações quantitativas e qualitativas das proteínas que atuam no metabolismo celular (Chen & Harmon, 2006). Conseqüentemente, a identificação de proteínas expressas diferencialmente permite a associação destes polipeptídeos com diferentes eventos fisiológicos que ocorrem nas células, tecidos e órgãos (Kormuták *et al.*, 2006).

Os protocolos para a realização da técnica são bem estabelecidos, variando em detalhes específicos a cada espécie analisada. Existe uma seqüência básica de atividades necessárias para a realização da análise proteômica quantitativa, utilizando 2-DE como meio de separação das proteínas (Santos *et al.*, 2004). A técnica 2-DE consiste em separar as proteínas de acordo com seu ponto isoelétrico, seguido do peso molecular dando lugar a comparação do conteúdo de cada uma das proteínas produzidas em diferentes células ou tecidos e em diferentes estados fisiológicos (Rabilloud, 2002). Esta técnica tem sido extensamente utilizada para a separação e análise de misturas complexas de proteínas e tem permitido a criação de bancos de dados de proteínas identificadas de várias espécies (Santa-Catarina *et al.*, 2004, kormuták & Vooková, 1997; Wheeler *et al.*, 1996).

A proteômica possui diversas aplicações, como o estudo de modificações pós-traducionais, estudos de interação proteínas-proteínas e suas possíveis aplicações no desenvolvimento de mecanismos de defesa, assim como o estudo da proteômica estrutural que visa o estudo da composição protéica de organelas e membranas (Dias *et al.*, 2000). Porém,

recentemente os padrões protéicos vêm sendo utilizados como marcadores moleculares estágios - específicas no processo de embriogênese somática em diferentes sistemas. Nascimento (2009) estudando os perfis protéicos de calos embriogênicos e não embriogênicos de pupunha, ao longo de diferentes estágios da embriogênese somática, identificaram um maior *pool* de proteínas em calos embriogênicos do que nos tecidos não embriogênicos. Essas proteínas são candidatas a marcadores moleculares da competência embriogênica dessa espécie.

Nos embriões somáticos de *Ocotea catharinensis* obteve-se a identificação de proteínas diferencialmente expressas; a germina apresentou maior expressão nos estágios globular e cotiledonar, enquanto a quitina apresentou maior expressão nos estágios cotiledonar inicial e maduro (Moraes, 2006). Dupire *et al.* (1999) utilizando a 2-DE analisaram as proteínas expressadas em culturas embriogênicas de tecidos mutantes e de tipos selvagens de *Asparagus officinalis* L., classificando 116 proteínas em 20 grupos potencialmente relacionados com a embriogênese somática. Seis polipeptídios foram específicos para o tipo mutante e poderiam estar relacionados com a competência dos tecidos à embriogênese somática. Onze proteínas foram detectadas especificamente nos tecidos do tipo selvagens e sua presença poderia estar relacionada com a inibição da embriogênese somática.

Nesse sentido, a utilização de marcadores moleculares estágios – específicos, como as proteínas, representa uma importante estratégia para a otimização e controle dos estágios da embriogênese somática, bem como dos embriões zigóticos de *E. guineensis*.

3 – Referências bibliográficas

ABERLENC-BERTOSI, F., NOIROT, M., DUVAL, Y. BA enhances the germination of oil palm somatic embryos derived from embryogenic suspension cultures. *Plant Cell, Tissues and Organ Culture*, v. 56, 53-57p., 1999.

ANITHA, K., SAJINI, K.K. Plantlet regeneration from leaf explants of oil palm. *Curret Science*, v. 71, 922-956p., 1996.

AMMAR, S., BENBADIS, A. Multiplication vegetative du palmier-dattier (*Phoenix dactylifera* L.) par la culture de tissus de jeunes plantes issues de semis. *Comptes Rendus des Sceances de l'Académie des Sciences. Serie III: Sciences de La Vie*, Paris, France, v. 284, 1789-1792p., 1977.

AMMIRATO, P. V. Embryogenesis. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V. and YAMADA, Y. (eds) *Handbook of plant cell culture*, vol 1. Macmillan, New York, 82–123p., 1983.

ARAUJO, A. G. de; JUNQUEIRA, K. P.; SANTOS, F. C. e RODRIGUES, V. A. Fontes de potássio no crescimento *in vitro* de plantas de orquídea *Cattleya loddigesii*. *Ciência Rural*. vol.38 n.1 , 2008.

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

BELTRÃO, N.E.M. O agronegócio do algodão no Brasil. Primeira edição, EMBRAPA, Campina Grande – PB, v.1, 1999.

BILLOTTE, N., NOYER, J.L., KOUAMÉ, B., BAUDOUIN, L., GLASZMAN, J.C., LAGODA, P. Identification of a candidate marker for shell presence in the oil palm using amplified fragment length polymorphism (AFLP) by bulked segregant analysis (BSA). *Plant and Animal Genomes Conference*, 7, 1999-01-17/1999-01-21, San Diego, Etats-Unis.

BRASIL. Lei n.º 11097, de 13 de janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira. *Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil*. Brasília, DF.

BRASIL. Lei n.º 11116, de 18 de maio de 2005. Dispõe sobre o Registro Especial, na Secretaria da Receita Federal do Ministério da Fazenda, de produtor ou importador de biodiesel e sobre a incidência da Contribuição para o PIS/Pasep e da Cofins sobre as receitas decorrentes da venda desse produto. *Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil*. Brasília, DF.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, v.2. p.87-132 p., 1998.

CAMILLO, J., LUIS, Z.G., SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. Tolerância de sementes de dendezeiro à criopreservação Pesq. agropec. bras., Brasília, v.44, n.2, 211-215p., 2009.

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

CGIAR (Consultive Group on International Agricultural Research) People and plants: the development agenda. Rome, IBPGR, 1993.

CHEN, S.; HARMON, A.C. Advances in plant proteomics. Proteomics, v. 6, p. 5504-5516, 2006.

DEORE A.J. & JOHNSON T.S. High frequency plant regeneration from leaf-disc cultures of *Jatropha curcas* L.: an important biodiesel crop, Plant Biotechnol Rep., 2008

DIAS, L.L.C., FLOH, E.L.S., SANTA-CATARINA, C., SILVEIRA, V. Proteômica comparativa aplicada à cultura de tecidos de plantas. Rio de Janeiro: Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), 7 p., 2000.

DUDITS, D.; GYORGYEY, J.; BOGRE, L.; BAKÓ, L. Molecular biology of somatic embryogenesis. In: THORPE, T.A. In vitro embryogenesis in plants. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 267-308.

DUFOUR, F.; QUENCEZ, P.; SCHMITY, G. Technique de culture en solutions nutritives du palmier à huile et du cocotier. Oléagineux, Paris, v. 33, n. 10, p. 485- 490, oct. 1988

DUPIRE, L.; DÉCOUT, E.; VASSEUR, J.; DELBREIL, B. Histological and 2-D protein patterns comparisons between a wild type and a somatic embryogenic mutant of *Asparagus officinalis* L. Plant Science, v. 147, p. 9 –17, 1999.

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

EEUWENS, C. J. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissues explants excised from mature coconut (*Cocos nucifera* L.) and date palm (*Phoenix dactylifera*) palms cultured *in vitro*. Physiologia Plantarum. Copenhagen, v.36 n.1, p.23-28, 1976.

ELKONIN, L. A. e PAKHOMOVA, N. V. Influence of nitrogen and phosphorus on induction embryogenic callus of sorghum. Plant Cell, and Tissue Organ Culture. 61:115–123; 2000.

ENGELMANN, F. Plant cryopreservation: Progress and prospects. *In vitro Cell. Dev. Biol. – Plant.* v. 40: 427-433, 2004.

ENGELMANN, F. *In vitro* germplasm conservation. *Proc. Int. Symp. Biotechnology Tropical & Subtropical Species.* Ed. R.A.Drew, Acta Hort. 461, ISHS, 1998.

FAIAD, M.G.R., SALOMÃO, A.N., FERREIRA, F.R., GONDIM, M.T.P., WETZEL, M.M.V. da S., MENDES, R.A., GOES, M. de., MIRANDA, A.R., de. Manual de procedimentos para conservação de germoplasma-semente a longo prazo na Embrapa. Brasília: Embrapa – Cenargen, 21p., 1998. (Embrapa – Cenargen. Documentos, 30).

FEITOSA, T., BASTOS, J.L.P., PONTE, L.F.A., JUCÁ, T.L., CAMPOS, F.A.P. Somatic embryogenesis in cassava genotypes from the northeast of Brazil. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, v. 50, 2007.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T.; ÖTVÖS, K.; MISKOLCZI, P.; DUDITS, D. Induction of embryogenic competence in somatic plant cells: a review. *Biologia*, v. 57, p. 5–12, 2002.

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

FERNÁNDEZ-GUIJARRO, B., CELESTINO, C., TORIBIO, M. Influence of external factors on secondary embryogenesis and germination in somatic embryos from leaves of *Quercus suber*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 41, 99-106, 1995.

FIUKA., RYBCZYNSKI, J. J. Genotype and plant growth regulator-dependent response of somatic embryogenesis from *Gentiana* spp. leaf explants. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* 44:90 - 99, 2008.

GAUTHERET, R.J. Plant tissue culture: a history. *Botanical Magazine*, v. 99, 393-410, 1983.

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

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, inoculum size, and conditioned medium on biomass production. *Journal of Biotechnology*, v. 108, p. 253-263, 2004.

GOVAERTS, R., DRANSFIELD, J. *World checklist of palms. 1.* Kew: Royal Botanic Gardens, 2005.

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. 111:65-71, 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. (ads.). *Culturas de tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Brasília, Embrapa-CBAB. V.2, 533-568, 1999.

HIGASHI, K., KAMADA, H., HARADA, H. The effects of reduced nitrogenous compounds suggests that glutamine synthetase activity is involved in the development of somatic embryos in carrot. *Pl. Cell Tis. Org. Cult.*, 45: 109-114, 1997.

HIGASHI, E.N., SILVEIRA, R.L.V.A., GONÇALVES, A.N. Propagação vegetativa de eucalyptus: princípios básicos e a sua evolução no Brasil. Instituto de pesquisas e Estudos Florestais, Circular Técnica, n. 192, 14 p., 2000.

HILAE, A., TE-CHATO, S. Effects of carbon sources and strength of MS medium on germination of somatic embryos of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *J. Sci. Technol.*, v. 3, 629-635, 2005.

HUONG, L.T.L., BAIOTTO, M., HUY, B.P., MEZZETTI, B., SANTILOCCHI, R., ROSATI, P. Somatic embryogenesis in Canary Island date palm. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 56: 1-7, 1999.

IBPGR (International Board for Plant Genetic Resources) *Geneflow: a publication about the earth's plant genetic resources*. Rome, Italy, pp. 19, 1993.

JÚNIOR, J. F.; MÜLLER, A. A. A agricultura familiar e a dendecultura na Amazônia. Comunicado Técnico 107. Embrapa. Belém, PA, dezembro. 2004.

KARUN, A.; SIRIL, E. A.; RADHA, E. e PARTHASARATHY, V. A. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from leaf and inflorescence explants of arecanut (*Areca catechu* L.). *Current Science*, v. 86, n. 12, 25 JUNE 2004.

KARUNARATNE, S., KURUKULAARACHCHI, C., GAMAGE, C.A. A report on the culture of embryos of dwarf coconut, *Cocos nucifera* L. var *nana*, *in vitro*. *Cocos*, Sri Lanka, v.3, p.1-8, 1985.

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

ERBAUY, G.B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S., BUSO, J.A. (Eds.). *Cultura de tecidos e*

transformação genética de plantas. Brasília: EMBRAPA – SPI/ EMBRAPA-CNPq, v. 2 p. 519-531, 1999.

KORMUTÁK, A.; SALAJ, T.; VOOKOVÁ, B. Storage protein dynamics in zygotic and somatic embryos of white fir. *Biologia Bratislava*, v. 61, p. 479-485, 2006.

KORMUTÁK, A., VOOKOVÁ, B. Biochemical variation between non-embryogenic and embryogenic call of silver fir. *Biologia Plantarum*, v.39, 125-130, 1997.

KOMATSUDA, T., LEE, W., OKA, S. Maturation and germination of somatic embryos as affected by sucrose and plant growth regulators in soybeans *Glycine gracilis* Skvortz and *Glycine max* (L.) Merr. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, V. 18, 103-113, 1992.

KRIKORIAN, A.D., BERQUAM, D.L. Plant cell and tissue culture: the role of Haberlandt. *Botanical Review*, v. 35, 59-88, 1969.

LEDO, A. da S.; LAMEIRA, O. A.; BENBADIS, A. K.; MENEZES, I. C. de; OLIVEIRA, M. do S. P. de; FILHO, S. M. Embriogênese somática em embriões zigóticos de *Euterpe oleracea* Mart. *Revista Brasileira Fruticultura*, vol.24 nº.3 Jaboticabal Dec. 2002.

LEIFERT, C., MURPHY, K.P., LUMSDEN, P.J. Mineral and carbohydrate nutrition of plant cell and tissue culture. *Critical Reviews in Plant Sciences*. Boca Raton, v.14, número 2. p.83-109, 1995.

LELJAK-LEVANIC', D.; BAUER, N.; MIHALJEVIC', S. e JELASKA, S. Somatic embryogenesis in pumpkin (*Cucurbita pepo* L.): control of somatic embryo development by nitrogen compounds. *Journal Plant Physiology*. 161: 229–236; 2004.

LIMA, S.M.V., FILHO, A.F., CASTRO, A.M.G., SOUZA, H.R. Desempenho da Cadeia Produtiva do Dendê na Amazônia Legal. Fundação do Desenvolvimento da UFPE, Manaus, 2000.

LIMA, P.C.R. Biodiesel: um novo combustível para o Brasil. Câmara dos Deputados. Brasília, 2005.

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, 432 p., 2004.

LOW, E., ALIAS, H., BOON, S., SHARIFF, E.M., TAN, C.A., OOI, L.C., CHEAH, S., RAHA, A., WAN, K., SINGH, R. Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) tissue culture ESTs: Identifying genes associated with callogenesis and embryogenesis. *Plant Biology*, 8:62 doi:10.1186/1471-2229-8-62, 2008

MAPA, Ministério da Agricultura , Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Produção e Agroenergia. Plano Nacional de Agroenergia, 2006-2011, 2º edição revisada. Brasília, DF, 2006.

MAGALHÃES, J. R. e WILCOX, G. E. Interação entre formas de nitrogênio e reguladores de crescimento. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, n.22. v.6. p. 576-585, 1987.

MIRANDA,R. de M.; MOURA, R.D – Óleo de dendê, alternativa ao óleo diesel como combustível para geradores de energia em comunidade da Amazônia. Anais 3º Encontro de Energia do Meio Rural. Sept. Embrapa Amazônia Ocidental - Manaus-AM- 2000.

MOORE H, E. Jr. The major groups os palms and their distribution. Gentes Herbarum, 11: 27-141, 1973.

MORAES, F.M.S. Análise proteômica da embriogênese somática e da aquisição de competência embriogênica de *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauracea). Dissertação de Mestrado. Brasília: Universidade de Brasília, 90p., 2006.

MOURA, E.F., VENTRELLA, M.C., MOTOIKE, S.Y., JUNIOR, A.Q.S., CARVALHO, M., MANFIO, C.E. Histological study of somatic embryogenesis induction on zygotic embryos of macaw palm (*Acrocomia aculeate* (Jacq.) Lodd. ex Martius). Plant Cell Tiss Organ Cult 95:175–184, 2009

MPOB (Malaysian Palm Oil Board Statistics). The World's Largest Palm Oil Exporter 2009. Disponível em < http://www.mpoc.org.my/Malaysian_Palm_Oil_Industry.aspx> acesso em: 05/01/10 13:27.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioessays with tobacco tissue cultures. Physiology Plantarum, Copenhagen, v. 15, p. 473-479, 1962.

NASCIMENTO, M.C.A. Proteômica e caracterização bioquímica da embriogênese em pupunha (*Bactris gasipaes*). Dissertação de mestrado. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 84p., 2009.

PANDOLFO, C.A. A cultura do dendê na Amazônia. Belém: SUDAM, 35p., 1981.

PASQUAL, M., HOFFMANN, A., RAMOS, J.D. Cultura de tecidos: tecnologia e aplicações – introdução: fundamentos básicos. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997.

PARANJOTHY, K.; OTHMAN, R.; TAN, C. C.; WONG, G. e SOH, A. C. Incidence of abnormalities in relation to in vitro protocols. In: RAO, V.; HENSON, I. E. e RAJANAIDU, N. (eds) Recent developments in oil palm tissue culture and biotechnology. Palm Oil Research Institute of Malaysia (PORIM), Kuala Lumpur, pp 70–85. (Proceedings of the 1993

ISOPB International Symposium on Recent Developments in Oil Palm Tissue Culture and Biotechnology, Kuala Lumpur, 24–25 September 1993), 1995.

PERERA, P. P.; HOCHER, V. VERDEIL, J. L.; DOULBEAU. S.; YAKANDAWALA, D. M. D. and WEERAKOOM, L. K. Unfertilized ovary: a novel explant for coconut (*Cocos nucifera* L.) somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*. 26:21–28, 2007.

PODDAR, K.; VISHNOI, R. K. and KOTHARI, S. L. Plant regeneration from embryogenic callus of finger millet *Eleusine coracana* (L.) Gaertn. on higher concentrations of NH₄NO₃ as a replacement of NAA in the medium. *Plant Science*. 129:101–106; 1997.

RABILLOUD, T. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but still climbs up the mountains. *Proteomics*, v.2, 3-10, 2002.

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*, 75: 41-47, 2003.

RAJU, C.R., SAJINI, K.K., BALACHANDRAN, S.M., SAJI, K.V., GEETHA, M.K., RAJASEKHARAN, P.E, GEETHA, L., AHAMED, B.K.V. Clonal multiplication of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Journal Plant. Crops*, v. 16, 17-20, 1989.

RESENDE, M.D.V., VALOIS, A.C., HIGA, A.R., SHIMIZU, J.Y., HIGA, R.C.V. Workshop sobre melhoramento de espécies florestais e palmáceas no Brasil. Documento 62, Embrapa, Colombo – PR, 2001.

RODRIGUES, R.A., ACCARINI, J.H. Programa Brasileiro de Biodiesel. Biocombustíveis no Brasil: Realidades e perspectivas. Brasília, DF, 2004.

SANTA-CATARINA, C., HANAI, L.R., DORNELAS, M.C., VIANA, A.M., FLOH, E.I.S. Sherk gene homolog expression, polyamines and amino acids associated with somatic embryogenic competence of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 79, 53-61, 2004

SOUZA, H. M., LORENZI, H. Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Instituto Plantarum, Nova Odessa, 2005.

SANTOS, P. M.; TEIXEIRA, M. C.; SÁ-CORREIA, I. A Análise Proteômica Quantitativa na Revelação de Mecanismos de Resposta a stresse químico em microrganismos. *Boletim de Biotecnologia*, 2004.

SCHWENDIMAN, J., PANNETIER, C., MICHAUX-FERREIRA, N. Histology of somatic embryogenesis from leaf explants of the oil palm *Elaeis guineensis*. *Annls of Botany*, v. 62: 43-52, 1988.

SOUZA, F.V.D., JUNGHANS, T.G., SOUZA, A.S., SANTOS-SEREJO, J.A., COSTA, M.A.P.C. Micropropagação. In: SOUZA, A.S., JUNGHANS, T.G (Eds.). Introdução a micropropagação de plantas. Bahia, Embrapa, 38-52, 2006

SHARP, W.R., SONDAHL, M.R., CALDAS, L.S., MARAFFA, S.B. The physiology of in vitro asexual embryogenesis. *Hort. Rev.*, 2: 268-310, 1980.

SUFRAMA. Instituto Superior de Administração e Economia ISAE/Fundação Getúlio Vargas (FGV). Ministério do desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior Superintendência da Zona Franca de Manaus. Potencialidades regionais estudos de viabilidade econômica – sumários executivos. V.5 – Dendê. Manaus, Amazonas, 2003.

SURRE, C.; ZILLER, R. La palmera de aceite. Editorial Blume. Coleccion Agricultura Tropical. 1969.

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, 44-49, 2004.

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

TEIXEIRA, L.C. Potencialidade de oleaginosas para a produção de biodiesel. *Informe Agropecuário*, v. 26, p. 18-27, 2005.

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

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

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

UTINO, S.; CARNEIRO, I. F.; CHAVES, L. J. Crescimento e oxidação de explantes de bananeira prata (*Musa* AAB) *in vitro*: IV. Concentrações de sais, ácidos ascórbicos e frequência de subcultivos. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Cruz das Almas, v. 23, n. 2, p. 409-412, ago. 2001.

VEIGA, A.S.; SMIT, L.; FÚRIA, L.R.R. Avaliação do dendezeiro como opção para o seqüestro de carbono na Amazônia. In: VIÉGAS, I. de J.M.; MÜLLER, A.A. (ed). A cultura do dendezeiro na Amazônia Brasileira. Belém: EMBRAPA/CPATU,. 374p 2000

VILLALOBOS, V.M., FERREIRA, P., MORA, A. The use of biotechnology in the conservation of tropical germplasm. *Biotech Advances*, v. 9, p. 197-215, 1991.

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

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

WASINGER, V.C.; CORDWELL, S.J.; CERPA-POLJAK, A.; YAN, J.X.; GOOLEY, A.A.; WILKINS, M.R.; DUNCAN, M.W.; HARRIS, R.; WILLIAMS, K.W.; HUMPHERY-SMITH, I. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis*, v. 16, p. 1090-1094, 1995.

WHEELER, C. H., BERRY, S. L., WILKINS, M. R., CORBETT, J. M., OU, K., GOOLEY, A. A., HUMPHERY-SMITH, I., WILLIAMS, K. L., DUNN, M. J. Characterization of proteins from two-dimensional electrophoresis gels by matrix-assisted laser desorption mass spectrometry and amino acid compositional analysis. *Electrophoresis* 17:580-587, 1996.

WAREING, P.F., PHILLIPS, I.D.J. Growth and differentiation in plants. Oxford: Pergamon, 343p., 1982.

ZEVEN, A.C. On the origin of the Oil Palm. *Ghana Palynologica*. 5 (1) pp. 121-123, 1964.

Capítulo 1

RESPOSTAS DE GENÓTIPOS BRASILEIROS DE DENDEZEIROS (*Elaeis guineensis* JACQ.) À EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS

Resumo

Este trabalho teve como objetivo avaliar respostas de genótipos brasileiros de dendezeiros (*Elaeis guineenses*) à embriogênese somática. Foram utilizados embriões zigóticos obtidos de frutos maduros de nove genótipos: C2001, C2328, C2301, C3701, CM1115, C7201, C2528, C2501 e CN1637. Inicialmente, os embriões zigóticos foram inoculados em meio de cultura para a indução de calos (450 µM de Picloram), com subcultivos a cada 30 dias. Após 150 dias, os calos foram transferidos para dois meios de cultura visando à diferenciação e maturação de embriões somáticos: MTD -1 (0,6µM de ANA e 12,3 µM de 2-iP) e MTD-2 (40 µM de Picloram). Após 90 dias, os calos com embriões somáticos foram transferidos para o meio de regeneração, desprovido de reguladores de crescimento. Em todas as etapas os explantes foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25±2°C e sob condições de escuro. Verificou-se que os genótipos testados apresentam diferentes respostas morfogênicas *in vitro*. Na fase de indução, os genótipos C2501, C2001, C7201, C2528, C2328 e C3701 apresentaram os melhores resultados na formação de calos embriogênicos, com valores entre 90 e 100%. Após 90 dias de regeneração, os genótipos que apresentaram os melhores resultados para formação e regeneração de embriões somáticos foram o C2328 e CM1115. Os resultados obtidos constituem uma importante ferramenta para que se melhore a eficiência, o entendimento e a clonagem da espécie, seja para a produção de mudas em escala, seja para acelerar programas de melhoramento genético da cultura.

Palavras-chave: *Elaeis guineenses*, embriogênese somática, efeito genotípico, micropropagação.

Chapter 1

RESPONSES OF GENOTYPES BRAZILIAN OIL PALM (*Elaeis guineensis* Jacq.)

FOR SOMATIC EMBRYOGENESIS FROM ZYGOTIC EMBRYOS

Abstract

This study aimed to evaluate the responses of genotypes Brazilian oil palm (*Elaeis guineensis*) somatic embryogenesis. Zygotic embryos used were obtained from mature fruits of nine genotypes: C2001, C2328, C2301, C3701, CM1115, C7201, C2528, C2501 and CN1637. Initially, the zygotic embryos were inoculated in culture medium for callus induction (450 μ M Picloram), with sub culture every 30 days. After 150 days, callus were transferred to two culture media in order to differentiation and maturation of somatic embryos: MTD -1 (0.6 μ M NAA and 12.3 μ M 2-iP) and MTD-2 (40 μ M Picloram). After 90 days, the callus with somatic embryos were transferred to regeneration medium devoid of growth regulators. At all stages the explants were kept in growth room with temperature $25 \pm 2^\circ$ C and dark conditions. It was found that the genotypes have different morphogenic responses in vitro. In the induction phase, genotypes C2501, C2001, C7201, C2528, C2328 and C3701 showed the best results on embryogenic callus formation, with values between 90 and 100%. After 90 days of regeneration, the genotypes that showed the best results in the formation and regeneration of somatic embryos were C2328 and CM1115. The results are an important tool for improving the efficiency, understanding and kind of cloning, whether for the production of seedlings in scale, is to accelerate breeding programs of culture.

Keywords: *Elaeis guineensis*, somatic embryogenesis, genotypic effect, micropropagation.

1 – Introdução

O dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) é uma monocotiledônea oleaginosa, perene e alógama, predominantemente cultivada em regiões de clima tropical úmido, como regiões da América Latina, Sudeste da Ásia e África. A espécie *E. guineensis* é originária da Região Noroeste da África (Guiné-Bissau) e pertence à família Arecaceae. A importância e expectativa agronômica da cultura do dendezeiro no cenário mundial advém de sua relevância para o cenário energético e ecológico, o que se deve, entre outros fatores, ao elevado rendimento de óleo, entre 5 e 7 ton ha⁻¹ ano⁻¹, e ao alto poder calorífico do mesmo, além de poder ser explorado num prazo não inferior a 25 anos. Com mais de 8 milhões de hectares plantados no mundo, o dendezeiro, depois da cultura da soja, constitui-se atualmente como a segunda fonte de óleo vegetal do planeta (Viegas & Muller, 2000; Rajesh *et al.*, 2003; Jouannic *et al.*, 2005; Miragaya, 2005; MPOBS, 2008).

Em razão desse potencial econômico do dendezeiro, diversos programas de melhoramento genético têm surgido pelo mundo, com destaque às Instituições sediadas em países do Continente Asiático e da América Latina. O programa conduzido pelo Brasil baseia-se fundamentalmente na coleção de germoplasma na Bacia do Rio Amazonas (Embrapa Amazônia Ocidental), introduzido da parceria entre a Embrapa e o Cirad (França) (Pandolfo, 1981) em meados dos anos 80. No entanto, apesar de mais de 20 anos de reconhecidos trabalhos, ainda é baixo o número de materiais selecionados, melhorados e lançados convencionalmente, em razão do longo ciclo da cultura (Low *et al.*, 2008).

Uma preocupação observada nos programas de melhoramento da espécie refere-se à multiplicação dos genótipos selecionados, visto que a principal forma de propagação é via sementes (Lorenzi *et al.*, 2004). Este método convencional de multiplicação requer um período relativamente longo até que novas mudas sejam formadas, além de apresentar

formação de plantas heterogêneas, acarretando plantios desuniformes (Viegas & Muller, 2000). Uma das formas de sanar esses problemas e acelerar os programas de melhoramento da espécie seria o desenvolvimento de protocolos para a propagação clonal e clonagem de genótipos de interesse.

De modo geral, entre as diversas técnicas de clonagem de plantas *in vitro*, a embriogênese somática é, sem dúvida, a mais indicada e perseguida cientificamente pelos pesquisadores visando à clonagem das palmeiras. A técnica apresenta a vantagem de poder ser induzida a partir de diferentes tipos de explantes (propágulos), tais como embriões zigóticos, inflorescências e folhas imaturas, podendo proporcionar a multiplicação de milhares de plantas idênticas (Zimmerman, 1993). Dessa forma, a embriogênese somática em dendezeiros poderia constituir-se uma potente ferramenta para a espécie, tanto para a produção de mudas clonais em larga escala, como para dar suporte prático para alcançar resultados mais rápidos nos programas de melhoramento genético, especialmente no relacionado à fixação de caracteres em gerações de cruzamentos F₁ ou mais avançadas, como nos retrocruzamentos de origem intra ou interespecíficos de dendê (*Elaeis guineensis*) e/ou caiaué (*Elaeis oleifera*) (Scherwinski-Pereira et al., 2010).

Em dendezeiro, os primeiros relatos de trabalhos com cultura de tecidos foram realizados por Rabéchault & Martin (1976), Corley *et al.* (1977) e Pannetier *et al.* (1981), existindo relatos de sua clonagem há pelo menos duas décadas, com o uso de diferentes explantes (De Touchet *et al.*, 1991; Teixeira *et al.*, 1993; Teixeira *et al.*, 1994; Teixeira *et al.*, 1995; Rival *et al.*, 1998). Apesar disso, protocolos e detalhes da produção de mudas capazes de clonar materiais elite são praticamente inexistentes na literatura, o que tem sido atribuído, em parte, ao grande interesse comercial por esta espécie (Rao & Ganapathi, 1993). De fato, apesar de na literatura existirem referências sobre vários ensaios visando melhorar as diferentes etapas envolvidas no processo, a indução da embriogênese somática em dendezeiro

ainda não é bem compreendida, com resultados muitas vezes divergentes, sendo que nem sempre é possível a reprodução dos mesmos. Isto se deve, principalmente, ao fato de que a cultura de tecidos, como técnica de propagação vegetativa, necessita ser adaptada às necessidades das espécies e cultivares, pois estas diferem geneticamente entre si, podendo apresentar resultados diferentes, mesmo sob as mesmas condições de cultivo (Fortes & Scherwinski-Pereira, 2001; Scherwinski-Pereira et al., 2010).

Assim, apesar da importância de se desenvolver, aperfeiçoar e aprofundar técnicas e protocolos de clonagem para o dendezeiro, seja para a multiplicação em larga escala ou como auxílio ao programa nacional de melhoramento genético da cultura, no Brasil os resultados são escassos e, até a presente data, inexistem trabalhos comparando a resposta de genótipos brasileiros de dendezeiros à embriogênese somática.

Neste contexto, o trabalho teve por objetivo avaliar respostas de genótipos brasileiros de dendezeiros à embriogênese somática a partir de embriões zigóticos maduros.

2 – Material e métodos

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos II da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Brasília – DF. Para o trabalho foram utilizados embriões zigóticos obtidos de frutos maduros de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.), coletados de plantas adultas de nove genótipos: C2001, C2328, C2301, C3701, CM1115, C7201, C2528, C2501 e CN1637, cedidos gentilmente pelo Programa de Melhoramento Genético da Embrapa Amazônia Ocidental, em Manaus – AM e originário do Banco de Germoplasma da espécie localizado no Campo Experimental do Rio Urubu, no município de Rio Preto da Eva, AM.

2.1 – Indução da embriogênese somática

Inicialmente, o endocarpo dos diásporos foi removido com o auxílio de um torno mecânico para a obtenção das amêndoas. Posteriormente, em capela de fluxo laminar as amêndoas foram imersas em etanol 70% por três minutos, seguido de 20 minutos em solução de hipoclorito de sódio 2,5% (solução comercial), e tríplice lavagem em água destilada e autoclavada. Os embriões zigóticos foram então removidos com o auxílio de pinça e bisturi e inoculados em meio de cultura de indução de calos (MI), composto pelos sais e vitaminas de MS alterado (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com 20 g.L⁻¹ de sacarose, 0,5 g.L⁻¹ de glutamina, 2,5 g.L⁻¹ de carvão ativado, 450 µM de Picloram e solidificado com 2,5 g.L⁻¹ de Phytigel (Sigma®).

Os embriões foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25±2°C e em condição de escuro durante 150 dias, com subcultivos a cada 30 dias. A cada subcultivo foram determinadas a percentagem de explantes com formação de calo, a massa fresca e área dos calos. A determinação do percentual de calos embriogênicos foi obtida fazendo-se a contagem da quantidade de explantes com calo embriogênico, dividido pela quantidade de explantes por placa. Os dados de massa fresca dos calos, expresso em miligrama (mg), foram obtidos por meio de pesagem dos calos em balança analítica de precisão.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, composto por nove genótipos e cinco repetições, sendo cada parcela formada por 10 embriões zigóticos. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA, com as médias comparadas pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade, com auxílio do programa de análises estatísticas Sisvar (Ferreira, 1998). Dados expressos em percentagem foram transformados segundo arco seno $(x/100)^{0,5}$ e os obtidos por contagem foram transformados segundo $(x + 1)^{0,5}$.

2.2 – Diferenciação e maturação dos embriões somáticos

Após 150 dias em meio de cultura de indução, os calos foram transferidos para novo meio de cultura para a diferenciação e maturação de embriões somáticos. Nesta fase foram testados dois meios de cultura, denominados de MDM-1, suplementando com 0,6 μ M de ANA e 12,3 μ M de 2-iP, e MDM-2, adicionado de 40 μ M de Picloram. Após a transferência para os meios de diferenciação e maturação, os agregados embriogênicos foram mantidos em sala de crescimento à temperatura de 25 \pm 2°C e sob condição de obscuridade, por até 90 dias, até que se visualizassem a diferenciação dos primeiros embriões somáticos em estágio globular e a formação dos eixos bipolares (apical e basal). Nesta condição foi avaliado a massa fresca (mg) das culturas embriogênicas, sendo também contabilizados o número de embriões somáticos diferenciados por explante, caracterizando-os quanto ao estágio de desenvolvimento.

O delineamento experimental adotado nesta fase foi o inteiramente casualizado, composto por nove genótipos, dois meios de cultura e quatro repetições, sendo cada repetição formada por cinco calos pró-embriogênicos por parcela. Assim como na etapa de indução, os dados obtidos foram submetidos à análise de variância com as médias comparadas pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade, sendo analisados com o emprego do programa de análises estatísticas Sisvar (Ferreira, 1998). Dados expressos em percentagem foram transformados segundo arco seno $(x/100)^{0,5}$ e os obtidos por contagem foram transformados segundo $(x + 1)^{0,5}$.

2.3– Regeneração dos embriões somáticos

Após a permanência dos materiais nos meios de cultura de maturação e diferenciação, os calos foram transferidos para novo meio de cultura, desta vez, desprovido de reguladores de crescimento. Nessa etapa, os explantes foram mantidos por 90 dias no escuro. Nesta condição, devido o desenvolvimento assíncrono dos embriões somáticos, foi avaliada a percentagem de calos com embriões somáticos e o número total de embriões somáticos (globular e/ou torpedo) por explante.

O delineamento experimental adotado na fase de regeneração foi o inteiramente casualizado, com nove genótipos e dois tratamentos dos calos em meio de diferenciação e maturação (meios de cultura MDM-1 e MDM-2). A análise contou com dados de quatro repetições e cinco calos embriogênicos por parcela. Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott utilizando-se o programa estatístico Sisvar. Dados expressos em percentagem foram transformados segundo arco seno $(x/100)^{0,5}$ e os obtidos por contagem foram transformados segundo $(x + 1)^{0,5}$.

2.4 – Varredura

As amostras foram fixadas em karnovisk (Johansen, 1940) e pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 2% e tampão cacodilato de sódio 0,05 M, pH 7,1 por 3 horas. Em seguida, elas foram lavadas três vezes em mesmo tampão de fixação, desidratadas em série etanólica crescente, secadas ao ponto crítico com CO₂ e metalizadas com ouro-paládio. Os espécimes foram observados e fotografados em microscópio de varredura.

3 – Resultados e discussão

3.1 -Indução da embriogênese somática

A primeira avaliação quanto à percentagem de calos formados entre os genótipos testados foi realizada apenas aos 60 dias após a inoculação dos explantes no meio de indução da embriogênese somática. Entretanto, após 14 dias de cultivo em meio de indução, explantes de todos os genótipos responderam ao tratamento aplicado. Neste período foi observado o intumescimento dos embriões zigóticos, que apresentaram o tamanho aproximado de 1,0 cm, equivalente a cerca de duas vezes o tamanho inicial dos embriões inoculados. Com 30 dias de estabelecimento, observou-se uma continuidade no incremento do tamanho dos embriões zigóticos em cultura. Também foi possível observar pigmentação amarelada durante toda sua extensão, e na região distal, pode-se constatar invaginações na protoderme (Figura 5A – I). O intumescimento dos embriões zigóticos, quando cultivados em meio de indução, é observado em diferentes espécies de palmeiras, como em *Acrocomia aculeata* (Moura *et al.*, 2009) e em *Bactris gasipaes* (Steinmacher *et al.*, 2007).

De maneira geral, após 60 dias de cultivo foi possível observar o rompimento e abertura da região proximal dos explantes em cultivo. Este fato possibilitou a exposição das massas merismáticas e formação dos calos primários compactos, que por sua vez, apresentaram coloração amarelada e crescimento não organizado (Figura 5 A1 – II). Nesta fase, em todos os genótipos houve a formação de calos primários (Figura 1). No entanto, foi possível classificar os genótipos em dois grupos quanto à percentagem de calo: o primeiro grupo composto pelos genótipos C2001, C2501, C2528 e C3701, que apresentaram formação de calo primário entre 54% e 81% dos explantes, valores significativamente superiores àqueles observados para o segundo grupo formado pelos genótipos C7201, C2328, C2301,

CN1637 e CM1115 que apresentaram valores de formação de calo primário entre 10% e 30% (Figura 1).

A frequência de indução de calos primários com competência embriogênica não depende somente das condições do cultivo *in vitro*, como os reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura, mas também dos genótipos e dos níveis de hormônios endógenos de cada explante (Carman, 1990; Jiménez, 2001). Respostas diferenciadas entre genótipos são comuns em condições de cultivos semelhantes. Thawaro & Te-chato (2009) observaram diferentes respostas quanto à formação de calo em seis genótipos de *E. guineensis*. Dentre os genótipos testados, os autores verificaram que o genótipo “# 58” apresentou uma maior percentagem de formação de calos (48%), sendo que os demais genótipos (#77; #118; #119; #130 e #137) apresentaram uma média de 19%.

Aos 90 dias de cultivo, de maneira geral os calos primários progrediram para calos embriogênicos, compactos, de aspecto nodular e coloração amarelada, estendendo-se por toda a região proximal do explante (Figura 5 A2 – I2). Nesta fase, os genótipos mostraram-se diferentes quanto à percentagem de calos embriogênicos formados (Figura 1). Nesse estágio os genótipos C7201, C2301 e CN1637 apresentaram valores para formação de calos embriogênicos estatisticamente inferiores aos demais, com médias de 36%, 34% e 16%, respectivamente.

Os reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura em protocolos de indução, especialmente as auxinas, são vastamente utilizados para a formação de calos embriogênicos (Portillo *et al.*, 2007; Eshraghi *et al.*, 2005). Essa classe de regulador de crescimento está envolvido na ativação e regulação da divisão e diferenciação celular (Namasivayam, 2007). Em *Bactris gasipaes* a formação de calos embriogênicos foi obtida em embriões zigóticos quando estes foram cultivados em meio de cultura contendo Picloram como fonte de auxina (Steinmacher *et al.*, 2007). Esta auxina também induziu a competência

embriogênica em *E. guineensis* (Teixeira *et al.*, 1995; Scherwinski-Pereira *et al.*, 2010). Já Moura *et al.* (2008) observaram dois tipos de calo na indução da embriogênese somática a partir de embriões zigóticos em *Acrocomia aculeata*: o calo tipo I com aspecto friável, e o calo tipo II com aspecto nodular e coloração amarelada. Para esses autores somente o calo tipo II foi considerado embriogênico.

No entanto, assim como verificado neste trabalho, podem ser observadas diferentes respostas genótípicas dentro de uma espécie, quanto à capacidade de formação de calos embriogênicos em explantes cultivados em presença de auxina. Sanputawong & Te-chato (2008) observaram diferenças significativas na comparação de 16 genótipos de dendezeiro durante a indução da embriogênese somática, a partir de embriões zigóticos. Os autores observaram que após 90 dias de cultivo, apenas um genótipo dos 16 testados apresentou maior percentagem de formação de calos, com média de 33,3%, demonstrando respostas distintas entre os genótipos. Efeito genotípico também foi obtido por Chehmalee & Te-chato (2008) durante a embriogênese somática de *E. guineensis* a partir de embriões zigóticos. Esses autores avaliaram três genótipos em meio de cultura adicionado de Dicamba, tendo sido verificando apenas o híbrido “174(D) x 206 (P)” superior estatisticamente aos demais genótipos quanto à maior formação de calos embriogênicos (26%).

Embora seja conhecido que genótipos de uma mesma espécie possam apresentar diferenças de resposta, mesmo quando cultivadas nas mesmas condições de cultivo, essas diferenças genótípicas podem estar ligadas as variações no conteúdo de hormônios endógenos entre os genótipos. Níveis elevados de AIA e ABA foram encontrados em explantes de genótipos mais competentes a embriogênese somática em trigo (Kopertekh & Butenko, 1995). Tran Thi & Pleschka (2005) verificaram uma relação positiva entre os conteúdos endógenos de ABA em pecíolos de *Daucus* sp. e sua capacidade embriogênica. No entanto, Jiménez & Bangerth (2001) verificou que em dois genótipos de cevada com diferentes conteúdos de

auxinas endógenas não houve diferença estatística em seu potencial embriogênico, demonstrando outro efeito para as diferenças genotípicas encontradas nesta espécie.

Outra possibilidade para essas diferenças genotípicas é a sensibilidade dos genótipos de reagirem com o conteúdo de reguladores de crescimento presentes no meio de cultura (Somleva *et al.*, 1995). Essa sensibilidade a auxinas pode ser relacionada com a capacidade e existência adequada de receptores hormonais, ativando genes específicos relacionados à resposta embriogênica (Guzzo *et al.*, 1994). Com a presença adequada de receptores hormonais ativando genes específicos, a RNA polimerase é ativada e os genes envolvidos na regulação da divisão celular são transcritos, dando continuidade ao processo embriogênico (Dudits *et al.*, 1995). Esse fato foi observado por Lo Schiavo (1995) que verificou que o 2,4-D era capaz de modular os níveis de proteínas de ligação durante o protocolo de culturas de suspensão celular em cenoura.

Aos 120 dias verificou-se oxidação lenta dos explantes em quase todos os genótipos, com exceção dos genótipos CN1637 e CM1115 (dados não mostrados). A oxidação do explantes é comum em diversas espécies cultivadas em concentrações elevadas de auxinas, incluindo as palmeiras (Moura *et al.*, 2009; Scherwinski-Pereira *et al.*, 2010). De fato, a oxidação ocorre geralmente em resposta a algum estresse induzido ou injúria, a qual é caracterizada pelo escurecimento das partes excisadas dos explantes e do meio de cultivo, influenciando na absorção dos constituintes do meio pelo explante em virtude da obstrução do tecido oxidado. Tal oxidação é resultante da liberação de compostos fenólicos *in vitro*, precursores da síntese de lignina pelo tecido injuriado (Van Winkle *et al.*, 2003). Esse acúmulo de polifenóis e produtos de oxidação, como melanina, suberina, lignina, cutina e calose em torno da superfície excisada, modifica a composição do meio de cultivo e, conseqüentemente, a absorção de metabólitos (Andrade *et al.*, 2000). Os compostos fenólicos sofrem oxidação pelas enzimas polifenases, produzindo substâncias tóxicas que normalmente

inibem o crescimento dos explantes, ocasionando, não raramente, até a morte dos mesmos (Sato *et al.*, 2001; Costa *et al.*, 2006).

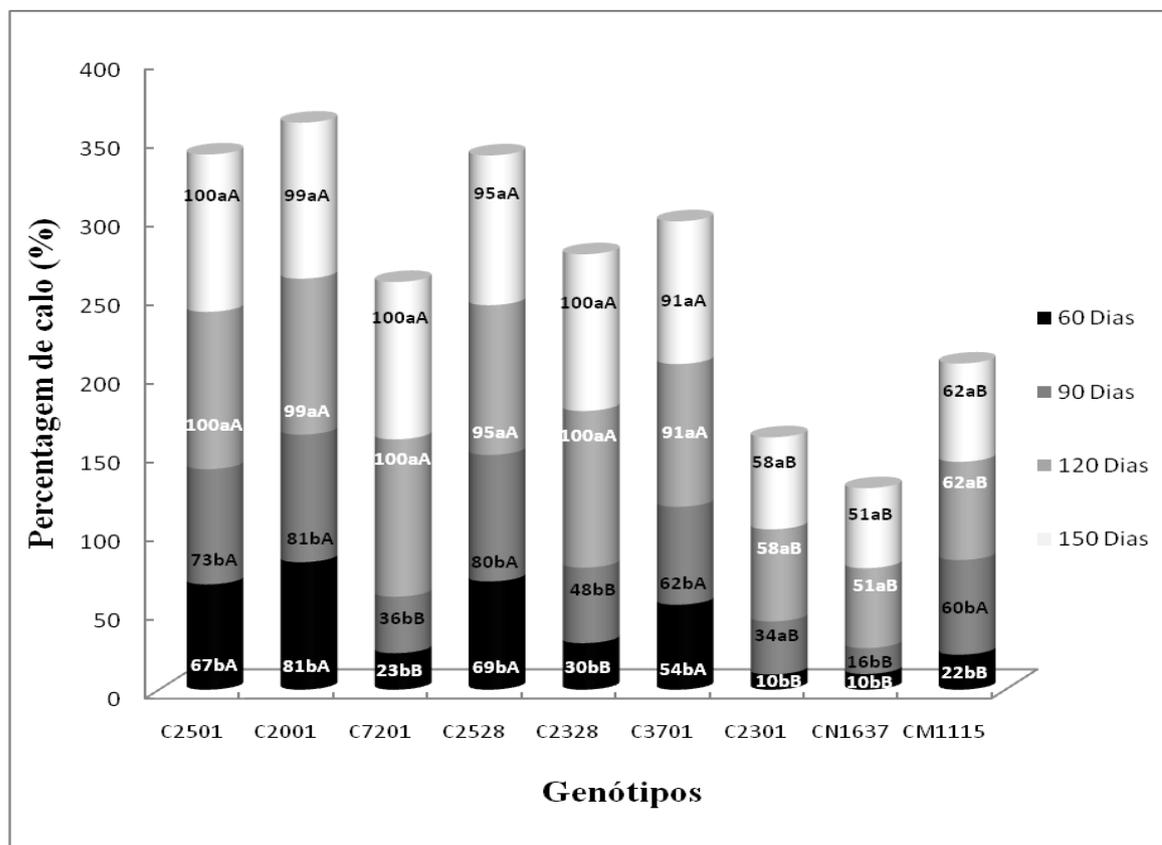


Figura 1: Respostas genóticas de dendezeiros (*E. guineensis*) na porcentagem de calos induzidos, durante a embriogênese somática, e em razão do período de cultivo em dias. Médias seguidas por letras distintas dentro de cada item, minúsculas na vertical (entre os períodos em dias) e maiúsculas na horizontal (entre os genótipos) diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Scott-Knott. Dados transformados em arco seno de $(x/100)^{0.5}$. C.V.: 26,9%.

Ainda aos 120 dias de cultivo em meio de indução de calos, observou-se que os explantes dos diferentes genótipos testados não mais apresentaram aumentos significativos nas taxas de formação de calos embriogênicos (Figura 1). No entanto, aos 135 dias os calos progrediram para pró-embriogênicos, sendo evidente o surgimento de pró-embriões (cf. capítulo 2, item 3.0). Quando os explantes completaram 150 dias de cultivo, verificaram-se

diferenças significativas nas taxas de formação de calos pró-embriogênicos entre os genótipos testados, com valores significativamente superiores (entre 90% e 100%) para os genótipos C2501, C2001, C7201, C2528, C2328 e C3701 (Figuras 1 e 5 A3 – I3), evidenciando que os diferentes genótipos de dendezeiro testados apresentam respostas diferenciadas *in vitro*, mesmo quando cultivados sob condições ambientais e nutricionais semelhantes. A especificidade genotípica durante o processo de indução da embriogênese somática também foi relatado em outras espécies como em *Feijoa sellowiana* (Guerra *et al.*, 2001), *Avena sativa* (Bispo *et al.*, 2007), assim como para *Phoenix dactylifera* (Al-Khayri & Al-Bahrany, 2004).

O peso fresco médio dos embriões zigóticos no início do experimento foi de 1,5 mg, sendo que, após 30 dias de cultivo em meio de indução, houve um incremento de massa em todos os genótipos testados (Figura 2). Nesta fase, foi possível classificar os genótipos em dois grupos quanto à massa fresca: o primeiro grupo composto pelos genótipos C2001, C7201, C2501, C2528, C2328 e C3701 que apresentaram massa fresca entre 85 e 137 mg, equivalente a uma taxa de crescimento médio de 5.868%. Esses valores foram significativamente superiores àqueles observados para o segundo grupo formado pelos genótipos CM1115, C2301 e CN1637, que apresentaram valores entre 15 e 57 mg, ou seja, uma taxa de crescimento médio de 1.624% (Figura 2).

De modo geral, após 60 dias de cultivo, os genótipos que apresentaram maior percentagem de formação de calo primário foram os que obtiveram um maior incremento de massa fresca (Figuras 1 e 2). Pode-se observar que os genótipos C2001, C7201, C2501, C2528 e C3701 foram estatisticamente superiores em massa fresca que os demais genótipos testados, com valores entre 160 e 232 mg, e uma taxa de crescimento médio de 88% inferior ao período anterior de avaliação (30 dias).

Aos 90 dias de cultivo, os genótipos mostraram-se mais heterogêneos quanto ao incremento de massa fresca dos explantes (Figura 2). De maneira geral, os genótipos C2001 e

C2501 foram estatisticamente superiores aos demais, com valores de massa fresca de 350 e 343 mg, e uma taxa de crescimento de 53 e 56% inferior ao período anterior de 60 dias, respectivamente. Os genótipos C7201, C2528, C2328 e C3701 não diferiram estatisticamente, com valores de massa fresca entre 241 e 276 mg, e uma taxa de crescimento médio de 53%. Sanputawong & Te-chato (2008) também observaram respostas heterogêneas quanto ao crescimento de calos embriogênicos quando 16 genótipos de *E. guinensis* foram avaliados.

Aos 120 dias de cultivo somente os genótipos C2001, C2501, C2328, C3701 e CN637 apresentaram peso fresco estatisticamente superior ao período anterior. Já os demais genótipos (CM1115, C7201, C2528 e C2301) não apresentaram incremento significativo de massa fresca na comparação com os períodos de 90 e 120 dias (Figura 2). Ainda aos 120 dias, o genótipo C2001 foi estaticamente superior ao demais, com valor de massa fresca de 610 mg, e uma taxa de crescimento de 76% quando comparado ao período anterior (90 dias), seguido dos genótipos C2501 e C2328 que apresentaram valores de massa fresca de 488 e 514 mg, e uma taxa de crescimento médio de 42 e 100% respectivamente.

Diferente do que foi observado para a variável percentagem de calo na comparação dos períodos de 120 e 150 dias, no qual, os explantes dos diferentes genótipos testados não mais apresentaram melhorias significativas nas taxas de formação de calos embriogênicos, na avaliação da massa fresca dos calos nestes mesmos períodos (120 e 150 dias), verificou-se um aumento significativo na taxa de crescimento em todos os genótipos testados, com exceção apenas dos genótipos CM1115 e C2501 que não apresentaram incrementos significativos aos 150 dias de cultivo.

A massa fresca e a taxa de crescimento de calos são importantes parâmetros para a determinação da capacidade de crescimento e necessidade de manutenção dos mesmos. Özgen *et al.* (1998) avaliaram a eficiência da indução de calos em diferentes genótipos de *Triticum aestivum*, constatando diferenças tanto na indução dos calos quanto no seu

crescimento. Esses autores observaram que entre os 11 genótipos avaliados, apenas o genótipo “Gerek 79” foi significativamente superior aos demais, tanto para a variável percentagem de calos, quanto para o crescimento em massa fresca. No entanto, quando estudos avaliando a seleção de genótipos brasileiros de soja quanto ao potencial embriogênico foram realizados, verificou-se diferenças significativas importantes e discriminantes quanto ao crescimento dos calos, após o período de indução estabelecido para a cultura (Droste *et al.*, 2010).

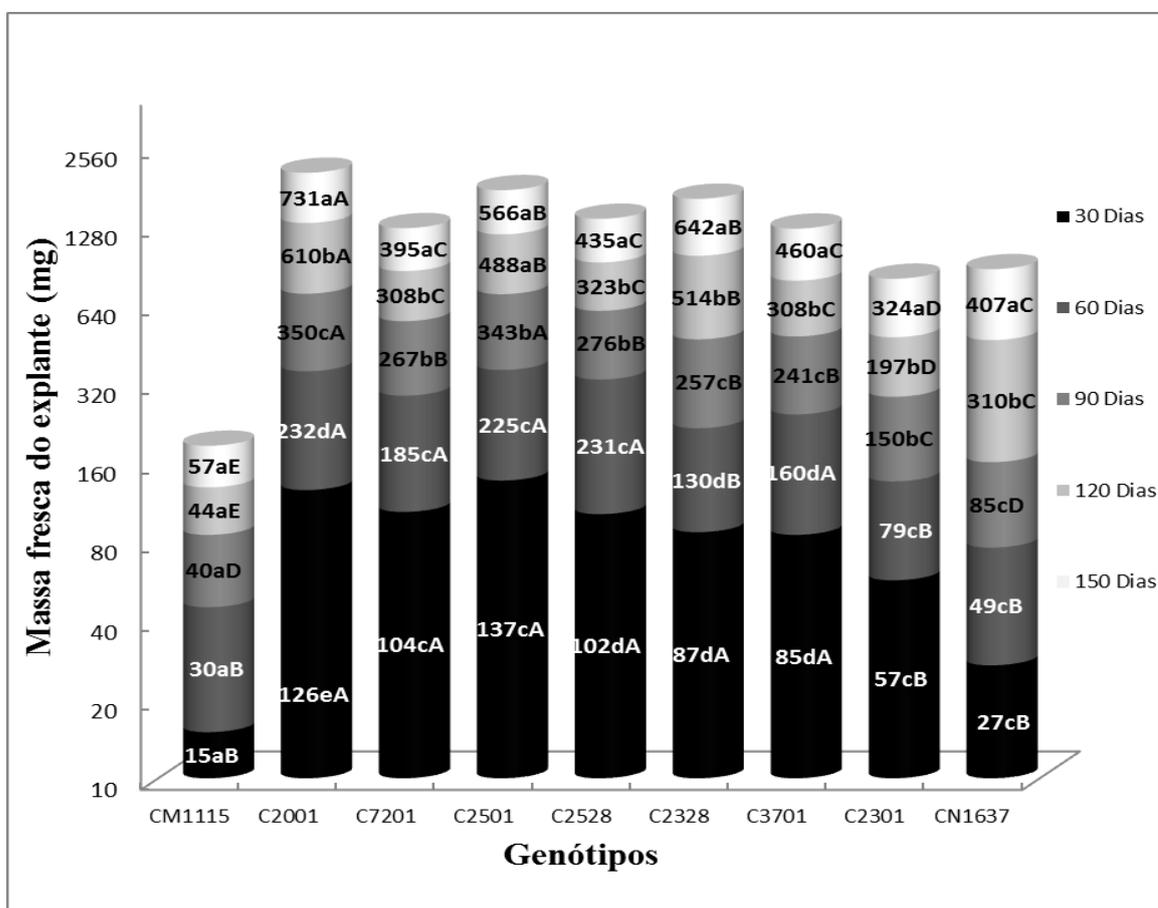


Figura 2: Respostas genótípicas de calos de dendezeiros quanto ao incremento da massa fresca (mg), em razão do período de cultivo em dias. Médias seguidas por letras distintas dentro de cada item, minúsculas na vertical (entre os períodos em dias) e maiúsculas na horizontal (entre os genótipos) diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Scott-Knott. C.V.: 25,8%.

3.2. – Diferenciação, maturação e regeneração dos embriões somáticos.

Após 150 dias na fase de indução, os calos pró-embriogênicos foram transferidos para dois diferentes meios de cultura, denominados de MDM-1 e MDM-2, visando à diferenciação e maturação de embriões somáticos. A passagem dos calos pró-embriogênicos para a fase de maturação permitiu observar, após 30 dias de cultivo, o início da diferenciação de embriões somáticos no estágio globular nos genótipos CN1637 e CM1115. Aos 90 dias de cultivo também foi possível verificar a diferenciação de embriões somáticos no estágio globular, em ambos meios de cultura utilizados, especialmente nos genótipos C2328 e C7201 (Figura 5 D4 e I4). Já nos genótipos CN1637 e CM1115 foi observado, após 90 dias, embriões em diferentes estágios de desenvolvimento, tanto embriões globulares, como no estágio torpedo, caracterizados pelo alongamento do cotilédone (Figura 5 C4 e G4; 6 D, E e F).

Outro aspecto a ser ressaltado nessa fase foi à ocorrência da embriogênese somática secundária, bastante evidente no genótipo CN1637 (Figura 5 C4). Neste genótipo foi possível se observar a formação de novos embriões somáticos a partir do embrião somático já diferenciado. Esse comportamento foi observado em diferentes espécies de monocotiledôneas (Scherwinski-Pereira *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 1992), sendo considerado uma importante característica a ser explorada durante trabalhos de embriogênese somática por permitir que o potencial embriogênico possa ser mantido por períodos mais longos, além de permitir uma maior taxa de multiplicação de plantas, como consequência dos ciclos repetitivos da embriogênese secundária (Raemakers *et al.* 1995).

Divergindo dos genótipos descritos anteriormente, até os primeiros 90 dias não foi observada a diferenciação de embriões somáticos nos genótipos C3701, C2501, C2001, C2528 e C2301, nos dois meios de cultura analisados (Figura 5 A4 – I4). No entanto, verificou-se a proliferação e manutenção dos calos obtidos da fase anterior. Também se pode

observar a formação de calos com um aspecto mais friável nos genótipos C2001, C2528 e C2301 (Figura 5 E4, F4 e G4). Já nos genótipos C3701 e C2501, os calos mantiveram-se compactos, com aspecto nodular e coloração amarelada.

A microscopia eletrônica de varredura evidenciou a diferença entre os calos compactos e friáveis. Os calos compactos foram caracterizados por células isodiamétricas contendo pouco espaço intracelular (Figura 6 A), enquanto, os calos friáveis apresentaram células alongadas e muito espaço intracelular (Figura 6 B). Nas células dos calos analisados também foram observados amiloplastos (Figura 6 C).

De maneira geral, não foram observadas diferenças no crescimento dos calos nos dois meios de cultura analisados, com exceção dos genótipos C2528, C2301 e CN1637, que tiveram seu crescimento aumentado significativamente quando cultivados no meio de cultura MDM-1 (Figura 3). A multiplicação e crescimento de calos podem ser observados em diversas culturas, que inicialmente, na fase de indução, tenham sido tratadas com altas concentrações de auxina, seguida de sua redução (Texeira *et al.*, 1993). Assim, de maneira geral, duas hipóteses poderiam ser mencionadas como variáveis respostas em relação à redução das concentrações de auxina, após a fase de indução de calos: a primeira, refere-se a possibilidade de poder-se estabelecer ciclos repetitivos de divisão celular e repressão dos processos de diferenciação de embriões somáticos, proporcionando, em último caso, a contínua multiplicação e crescimento dos calos (Guerra *et al.*, 1999). Já a segunda hipótese estaria relacionada com a diminuição da pressão sobre a indução de ciclos repetitivos de divisão celular, com conseqüente diferenciação de embriões somáticos (Teixeira *et al.*, 1995). No entanto, vários trabalhos em dendezeiro têm relatado que plantas oriundas de embriogênese somática, regeneradas em meio de cultura suplementando com citocinina, podem apresentar anormalidade floral em campo (Besse *et al.*, 1992; Jones *et al.*, 1990; Jones *et al.*, 1995).

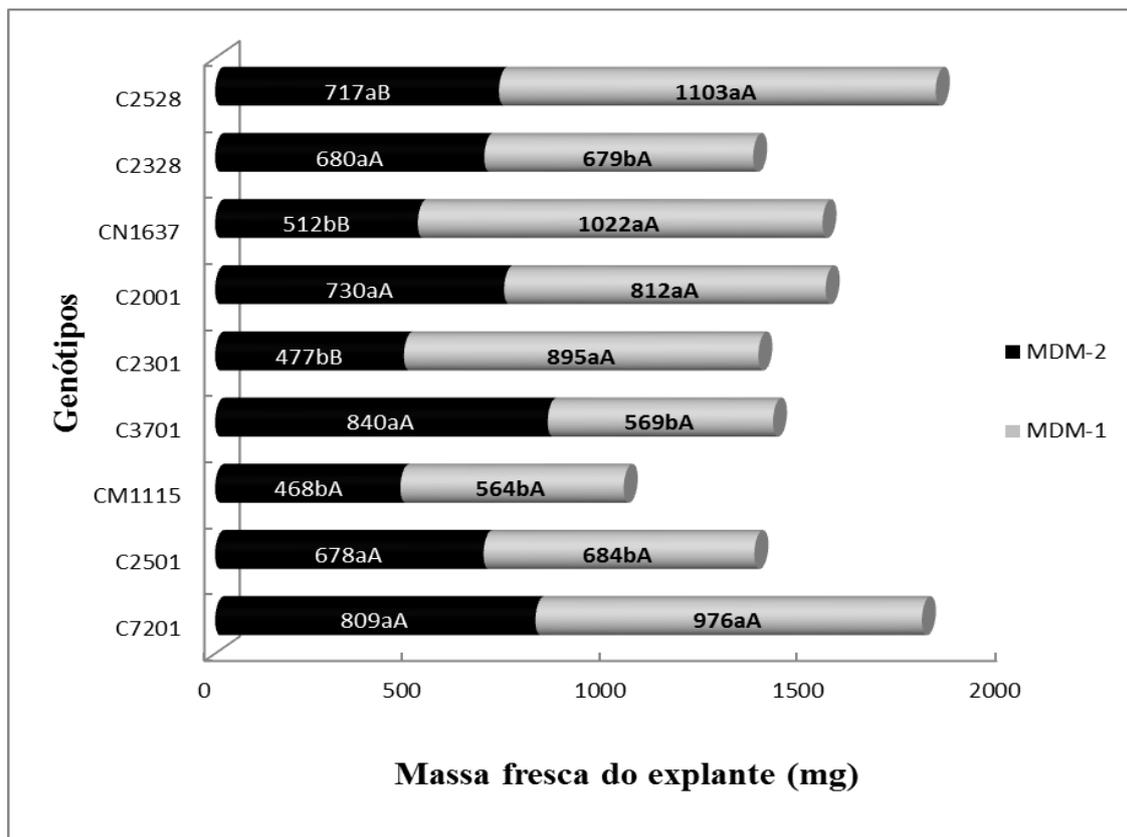


Figura 3: Respostas genóticas de dendezeiros quanto à massa fresca dos explantes, em razão do meio cultivo após 90 dias. Médias seguidas por letras distintas dentro de cada item, minúsculas na vertical (entre os genótipos) e maiúsculas na horizontal (entre os meios de cultura) diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Scott-Knott. MTD-2 = 40 μ M de picloran; MTD-1 = 12,6 μ M de 2iP e 0,6 μ M de ANA. CV(%): 21,7.

No presente trabalho, verificaram-se respostas diferenciadas quanto ao número total de embriões somáticos em estágio globular e torpedos formados nos diferentes meios de cultura de diferenciação/maturação testados. No entanto, de maneira geral aos 90 dias em meio de regeneração, não foram observadas diferenças significativas na frequência de calos com embriões somáticos em genótipos de dendezeiro, em razão do meio de cultura de diferenciação/maturação utilizado (MDM-1 e MDM-2) (Figura 4). Diferenças significativas só foram observadas quanto ao número total de embriões somáticos no estágio globular e torpedo formados por calo embriogênico (Tabela 1).

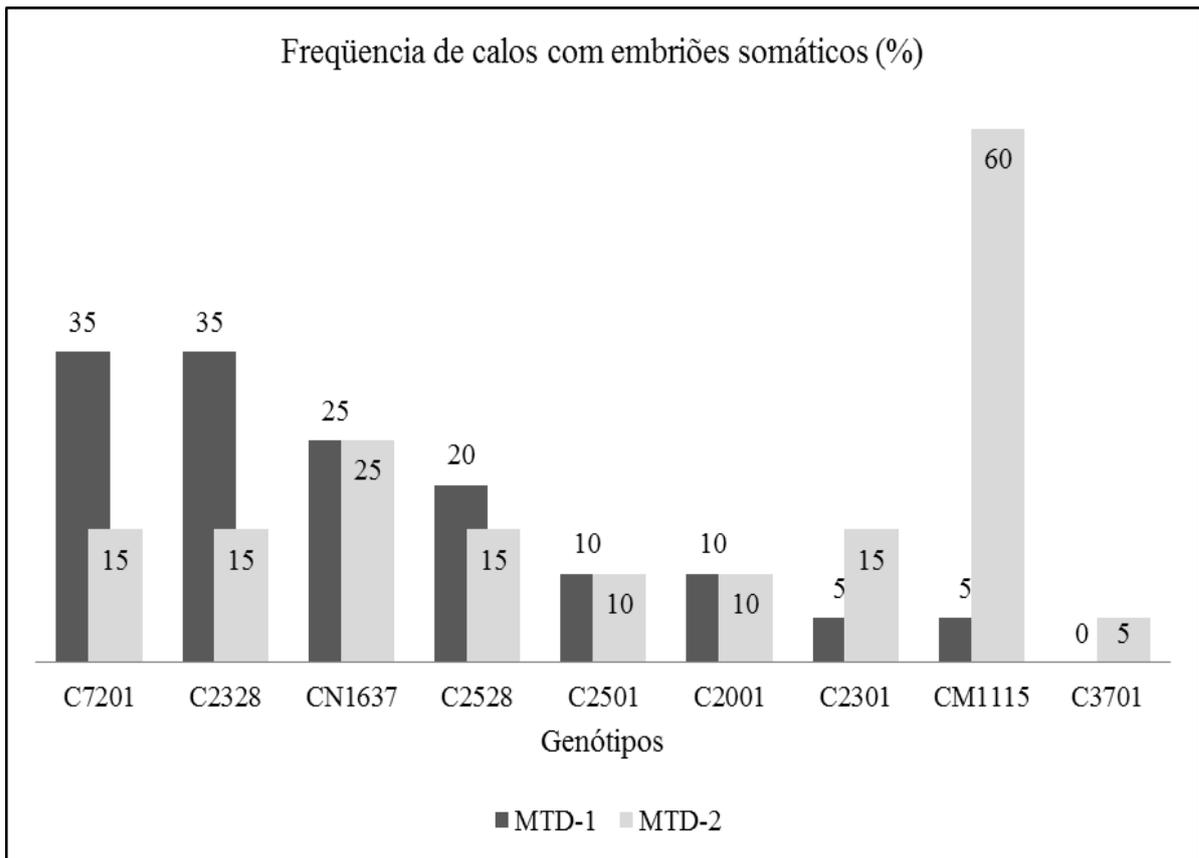


Figura 4: Frequência de calos com embriões somáticos em genótipos de dendezeiro em razão do meio de cultura de diferenciação/maturação (MTD-1 ou MTD-2), após três meses de cultivo em meio de regeneração. Dados não significativos pelo teste F ao nível de 5% para nenhum dos fatores avaliados (Genótipos e meios de cultura), nem sua interação.

Na comparação dos dois meios de cultura de diferenciação (MTD-1 e MTD-2), o genótipos C2328 e C2501 em MTD-1 foram os que apresentarem valores significativamente superiores quanto ao número de embriões somáticos (globular e torpeda) formados, comparativamente ao meio MTD-2, com 52 e 11 embriões somáticos por calo embriogênico, respectivamente (Tabela 1). Já no meio MTD-2, o único genótipo a apresentar número significativamente superior de embriões somáticos comparativamente ao meio MTD-1 foi o CM1115 com 40 embriões somáticos por calo. Para os demais genótipos não foram observadas diferenças estatísticas significativas quanto à formação de embriões somáticos em razão do tipo de meio de cultura de diferenciação e maturação usado.

Na análise individual dos meios de cultura , verificou-se que no meio MTD-1 o genótipo C2328 foi o que apresentou a formação do maior número de embriões somáticos por calo (52 embriões somáticos). Os genótipos C7201, CN1637, C2528 e CM1115 não diferiram estatisticamente entre si (24 a 11 embriões somáticos por calo), mas foram superiores quanto ao número de embriões somáticos formados aos genótipos C2001, C2301 e C3701 (0 a 4 embriões somáticos por calo). Já no meio de cultura MTD-2, o genótipo que foi estatisticamente superior aos demais foi o CM1115, com a formação de 40 embriões somáticos. Os genótipos C7201, CN1637, C2528 e C2301 apresentaram entre 10 e 12 embriões somáticos por calo, não diferindo estatisticamente entre si, mas com resultados superiores aos genótipos C2328, C2501, C2001 e C3701 que apresentaram de 1 a 4 embriões somáticos (Tabela 1). Esses resultados sugerem que cada genótipo necessita de um meio de cultura específico que melhor favoreça a diferenciação, maturação e posterior regeneração dos embriões somáticos.

Esses resultados corroboram com os obtidos por Droste *et al.* (2010) estudando oito genótipos brasileiros de soja quanto ao alto potencial para a embriogênese somática e regeneração de plantas. Esses autores também verificaram diferenças genotípicas para o número de embriões somáticos diferenciados, com os melhores resultados para o genótipo “BRSMG 68 Vencedora”. Além das diferenças genotípicas, esses autores observaram que quando o genótipo “BRSMG 68 Vencedora” foi cultivado em meio de cultura suplementado com ABA e carvão ativado, houve um incremento no número de embriões somáticos histodiferenciados e plantas regeneradas, sugerindo a especificidade do meio de cultivo para cada genótipo dentro de uma espécie.

Tabela 1. Influência do genótipo e do meio de diferenciação e maturação sobre o número médio de embriões somáticos formados em estágio globular e/ou torpedado (G+T) por calo apresentando embriões somáticos diferenciados, após três meses de cultivo em meio de regeneração

Genótipos	Número médio de embriões somáticos (G+T) formados por calo		
	Meio de cultura de diferenciação/maturação		Média (Genótipo)
	MTD-1	MTD-2	
C7201	24,9 bA	10,1bA	17,5 b
C2328	52,5 aA	4,0 cB	28,2 a
CN1637	26,0 bA	12,4 bA	19,2 b
C2528	11,5 bA	11,5 bA	11,5 b
C2501	11,0 bA	2,0 cB	6,5 c
C2001	4,0 cA	2,0 cA	3,0 c
C2301	3,0 cA	9,9 bA	6,4 c
CM1115	11,0 bB	40,7 aA	25,8 a
C3701	0,0 cA	1,0 cA	0,5 d
Média (Meio de cultura)	16,0 A	10,4 B	
CV (%)	29,9		
F (A: Genótipos)	13,198**		
F (B: Meios)	6,620*		
F (A x B)	9,342**		

Médias seguidas por letras distintas dentro de cada item, minúsculas na vertical (entre os genótipos dentro de cada meio de cultura) e maiúsculas na horizontal (entre os meios de cultura dentro de cada genótipos) diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Scott-Knott. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Outro aspecto a ser ressaltado nessa fase foi à ocorrência do desenvolvimento embriogênico assincronizado, ou seja, as culturas apresentaram embriões somáticos em diferentes estágios de desenvolvimento ao mesmo tempo (globular e torpedado), diferindo, inclusive, do início da regeneração de plantas. O desenvolvimento assincronico de embriões somáticos em palmeiras é freqüentemente relatado na literatura. Ledo *et al.* (2002) observaram que o meio de cultura suplementando com ANA e 2iP foi eficiente para a multiplicação e manutenção de calos embriogênicos de *Euterpe oleracea* Mart., além de

promover a progressão dos calos em estágios mais avançados dos embriões somáticos. Em pupunheira, Steinmacher *et al.* (2007) relatam que a transferência de calos embriogênicos para o meio de regeneração desprovido de reguladores de crescimento também promoveu respostas morfológicas distintas, incluindo o desenvolvimento não sincronizado dos embriões somáticos.

Aos 90 dias após a transferência das culturas para o meio de MS desprovido de reguladores de crescimento também foi possível observar a protusão dos primórdios foliares, caracterizando, assim, o início da germinação dos embriões somáticos. Esse comportamento foi verificado nos genótipos C2501 (Figura 5 B5), CN1637 (Figura 5 C5), C7201 (Figura 5 D5), CM1115 (Figura 5 H5) e C2328 (Figura I5). Isso sugere que alguns genótipos apresentaram respostas mais rápidas que outros em relação à regeneração dos embriões somáticos, e que alguns precisam de um período mais prolongado em meio de regeneração para a germinação e formação de plantas.

No presente trabalho, foi observada a conversão de embriões somáticos em plântulas (Figura 7), e através das análises anatômicas foi possível verificar que a germinação dos embriões somáticos e formação de plântulas foram similares à embriogênese zigótica (cf. capítulo 2, item 3.0). Esses dados corroboram com os obtidos por Teixeira *et al.* (1994), os quais obtiveram plantas inteiras, a partir da embriogênese somática de *E. guineensis*, quando os embriões somáticos foram cultivados em meio de cultura na ausência de regulador de crescimento.

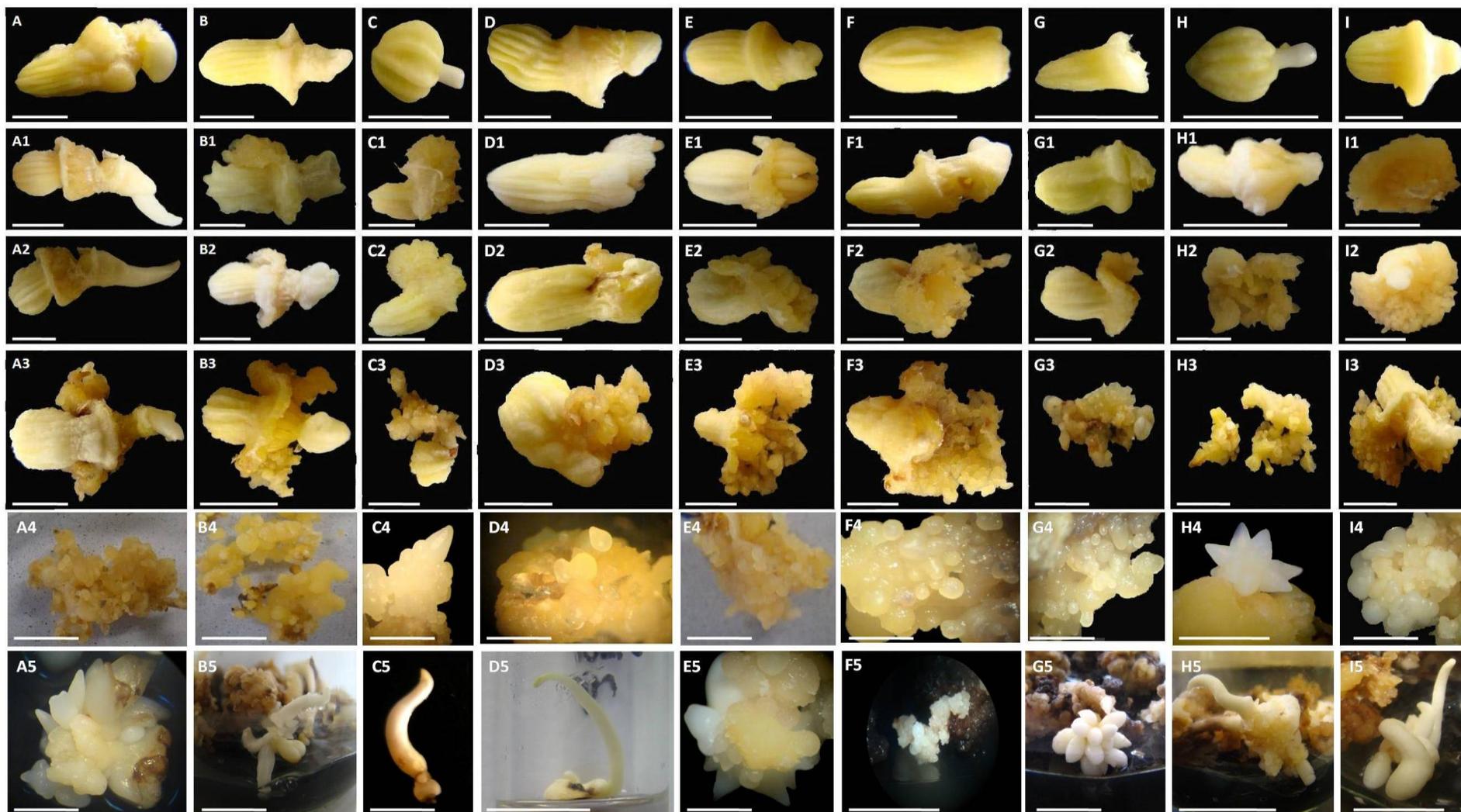


Figura 5: Estágios morfogênicos de genótipos brasileiros de dendezeiros (*Elaeis guineensis* Jacq.) à embriogênese somática; A – A5: Genótipo C3701; B – B5: Genótipo C2501; C – C5: Genótipo CN1637; D – D5: Genótipo C7201; E – E5: Genótipo C2001; F – F5: Genótipo C2528; G – G5: Genótipo C2301; H – H5: Genótipo CM1115; I – I5: Genótipo C2328. A- H: Explantes com 30 dias de cultivo, quando se observa o início do intumescimento dos embriões zigóticos; A1-I1: Início da formação e progressão dos calos primários, após 60 dias de cultivo; A2 – I2: Formação de calos embriogênicos com 90 dias de cultivo; A3 – I3: Aspectos dos calos pró-embriogênicos, após 150 dias de cultivo; A4 – I4: Calos embriogênicos e embriões somáticos (globular ou torpedo), após 90 dias em meio de diferenciação e maturação; A5 – I5: Diferenciação e regeneração de embriões somáticos, após 90 dias em meio de regeneração. (Barras = 1cm).

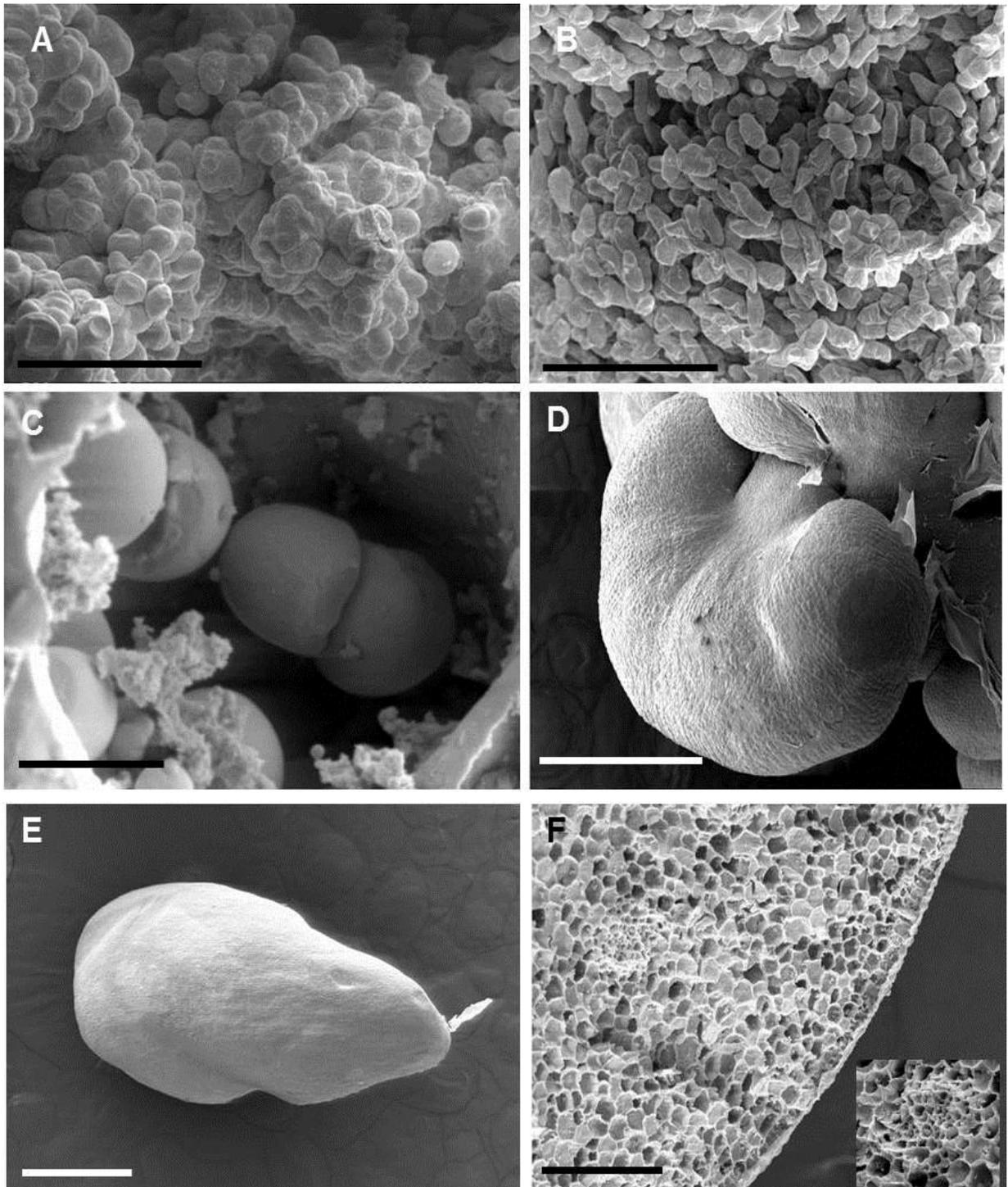


Figura 6: Aspectos morfológicos dos explantes em diferentes estágios da embriogêneses somática de *Elaeis guineensis*. A: microscopia eletrônica de varredura evidenciando as células isodiamétricas dos calos compactos. B: Células alongadas do calo friável. C e D: Embriões somáticos. F: Corte transversal do embrião somáticos evidenciando as células do procâmbio.



Figura 7: Planta regenerada a partir de embrião somático.

4 – Conclusões

- Os genótipos C2501, C2001, C7201, C2528, C2328 e C3701 foram superiores aos demais, quanto à formação de calos, evidenciando efeito genotípico.
- O genótipo C2001 obteve maior crescimento do explante, quando cultivado em meio de indução.
- Os genótipos C2328 e o CM1115 obtiveram maior regeneração de embriões somáticos.
- Cada genótipo necessita de um meio de cultura específico para a fase de diferenciação e maturação, potencializando a regeneração de embriões somáticos.

5– Referências Bibliográficas

AL-KHAYRI, J. M., AL-BAHRANY, A. M. Genotype-dependent *in vitro* response of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars to silver nitrate. *Scientia Horticulturae*, 99: 153–162, 2004.

ANDRADE, M.W., LUZ, J.M.Q., LACERDA, A.S. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.). *Ciência e Agrotecnologia*, 24 (1): 174-180, 2000.

BESSE I., VERDEIL J.L., DUVAL Y., SOTTA B., MALDINEY R., MIGINIAC, E. Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) clonal fidelity: endogenous cytokinins and indoleacetic acid in embryogenic callus cultures. *J. Exp. Bot.*, 43 (252): 983–989, 1992.

BISPO, N.B., GRANDOI, M.F., SUZIN, L.A.M. Indução de embriogênese somática em diferentes explantes de aveia (*Avena sativa* L.). *Ciência Rural*, 37 (3): 890-893, 2007.

CARMAN, J.G. Embryogenic cells in plant tissue cultures: occurrence and behavior. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 26: 746–753, 1990.

CHEHMALEE, S., TE-CHATO, S. Induction of somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured zygotic embryo of oil palm. *Journal of Agricultural Technology*, 4(2): 137-146, 2008.

CORLEY, R.V.H., BARRET, J.N., JONES, L.H. Vegetative propagation of oil palm via tissue culture. *Oil Palm News*, 22: 2-7, 1977.

COSTA, F.H.S., SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E., PEREIRA, M.A.A., OLIVEIRA, J.P. Efeito da interação entre carvão ativado e N⁶ - Benzilaminopurina na propagação in vitro de bananeira, cv. Grand naine (AAA). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 28(2): 280-283, 2006.

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

DROSTE, A., SILVA, A.M., SOUZA, I.F., WIEBKE-STROHM, B., BÜCKER-NETO, L., BENCKE, M., SAUNER, M.V., BODANESE-ZANETTINI, M.H. Screening of Brazilian soybean genotypes with high potential for somatic embryogenesis and plant regeneration. *Pesq. agropec. bras.*, 45 (7): 715-720, 2010.

DUDITS, D., GYORGYEY, J., BOGRE, L., BAKO, L. Molecular biology of somatic embryogenesis. In: Thorpe, T.A. (Ed.), *In vitro embryogenesis in plants*. Kluwer Academic Publishers, 1: 267–308, 1995.

ESHRAHGI, P., ZARGHAMI, R., MIRABDULBAGHI, M. Somatic embryogenesis in two Iranian date palm cultivars. *African Journal of Biotechnology*, 4 (11): 1309-1312, 2005.

FERREIRA, D. F. Sisvar - sistema de análise de variância para dados balanceados. Lavras: UFLA, 19 p., 1998.

FORTES, G.R.L., SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. Estabelecimento in vitro da ameixeira cv. América. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 23 (1): 183-185, 2001.

GUERRA, M.P., DAL VESCO, L.L., DUCROQUET, J.P.H.J., NODARI, R.O., DOS REIS, M.S. Somatic embryogenesis in goiabeira serrana: genotype response, auxinic shock and synthetic seeds. *R. Bras. Fisiol. Veg.*, 13(2):117-128, 2001.

GUERRA, M.P., TORRES, A.C., TEIXEIRA, J.B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S., BUSO, J.A. (ads.). *Culturas de tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Brasília, Embrapa-CBAB. V.2, 533-568, 1999.

GUZZO F., BALDAN B., MARIANI P., LO SCHIAVO F., TERZI M. Studies on the origin of totipotent cells in explants of *Daucus carota* L. *J. Exp. Bot.* 45: 1427–1432, 1994.

JOUANNIC, S., ARGOUT, X., LECHAUVE, F., FIZAMES, C., BORGEL, A., MORCILLO, F., ABERLENC-BERTOSSI, F., DUVAL, Y., TREGEAR, J. Analysis of expressed sequence tags from oil palm (*Elaeis guineensis*). FEBS letters, 579(12): 2709-2714, 2005.

JIMÉNEZ, V.M. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. Rev. Bras. Fisiol. Veg. 13: 196–223, 2001.

JIMÉNEZ, V.M., BANGERTH, F. *In vitro* culture and endogenous hormone levels in immature zygotic embryos, endosperm and callus cultures of normal and high-lysine barley genotypes. J. Appl. Bot., 75: 1–7, 2001.

JONES, L.H. Endogenous cytokinins in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) callus, embryoids and regenerant plants measured by radioimmunoassay. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 20: 201–209, 1990.

JONES, L.H., HANKE, D.E., EEUWENS, C.J. An evaluation of the role of cytokinins in the development of abnormal inflorescences in oil palms (*Elaeis guineensis* Jacq.) regenerated from tissue culture. J. Plant Growth Regul, 14: 135–142, 1995.

KOPERTEKH, L.G., BUTENKO, R.G. Naturally occurring phytohormones in wheat explants as related to wheat morphogenesis *in vitro*. Russ. J. Plant Physiol., 42: 488–491, 1995.

LEDO, A.S., LAMEIRA, O.A., BENBADI, 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, 24: 601-603, 2002.

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, 432 p., 2004.

LO SCHIAVO, F. Early events in embryogenesis. In: Bajaj Y.P.S. (ed.), Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I. Biotechnology in Agriculture and Forestry, 30: 20–29. 1995

LOW, E., ALIAS, H., BOON, S., SHARIFF, E.M., TAN, C.A., OOI, L.C., CHEAH, S., RAHA, A., WAN, K., SINGH, R. Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) tissue culture ESTs: Identifying genes associated with callogenesis and embryogenesis. Plant Biology, 8: 1471-2229-8-62, 2008.

MOURA, E.F., VENTRELLA, M.C., MOTOIKE, S.Y., JUNIOR, A.Q.S., 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 Tiss Organ Cult*, 95:175–184, 2008.

MOURA, E.F., MOTOIKE, S.Y., VENTRELLA, M.C., JUNIOR, A.Q.S., CARVALHO, M. Somatic embryogenesis in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from zygotic embryos. *Scientia Horticulturae*, 119: 447–454, 2009.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*, Copenhagen, 15: 473-479, 1962.

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

MPOBS (Malaysian Palm Oil Board Statistics) Disponível em: <<http://econ.mpob.gov.my/economy/overview07.htm>> Acesso em: 29 de dezembro de 2008, 08:30.

NAMASIVAYAM, P. Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 90:1–8, 2007.

ÖZGEN, M., TÜRET, M., ALTINOK, S., SANCAK, C. Efficient callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. *Plant Cell Reports*, 18: 331–335, 1998.

PANDOLFO, C.A. A cultura do dendê na Amazônia. Belém: SUDAM, 35p., 1981.

PANNETIER, C., ARTHUIS, P., LIEVOUX, D. Neoformation de jeunes plantes d'*Elaeis guineensis* a partir de cals primaires obtenus sur fragments foliaires cultivés in vitro. *Oleagineux*, 36:119-120, 1981.

PORTILLO, L., SANTACRUZ-RUVALCABA, F., GUTIÉRREZ-MORA, A., RODRÍGUEZ-GARAY, B. Somatic embryogenesis in Weber cultivar azul. *In Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant*, 43:569–575, 2007.

RABECHAULT-MARTIN, J.P. Multiplication végétative du palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) à l'aide de cultures de tissus foliaires. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, 283:1735-7, 1976.

RAEMAKERS, C.J.J.M., JACOBSEN, E., VISSER, R.G.F. Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. *Euphytica*, 81: 93-107, 1995.

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*, 75: 41-47, 2003.

RAO, P. S., GANAPATHI, T. R. Micropropagation of palms. In: Ahuja M. R. (ed) Micropropagation of woody plants. Springer, Berlin, 405–421, 1993.

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

SANPUTAWONG, S., TE-CHATO, S. Effect of genotypes of oil palm as indicator for speed of callus and embryogenic callus formation. *Journal of Agricultural Technology*, 4(2): 147-156, 2008.

SATO, A.Y., DIAS, H.C.T., ANDRADE, L.A. Micropropagação de *Celtis* sp.: controle da contaminação e oxidação. *Cerne*, Lavras, 7 (2):117-123, 2001.

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

SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E., GUEDES, R.S., FERMINO, P.C.P., SILVA, T.L., COSTA, F.H.S. Somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm using the thin cell layer technique. *In Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant*, 46:378–385, 2010.

STEINMACHER, D.A., CANGAHUALA-INOCENTE, G.C., CLEMENT, C.R., GUERRA, M.P. Somatic embryogenesis from peach palm zygotic embryos. *In Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant*, 43:124–132, 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*, 40: 105–111, 1995.

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

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

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

TRAN THI L., PLESCHKA, E. Somatic embryogenesis of some *Daucus* species influenced by ABA. *J. Appl. Bot. Food Qual.*, 79: 1–4. 2005.

VAN WINKLE, S., JOHNSON, S., PULLMAN, G.S. The impact of gelrite and activated carbon on the elemental composition of plant tissue culture media. *Plant Cell Report*, 21:1175-1182, 2003.

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

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

Capítulo 2

ONTOGENIA DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE DENDEZEIRO (*Elaeis guineensis* JACQ.) A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS MATUROS

Resumo

O objetivo desse trabalho foi descrever os eventos ontogênicos e histoquímicos que envolvem o processo de embriogênese somática de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.). Embriões zigóticos foram inoculados em meio MS alterado, suplementado com 450 μM de picloram. Aos 14 dias em meio de indução foram observadas as primeiras divisões nas células procâmbiais e perivasculares. Essa região progrediu para a formação de massas meristemáticas, após 21 dias, indicando sua origem procambial e perivascular. Calos primários surgiram após 45 dias de cultura, seguido da progressão para calos embriogênicos aos 90 dias. A formação de proembriões, a partir das células meristemáticas, ocorreu após 135 de cultivo. Os proembriões apresentavam-se isolados do tecido de origem, pelo leve espessamento da parede celular, indicando sua origem unicelular. Quando transferidos para fase de maturação, nos meios de cultura MTD -1 (0,6 μM de ANA e 12,3 μM 2-iP) e MTD-2 (40 μM picloran), observou-se a regeneração de embriões somáticos em diferentes estágios de desenvolvimento (globular-torpedo). Os embriões diferenciados apresentaram protoderme, cordões de procâmbio e plúmula. Em seguida foram transferidos para o meio de cultura isento de reguladores de crescimento (fase de regeneração de plantas), no qual foi observada a conversão dos embriões somáticos em plantas. O acúmulo de amido durante o processo de embriogênese somática concentrou-se próximos aos centros de intensa divisão celular, e no córtex dos calos primários e embriogênicos. No entanto, nos diferentes estágios de embriões somáticos não foi observado o acúmulo de amido. Estes resultados permitem uma maior compreensão do processo da embriogênese somática em *E. guineensis*. Possibilitando, assim, que novos estudos sejam realizados visando um aumento na eficiência na produção de embriões somáticos e formação de mudas.

Palavras- chave: *Elaeis guineensis*; embriogênese somática; ontogênese, acúmulo de amido.

Chapter 2

ONTOGENY OF SOMATIC EMBRYOGENESIS IN OIL PALM (*Elaeis guineensis* JACQ.) FROM MATURE ZYGOTIC EMBRYOS

Abstract

The aim of this study was to describe the ontogenetic and histochemical events involving the somatic embryogenesis process in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). Zygotic embryos were inoculated on MS modified medium by supplementing with 450 μM picloram. At 14 days in the induction medium the first divisions in perivascular cells and procambial were observed. This region has progressed to the formation of meristematic mass, after 21 days, indicating their perivascular origin. Primary calluses arose after 45 days of culture, followed by a progression to embryogenic calluses at 90 days. The proembryos formation, from meristematic cells, occurred after 135 days of cultivation. The proembryos were surrounded by a thickened outer wall, clearly separating them from the surrounding tissues, indicating their unicellular origin. When transferred to the maturation phase in the culture medium MTD-1 (0.6 μM NAA and 12.3 μM 2iP) and MTD-2 (40 μM picloram), we observed the somatic embryos regeneration at different development stages (globular and torpedo.) The totally regenerated somatic embryos presented protoderm, plumule and procambial strand. Then were transferred to culture medium without growth regulators (regeneration phase of plants), being successfully observed the conversion of somatic embryos in plants. The starch accumulation during the somatic embryogenesis process was concentrated near the cell intense division's cores and in the cortex of the primary callus and embryogenic. However, there was no observation of starch accumulation in different stages of somatic embryos. These results allow a better understanding of the process of somatic embryogenesis in *E. guineensis*. Allowing, therefore, that further studies are made in order to increase efficiency in the production of somatic embryos and seedlings.

Keywords: *Elaeis guineensis*; somatic embryogenesis; ontogeny, accumulation of starch.

1 – Introdução

O dendezeiro (*Elaeis guineensis* JACQ.) é uma espécie monocotiledônea membro da família Arecaceae (Golvaerts & Dransfield, 2005). Seu cultivo é predominante feito em regiões tropicais, como a Ásia, África e América do Sul, constituindo-se como uma das principais fontes de óleo vegetal do mundo, com rendimento de óleo entre 5 a 7 toneladas por hectare/ano sob condições favoráveis de desenvolvimento (Rajesh *et al.*, 2003; Jouannic *et al.*, 2005; Deore & Johnson, 2008).

Atualmente, a produção brasileira deste óleo gira em torno de 115 mil toneladas/ano, não chegando, portanto, a 1% do total produzido pela Malásia e 0,5% da produção mundial. Ao nível internacional, o Brasil ocupa o 13º lugar na produção desta oleaginosa. O Estado com maior produção é o Pará, responsável por aproximadamente 85% do óleo produzido no país. Na América Latina, o Brasil ocupa o 3º lugar, logo após as produções da Colômbia e Equador. No entanto, o dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) tem sido considerado uma cultura de grande potencial agrícola ao País, pelo fato de seu óleo possuir alto poder calorífico, abrindo possibilidades de ser utilizado como biocombustível, além da cultura poder ser plantada em áreas desmatadas e degradadas da Amazônia (Lopes *et al.*, 2008; Chia *et al.*, 2009).

Nesse contexto, programas de melhoramento desta espécie têm sido estrategicamente implementados por instituições de pesquisa, com ênfase na introdução, seleção e melhoramento genético de materiais com características agronômicas de interesse. No entanto, por tratar-se de uma espécie monocotiledônea típica, o dendezeiro possui um único ápice crescente, impedindo que sua multiplicação seja feita vegetativamente por meios convencionais, fato que torna praticamente impossível a obtenção de culturas uniformes e a perpetuação das características de um indivíduo de

alto valor genético selecionado. Portanto, torna-se imperativo que se avance nas pesquisas para a obtenção de protocolos seguros e confiáveis para a propagação clonal de materiais superiores, seja para a produção de mudas em larga escala, seja para reduzir ciclos de seleção e auxiliar programas de melhoramento genéticos da cultura (Scherwinski-Pereira et al. 2010).

Entre as diferentes técnicas de clonagem *in vitro*, a embriogênese somática (ES) é sem dúvida a mais indicada para a propagação clonal de palmeiras (Schwendiman *et al.*, 1988; Teixeira *et al.*, 1994; Guerra & Handro, 1998; Ledo *et al.*, 2002; Karun *et al.*, 2004; Scherwinski-Pereira et al. 2010). Esta técnica permite a regeneração de plantas por meio de estruturas bipolares (embriões somáticos), a partir de células somáticas, através de uma série ordenada de fases embriogênicas, sem que ocorra a fusão de gametas (Portillo *et al.*, 2007). Durante o processo de propagação clonal, os embriões somáticos apresentam características anatômicas semelhantes aos embriões zigóticos. Ambos são caracterizados pela diferenciação do ápice caulinar e radicular, passando geralmente pelos estágios de desenvolvimento embrionários: globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar. No entanto, embora exista um vasto número de trabalhos na literatura, a ES ainda está longe de estar completamente dominada e bem entendida, muito embora se saiba que, de maneira geral, a indução de calos e o uso de auxinas são pré-requisitos fundamentais para se obter resultados satisfatórios (Zimmermam, 1993; Fehér *et al.*, 2003; Corredoira *et al.*, 2006).

A utilização das observações histológicas durante o processo de ES tem se mostrado uma ferramenta útil para melhor entendimento do processo embriogênico. O estudo do desenvolvimento celular e dos tecidos, nas diferentes etapas do processo, tem ajudado a melhorar a eficiência dos protocolos de propagação clonal, permitindo a identificação de alterações associadas com a posição e a atividade das células com

competência embriogênica, assim como todo o desenvolvimento ontogênico (Verdeil *et al.*, 2001; Sané *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2006; Ulisses *et al.*, 2010).

O desenvolvimento ontogênico dos embriões somáticos em monotiledôneas, desde a origem das células meristemáticas até sua completa diferenciação, varia de acordo com a espécie (Davoodi *et al.*, 2002; Sáenz *et al.*, 2006). Moura *et al.* (2009) constataram, durante a ES de macaúba (*Acrocomia aculeata*) a partir de embriões zigóticos, que as células meristemáticas originavam-se de células do procâmbio ou de células perivasculares que proliferavam produzindo massas meristemáticas em meio de indução. Entretanto, a iniciação do desenvolvimento da embriogênese somática de dendezeiro (*Eleais guineensis*), também a partir de embriões zigóticos, revelou pela análise morfo-anatômica origem subepidermal (Kanchanapoom & Domyoas, 1999).

Por meio de estudos morfo-anatômicos também é possível identificar as fases do desenvolvimento embrionário (Portillo *et al.*, 2007). Verdeil *et al.* (2001) estudando a aquisição da competência embriogênica em *Cocos nucifera* observaram, aos 56 dias de cultivo, a formação de pró-embriões. Esses mesmos autores verificaram mudanças na parede celular, como o fechamento dos plasmodesmas e deposição de calose, e que esses eventos levariam o isolamento necessário para a reprogramação celular e início dos eventos embriogênicos. Portanto, um conhecimento mais aprofundado dos eventos morfo-anatômicos envolvidos no processo embriogênico podem melhorar sobremaneira o entendimento das diferentes etapas envolvidas na ES, além de poder contribuir para que determinadas condições de cultivo sejam melhor adequadas, como por exemplo, a constituição de meios de cultura. Além disso, não é difícil se imaginar que a exata caracterização morfo-anatômica dos diferentes estágios da ES em uma espécie poderia constituir-se como um marcador morfológico do processo (Sáenz *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2009).

Nesse contexto, este trabalho teve por objetivo elucidar a ontogênese e os eventos histoquímicos envolvidos durante a embriogênese somática de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) a partir de embriões zigóticos maduros.

2 – Material e métodos

2.1 – Material Vegetal

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos II da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Brasília – DF. Foram consideradas três fases durante a embriogênese somática de híbridos de *Elaeis guineensis*: indução de calos embriogênicos, diferenciação e maturação de embriões somáticos e regeneração de plantas. As sementes maduras foram fornecidas pela Embrapa Amazônia Ocidental (Estação Experimental do Rio Urubu), localizada em Rio Preto da Eva, AM, Brasil.

Os embriões zigóticos foram inoculados em meio de cultura composto pelos sais e vitaminas de MS alterado (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com 20 g.L⁻¹ de sacarose, 0,5 g.L⁻¹ de glutamina, 2,5 g.L⁻¹ de carvão ativado, 450 µM de picloram e solidificado com 2,5 g.L⁻¹ de Phytigel (Sigma®). Os explantes permaneceram nesta fase por um período de 150 dias, até a obtenção de calos embriogênicos,.

Para a etapa de diferenciação e maturação de embriões somáticos, foram resgatados calos embriogênicos provenientes da fase de indução. Nesta fase foram testados dois meios de cultura: MDM-1 (meio de diferenciação e maturação), suplementando com 0,6µM de ANA e 12,3 µM 2-iP, e o segundo meio (MDM-2) composto de 40µM de picloran. Nesta fase, os explantes permaneceram por 90 dias. Após a etapa de maturação, os embriões somáticos foram transferidos para um novo

meio de cultura isento de reguladores de crescimento, para germinação e regeneração de plantas.

2.2 – Análises anatômicas e histoquímicas

Para a análise anatômica os explantes foram coletados aos 0, 14, 21, 30, 45, 60, 90, 135 e 150 dias após a indução da embriogênese somática. Na fase de diferenciação e maturação de embriões somáticos os explantes foram coletados após 60 dias em ambos os meios de cultura testados. Seguido pela coleta aos 30 e 90 dias em meio de regeneração de plantas. 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 uma série alcoólica crescente (70-100%), infiltradas e incluídas em historresina (Leica®) de acordo com as recomendações do fabricante. Cortes seriados transversais e longitudinais (7µm) foram obtidos em micrótomo rotatório manual (Leica modelo RM 2125), 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), e submetidos ao teste de lugol (Johansen, 1940) para detecção de grãos de amido, seguido da montagem entre lâmina-lamínula com Entellan. Para a identificação de lipídios totais, foram realizados cortes transversais de materiais frescos de embriões zigóticos. Os cortes foram submetidos ao teste com Sudan IV (Gerlach, 1984). Os resultados foram registrados em fotomicroscópio Zeiss, modelo Axioskop, acoplado a um sistema digital de captura de imagens (Software ImagePro 4.0).

3 – Resultados e discussão

Embriões zigóticos maduros foram utilizados como explantes para a embriogênese somática de *Elaeis guineensis* (Figura 1 B e C). Neste estágio, o embrião é cônico e pequeno em relação ao volume total do endosperma, com cerca de 5mm (Figura 1 B e C), constituído pela região distal e proximal. A região distal corresponde ao haustório e contém três tipos de células: do meristema fundamental, do procâmbio e da protoderme. E a região proximal entende-se com os tecidos próximos ao eixo embrionário, contendo folhas primordiais que envolvem o meristema apical ou plúmula (Figura 1 D e E). Entretanto, as duas regiões podem ser distinguidas por meio da coloração, onde em material fresco, logo após a retirada do embrião da semente, a porção mais amarelada corresponde a região proximal e, a porção mais clara, de cor branca corresponde à região distal (Figura 1 C).

O embrião zigótico de *E. guineensis* é semelhante ao da maioria dos embriões das espécies da família Arecaceae, como *Acrocomia aculeata* (Moura *et al.*, 2010), *Oenocarpus minor* (Oliveira *et al.*, 2010), *Euterpe precatória* (Aguiar & Mendonça, 2003) e *Cocos nucifera* (Sugimura & Murakami, 1990), apresentando um único cotilédone denominado haustório, e o meristema apical coberto pelos primórdios foliares.

As análises histoquímicas realizadas nos embriões zigóticos evidenciaram o acúmulo de lipídio como material de reserva (Figura 1 F), entretanto, não foram detectados grãos de amido no explante. O grande acúmulo de lipídios em células dos embriões zigóticos também é comum em outras espécies da família Arecaceae (Moura *et al.*, 2010; Demason, 1988). Os grãos de lipídios são de suma importância nos estágios iniciais de germinação e no estabelecimento de plântulas. Neste período, o haustório

participa ativamente na hidrólise dos lipídios e mobilização das reservas (Verdeil & Hocher, 2002).

Os embriões zigóticos apresentaram os primeiros sinais de proliferação celular após 14 dias em meio de indução (450 μ M), quando foi possível observar o intumescimento e a formação de estrias na região distal do explante (Figura 2 A). Nesta fase, as observações histológicas evidenciaram que as primeiras divisões celulares ocorreram em células procambiais e nas parenquimáticas adjacentes ao tecido vascular (Figura 2 B). Como consequência, essas divisões adicionaram novas camadas celulares no explante, proporcionando o intumescimento dos embriões. Segundo Steinmacher *et al.* (2007), nas palmeiras as células adjacentes ao tecido vascular, aparentemente, têm maior capacidade morfogênica. Em estudos com *E. guineensis* (Schwendiman *et al.*, 1988), *Euterpe edulis* (Guerra & Handro, 1998) e *P. dactylifera* (Sané *et al.*, 2006) mostrou que os primeiros eventos da divisão celular durante a embriogênese somática sempre foram observados em células adjacentes ao tecido vascular, resultando em calos meristemáticos primários ou nodulares semelhantes aos observados no presente estudo.

Observou-se que as divisões celulares ocorreram com maior intensidade na região proximal do explante, demonstrando ser a região mais responsiva aos estímulos. Verificou-se ainda a formação de células perivasculares isodiamétricas, com citoplasma denso, núcleo volumoso e nucléolos evidentes. Já as procambiais, caracterizaram-se como alongadas, apresentando seu maior eixo paralelo ao maior eixo do embrião. Nas células vasculares foi possível observar a diferenciação de elementos traqueais com padrão helicoidal de deposição de parede secundária, evidenciada pela coloração esverdeada (Figura 1 B e C).

Na região distal do explante, observaram-se invaginações da protoderme e feixes de procâmbio. A protoderme possuía apenas uma camada celular, com células

retangulares contendo grãos de amido. Ressalta-se que, na protoderme as divisões ocorreram no sentido periclinal, formando apenas células epidérmicas. As camadas subepidérmicas apresentaram células menores, enquanto no interior do explante, as células eram maiores, isodiamétricas e com citoplasma pouco denso (Figura 2 D).

Nesta fase, observou-se o acúmulo de grãos de amido ocorreu no tecido parenquimático, principalmente nas células localizadas próximas aos centros de divisão celular (Figura 2 E). Conforme verificado, o embrião zigótico de *E. guineensis* não possui amido como material de reserva, indicando que a síntese do amido ocorreu durante as duas primeiras semanas de indução da embriogênese somática.

O acúmulo de amido nas células parenquimáticas adjacentes as regiões com intensas divisões pode estar ligado à aquisição de competência embriogênica. Magnaval *et al.* (1991) estudando a embriogênese somática de *Cocos nucifera* observaram a presença de amido nas células adjacentes às células meristemáticas. Kanchanapoom & Domyoas (1999) também detectaram acúmulo de amido nos calos e nos embrióides bipolares de *E. guineensis*, indicando que o amido acompanha a formação de embriões somáticos. Entretanto, o acúmulo do amido durante o processo de embriogênese somática ainda não está claro. A pouca atividade mitótica das células parenquimáticas que armazenam esse material de reserva, pode ser a provável hipótese, já que as células em intensa divisão, geralmente não apresentam acúmulo de amido.

A quantidade de amido também pode mudar dependendo da fase de crescimento do embrião, pois, a divisão e a diferenciação celular demandam energia, e pela degradação do amido são formados intermediários glicolíticos que submetidos à catálise oxidativa, suprem os altos níveis de ATP necessários para o metabolismo celular (Martin *et al.*, 2000).

Aos 21 dias em meio de indução, os explantes apresentavam-se com aspecto mais intumescido e com coloração amarelada e as invaginações da protoderme se tornaram mais evidentes (Figura 3 A). A análise histológica evidenciou que as células adjacentes ao tecido vascular que se apresentavam em divisão celular progrediram para a formação de massas de células meristemáticas (Figura 3 B e D). Essa região meristemática apresentou células pequenas, isodiamétricas, com citoplasma denso, núcleo e nucléolos evidentes (Figura 3 E). Na região proximal, observou-se o desenvolvimento dos primórdios foliares do embrião zigótico, nos quais, foi possível observar divisões das células procambiais (Figura 3 B).

Os resultados obtidos nesse trabalho discordam daqueles obtidos por Kanchanapoom & Domyoas (1999), que estudando a ontogênese da embriogênese somática a partir de embriões zigóticos de *E. guineensis* descrevem que as massas de células meristemáticas tinham origem a partir de células subepidermicas. Moura *et al.* (2009) também observaram que embriões somáticos se originavam de massas celulares meristemáticas formadas a partir de células perivasculares em embriões zigóticos de *Acrocomia aculeata*. Apesar do tipo diferencial de tecido vegetal utilizado, Schwendiman *et al.* (1988) também observaram que calos nodulares de dendezeiro, provenientes de folhas jovens tiveram origem a partir de células perivasculares. Esse comportamento também foi observado na indução da embriogênese somática a partir de folhas de *Euterpe edulis* (Guerra & Handro, 1998).

Após 30 dias de cultivo dos embriões zigóticos em meio de indução da embriogênese somática, verificou-se na região proximal do explante que as massas celulares meristemáticas, próximas aos cordões de procâmbio, tornaram-se mais evidentes. Já na região distal, os feixes procambiais localizados nas invaginações da protoderme apresentaram intensa atividade mitótica que proporcionou um incremento de

massa celular nessa região do explante (Figura 3 F). O acúmulo de grãos de amido aos 21 e 30 dias de cultivo se concentrou nas células próximas a região de divisão celular (massa celular meristemática), e também nas células parenquimáticas subepidérmicas da região distal do explante confirmando a hipótese que o seu acúmulo seja um forte indicador de tecidos com alta competência embriogênica (Figura 3 C e F).

Aos 45 dias de cultivo, a ativa divisão celular nas regiões meristemáticas provocou a ruptura da protoderme da região proximal do explante, onde se encontrava o eixo embrionário, expondo as extensões dos cordões procambiais e as massas meristemáticas (Figura 4 A e B). Pode-se observar também, a formação de calos com aspecto nodular e coloração amarelada, entre os feixes de procâmbio e a protoderme, caracterizado como calo primário (Figura 4 A). Através das análises histológicas, foi possível caracterizar os calos nodulares, os quais eram constituídos somente por células meristemáticas (Figura 4 D e E).

Steinmacher *et al.* (2007) estudando a embriogênese somática de *Bactris gasipaes* (Kunth), observaram nos embriões zigóticos em cultivo, após quatro semanas em meio de indução, divisões celulares em todo o explante, com posterior formação de calo primário de coloração amarelada. Esses mesmos autores evidenciaram através de análises histológicas, que os calos eram constituídos de células meristemáticas. Moura *et al.* (2009) também observaram calos nodulares em *Acrocomia aculeata* após 50 dias de cultivo em meio de indução. Os calos eram constituídos de células pequenas, isodiamétricas, com citoplasma denso e núcleo evidente, caracterizando células de tecido meristemático.

Nesta fase, a região distal do explante apresentou a diferenciação do procâmbio em elementos traqueais, e o acúmulo de amido nas células parenquimáticas não foi mais observado (Figura 4 F). Isso se deve, possivelmente, à degradação do amido para suprir

os altos níveis de ATP necessário para as divisões e diferenciação do procâmbio. No entanto, o acúmulo de amido foi observado nas células adjacentes às células meristemáticas dos calos nodulares.

A proliferação de calos primários de coloração amarelada foi observada após 60 dias em meio de indução. Através da análise histológica, verificou-se numerosas estruturas nodulares, constituídas principalmente por células meristemáticas. Nesta fase, também foi possível visualizar a formação de primórdios radiculares com meristema fundamental, meristema apical da raiz e coifa (Figura 5 C e E). Aberlenc-Bertossi *et al.* (1999) observaram que culturas embriogênicas de *E. guineensis* mantidas em meio de cultura suplementado com auxinas, apresentavam embriões contendo apenas o ápice radicular. Em contrapartida, esses mesmos autores observaram que após o tratamento com citocinina, os embriões apresentavam os dois eixos meristemáticos diferenciados. Buffard-Morel *et al.* (1992) também observaram a formação de primórdios radiculares na indução de explantes de *Cocos nucifera*.

Aos 90 dias de cultivo houve a formação de calos embriogênicos (Figura 5 D e E). Nesta etapa, pode-se observar a formação de calos constituídos por células meristemáticas, que apresentaram células pequenas, isodiamétricas, com citoplasma denso, núcleo e nucléolos evidentes. Já, na região do córtex do calo observou-se células maiores, com baixa relação núcleo/citoplasma com acúmulo de amido (Figura 5 F). Embriões em estágio globular caracterizados pelo início da formação da protoderme (Figura 5 G) também foram observados nesse período de indução.

A deposição de amido no córtex em calo embriogênico é observada em várias espécies (Cangahuda-Inocente *et al.*, 2009; Moura *et al.*, 2008; Portillo *et al.*, 2007; Verdeil *et al.*, 2001; Raj Bhansali, 1990; El Maâtaoui *et al.*, 1990). Essas observações sugerem que, o amido mobilizado da região do córtex do calo é utilizado como fonte de

energia pelas células meristemáticas em intensa divisão. Mangat *et al.* (1990) trabalhando com organogênese em *Begonia rex* sugeriram que o amido encontrado é mobilizado e utilizado com fonte de energia para o desenvolvimento dos primórdios foliares. Diante do exposto, o metabolismo do amido deve contribuir para suprir os níveis energéticos necessários para a intensa divisão celular e diferenciação dos tecidos.

Aos 135 dias de cultivo em meio de indução, ocorreu a formação de agrupamentos de células em meio às células meristemáticas, caracterizadas como pró-embriões somáticos (Figura 6 B-D). Os pró-embriões apresentavam-se individualizados por um aparente espessamento de parede (Figura 6 C), causado possivelmente pela dissolução da lamela média. Verdeil *et al.* (2001) estudando a aquisição da competência embriogênica em *Cocos nucifera* observaram o isolamento dos pró-embriões pelo espessamento da parede exterior. Esses mesmos autores verificaram mudanças na parede celular como o fechamento dos plasmodesmas e deposição de calose (polímeros de glicose) e que esses eventos levariam o isolamento necessário para a reprogramação celular e início dos eventos embriogênicos. O espessamento de parede ao redor dos pró-embriões também foi verificado por Sané *et al.* (2006) na indução de embriogênese somática em calos de *Phoenix dactylifera*. Nesta fase, verificou-se o acúmulo de amido ocorreu apenas nas células adjacentes aos pró-embriões (Figura 6 D).

Aos 150 dias de cultivo, os explantes apresentaram calos embriogênicos com aspecto nodular, consistência compacta e coloração amarelada (Figura 7 A). As análises histológicas evidenciaram nesta fase, regiões com intensa formação de pró-embriões (Figura 7 B), e embriões em estágio globular constituído por células meristemáticas delimitadas por uma protoderme característica, e não conectados ao tecido de origem (Figura 7 D). O isolamento do embrião somático demonstrando independência do tecido de origem evidencia uma origem unicelular. Esses resultados corroboram os obtidos por

Kanchanapoom & Domyoas (1999), os quais descreveram que a embriogênese de *E. guineensis* obtida a partir de embriões zigóticos teve origem unicelular.

Embriões somáticos em fase mais avançada também foram observados. Estes encontravam-se delimitados por uma protoderme e apresentavam início de organização das células procambiais (Figura 7 E). Além disso, esses embriões apresentaram duas estruturas anatômicas distintas: uma região apical alongada e constituída pelo haustório (parte principal do cotilédone) e uma região basal curta, onde se localizará o futuro eixo embrionário. Santos *et al.*, (2006) observaram que o início da formação do procâmbio ocorreu somente quando os embriões somáticos estavam no estágio globular mais avançado.

Os diferentes estágios observados aos 150 dias de cultivo evidenciam o desenvolvimento não sincronizado da embriogênese somática de *E. guineensis*. O desenvolvimento assincrônico de embriões somáticos em palmeiras é freqüentemente relatado na literatura. Ledo *et al.* (2002) observaram que o meio de cultura suplementando com ANA e 2iP foi eficiente para a multiplicação e manutenção de calos embriogênicos de *Euterpe oleracea* Mart., além de promover a progressão dos calos em embriões somáticos, caracterizando desenvolvimento embriogênico não sincronizado para esta espécie. Em pupunheira, após a transferência dos calos embriogênicos para um meio de regeneração, Steinmacher *et al.* (2007) observaram respostas morfológicas distintas, incluindo o desenvolvimento não sincronizado dos embriões somáticos.

Após 150 dias na fase de indução, os calos embriogênicos e os pró-embriões, foram transferidos para diferentes meios de cultura, visando à diferenciação e maturação de embriões somáticos. O primeiro meio de cultura MDM-1 (meio de diferenciação e maturação) foi suplementando com 0,6 μM de ANA e 12,3 μM 2-iP, e o segundo meio (MDM-2) composto de 40 μM de picloran.

A passagem dos calos embriogênicos para a fase de maturação permitiu observar após 60 dias de cultivo, a formação intensa de embriões somáticos em estágios globulares (Figura 8 B) e em fase mais avançada (Figura 8 C e D), caracterizado pelo haustório bem desenvolvido e a formação dos cordões de procâmbio. Neste período também foi observado embrião somático totalmente diferenciado, apresentando haustório, meristema apical (plúmula) e duas bainhas foliares (Figura 8 E e F). O desenvolvimento de embriões somáticos isolados do tecido de origem, em diferentes estágios de diferenciação celular, também foi observado durante a embriogênese somática em *Bactris gasipaes* (Steinmacher *et al.*, 2007).

Neste estágio de desenvolvimento, não foi possível observar a formação do primórdio radicular. Segundo Camillo *et al.* (2009) o meristema radicular em *E. guineensis* só inicia sua diferenciação após o desenvolvimento dos primórdios foliares. Esses resultados também foram observados em embriões de *Cocos nucifera* (Haccius & Philip, 1979) e *Euterpe precatória* (Aguiar & Mendça, 2003). Nos embriões somáticos, provenientes dos dois meios de diferenciação/maturação testados, não foi observado acúmulo de amido.

Vários trabalhos têm relatado que as plantas regeneradas em meio de cultura suplementando com citocinina, quando cultivadas no campo apresentam anormalidade floral (Besse *et al.*, 1992; Jones *et al.*, 1990; Jones *et al.*, 1995). No entanto, Aberlenc-Bertossi *et al.*, (1999) observaram que o cultivo em meio de cultura com adição de citocinina proporcionou um aumento no número de embriões somáticos com formação do eixo apical. No presente trabalho não foi observado diferenças quanto ao desenvolvimento dos embriões somáticos nos meios de maturação testados, com e sem citocinina.

Após 90 dias em meio de maturação os embriões somáticos foram transferidos para o meio de cultura desprovido de reguladores de crescimento (fase de regeneração). Nesta etapa, os embriões somáticos apresentaram forma arredondada e alongada, apresentando tamanho maior quando comparado com o embrião zigótico (Figura 1 D e 9 A). As análises histológicas evidenciaram a separação entre a região distal e proximal (Figura 9 A). A protoderme, o meristema fundamental e o procâmbio estão claramente identificados (Figura 9 B, C e D). O eixo embrionário está completamente formado, apresentando pólo radicular, meristema apical (plúmula) (Figura 9 C) e três primórdios foliares (Figura 9 D). A diferenciação completa de embriões somáticos também foi observada durante a propagação clonal de *Phoenix dactylifera*, utilizando embriões zigóticos como fonte de explante (Sané *et al.*, 2006). Esses resultados também foram obtidos por Scherwinski-Pereira *et al.* (2010), durante a embriogênese somática de *E. guineensis*, utilizando a técnica de *TCL* (*Thin Cell Layer*).

Nesta fase, também é possível observar o início do processo de germinação caracterizado pela abertura da fenda cotiledonar (Figura 9 D) permitindo, posteriormente, a protusão dos primórdios foliares. A conversão dos embriões somáticos em plântulas foi observada aos 90 dias em meio de regeneração (Figura 9 E). As análises histológicas evidenciaram o desenvolvimento do ápice caulinar, que conta com oito primórdios foliares diferenciados, sendo que os dois primeiros permaneceram no estágio de bainha envolvendo os primórdios que desenvolveram posteriormente (Figura 9 F e G). No entanto, nesta etapa não foi verificado a protusão da radícula. Esses dados corroboram com Camillo *et al.* (2009), no qual, durante a germinação de embriões zigóticos de *E. guineensis*, observaram que as bainhas são as primeiras estruturas a emergir, e sinalizam o início da germinação. Esses mesmos autores

verificaram que a protusão da radícula ocorre somente após a emergência das primeiras folhas verdadeiras, indicando similaridade com a embriogênese somática.

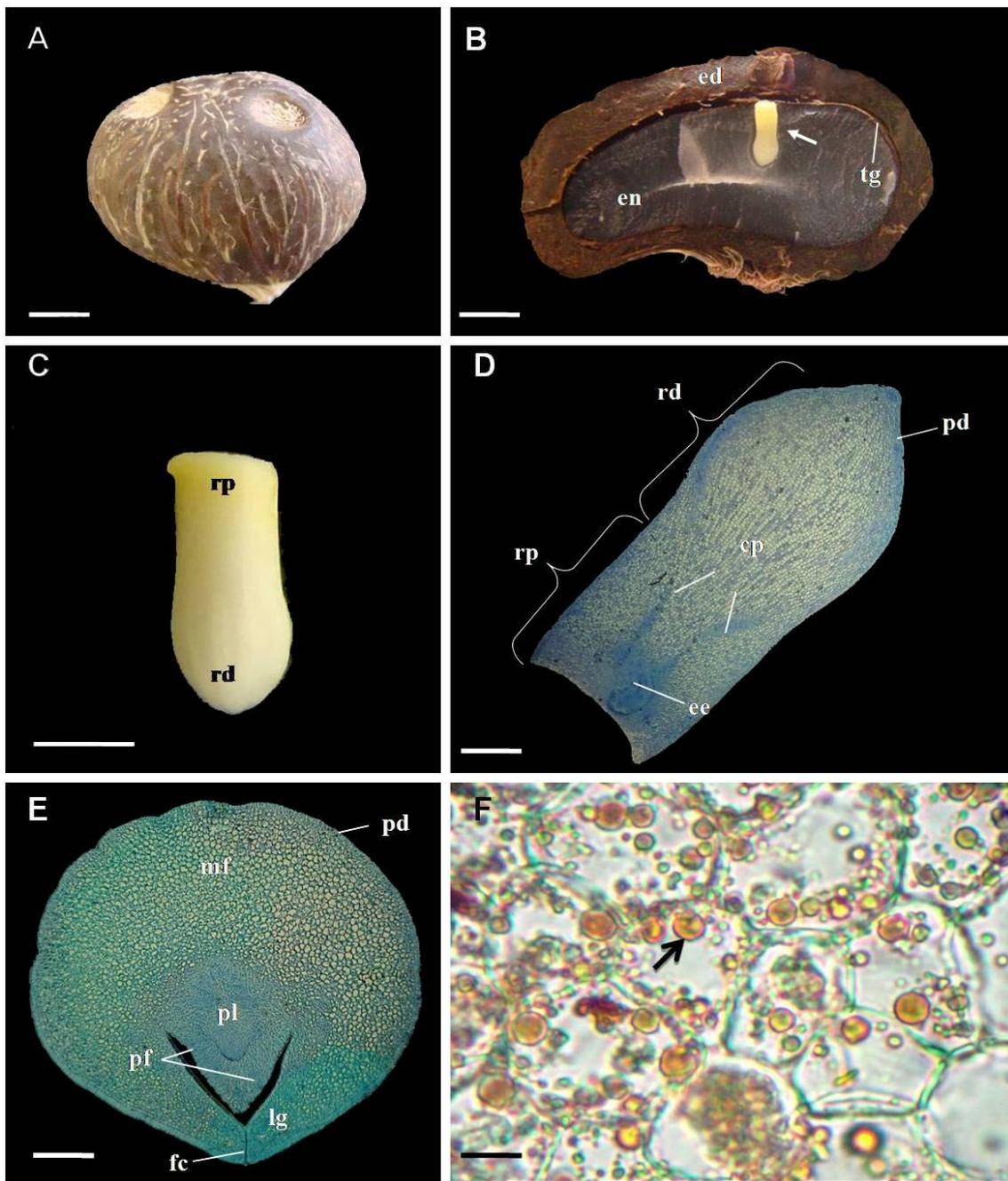


Figura 1: Explante utilizado para a indução da embriogênese somática de *Elaeis guineensis* Jacq. A: Diásporo (barra = 3 mm). B: Corte longitudinal do diásporo evidenciando o embrião zigótico (seta) (barra = 5 mm). C: Embrião zigótico (barra = 2 mm). D: Corte longitudinal do embrião zigótico (barra = 200 μ m). E: Corte transversal da região proximal, evidenciando o eixo embrionário (barra = 200 μ m). F: Acúmulo de lipídio nas células do meristema fundamental do embrião zigótico (seta) (barra = 200 μ m). Cp: cordões de procâmbio; ed: endocarpo; ee: eixo embrionário; en: endosperma; fc: fenda codiledonar; lg: lígula; mf: meristema fundamental; pd: protoderme; pf: primórdios foliares; pl: plúmula; rd: região distal; rp: região proximal; tg: tegumento.

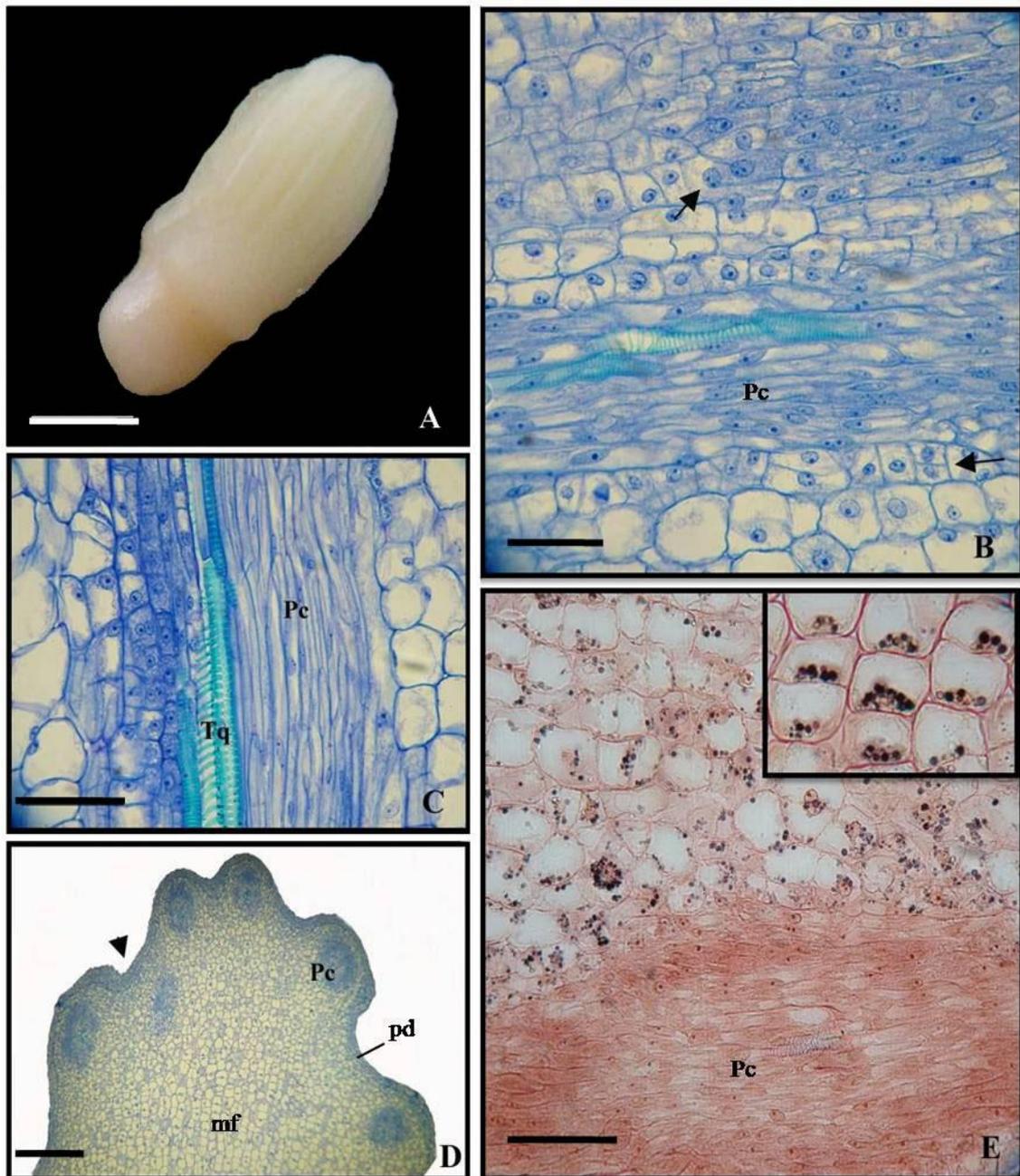


Figura 2: Embrião zigótico de *Elaeis guineensis* Jacq. aos 14 dias de cultivo em meio de cultura para a indução da embriogênese somática (450 μ M de picloram plicoran). A: Embrião zigótico intumescido, apresentando estrias na região distal (barra = 5 mm). B: Detalhe das células perivasculares (setas) e procambiais em divisão (barra = 100 μ m). C: Detalhe dos elementos traqueais com paredes secundárias evidenciadas pela coloração esverdeada (barra = 100 μ m). D: Região distal do embrião zigótico, com invaginações da protoderme (seta) e formação de feixes procambiais (barra = 100 μ m). E: Acúmulo de amido nas células parenquimáticas adjacentes a região de intensa divisão do procâmbio (barra = 100 μ m). Mf: meristema fundamental; pc: procâmbio; pd: protoderme; tq: elementos traqueais.

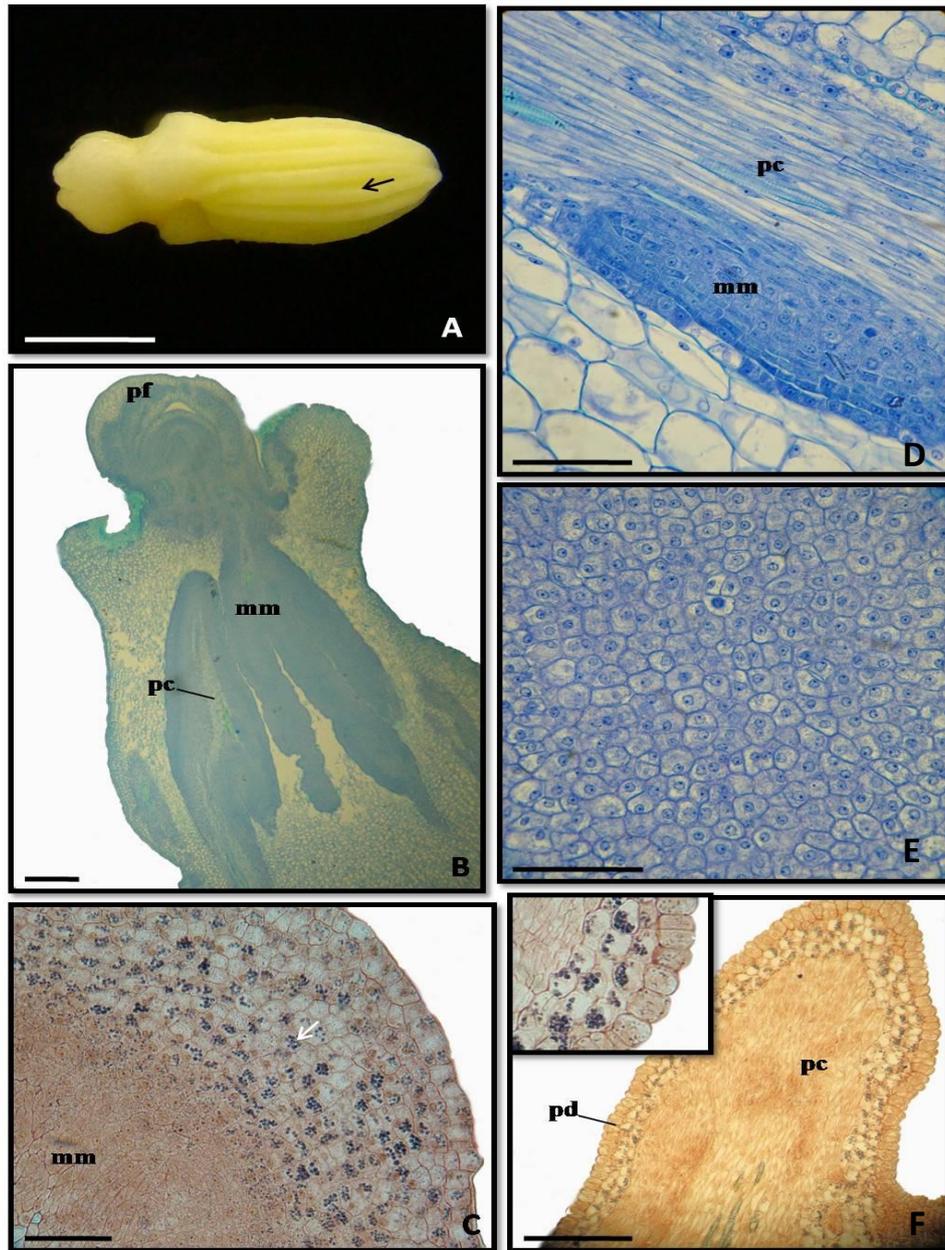


Figura 3: Embrião zigótico de *Elaeis guineensis* Jacq. aos 21 e 30 dias de cultivo em meio de cultura de indução da embriogênese somática. A: Embrião zigótico intumescido e com estrias na região distal do explante (seta) (barra = 1 cm). B: Região proximal do explante, com massas celulares meristemáticas ao redor do procâmbio e desenvolvimento dos primórdios foliares (barra = 100 μ m). C: Acúmulo de amido nas células adjacentes das massas meristemáticas aos 30 dias (barra = 100 μ m). D: Detalhe da massa celular meristemática próxima ao feixe procambial aos 21 dias (barra = 100 μ m). E: Região meristemática com células pequenas, isodiamétricas, citoplasma denso e núcleo evidente (barra = 100 μ m). F: Região distal com acúmulo de amido nas células subepidérmicas (seta) e o procâmbio (barra = 100 μ m). Mm: massa meristemática; Pc: procâmbio; pd: protoderme; pf: primórdios foliares.

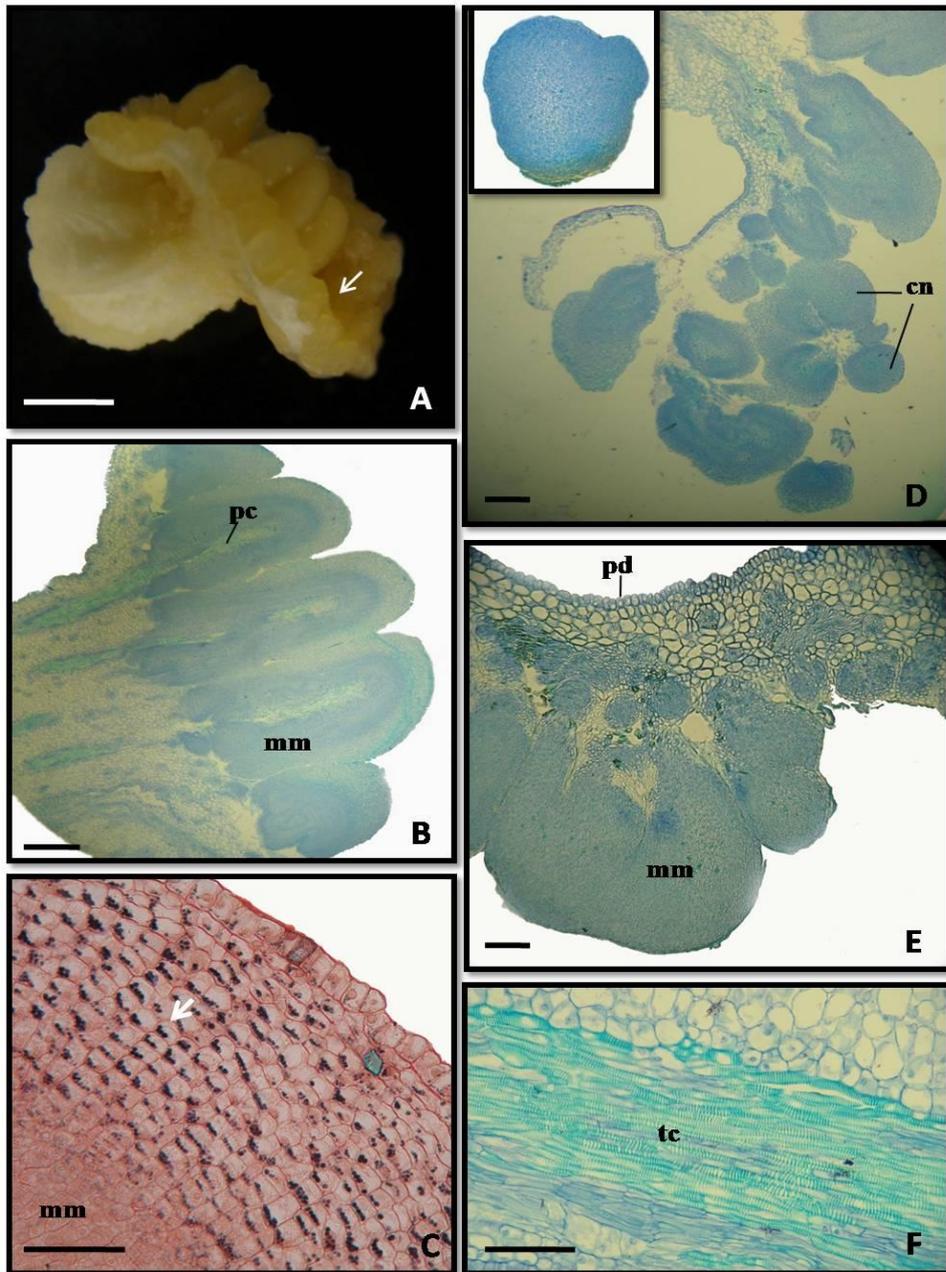


Figura 4: Embrião zigótico de *Elaeis guineensis* Jacq. aos 45 dias de cultivo em meio de cultura para a indução da embriogênese somática. A: Embrião zigótico intumescido com formação de calos nodulares de coloração amarelada (seta) (barra = 1 cm). B: Região proximal do explante, com massas meristemáticas ao redor do procâmbio (barra = 100 µm). C: Acúmulo de amido nas células adjacentes às massas meristemáticas (barra = 100 µm). D: Fragmentação das massas meristemáticas e formação de calos nodulares (barra = 100 µm). E: Região meristemática com células pequenas, isodiamétricas, citoplasma denso e núcleo evidente (barra = 100 µm). F: Região distal com elementos traqueais bem desenvolvidos (barra = 100 µm). Cn: calo nodular; mm: massa meristemática; pc: procâmbio; pd: protoderme; tc: elementos traqueais.

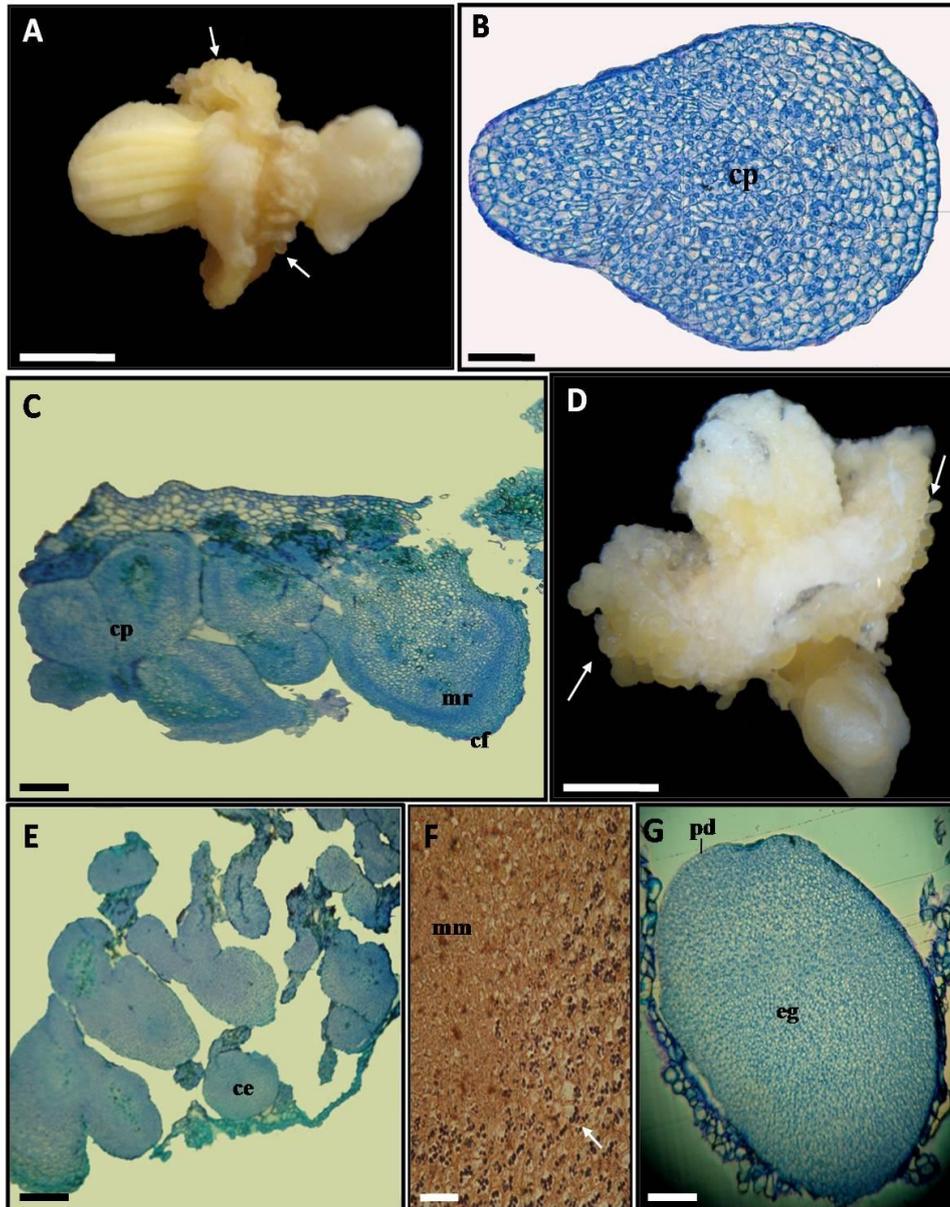


Figura 5: Secções de explante de *Elaeis guineensis* Jacq. aos 60 (A, B e C) e 90 (D, E, F e G) dias de cultivo em meio para indução da embriogênese somática. A: Explante com 60 dias de cultivo, apresentando calo primário (seta) (barra = 0,5 cm). B: Calo com células meristemáticas, caracterizadas por núcleo volumoso e citoplasma denso e com intensas divisões celulares aos 60 dias de cultivo (barra = 100 μ m). C: Aspecto geral de aglomerados celulares e primórdios radiculares em diferenciação aos 60 dias (barra = 100 μ m). D: Calos embriogênicos nodulares e compactos (seta) após 90 dias em meio de indução (barra = 0,5 cm). E: Aspecto geral de calos embriogênicos constituídos por células meristemáticas (barra = 100 μ m). F: Acúmulo de amido no córtex dos calos embriogênicos (barra = 100 μ m). G: Embrião globular caracterizado pelo início da formação da protoderme (seta) após 90 dias de cultivo (barra = 100 μ m). ce: calo embriogênico; cf: coifa; cp: calo primário; eg: embrião globular; mf: meristema radicular; mm: massa meristemática; pd: protoderme.

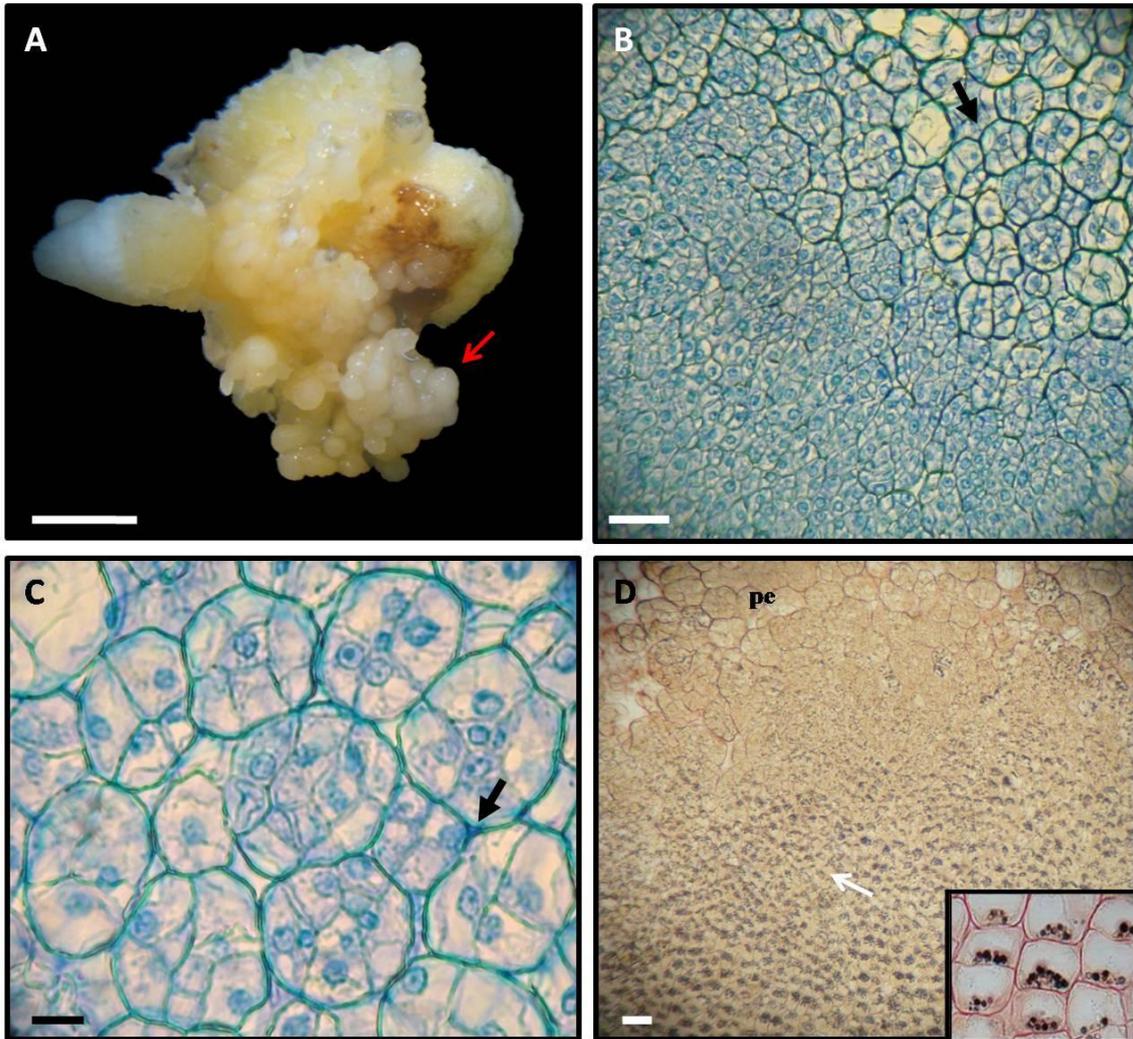


Figura 6: Secções de explante de *Elaeis guineensis* Jacq. aos 135 dias de cultivo em meio para indução da embriogênese somática. A: Explante apresentando calos pró-embriogênicos com aspecto nodular e compacto (seta) (barra = 0,5 cm). B: Início da formação de pró-embriões (seta) (barra = 100 μ m). C: Pró-embriões com parede celular espessada (seta) (barra = 100 μ m). D: Detalhe do acúmulo de amido (seta) nas células adjacentes dos pró-embriões (barra = 100 μ m). PE: pró-embriões.

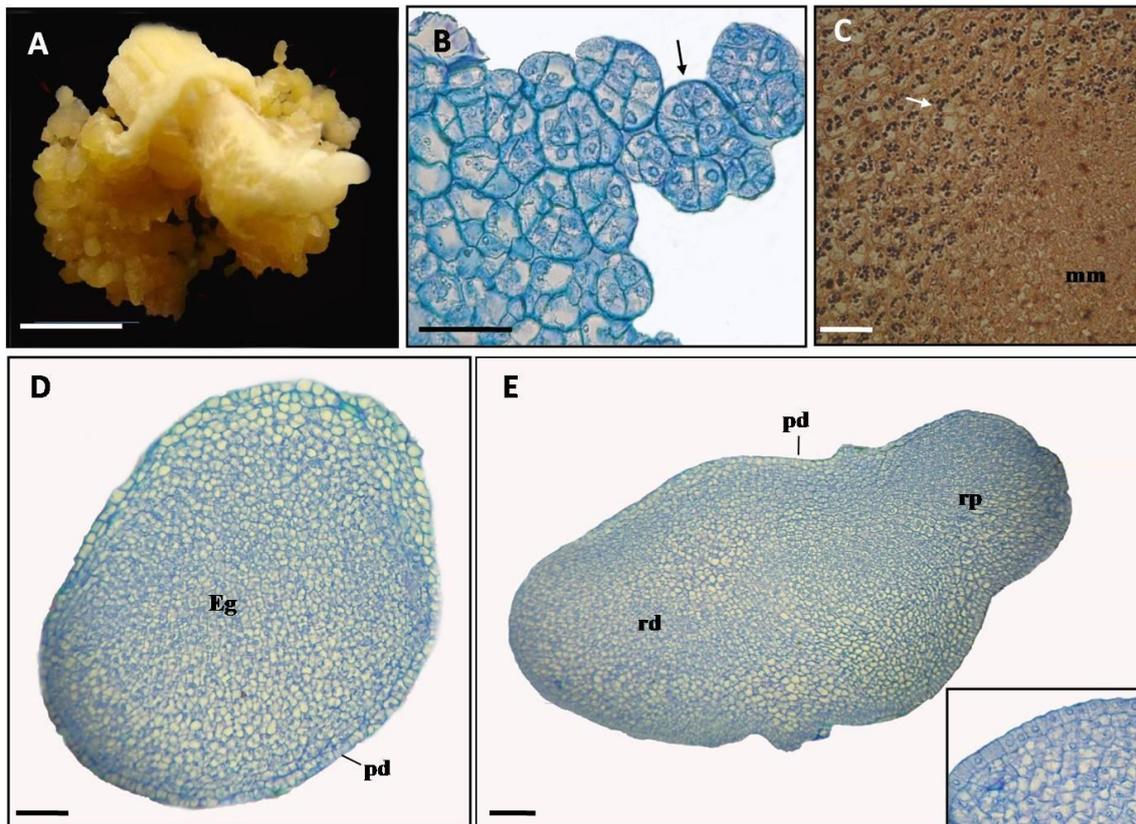


Figura 7: Secções de explante de *Elaeis guineensis* Jacq. aos 150 dias de cultivo em meio para indução da embriogênese somática. A: Calos embriogênicos com aspecto nodular, compacto e coloração amarelada (barra = 1 cm). B: Formação de pró-embriões (seta) (barra = 100 µm). C: Acúmulo de amido nas células adjacentes dos pró-embriões e das massas meristemáticas (barra = 100 µm). D: Embrião somático no estágio globular (barra = 100 µm). E: Embrião somático em estágio mais avançado e delimitado pela protoderme (detalhe) (barra = 100 µm). Eg: embrião globular; mm: massa meristemática; pd: protoderme; rd: região distal; rp: região proximal.

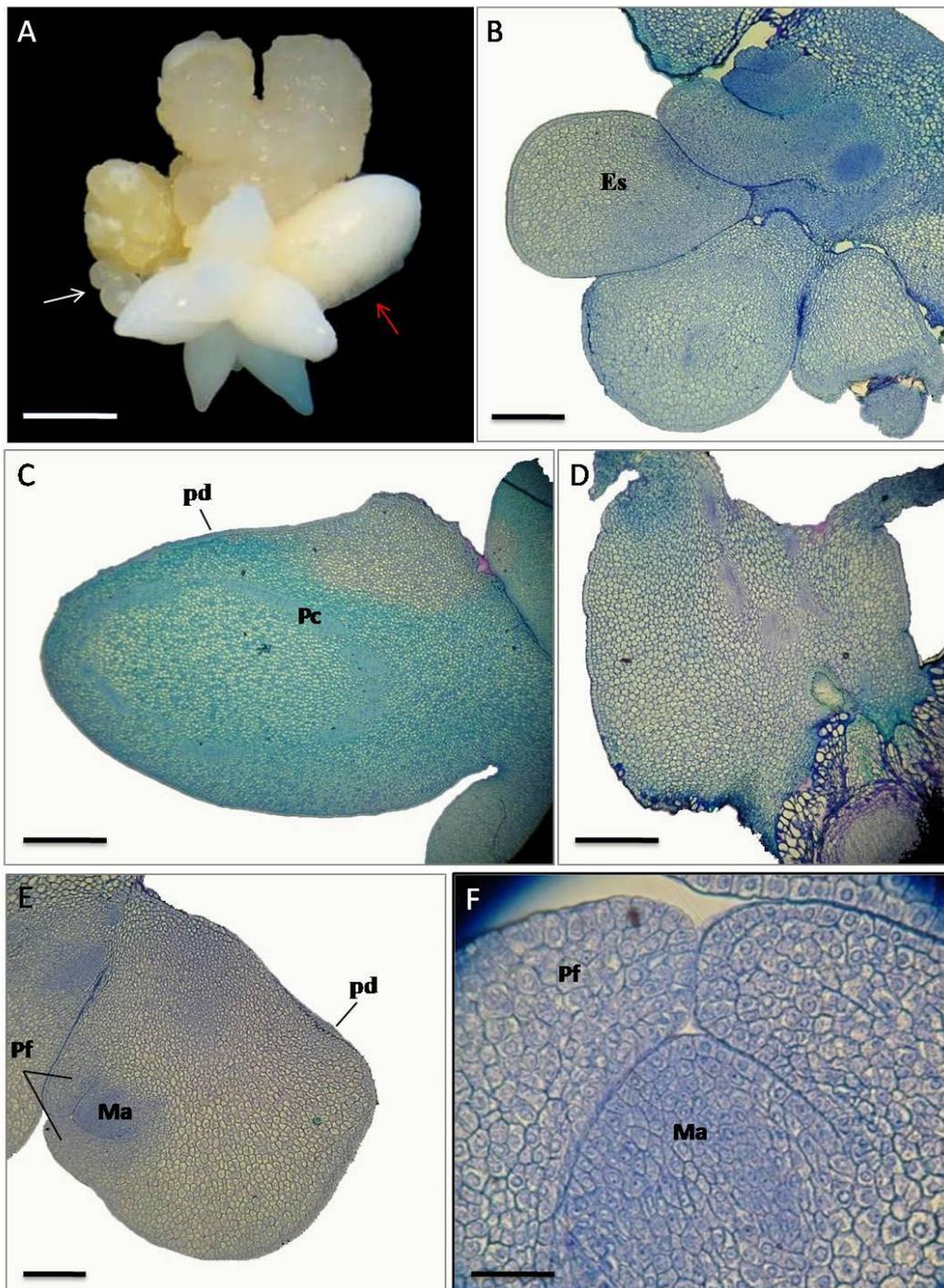


Figura 8: Secções de explante de *Elaeis guineensis* Jacq. aos 60 dias de cultivo em meio de diferenciação e maturação de embriões somáticos. A: Embriões somáticos em estágio globular (seta branca), e torpedo (seta vermelha) (barra = 1 cm). B: Embriões somáticos (barra = 200 μ m). C e D: Embrião somático em estágio mais avançando (barra = 200 μ m). E: Embrião somático totalmente diferenciado (barra = 100 μ m). F: Detalhe do meristema apical do caule (barra = 200 μ m). Es: embrião somático; ma (meristema apical); pc: procâmbio; pd: protoderme; pf: primórdio foliar.

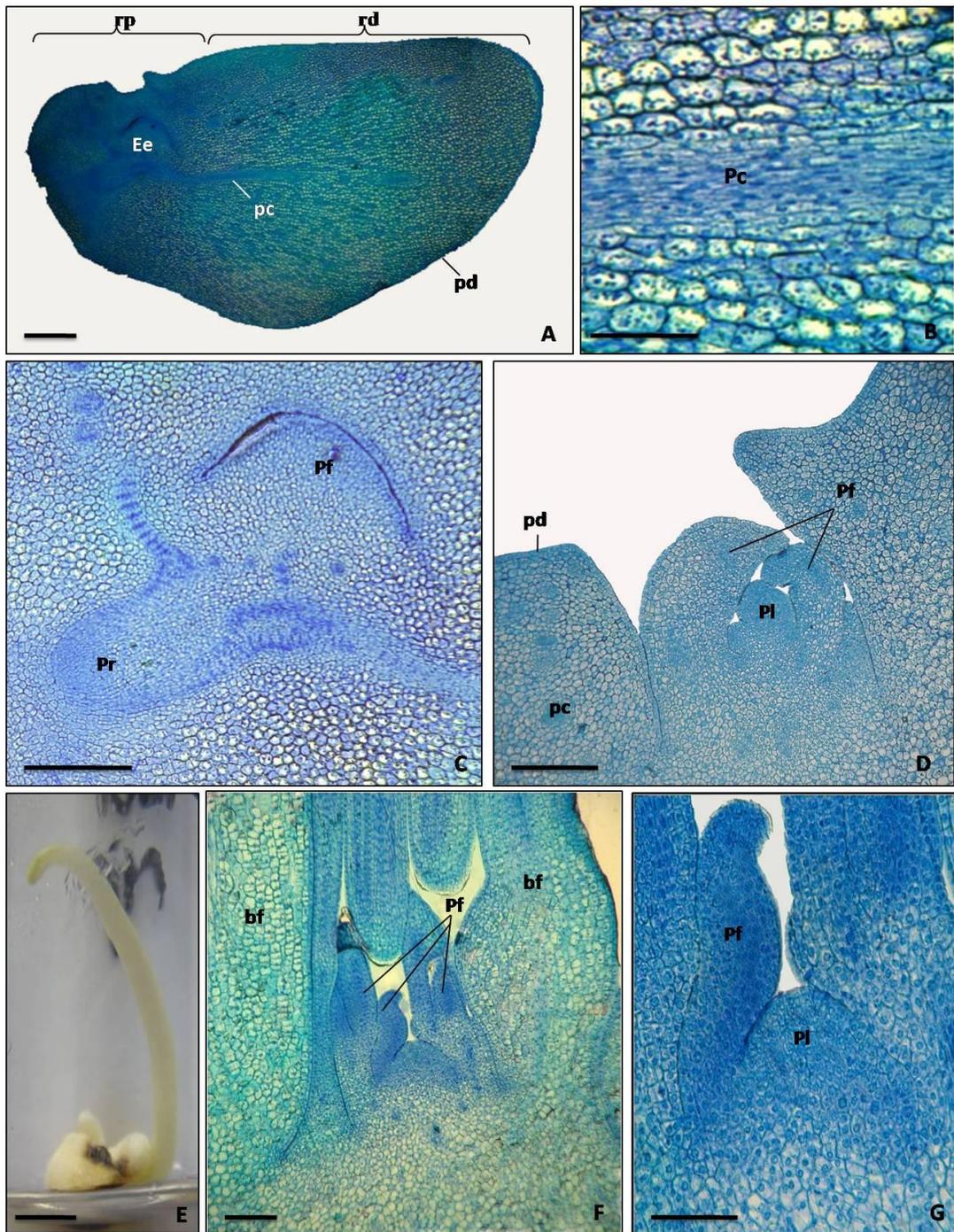


Figura 9: Secções do embrião somático de *Elaeis guineensis* Jacq. aos 30 (A, B, C e D) e 90 (E, F e G) dias no meio de cultura de regeneração). A: Corte longitudinal do embrião somático (barra = 200 μ m). B: Detalhe dos cordões de procâmbio (barra = 100 μ m). C: Detalhe do eixo embrionário (região proximal) (barra = 100 μ m). D: Pólo apical do embrião somático (barra = 50 μ m). E: Conversão do embrião somático em plântula aos 90 dias em meio de regeneração (barra = 1 cm). F: Corte longitudinal da plântula (barra = 200 μ m). G: Detalhe do ápice caulinar (barra = 50 μ m). Bf: bainha foliar; Ee: eixo embrionário; pc: procâmbio; pd: protoderme; pf: primórdio foliar. pl: plúmula; pr: primórdio radicular; rd: região distal; rp: região proximal.

4 – Conclusões

- A origem das células meristemáticas provém das células procâmbiais ou perivasculares.
- Calos primários originam aos 60 dias de cultivo em meio de indução.
- Calos embriogênicos com células isodiamétricas, núcleo volumoso originam aos 90 dias de cultivo em meio de indução.
- Aos 135 dias de cultivo em meio de indução ocorre a formação de pró-embriões.
- O desenvolvimento embriogênico nesta espécie é assincrônico.
- Os embriões somáticos apresentam todas as características dos embriões zigóticos, assim como a conversão de plântulas normais.

5 – Referências bibliográficas

ABERLENC-BERTOSSI, F., NOIROT, M., DUVAL, Y. BA enhances the germination of oil palm somatic embryos derived from embryogenic suspension cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 56: 53–57, 1999.

AGUIAR, M.O., MEDONÇA, M.S. Morfo-anatomia da semente de *Euterpe precatória* (Palmae). *Revista Brasileira de Sementes*, 25: 37-42, 2003.

BESSE I., VERDEIL J.L., DUVAL Y., SOTTA B., MALDINEY R., MIGINIAC E. Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) clonal fidelity: endogenous cytokinins and indoleacetic acid in embryogenic callus cultures. *J. Exp. Bot.* 43 (252): 983–989, 1992.

BUFFARD-MOREL, J., VERDEIL, J.L., PANNETIER, C. Embryogenese somatique du cocotier (*Cocos nucifera* L) a partir d'explants foliaires: études histologiques. *Canadian Journal of Botany*, 70: 735-741, 1992.

CAMILLO, J., LUIS, Z.G., SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. Tolerância de sementes de dendezeiro à criopreservação. *Pesq. agropec. bras.*, 44(2): 211-215, 2009.

CANGAHUALA-INOCENTE, G.C., STEINER, N., MALDONADO, S.B., GUERRA, M.P. Patterns of protein and carbohydrate accumulation during somatic embryogenesis of *Acca sellowiana*. *Pesq. agropec. bras.*, 44(3):217-224, 2009.

CORREDOIRA, E., VALLADARES, S., VIEITEZ, A.M. Morphohistological analysis of the origin and development of somatic embryos from leaves of mature *Quercus robur*. *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant*, 42:525–533, 2006.

DAVOODI, D., MAJIDI, E., KHOSHKAM. Some Morphological and Anatomical Aspects of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) Somatic Embryogenesis in Tissue Culture. *J. Agric. Sci. Technol.*, 4: 63-71, 2002.

DEMASON, D.A. Embryo structure and storage reserve histochemistry in the palm *Washingtonia filifera*. *American Journal of Botany*, 75: 330-337. 1988.

DEORE A.J., JOHNSON T.S. High frequency plant regeneration from leaf-disc cultures of *Jatropha curcas* L.: an important biodiesel crop, *Plant Biotechnol Rep.*, 2: 10–15, 2008.

EDEM, D.O. Palm oil: Biochemical, physiological, nutritional, hematological, and toxicological aspects: A review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 57: 319–341, 2002.

EI MAÂTAOUI, M., ESPAGNAC, H., MICHAUX-FERRIÈRE, N. Histology of callogenesis and somatic embryogenesis induced in stem fragments of Cork Oak (*Quercus suber*) cultured in vitro. *Ann. Bot.* 66:183-190, 1990.

GERLACH, D. *Plant histochemistry and cytochemistry*. New York, Academic Press, 301p., 1984.

GOVAERTS, R., DRANSFIELD, J. World checklist of palms. 1. Kew: Royal Botanic Gardens, 2005.

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*, 111: 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. (ads.). *Culturas de tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Brasília, Embrapa-CBAB, 2: 533-568, 1999.

HACCIUS, B.M., PHILIP, K.V.J. Embryo development in *Cocos nucifera* L.: a critical contribution to general understanding of palm embryogenesis. *Plant Systematics and Evolution*, 132: 91-106, 1979.

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

JONES, L.H. Endogenous cytokinins in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) callus, embryoids and regenerant plants measured by radioimmunoassay. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 20: 201–209, 1990.

JONES, L.H., HANKE, D.E., EEUWENS, C.J. An evaluation of the role of cytokinins in the development of abnormal inflorescences in oil palms (*Elaeis guineensis* Jacq.) regenerated from tissue culture. *J. Plant Growth Regul*, 14: 135–142, 1995.

JOUANNIC, S., ARGOUT, X., LECHAUVE, F., FIZAMES, C., BORGEL, A., MORCILLO, F., ABERLENC-BERTOSSI, F., DUVAL, Y., TREGEAR, J. Analysis of expressed sequence tags from oil palm (*Elaeis guineensis*). *FEBS letters*, 579 (12): 2709-2714, 2005.

KANCHANAPOOM, K., DOMUOAS, P. The Origin and Development of Embryoids in Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq) Embryo Culture. *ScienceAsia*, 25: 195-202, 1999.

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*, 86(12), 2004.

LEDO, A.S., LAMEIRA, O.A., BENBADI, 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*, 24: 601-603, 2002.

MAGNAVAL, C., NOIROT, M., VERDEIL, J.L., BLATTES, A., HUET, C., GROSDÉMANGE, F., BUFFARD-MO, J. Free Amino Acid Composition of Coconut (*Cocos nucifera* L.) Calli under Somatic Embryogenesis Induction Conditions. *J. Plant Physiol*, 146: 155-161, 1991.

MANGAT, B. S., PELEKIS, M. K., CASSELLS, A. C. Changes in the starch content during organogenesis in vitro cultured *Begonia rex* stem explants. *Physiol. Plant*, 79: 267-274, 1990.

MARTIN, A.B., CUADRADO, Y., GUERRA, H., GALLEGO, P., HITA, O., MARTIN, L., DORADO, A., VILLALOBOS, N. Differences in the contents of total sugars, starch and sucrose in embryogenic and non-embryogenic calli from *Medicago arborea* L. *Plant Science*, 154: 143 – 151, 2000.

MOURA, E.F., VENTRELLA, M.C., MOTOIKE, S.Y. Anatomy, histochemistry and ultrastructure of seed and somatic embryo of *Acrocomia aculeate* (Arecaceae). *Sci. Agric.*, 67(4): 399-407, 2010.

MOURA, E.F., VENTRELLA, M.C., MOTOIKE, S.Y., JUNIOR, A.Q.S., CARVALHO, M., MANFIO, C.E. Histological study of somatic embryogenesis induction on zygotic embryos of macaw palm (*Acrocomia aculeate* (Jacq.) Lodd. ex Martius). *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 95:175–184, 2009.

MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*, Copenhagen, 15: 473-479, 1962.

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

OLIVEIRA, A.B., MENDOÇA, M.S., ARAÚJO, M.G.P. Aspectos anatômicos do embrião e desenvolvimento inicial de *Oenocarpus minor* Mart.: uma palmeira da Amazônia. *Acta bot. bras.* 24(1): 20-24. 2010.

PEREIRA, P. P., HOCHER, V. VERDEIL, J. L., DOULBEAU, S., YAKANDAWALA, D. M. D., WEERAKOOM, L. K. Unfertilized ovary: a novel explant for coconut (*Cocos nucifera* L.) somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*. 26:21–28, 2007.

PORTILLO, L., SANTACRUZ-RUVALCABA, F., GUTIÉRREZ-MORA, A., RODRÍGUEZ-GARAY, B. Somatic embryogenesis in Weber cultivar azul. *In Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant*, 43:569–575, 2007.

PUIGDERRAJOLS, P., MIR, G., MOLINAS, M. Ultrastructure of Early Secondary Embryogenesis by Multicellular and Unicellular Pathways in Cork Oak (*Quercus suber* L.) *Annals of Botany*, 87: 179-189, 2001.

RAJ-BHANSALI, R. Somatic embryogenesis and regeneration of plantlets in pomegranate. *Ann. Bnt.* 66: 249-253, 1990.

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*, 75: 41-47, 2003

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 Cell. Dev. Biol.—Plant* 42:19–25, 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*, 98: 301–308, 2006.

SANTOS, K.G.B., MARIATH, J.E.A., MOÇO, M.C.C., BODANESE-ZANETTINI, H. Somatic Embryogenesis from Immature Cotyledons of Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.): Ontogeny of Somatic Embryos. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49: 49-55, 2006.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E., GUEDES, R.S., FERMINO, P.C.P., SILVA, T.L., COSTA, F.H.S. Somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm using the thin cell layer technique. *In Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant*, 46: 378–385, 2010.

SCHWENDIMAN, J., PANNETIER, C., MICHAUX-FERRIERE, N. Histology of somatic embryogenesis from leaf explants of the oil palm *Elaeis guineensis*. *Annals of Botany*, 62: 43-52, 1988.

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

SUGIMURA, Y., MURAKAMI, T. Structure and function of the haustorium in germinating Coconut palm seed. *JARQ Paris*, 24: 1-14, 1990.

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

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

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

ULISSES, C., CAMARA, T.R., WILLADINO, L., ALBUQUERQUE, C.C., BRITO, J.Z. Early somatic embryogenesis in *Heliconia chartacea* Lane. Braz. Arch. Biol. Technol., 53(1): 11-18, 2010.

VERDEIL, J.L., HOCHER, V. Digestion and absorption of food in plants: a plant stomach. Trends in Plant Science, 7: 280-281, 2002.

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, 88: 9-18, 2001.

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

Capítulo 3

ANÁLISE PROTEÔMICA DE ETAPAS ENVOLVIDAS COM A INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM DENDEZEIRO (*Elaeis guineensis* JACQ.) A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS

Resumo

Este trabalho consiste em identificar e caracterizar as proteínas expressas durante os diferentes estágios de desenvolvimento de calos embriogênicos de *E. guineensis* a partir de embriões zigóticos. Para isso, foram coletadas amostras dos embriões zigóticos (E1), explantes intumescidos com 14 dias (E2) em meio de indução, calo primário (E3) e calo pró-embriogênico (E4). As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido, seguido da extração das proteínas totais pelo método fenol/acetona, e posteriormente, submetidas à focalização isoeletrica utilizando-se géis de gradiente imobilizados de pH (IPG) de 13 cm, na faixa de 3-10 não linear. Após esse procedimento, foi realizada a eletroforese bidimensional (2DE). Os spots diferencialmente expressos foram analisados por espectrometria de massa, e proteínas envolvidas no processo de aquisição da competência embriogênica foram identificadas. As proteínas foram categorizadas em sete grupos de acordo com sua função biológica, bem como pela participação em vias metabólicas distintas: 1) proteínas expressas em condições de estresse; 2) proteínas envolvidas no ciclo celular; 3) proteínas envolvidas no acúmulo de amido; 4) proteínas do metabolismo energético; 5) proteína do metabolismo do nitrogênio; 6) processamento das proteínas; e 7) proteínas do embrião zigótico. O conhecimento da reconstituição *in vitro* dos eventos bioquímicos, que envolvem o processo de embriogênese somática em *E. guineensis*, permitiu uma maior elucidação dos pontos de controle dessa rota morfogênica. Permite assim, que melhorias no protocolo de clonagem da espécie sejam realizadas com sucesso.

Palavras-chave: *Elaeis guineensis*; embriogênese somática; proteômica.

Capítulo 3

PROTEOMICS ANALYSIS OF STEPS INVOLVED WITH THE INDUCTION OF SOMATIC EMBRYOGENESIS IN OIL PALM (*Elaeis guineensis* Jacq.) FROM ZYGOTIC EMBRYOS

Abstract

This study it is to identify and characterize the proteins expressed during different developmental stages of callus of *E. guineensis* is from zygotic embryos. For this, samples were collected from zygotic embryos (E1), with swollen explants 14 days (E2) in induction medium, primary callus (E3) and callus pro-embryogenic (E4). The samples were grinded in liquid nitrogen, followed by total protein extraction method for phenol / acetone, and subsequently submitted to isoelectric focusing gels using immobilized pH gradient (IPG) of 13 cm, range 3-10 not linear. After this procedure, we performed a two-dimensional electrophoresis (2DE). The differentially expressed spots were analyzed by mass spectrometry, and proteins involved in the acquisition of embryogenic competence were identified. Proteins were categorized into seven groups according to their biological function as well as by participating in different metabolic pathways: 1) proteins expressed in stress conditions, 2) proteins involved in cell cycle, 3) proteins involved in the accumulation of starch, 4) energy metabolism proteins, 5) protein of nitrogen metabolism, 6) processing of proteins and 7) proteins of zygotic embryo. Knowledge of the *in vitro* reconstitution of biochemical events, which involve the process of somatic embriogencese *E. guineensis*, allow a further elucidation of the control points of this route morphogenic. Permeate so that improvements in the protocol for cloning of the species are performed successfully.

Keywords: *Elaeis guineensis*; somatic embryogenesis; proteomics.

1 – Introdução

A embriogênese somática permite a regeneração de plantas por meio de uma série ordenada de fases embriogênicas, sem que ocorra a fusão de gametas, com base na totipotencialidade das células vegetais (Zimmerman, 1993; Sané *et al.*, 2006). Nesta via morfogênica, a fase de indução é um evento mediado por diversos fatores, como a composição nutricional (Gorret *et al.*, 2003; Nuutila *et al.*, 2000), o pH do meio de cultura (Pasternak *et al.*, 2002; Santarem *et al.*, 1997) e choques térmicos (Moraes *et al.*, 2004). No entanto, a utilização de reguladores de crescimento, como as auxinas, é considerada como fator determinante no processo (Su & Zhang, 2009; Valverde *et al.*, 1987; Moura *et al.*, 2009).

Em muitas espécies de plantas, como o dendezeiro, as culturas embriogênicas fazem parte das ferramentas mais adequadas para a clonagem de genótipos elites e transformação genética (Teixeira *et al.*, 1995; Scherwinski-Pereira *et al.*, 2010). No entanto, o sucesso na formação de calos embriogênicos, diferenciação de embriões somáticos e regeneração de plantas demanda uma maior compreensão desse processo. De acordo com Jimenez (2001), o processo de embriogênese somática pode ser dividido em duas fases distintas: indução e expressão. Durante a fase de indução, geralmente células somáticas são desdiferenciadas, adquirem competência embriogênica e se proliferam como formações embriogênicas. Já na fase de expressão, as células embriogênicas exibem seu potencial embriogênico adquirido na fase anterior e se diferenciam para formar embriões somáticos.

De fato, os estudos pioneiros de embriogênese somática *in vitro* iniciaram com Steward *et al.* (1958) em cenoura. Posteriormente, vários outros trabalhos buscaram identificar os vários fatores que controlam esta rota morfogênica nas plantas, mas quase

que sua totalidade, ligados às necessidades nutricionais e hormonais das diferentes espécies (Portillo *et al.*, 2007; Eshraghi *et al.*, 2005). Assim, os mecanismos bioquímicos e moleculares que regulam a embriogênese somática ainda são pouco conhecidos.

Atualmente, alguns trabalhos vêm sendo desenvolvidos em calos embriogênicos visando um maior conhecimento do processo em nível molecular (Marsoni *et al.*, 2008; Sghaier-Hammami, *et al.*, 2009). Sabe-se que durante a aquisição da competência embriogênica das células somáticas, ocorre uma reprogramação celular onde vários genes específicos são ativados, resultando na síntese de novos RNAm e proteínas (Chugh & Khurana, 2002). Um dos primeiros genes descritos como envolvidos na expressão da competência celular foi o SERK (*Somatic Embryogenesis Receptor Kinase*) em cultura de *Daucus carota* (Schmidt *et al.*, 1997), sendo sua expressão utilizada atualmente como um marcador genético do processo (Santa-Catarina *et al.*, 2004).

Embora a embriogênese somática já tenha sido utilizada na micropropagação de *E. guineensis* (Pannetier *et al.*, 1981; De Touchet *et al.*, 1991; Teixeira *et al.*, 1994; Thawaro & Te-chato, 2009; Scherwinski-Pereira *et al.*, 2010), há uma escassez de estudos básicos do metabolismo celular, como a identificação de proteínas expressas durante este processo. O conhecimento da reconstituição *in vitro* dos eventos fisiológicos e bioquímicos envolvidos podem permitir a elucidação dos pontos de controle desta rota morfogênica. Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi identificar e caracterizar as proteínas expressas durante os diferentes estágios de indução e desenvolvimento de calos pró-embriogênicos de dendezeiros (*Elaeis guineensis*) a partir de embriões zigóticos.

2 – Material e métodos

2.1 – Material vegetal

Para o estudo da análise proteômica foi utilizado inicialmente como material propagativo, embriões zigóticos de frutos maduros do genótipo de dendezeiro C2328. Este genótipo foi selecionado para os estudos proteômicos por ser altamente responsivo à formação de calos embriogênicos e diferenciação de embriões somáticos (cf. capítulo 1 § 3.0). No total foram avaliados quatro estágios da indução da embriogênese somática, sendo os calos coletados aos 0 (controle), 14, 60 e 150 dias do início da fase de indução. O embrião zigótico foi considerado como primeiro estágio (E1); o explante em início de diferenciação, com 14 dias foi denominado como o segundo estágio (E2), o calo primário com 60 dias o terceiro (E3), e o calo pró-embriogênico, após 150 dias de indução, o quarto estágio (E4). Uma vez coletados, os explantes foram acondicionados em tubos do tipo Falcon, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C até a sua utilização

2.2 – Extração de proteínas

O material vegetal das diferentes fases embriogênicas foi pulverizado em nitrogênio líquido com o auxílio de um pistilo e um almofariz. Em seguida, aproximadamente 100 mg do pó pulverizado foi transferido para microtubos (1,5 ml). A extração foi realizada utilizando 750 µl de tampão de extração (0,7M sacarose; 0,5M Tris; 0,07M HCl; 0,05M EDTA; 0,1M de KCl, 40mM de DTT) e o mesmo volume de fenol. Os microtubos foram mantidos sob agitação em vórtex por 15 minutos e posteriormente, centrifugados por 3 minutos a 23°C e 12.000 rpm. O sobrenadante foi

transferido para novos microtubos e o procedimento foi repetido três vezes. A precipitação das proteínas foi realizada com adição de cinco volumes de acetato de amônio 0,1 M em metanol. O pellet foi lavado com 500 µl de acetona 80% e suspenso em 80 µl de tampão de solubilização (7M uréia; 1M tioureia; 4% (m/v) chaps; 2% IPG buffer com pH 3-10 NL; 40mM DTT). A quantificação das proteínas foi realizada de acordo com Bradford (1976).

2.3 - Eletroforese bidimensional (2-DE)

A hidratação das tiras (*Immobiline DryStrip*, 13 cm, pH 3-10 NL) foi realizada por um período de 16 horas com aproximadamente 400 µg de proteínas em 250 µl de tampão de hidratação (7M uréia; 2M tioureia; 2% chaps; 2% IPG Buffer pH 3-10 NL; 0,002% azul de bromofenol 1%). Após este procedimento, foi realizada a eletroforese de 1ª dimensão utilizando o sistema *Multiphor II* (GE Healthcare), de acordo com as instruções do fabricante.

Em seguida, as *strips* foram equilibradas por 15 minutos em tampão de equilíbrio (Tris-HCl 1, 5M pH 8,8; Uréia 6M; Glicerol 30%; SDS 2%; Azul de bromofenol 1%, contendo 1M de DTT), seguido por 15 minutos em tampão de equilíbrio contendo 2,5% de iodoacetamida.

A segunda dimensão (SDS-PAGE) foi realizada em gel de poliacrilamida 13,8% e a eletroforese desnaturante foi executada em um sistema vertical, com a utilização de tampão Tris-Glicina (Tris HCl 20 mM, glicina 0,192 mM e SDS 0,1%, pH 8,3), e do marcador de massa molecular “Benchmark Protein Ladder” (Invitrogen). Os géis foram submetidos à eletroforese em voltagem constante de 135. Após a eletroforese os géis foram fixados em solução de metanol (50%), ácido acético (12%) e água destilada

(38%) por uma hora e, posteriormente, corados com Azul de Coomassie Coloidal G-250 por 24 horas. Cada amostra foi analisada em triplicata e as imagens foram digitalizadas utilizando o Image Scanner (GE Healthcare). Para as análises de expressão e comparação do perfil de proteínas dos diferentes estágios da embriogênese, foi utilizado o software Image Master 2D Platinum (GE Healthcare). As proteínas foram consideradas como diferencialmente expressas quando apresentaram valores significativos pelo teste Tukey com 95% de significância.

2.4 – Digestão *in gel* das proteínas

A digestão das proteínas foi realizada de acordo com protocolo descrito por Shevchenko *et al.* (1996). As proteínas foram excisadas dos géis e posteriormente lavadas por 15 minutos em 50% de acetonitrila e 25 mM de bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3), seguido de acetonitrila a 100%, por 10 minutos. Após a lavagem com acetonitrila, os fragmentos de géis foram secos e rehidratados por adição de 15 μL de solução contendo 50 mM de NH_4HCO_3 e tripsina Sequencing Grade (Promega). Os fragmentos de géis foram incubados a 37°C por 22 horas.

2.5–Identificação das proteínas por espectrometria de massa

Após a digestão das proteínas, 1 μL de cada digestão foi misturado a 1 μL de matriz de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico ($10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em 50% de acetonitrila e TFA 0,1%) e aplicado na placa de aço. Os peptídeos foram analisados em espectrômetro de massa MALDI TOF-TOF Ultra Flex II (Bruker Daltonics) operando nos modos refletido positivo (MS) e LIFTTM (MS/MS).. Os espectros obtidos foram utilizados para

as buscas no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) através do programa MASCOT ([http://: www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)).

3 – Resultados e discussão

As análises das imagens no Image Master Platinum revelaram 432 proteínas reproduzíveis em gel corado com azul de comassie ao longo de uma faixa de pH 3-10 e massas moleculares de 10 a 160 kDa. Deste total de proteínas, 385 foram exclusivas das diferentes fases (Figura 1), sendo 43 da fase inicial (E1), 105 e 160 dos estágios E2 e E3, respectivamente, seguido de um decréscimo na fase E4, que apresentou 77 proteínas únicas. As demais proteínas (43) tiveram diferenças de expressão nos estágios analisados. Na comparação dos estágios E1 e E2 pôde-se observar 19 proteínas diferencialmente expressas, sendo 9 reprimidas em E2 e 10 induzidas. Já na comparação dos estágios E1 e E4, foram detectadas 7 proteínas induzidas em E4 e 1 reprimida.

O processo de embriogênese somática envolve a aquisição da capacidade embriogênica de células somáticas, através da sua desdiferenciação e reprogramação celular, que envolve a expressão de genes específicos (Feher *et al.*, 2003). O aumento de proteínas exclusivas observado nos estágios E2 e E3, equivalentes aos estágios de calos induzidos aos 14 e 60 dias, se devem, provavelmente, à alta atividade mitótica durante a proliferação celular, e pela desdiferenciação das células somáticas. De acordo com Dewitte & Murray (2003) e Silveira (2004), o ciclo celular é dependente da síntese de novas proteínas que trazem mudanças morfológicas e bioquímicas associadas à atividade mitótica. No entanto, o decréscimo de proteínas exclusivas em calos pró-embriogênicos (E4) observado em nosso trabalho pode estar relacionado com a fase de desaceleração da curva de crescimento da cultura. Esses dados corroboram com os

resultados obtidos por Serra *et al.* (2000), os quais demonstram um declínio no teor de proteínas em calos de *Bertholletia excelsa*

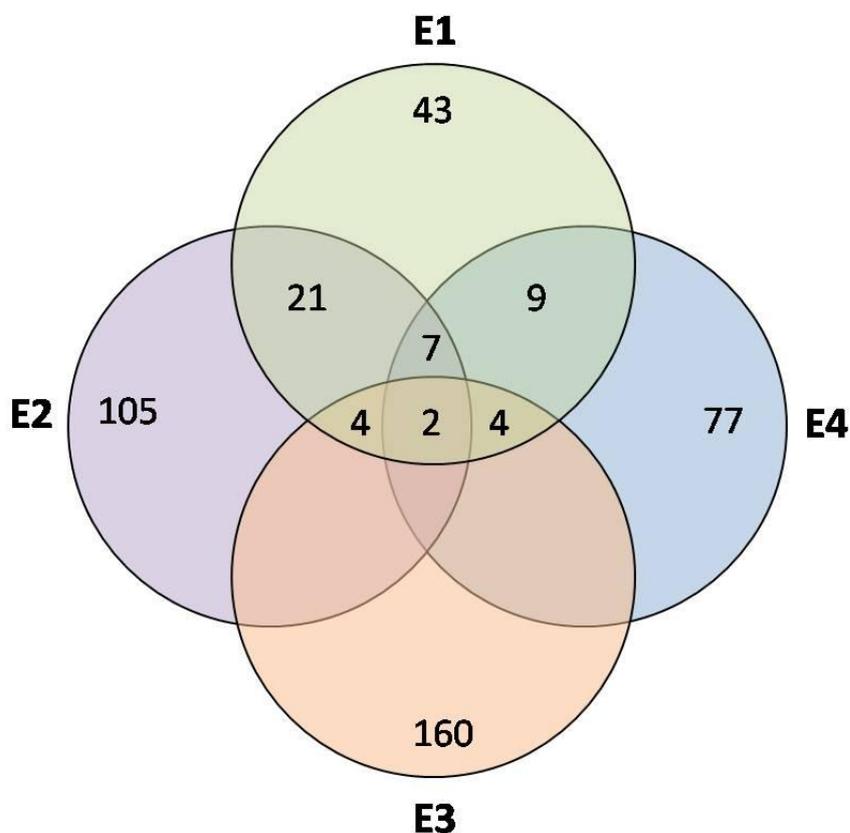


Figura 1: Número de proteínas exclusivas e comuns em diferentes estágios (E1: embrião zigótico; E2: explante com 14 dias em meio de indução (início da proliferação celular); E3: calo primário com 60 dias e E4: calo pró-embriogênico com 150 dias) durante a aquisição de competência embriogênica em *Elaeis guineensis*.

Spots diferencialmente expressos foram analisados por espectrometria de massa, e proteínas envolvidas no processo de aquisição da competência embriogênica foram identificadas. As proteínas foram categorizadas em sete grupos de acordo com sua função biológica, bem como pela participação em vias metabólicas distintas: 1) proteínas expressas em condições de estresse; 2) proteínas envolvidas no ciclo celular; 3) proteínas envolvidas no acúmulo de amido; 4) proteínas do metabolismo energético;

5) proteína do metabolismo do nitrogênio; 6) processamento das proteínas; e 7) proteínas do embrião zigótico.

3.1 – Resposta ao estresse

O cálcio é um mensageiro essencial às plantas durante processos biológicos em resposta aos hormônios e sinais de estresse. Isso é conseguido através da ligação do cálcio a sensores (Ca^{2+}), ativando ou inibindo reações bioquímicas adequadas (Rudd *et al.*, 2001). A calmodulina, identificada no presente trabalho, é o mais importante transdutor de sinais em todos os eucariotos (Reddy, 2001). Essa proteína foi expressa nos estágios E3 e E4, com maior intensidade nesse último, indicando sua importância na resposta aos sinais de estresse hormonal, durante a indução da embriogênese somática.

Após a sinalização da calmodulina, vários genes são induzidos em resposta ao estresse. Neste trabalho, foram identificadas três proteínas relacionadas ao estresse induzido durante a formação de calos pró-embriogênicos: *Cytosolic ascorbate peroxidase* (spot 996), *Class – 1 LMW heat shock protein* (spot 2255) e Cyclophilin (spot 860). É de suma importância o conhecimento da expressão de diferentes proteínas relacionadas ao estresse durante o processo embriogênico *in vitro*, pois, indicam que o estresse em si pode desempenhar um papel crucial como gatilho embriogênico (Lippert *et al.*, 2005; Marsoni *et al.*, 2008). No entanto, o elevado conteúdo endógeno de fitohormônios, principalmente as auxinas, é considerado como fator mais importante (Steinmacher *et al.*, 2007; Scherwinski-Pereira *et al.*, 2010), indicando que a aquisição de competência embriogênica é uma resposta ao estresse extremo das células das plantas cultivadas sobre concentrações elevadas de auxinas (Karimi & Saidi, 2009).

As concentrações elevadas de auxinas causam um estresse oxidativo, ocasionado pelo aumento de moléculas reativas contendo oxigênio (ROS). Este processo foi relatado durante a ES em diversas espécies vegetais (Luo *et al.*, 2001; Pasternak *et al.*, 2002; Caliskan *et al.*, 2004; Ganesan & Jayabalan, 2004). No entanto, a produção descontrolada de ROS pode causar danos celulares, principalmente no DNA, RNA e proteínas, podendo levar ao envelhecimento e morte celular (Karimi & Saidi, 2009). A expressão da proteína *Cytosolic ascorbate peroxidase* (Tabela 1 e Figura 2) durante esse processo, está associada com a proteção da célula contra os efeitos nocivos da quantidade de ROS, eliminando esses radicais (Mittler, 2002) e permitindo assim, a continuidade do processo embriogênico. No presente trabalho foi observada a expressão da proteína *Cytosolic ascorbate peroxidase* (Spot 996), que foi expresso nos estágios E3 e E4, aumentando nesse último ao seu mais alto volume. Esses resultados indicam um aumento substancial de ROS durante a indução de calos pró-embriogênicos.

A produção de ROS em condições de estresse também induz a expressão de chaperonas (HSP), proporcionando uma função protetora contra o estresse oxidativo (Timperio *et al.*, 2008). O seu papel durante o acúmulo de metais livres é a prevenção dos danos irreversíveis no desdobramento das proteínas, causado pela produção excessiva de ROS (Bona *et al.*, 2007). Em nosso trabalho foi observada a expressão da proteína *Class – 1 LMW heat shock protein* (Spot 2255), que foi mais expresso no estágio E1, em comparação ao estágio E2, decaindo nesse último ao seu mais baixo volume.

A *cyclophilin* é outra proteína induzida por estresse abiótico e biótico (Marivet *et al.*, 1992; Marivet *et al.*, 1995; Scholze *et al.*, 1999; Godoy *et al.*, 2000; Kong *et al.*, 2001; Sharma & Singh, 2003). No presente trabalho, essa proteína foi exclusiva do estágio E3 e possui uma gama de funções caracterizadas na literatura, podendo ser

essencial para a manutenção da conformação de proteínas (Romano *et al.*, 2004), processamento do RNA (Krzywicka *et al.*, 2001), degradação de proteínas e transdução de sinal (Brazin *et al.*, 2002; Yurchenko *et al.*, 2002). Essa proteína pode também ter papel importante na sinalização para a proliferação de células (Lee, 2010), sendo crucial durante o desenvolvimento e a capacidade de resposta ao estresse.

3.2 – Proliferação celular

Durante a embriogênese somática, o estresse causado pelo elevado conteúdo de auxina sinaliza as células somáticas a se desdiferenciarem e multiplicarem (Ulisses *et al.*, 2010). Neste processo, a síntese de novas proteínas trazem as mudanças morfológicas e bioquímicas associadas ao ciclo celular (Dewitte & Murray, 2003; Silveira, 2004). Duas proteínas envolvidas no ciclo celular foram identificadas no presente trabalho: *Tubulin beta chain* (Spot 1365) e *Eukaryotic translation elongation factor* (Spot 1502).

A *Tubulin beta chain* foi expressa nos estágios E2, E3 e E4, aumentando a expressão significativamente nas etapas de calo primário (E3) e pró-embriogênico (E4) (Tabela 1). Através de análises anatômicas foi observado início da divisão celular aos 14 dias, coincidindo com o início da expressão da proteína *Tubulin beta chain*. Aos 60 dias foram observados calos primários com intensa divisão das células meristemáticas, aumentando a expressão dessa proteína, assim como verificado na divisão e formação de pró-embriões em E4 (cf. capítulo 2 § 3.0).

As tubulinas constituem a base dos microtúbulos e desempenham papéis importantes nas atividades intracelulares, de divisão celular, de morfogênese em plantas e no citoesqueleto (Baskin, 2000; Buschmann *et al.*, 2004; Sedbrook *et al.*, 2004;

Ambrose *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2009). Buschmann *et al.* (2006) observaram que as auxinas induzem a formação de MAPs (microtúbulos associados a proteínas), participando da regulação do ciclo celular e, conseqüentemente, da divisão e crescimento tecidual.

Já a proteína EF1 (*Eukaryotic translation elongation fator*) foi igualmente expressa nos estágios E2 e E3, aumentando em E4 (Tabela 1). Esta proteína também foi induzida durante o início da divisão das células somáticas, assim como observado com a tubulina. Embora a EF1 forme um complexo com as tubulinas, seu papel central parece estar associado à tradução das proteínas, sendo igualmente importante durante o ciclo celular (Lambert *et al.*, 2004). A EF1 é conhecida por estar envolvida em diversos processos celulares, incluindo a embriogênese, proliferação celular e organização do citoesqueleto (Gangwani *et al.*, 1998).

3.3 – Acúmulo de amido

A intensa divisão mitótica, observada nos calos primários e pró-embriogênicos, demanda elevado gasto energético, sendo que uma das fontes de energia observadas durante a indução de calo foi o amido. No presente trabalho foi identificada a proteína *14-3-3-like proteína GF14-12* (spot 436), envolvida com o acúmulo de amido nas células. Essa proteína foi expressa nos estágios E2, E3 e E4, aumentando em E4 ao seu mais alto volume. A expressão dessa proteína coincide com os ensaios histoquímicos, nos quais se pode observar que o acúmulo de grãos de amido ocorreu no tecido parenquimático, principalmente nas células localizadas próximas aos centros de divisão celular (E2), nos calos primários (E3) e calos pró-embriogênico (E4). No entanto, essa proteína não foi observada em E1, e conforme verificado pelas análises anatômicas, o

embrião zigótico não possui amido como material de reserva (cf. capítulo 2 § 3.0), indicando que a síntese do amido ocorreu durante as duas primeiras semanas após a indução da embriogênese somática.

A deposição de amido no córtex de calos embriogênicos é observada em diversas espécies (El Maâtaoui *et al.*, 1990; Raj Bhansali, 1990; Verdeil *et al.*, 2001; Portillo *et al.*, 2007; Cangahuda-Inocente *et al.*, 2009; Moura *et al.*, 2009). Essas observações sugerem que o amido mobilizado da região do córtex do calo é utilizado como fonte de energia pelas células meristemáticas em intensa divisão e diferenciação celular. As proteínas pertencentes à família 14-3-3 estão relacionadas diretamente com o acúmulo de amido em plantas. Sehnke *et al.* (2001) observaram que plantas transgênicas de *Arabidopsis* expressando o gene 14-3-3 GF14 apresentaram níveis elevados de acúmulo de amido em folhas (28 ± 7 mg de amido por g de massa fresca), em relação as plantas do tipo selvagem (15 ± 3 mg de amido por g de massa fresca). Esses mesmos autores também verificaram, através de técnicas de imunolocalização, que os grânulos de amido possuíam inúmeros anticorpos que reconhecem oito membros da família 14-3-3, dentre eles, anticorpos específicos para GF14. Esses resultados sugerem que as proteínas 14-3-3 também podem estar envolvidas na biossíntese de amido.

3.4 – Metabolismo energético

No presente trabalho foram identificadas três proteínas relacionadas ao metabolismo energético: *Enolase* (spot 12), *Alcohol dehydrogenase, putative* (spot 548) e *ADHI* (spot 560) (Tabela 1). A enolase foi expressa em todos os estágios analisados, no entanto, nos estágios E3 e E4, houve uma maior expressão dessa proteína. Já as

demais proteínas foram expressas nos estágios E3 e E4, aumentando em E4 ao seu mais alto volume. Nos estágios E3 e E4, observa-se através das análises anatômica, intensa divisão celular nos calos primários (E3), e formação de pró-embriões em E4 (cf. capítulo 2 § 3.0). Essas atividades celulares, nas condições de estresse *in vitro*, demandam elevado gasto energético, justificando assim, a maior expressão de proteínas do metabolismo energético nos últimos estágios.

A enolase é responsável pela catalise da conversão de 2-fosfoglicerato (2-PG) a fosfoenolpiruvato (PEP), na via glicolítica, convertendo glicose em piruvato, produzindo NADH e ATP (Barkla *et al.*, 2009). Uma das formas de obtenção de glicose durante a indução de calos pró-embriogênicos é através da degradação do amido acumulado pelas células, formando intermediários glicolíticos que submetidos à catálise oxidativa, suprem os altos níveis de ATP necessários para o metabolismo celular (Martin *et al.*, 2000). No entanto, durante a via glicolítica, para que ocorra a redução de NAD⁺ para NADH, há a necessidade de um grupo de enzimas desidrogenases (ADH), demonstrando a interdependência dessas proteínas durante o metabolismo energético (Parés *et al.*, 2008; Haseba & Ohno, 2010).

3.5 – Metabolismo do nitrogênio

A capacidade das células em se diferenciar e rediferenciar pode ser imposta pelos componentes orgânicos e inorgânicos presentes nos meios de cultura. O nitrogênio sob forma de nitrato de amônio é um elemento chave no meio de cultura de MS. Este componente afeta numerosas respostas *in vitro*, sendo determinante no sucesso da embriogênese somática (Ammirato, 1983; Poddar *et al.*, 1997; Elkonin & Pakhomova, 2000; Leljok-Levanic *et al.*, 2004). Por ser constituinte de várias

biomoléculas essenciais, como aminoácidos, ácidos nucleicos, proteínas, enzimas e outros, sua assimilação se dá em diversos processos metabólicos na planta (Magalhães & Wilcox, 1987). Uma das proteínas identificadas no presente trabalho está relacionada com a assimilação de nitrogênio pelas células: *Glutamine synthetase isoform GSe1* (spot 1194). Esta proteína foi expressa nos estágios E2, E3 e E4, sendo mais expressa nos dois últimos estágios analisados (Tabela 1).

A glutamina sintetase (GSe1) evita a toxicidade do amônio nas células vegetais, pela rápida conversão do amônio a partir da assimilação do nitrato. A principal via para esta conversão envolve a ação sequencial da glutamina sintetase (GSe1). A glutamina sintetase combina o amônio com o glutamato para formar a glutamina. Esse processo ocorre no citosol, muitas vezes estimulado pelos níveis elevados de glutamina nos plastídeos (Canovas *et al.*, 2007; Bernard *et al.*, 2008).

3.6 – Processamento de proteínas

No presente trabalho foram identificadas duas proteínas relacionadas ao processamento de proteínas: *Protein disulfide isomerase 2 precursor* (spot 628) e *Putativa cyclosporin A-binding protein* (spot 875) (Tabela 1). A proteína dissulfeto isomerase foi igualmente expressa nos estágios E2, E3 e E4. Esta enzima está diretamente relacionada com uma importante defesa das células contra o enovelamento incorreto das proteínas (Hatahet & Ruddock, 2009). Ela atua acelerando o dobramento das proteínas por remodelação das pontes dissulfeto (Wen-Bin *et al.*, 2001). Desta forma, esta proteína possui grande importância em todos os estágios analisados, pois, permite a correta formação das estruturas tridimensionais das proteínas expressas, proporcionando sua funcionalidade nos processos bioquímicos essenciais para a

produção de calos pró-embriogênicos. No entanto, a proteína *cyclosporin A-binding* foi exclusiva do estágio E3. Esta proteína catalisa a isomerização cis-trans das ligações peptídicas em oligopeptídeos, e acelera a renaturação de diversas proteínas *in vitro* (Fischer *et al.*, 1984; Tan *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1997).

3.4 – Proteínas do embrião zigótico

Proteínas provenientes do explante de origem (embrião zigótico) foram também identificadas e incluem 7S globulin (spot 64), EMZ08 (spot 2337) e *MYB60-like protein* (spot 20) (Tabela 1). A globulina 7S foi expressa em todos os estágios, sendo mais expressa no estágio E1, decaindo ao seu mais baixo volume em E4 (Tabela 1). Esta globulina é uma proteína de reserva rica em aminoácidos básicos, e o acúmulo se inicia vários dias após a polinização, coincidindo o nível máximo com a maturidade da semente (Dierks-Ventlind, 1982; Dierks-Ventling, 1983). Já a proteína EMZ08 foi exclusiva do estágio E1 e corresponde a uma LEA (*late embryogenesis abundant*). As proteínas LEA são produzidas em abundância durante o final do desenvolvimento embrionário e desempenham papel fundamental na proteção contra desidratação dos embriões zigóticos (Wise & Tunnacliffe, 2004).

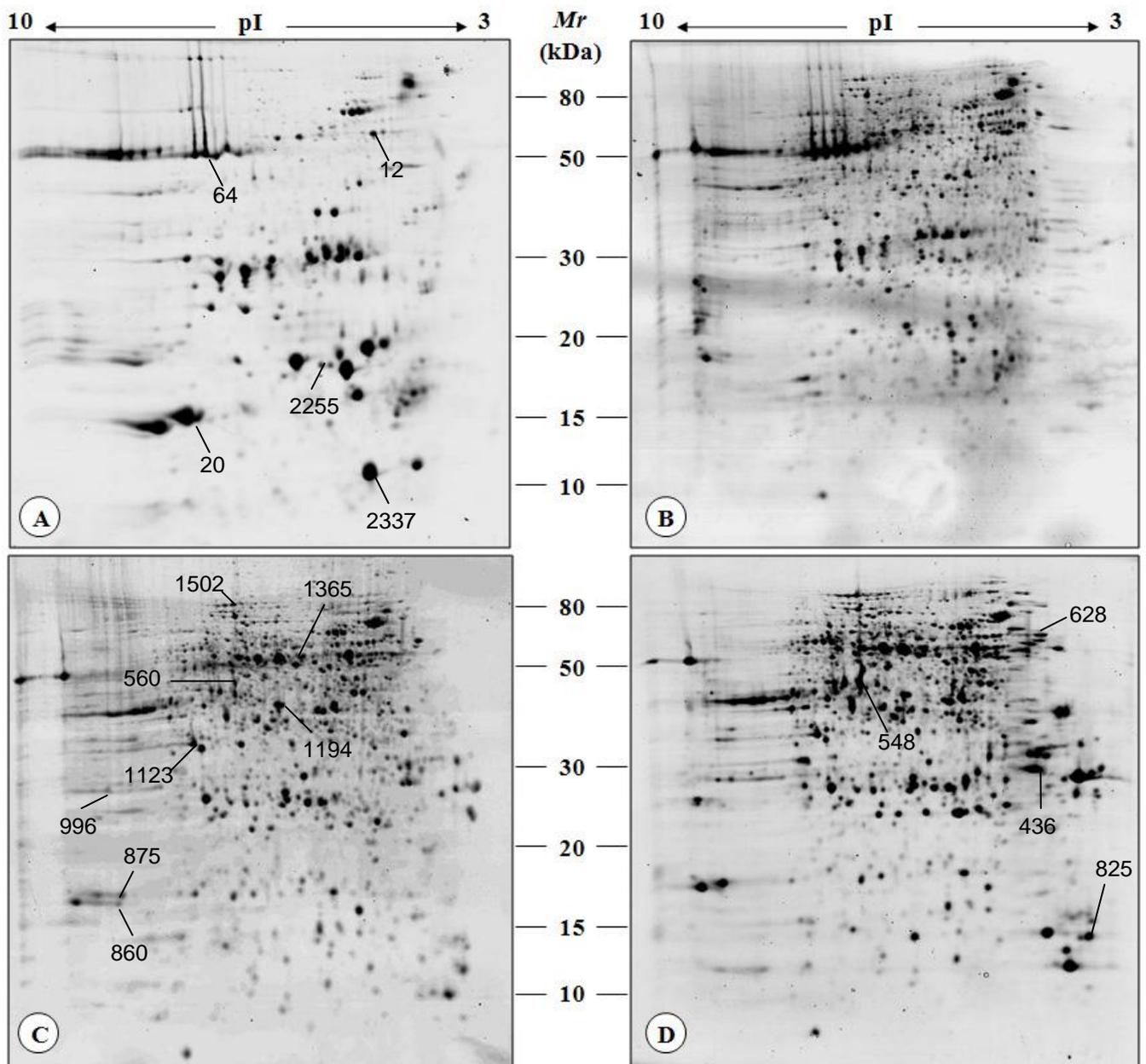
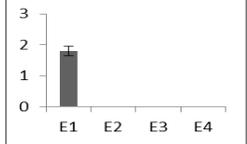
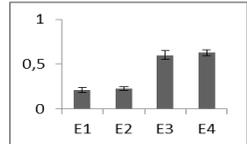
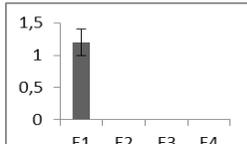
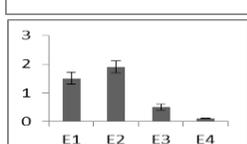
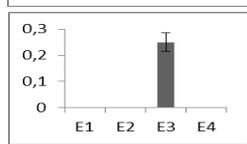
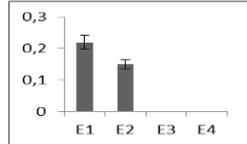
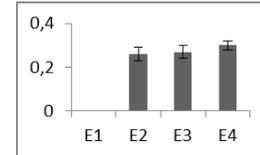
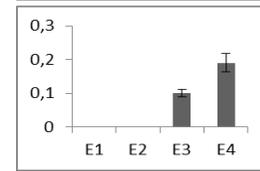
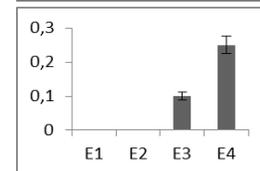
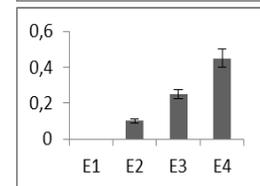
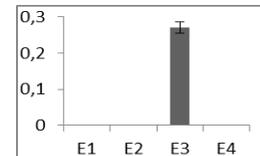
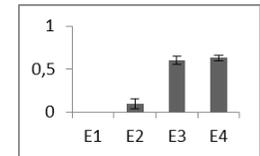


Figura 2: Perfil bidimensional de proteínas durante a aquisição de competência embriogênica em *Elaeis guineensis*. A: Embrião zigótico utilizado como fonte de explante durante a indução de calos pró-embriogênicos. B: Explante após 14 dias em meio de indução (450 μ M de Picloram). C: Calo primário após 60 dias em meio de indução. D: Calos pró-embriogênicos após 150 dias. Focalização isoeétrica usou gel de IPG de pH 3-10 não linear, 400 μ g de proteínas; a segunda dimensão usou gel de gradiente de poliácridamida de 13,8%. Coloração em azul de comassie.

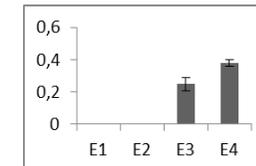
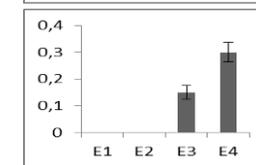
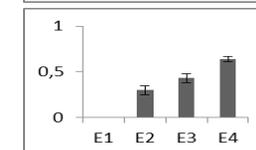
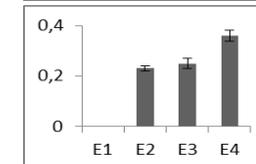
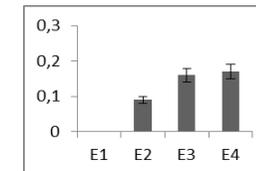
Tabela 1: Proteínas da aquisição de competência embriogênica em *Elaeis guineensis*, identificados por eletroforese bidimensional (2D-PAGE) associado à espectrometria de massa (MALDI-ToF/ToF).

Spot N°	Proteína identificada	Espécie	Acesso	Score	Mr/pI (Cal)	Mr/pI (Gel)	Volume do spot
20	MYB60-like protein	<i>Citrus macrophylla</i>	ABK59039	85	39/5.39	17/7.8	
12	Enolase	<i>Elaeis guineensis</i>	ACF06525	95	48/5.98	64/5.2	
2337	EMZ08	<i>Elaeis guineensis</i>	ABD66069	76	10 / 5.71	11.8/5.2	
64	7S globulin	<i>Elaeis guineensis</i>	AAK28402	125	67/6.53	55/7.5	
860	Cyclophilin	<i>Elaeis guineensis</i>	ACF06480	108	18/8.73	17.9/8.5	
2255	Class-1 LMW heat shock protein	<i>Ananas comosus</i>	AAM28293	62	17/6.77	18.7/6.8	

1194	Glutamine synthetase isoform GSe1	<i>Triticum aestivum</i>	AAR84349	131	39/5.53	44/6.2
875	Putative cyclosporin A-binding protein	<i>Picea abies</i>	CAC81066	114	18/ 8.39	18/8.5
436	14-3-3-like protein GF14-12	<i>Hordeum vulgare</i>	CAA74592	100	29/ 4.73	30/4.3
548	Alcohol dehydrogenase, putative	<i>Ricinus communis</i>	XP_002534157	144	41/ 5.98	51/6.8
560	ADH1	<i>Oryza sativa</i>	ADH03863	78	41/6.08	46/6.8
628	Protein disulfide isomerase 2 precursor	<i>Elaeis guineensis</i>	ACF06590	80	56/4.74	64/4.2



1123	annexin P35	<i>Elaeis guineensis</i>	ACF06570	77	36/6.63	36/7.1
1502	Eukaryotic translation elongation factor, putative	<i>Ricinus communis</i>	XP_002523907	74	94/5.87	93/6.1
1365	Tubulin beta chain, putative	<i>Ricinus communis</i>	XP_002527881	78	50/4.81	56/5.3
996	Cytosolic ascorbate peroxidase	<i>Elaeis guineensis</i>	ACF06591	50	27/5.42	30/5.0
825	Calmodulin	<i>Triticum aestivum</i>	1109190A	88	16/4.10	18/4.5



4 – Conclusões

- Foram identificadas proteínas em diferentes estágios da indução de calos pró-embriogênicos.
- No explante de origem (embrião zigótico) foram identificadas as proteínas: 7S globulin, EMZ08 e *MYB60-like protein*.
- Durante a indução de calos pró-embriogênicos foi identificadas proteínas relacionadas com o estresse oxidativo.
- Aos 14 dias em meio de indução foi observada a expressão de proteínas envolvidas no acúmulo de amido, divisão células e relacionados ao estresse abiótico.
- Nos calos primários foram identificadas proteínas exclusivas, como as proteínas: *Putative cyclosporin A-binding protein* e *Cyclophilin*.
- Aos 150 dias, durante a formação de pró-embriões houve um aumento significativo na expressão das proteínas envolvidas no acúmulo de amido e divisão celular.

5 - Referências bibliográficas

AMBROSE, J.,C., SHOJI, T., KOTZER, A.,M., PIGHIN J.,A WASTENEYS, G.,O. The Arabidopsis CLASP gene encodes a microtubule-associated protein involved in cell expansion and division. *The Plant Cell* 19: 2763–2775, 2007.

AMMIRATO, P.,V. Embryogenesis. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V. and YAMADA, Y. (eds) *Handbook of plant cell culture*, vol 1. Macmillan, New York, 82–123, 1983.

BARKLA,B.,J., VERA-ESTRELLA, R., HERNÁNDEZ-CORONADO, M., PANTOJA, O. Quantitative Proteomics of the Tonoplast Reveals a Role for Glycolytic Enzymes in Salt Tolerance. *The Plant Cell*, 21: 4044–4058, 2009.

- BUSCHMANN, H., FABRI, C.O., HAUPTMANN, M., et al. Helical growth of the *Arabidopsis* mutant *tortifolia1* reveals a plant-specific microtubule-associated protein. *Current Biology* 14: 1515–1521, 2004.
- BUSCHMANN, H., CHAN, J., SANCHEZ-PULIDO, L., ANDRADE-NAVARRO, M.A., DOONAN, J.H., LLOYD, C.W. Microtubule-associated AIR9 recognizes the cortical division site at preprophase and cell-plate insertion. *Current Biology* 16: 1938–1943, 2006.
- BASKIN, T.I. The cytoskeleton. In: Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL, eds. *Biochemistry and molecular biology of plants*. San Diego: American Society of Plant Biologists, 202–258, 2000.
- BONA, E., MARSANO, F., CAVALETTO, M., BERTA, G. Proteomic characterization of copper stress response in *Cannabis sativa* roots. *Proteomics*, 7: 1121–1130, 2007.
- BLUM, H., BEIER, H., GROSS, H., J. Improved silver staining of plant-proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 8: 93-99. 1987.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 248–254. 1976.
- BRAZIN, K.N, MALLIS, R.J, FULTON, D.B, ANDREOTTI, A.H. Regulation of the tyrosine kinase Itk by the peptidyl-prolyl isomerase cyclophilin A. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 1899–1904, 2002.
- CHUGH, A., KHURANA, P. Gene expression during somatic embryogenesis—recent advances. *Currents Science*. 83: 715 – 730, 2002.
- CALISKAN, M., TURET, M., CUMING, A.C. Formation of wheat (*Triticum aestivum* L.) embryogenic callus involves peroxide-generating germin-like oxalate oxidase. *Planta* 219: 132-140, 2004.
- CANGAHUALA-INOCENTE, G.C., STEINER, N., MALDONADO, S.B., GUERRA, M.P. Patterns of protein and carbohydrate accumulation during somatic embryogenesis of *Acca sellowiana*. *Pesq. agropec. Bras*, 44 (3) :217-224, 2009.
- DIESKS-VENTLING, C. Storage protein characteristics of praline requiring mutants of *Zea mays*. *Theoretical and Applied Genetics*, New York, 51: 145-149, 1982.
- DIESKS-VENTLING, C. Lysine biosynthesis and utilization during seed development of normal and opaque-2 *Zea mays* L. *Planta*, New York, 157: 233-238, 1983.
- DEWITTE, W., MURRAY, J.A.H., THE PLANT CELL CYCLE. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54: 235–64, 2003.

DUPIRE, L., DÉCOUT, E., VASSEUR, J., DELBREIL, B. Histological and 2-D protein patterns comparisons between a wild type and a somatic embryogenic mutant of *Asparagus officinalis* L. *Plant Science*. 147: 9–17, 1999.

DE MOT, R., VANDERLEYDEN, J. Application of two-dimensional protein analysis for strain fingerprinting and mutant analysis of *Azospirillum* species. *Can. J. Microbiol.*, 35: 960pp., 1989.

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

ELKONIN, L.A. e PAKHOMOVA, N., V. Influence of nitrogen and phosphorus on induction embryogenic callus of sorghum. *Plant Cell, and Tissue Organ Culture*. 61: 115–123; 2000.

FISCHER, G., BANG, H., MECH, C. Detection of enzyme catalysis for cis-trans-isomerisation of peptide bonds using proline-containing peptides as substrates. *Biochim. Biophys. Acta* 43: 1101–1111, 1984.

FEHER, A., PASTERNAK, T.P., DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 74: 201-228, 2003.

GUERRA, M.P., TORRES, A.C., TEIXEIRA, J.B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S., BUSO, J.A. (ads.). *Culturas de tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Brasília, Embrapa-CBAB. 2: 533-568, 1999.

GODOY, A.V., LAZZARO A.S., CASALONGUE, C.A., SAN SEGUNDO, B. Expression of a *Solanum tuberosum* cyclophilin gene is regulated by fungal infection and abiotic stress conditions. *Plant Sci* 152: 123–134. 2000.

GANGWANI, L., MIKRUT, M., GALCHEVA-GARGOVA, Z., DAVIS, R.,J. Interaction of ZPR1 with translation elongation factor-1alpha in proliferating cells. *J Cell Biol*, 143: 1471-1484, 1998.

GANESAN, M., JAYABALAN, N. Evaluation of haemoglobin (erythrogen): for improved somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hissutum* L. cv. SVPR 2). *Plant Cell Rep* 23: 181-187, 2004.

HATAHET, F., RUDDOCK, L.,W. Protein disulfide isomerase: a critical evaluation of its function in disulfide bond formation. *Antioxid Redox Signal*. 11 (11) : 2807-50, 2009.

- HASEBA, T., OHNO, Y. A New View of Alcohol Metabolism and Alcoholism—Role of the High-Km Class III Alcohol Dehydrogenase (ADH3). *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 7: 1076-1092, 2010.
- IMIN, N., NIZAMIDIN, M., DANIHER, D., NOLAN, K.,E., ROSE, R.J., ROLFE, B.,C. Proteomic analysis of somatic embryogenesis in *Medicago truncatula*. Explant cultures grown under 6-Benzylaminopurine and 1-Naphthaleneacetic acid treatments. *Plant Physiology*. 137: 1250-1260, 2005.
- JIMENEZ, V.,M. Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on to the role of endogenous hormones. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 13: 196–223, 2001.
- KARIMI, O., SAIDI, A. The molecular basis for stress-induced acquisition of somatic embryogenesis. *Mol Biol Rep*, 2009.
- KONG, H.,Y, LEE, S.,C., HWANG, B.,K. Expression of pepper cyclophilin gene is differentially regulated during the pathogen infection and abiotic stress conditions. *Physiol Mol Plant Pathol* 59: 189–199, 2001.
- LEE, J. Role of cyclophilin a during oncogenesis. *Arch Pharm Res*. 33 (2) :181-7, 2010.
- LELJAK-LEVANIC´, D., BAUER, N., MIHALJEVIC´, S., e JELASKA, S. Somatic embryogenesis in pumpkin (*Cucurbita pepo* L.): control of somatic embryo development by nitrogen compounds. *Journal Plant Physiology*. 161: 229–236; 2004.
- LAMBERTI, A., CARAGLIA, M., LONGO, O., MARRA, M., ABBRUZZERE, A., ARCARI, P. The translation elongation factor 1A in tumorigenesis, signal transduction and apoptosis: Review article. *Amino Acids*, 26: 443-448, 2004.
- LUO, J.,P., JIANG, S.,T., PAN, L.,J. Enhanced somatic embryogenesis by salicylic acid of *Astragalus adsurgens* Pall.: relationship with h₂o₂ production and h₂o₂-metabolizaing enzyme activitires. *Plant Sci*, 161: 125-132, 2001.
- LIPPERT, D., ZHUANG, J., RALPH, S., ELLIS, D.,E, GILBERT, M., OLAFSON, R., RITLAND, K., ELLIS, B., DOUGLAS, C.,J., BOHLMANN, J. Proteome analysis of early somatic embryogenesis in *Picea glauca*. *Proteomics* 5: 461–473, 2005.
- LAEMMLI, U.,K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685. 1970.
- MARSONI, M., BRACALE, M., ESPEN, L., PRINSI, B., NEGRI, A.,S., VANNINI, C. Proteomic analysis of somatic embryogenesis in *Vitis vinifera*. *Plant Cell Rep*, 27: 347-356, 2008.

MOURA, E.,F., VENTRELLA, M.,C., MOTOIKE, S.,Y., JUNIOR, A.,Q.,S., CARVALHO, M., MANFIO, C.,E. Histological study of somatic embryogenesis induction on zygotic embryos of macaw palm (*Acrocomia aculeate* (Jacq.) Lodd. ex Martius). *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 95:175–184, 2009.

MARTIN, A.,B., CUADRADO, Y., GUERRA, H., GALLEGO, P., HITTA, O., MARTIN, L., DORADO, A., VILLALOBOS, N. Differences in the contents of total sugars, starch and sucrose in embryogenic and non-embryogenic calli from *Medicago arborea* L. *Plant Science*, 154: 143 – 151, 2000.

MAGALHÃES, J.,R., WILCOX, G., E. Interação entre formas de nitrogênio e reguladores de crescimento. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 22 (6): 576-585, 1987.

MARIVET, J., FRENDON, P., BURKARD, G. Effects of abiotic stresses on cyclophilin gene-expression in maize and bean and sequence analysis of cyclophilin cDNA. *Plant Sci* 84: 171–178, 1992.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7:405–410, 2002.

NASCIMENTO, M.,C.,A. Proteômica e caracterização bioquímica da embriogênese em pupunha (*Bactris gasipaes*). Dissertação de mestrado. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 84p., 2009.

PODDAR, K., VISHNOI, R., K. and KOTHARI, S., L. Plant regeneration from embryogenic callus of finger millet *Eleusine coracana* (L.) Gaertn. on higher concentrations of NH₄NO₃ as a replacement of NAA in the medium. *Plant Science*. 129 :101–106, 1997.

PARÉSA, X., FARRÉSA, J., KEDISHVILIB, N., DUESTERC, G. Medium-chain and short-chain dehydrogenases/reductases in retinoid metabolism. *Cell Mol Life Sci*. 65 (24): 3936–3949, 2008.

PORTILLO, L., SANTACRUZ-RUVALCABA, F., GUTIÉRREZ-MORA, A., RODRÍGUEZ-GARAY, B. Somatic embryogenesis in Weber cultivar azul. *In Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant*, 43: 569–575, 2007.

PASTERNAK, T., PRINSEN, E., AYAYDIN, F., MISKOLCZI, P., POTTERS, G., ASARD, H., VAN ONCKELEN, H., DUDITS, D., FEHÉR, A. The role of auxin, pH and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol.*, 129: 1807-1819, 2002.

PANNETIER, C., ARTHUIS, P., LIEVOUX, D. Neof ormation de jeunes plantes d'*Elaeis guineensis* a partir de cals primaires obtenus sur fragments foliaires cultivés in vitro. *Oleagineux*, 36: 119-120, 1981.

RUDD, J.,J., FRANKLIN-TONG, V.,E. Unravelling responsespecificity in Ca²⁺ signaling pathways in plant cells. *New Phytologist*, 151: 7-33, 2001.

REDDY, A.,S. CALCIUM. Silver bullet in signaling. *Plant Sci*, 160:381-404, 2001.

ROMANO, P.,G.,N., HORTON, P.,GRAY, J.,E. The Arabidopsis Cyclophilin Gene Family. *Plant Physiology*, 134: 1268–1282, 2004.

RAJ-BHANSALI, R. Somatic embryogenesis and regeneration of plantlets in pomegranate. *Ann. Bnt.* 66: 249-253, 1990.

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

SANTA-CATARINA, C., HANAI, L.,R., DORNELAS, M.,C., VIANA, A.,M., FLOH, E.,I.,S. Sherk gene homolog expression, polyamines and amino acids associated with somatic embryogenic competence of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*.79: 53-61, 2004

SCHMIDT, E.,D.,L., GUZZO, F., TOONEN, M.,A.,J., DE VRIES, S.,C. A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development*. 124: 2049-2062, 1997.

SHEVCHENKO, M., WILM, O., VORM, M., MANN. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 850–858. 1996.

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*. 100: 699-709, 2007.

STEWART, F.,C., MAPES, M.,O., MEARS K. Growth and Organized Development of Cultured Cells. II. Organization in Cultures Grown from Freely Suspended Cells. *American Journal of Botany*. 45: 705 – 708, 1958.

SU, Y.,H., ZHANG, X.,S. Auxin gradients trigger de novo formation of stem cells during somatic embryogenesis. *Plant Signaling & Behavior*. 4: 574-576, 2009.

SILVEIRA, V., BALBUENA, T.,S., SANTA-CATARINA, C., FLOH, E.,I., S.; GUERRA, M.,P., HANDRO, W. Biochemical changes during seed development in *Pinus taeda* L. *Plant Growth Regulation*, 44: 147-156, 2004.

SERRA, A.,G., P., PAIVA, R., PAIVA, P., D. O. Análises bioquímicas de calos formados de explantes foliares de castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, 24 (40): 833-840, 2000.

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

SCHERWINSKI-PEREIRA, J.,E.; GUEDES, R.,S., FERMINO, P.,C.,P., SILVA, T.,L., COSTA, F.,H.,S. Somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm using the thin cell layer technique. *In Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant* 46: 378–385. 2010.

SEDBROOK, J.,C., EHRHARDT D.,W., FISHER SE, SCHEIBLE WR, SOMERVILLE CR. The *Arabidopsis* *SKU6/SPIRAL1* gene encodes a plus endlocalized microtubule-interacting protein involved in directional cell expansion. *The Plant Cell* 16: 1506–1520, 2004.

SEHNKE, P.C., CHUNG, H., WU, K., FERL, R.,J. Regulation of starch accumulation by granule-associated plant 14-3-3 proteins. *PNAS*, 98 (2): 765–770, 2001.

SCHOLZE, C., PETERSON, A., DIETRICH, B., LUCKNER, M. Cyclophilin isoforms from *Digitalis lanata*: sequences and expression during embryogenesis and stress. *J Plant Physiol* 155: 212–219, 1999.

SHARMA, A.,D, SINGH, P. Effect of water stress on expression of a 20 kD cyclophilin-like protein in drought susceptible and tolerant cultivars of Sorghum. *J Plant Biochem Biot* 12: 77–80, 2003.

TAN, Y.,J., OLIVEBERG, M., OTZEN, D.,E., FERSHT, A.,R. The rate of isomerisation of peptidyl-proline bonds as a probe for interactions in the physiological denatured state of chymotrypsin inhibitor 2. *J. Mol. Biol.* 269: 611–622, 1997.

TIMPERIO, A.,M., EGIDI, M.,G., ZOLLA, L. Proteomics applied on plant abiotic stresses: Role of heat shock proteins (HSP). *journal of proteomics* 7 1: 391– 411, 2008.

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

ULISSES, C., CAMARA, T.,R., WILLADINO, L., ALBUQUERQUE, C.,C., BRITO, J.,Z. Early Somatic Embryogenesis in *Heliconia chartacea* Lane ex Barreiros cv. Sexy Pink Ovary Section Explants. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 53 (1): 11-18, 2010.

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*, 88: 9-18, 2001.

WISE, J.,M., TUNNACLIFFE, A. POPP the question: what do LEA proteins do? Trends in Plant Science, London, 9: 13-17, 2004.

YANG, H.,P., ZHONG, H.,M., AND ZHOU, H.,M. Catalysis of the refolding of urea denatured creatine kinase by peptidyl-prolyl cis-trans isomerase. Biochim. Biophys. Acta 1338: 147–150, 1997

YURCHENKO, V., ZYBARTH, G., O'CONNOR, M., DAI W.,W, FRANCHIN, G., HAO, T., GUO, H., HUNG, H.,C, TOOLE, B., GALLAY, P., SHERRY, B., BUKRINSKY, M. Active site residues of cyclophilin A are crucial for its signaling activity via CD147. J Biol Chem 277: 22959–22965, 2002.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse estudo descreve respostas de genótipos brasileiros durante o processo de embriogênese somática a partir de embriões zigóticos maduros. Os resultados aqui obtidos sugerem que dos nove genótipos testados, o C2328 e o CM1115 foram os que apresentaram a maior capacidade de formação e regeneração de embriões somáticos, uma vez que eles apresentaram elevada capacidade de formação de embriões somáticos já nos diferentes meios de cultura de diferenciação e maturação, diferentemente dos demais em que a evidente formação de embriões somáticos só ocorreu com maior intensidade quando estes já estavam em meio de regeneração. Esse fato evidencia a hipótese de que cada genótipo apresenta a sua especificidade de resposta durante as etapas que envolvem a embriogênese somática.

Para que ocorram melhorias no protocolo de propagação no âmbito genotípico, também se faz necessário o conhecimento mais aprofundado dos eventos morfo-anatômicos envolvidos neste processo, como a origem das células meristemáticas e a diferenciação e maturação dos embriões somáticos. O conhecimento ontogênico obtido neste trabalho vai contribuir para que ocorram melhorias nos meios de cultivo para cada estágio embriogênico. Além disso, não é difícil se imaginar que a exata caracterização morfo-anatômica dos diferentes estágios da embriogênese somática em uma espécie constitui como um marcador morfológico do processo.

Através da análise proteômica também pode-se obter um conhecimento a nível molecular durante a indução da competência embriogênica. Esses resultados permitiram a identificação de proteínas envolvidas no processo de indução de calos pró-embriogênicos. Estas proteínas serão futuramente analisadas através de RT-PCR para confirmar a expressão diferencial. Esses resultados e informações obtidas, constituem-se como uma importante ferramenta para que avanços possam ser obtidos no conhecimento e melhoria da eficiência da propagação clonal de cada genótipo, podendo tornar-se um importante aliado prático para que

resultados mais rápidos possam ser obtidos nos programas de melhoramento genéticos da espécie.

ANEXOS

Tabela 1: Soluções estoque de MS Alterado (1000ml).

Sol. Estoque	Vol. no meio de cultura (ml)	Compostos	Conc. na Sol. Estoque	Conc. Final
1	20	KNO ₃	95,0 g.L	1,9 g.L
		NH ₄ NO ₃	82,5 g.L	1,65 g.L
		MgSO ₄ 7H ₂ O	18,5 g.L	0,37 g.L
		KH ₂ PO ₄	8,5 g.L	0,17 g.L
2	20	CaCl ₂	16,6 g.L	0,33 g.L
3	10	Na ₂ EDTA	3,73 g.L	0,037 g.L
		FeSO ₄ 7H ₂ O	2,78 g.L	0,027 g.L
4	10	KI	0,083 g.L	0,83mg.L
		H ₃ BO ₃	0,62 g.L	6,2 mg.L
		MnSO ₄ H ₂ O	1,69 g.L	16,9 mg.L
		NaMoO ₄ 2H ₂ O	0,025 g.L	0,25 mg.L
		CuSO ₄ 5H ₂ O	0,0025 g.L	0,025 mg.L
		CoCl ₂ 6H ₂ O	0,0025 g.L	0,025mg.L
		ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,86 g.L	8,6 mg.L
		5	10	Tiamina
	Piridoxina	0,15 g.L		1,5 mg.L
	Ac. Nicotínico	0,1 g.L		1 mg. L
	Biotina	0,025 g.L		0,25 mg.L
	Ac. pantotênico	0,025 g.L		0,25mg.L
	Glicina	0,2 g.L		2 mg .L
	Mio-inositol	10,0 g.L		100 mg.L
	L - glutamina			0,5 g.L
	Sacarose			20 g.L
	Fitagel		2,5 g.L	