

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
REDE DE BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA DA AMAZÔNIA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E
BIOTECNOLOGIA DA REDE BIONORTE (PPG-BIONORTE)

APERFEIÇOAMENTO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA, REPRODUÇÃO E
ANÁLISE MOLECULAR DE RETROCRUZAMENTOS INTERESPECÍFICOS
EM PALMA DE ÓLEO (*Elaeis* spp.)

TALITA APARECIDA BALZON

Manaus, Amazonas

Outubro, 2017

TALITA APARECIDA BALZON

**APERFEIÇOAMENTO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA, REPRODUÇÃO E
ANÁLISE MOLECULAR DE RETROCRUZAMENTOS INTERESPECÍFICOS
EM PALMA DE ÓLEO (*Elaeis spp.*)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte (PPG-BIONORTE), como requisito para a obtenção do título de Doutora em Biodiversidade e Biotecnologia.

Orientador:

Dr. Jonny Everson Scherwinski-Pereira

Manaus, Amazonas

Outubro, 2017

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos pela
autora

B198a Balzon, Talita Aparecida
APERFEIÇOAMENTO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA,
REPRODUÇÃO E ANÁLISE MOLECULAR DE
RETROCRUZAMENTOS INTERESPECÍFICOS EM PALMA DE
ÓLEO (*Elaeis* spp.) / Talita Aparecida Balzon. 2017
123 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Jonny Everson Scherwinski-Pereira
Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede
Bionorte) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Arecaceae. 2. *Elaeis guineensis*. 3. morfogênese. 4. camada
fina de células. 5. melhoramento genético de plantas. I.
Scherwinski-Pereira, Jonny Everson II. Universidade Federal do
Amazonas III. Título

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

BALZON, T. A. **Aperfeiçoamento da embriogênese somática, reprodução e análise molecular de retrocruzamentos interespecíficos em palma de óleo (*Elaeis* spp.)**. Universidade Federal do Amazonas, Tese de doutorado, Manaus – AM, 123 p., 2017.

Ofereço aos meus pais,

*Marisa da Silva Balzon e Rinaldo Balzon Filho,
como forma de gratidão.*

*Dedico ao meu marido
e ao meu filho, com amor.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo amor singular de todos os dias, por me proporcionarem uma ótima base educacional e por todos os ensinamentos para a vida;

Aos meus irmãos, por todas as palavras de apoio, as boas risadas e por serem os melhores irmãos de todos;

Ao meu filho, pela paciência, colinho, palavras de incentivo e carinho nos dias em que eu não tinha mais energia ou tempo para as nossas brincadeiras;

Ao meu marido, pelo apoio, incentivo, amor e, principalmente, por ser a minha maior inspiração para a realização deste trabalho;

Aos meus sogros Nair Iracema e Germano Scherwinski Pereira e aos meus cunhados Regis e Geri, por todas as bênçãos e orações para que tudo sempre dê certo nas nossas vidas;

Ao meu orientador Dr. Jonny Everson Scherwinski Pereira, pelos ensinamentos, apoio, paciência, presteza, disponibilidade e comprometimento com o trabalho;

Aos anjos da guarda e primos queridos Paula Barzon, Francisco Menezes e Maria Clara por todo o “help” que sempre nos deram e, principalmente, pela verdadeira amizade;

Aos queridos Checo Jr., Lea Borges, Thiago Brasil, Cristina Almeida, Mirla “Alcântara”, Frederico “Fred”, Rodrigo Aiache, André Albuquerque, Cláudio Porfiro (vizinho herói), Priscila e Patrícia Barros, Galzinha, Jean e Dani, Flávio Vanucchi, Aliedson Sampaio e Ney Kássio. Sem vocês eu jamais seria a pessoa cheia de boas histórias que sou hoje;

Aos amigos do LAB, Hugo, Filipe, Zan, Gabriela, Inaê, Amanda, Jéssica, Fernanda, Paulo, Renan, André, Luciana, Jêniifer, Tati, Janiffe, Emília, Raphael, Rennan, Paloma, Tati Monteiro, Elinea, Luana, Giuliano, Sharrine, Quesia e Luciene, por todos os momentos de descontração e apoio mútuo e pelas trocas de experiências e vivências;

Aos grandes professores, eternos mestres, Spartaco Filho (Ufam), Jair Maia (UEA), Antônia Souza (Ufam), Judson Valentim (Embrapa); Elizabeth Lima, Roberto Feres (Ufac), Zenóbio (Ufac), Fernando Escócio (Ufac), Oliveira (UnB), Cicero (UnB), Paulo Câmara (UnB), pelos ensinamentos, oportunidade do aprendizado e orientações;

Aos integrantes da banca examinadora, Frederico Henrique, Tatiane Loureiro, Almecina Balbino, Janiffe Peres por se disponibilizarem a participar da minha defesa de tese;

Ao meu médico, Dr. Eduardo Franklin pelo apoio médico, hospitalar e, principalmente por todo o apoio emocional;

Aos pesquisadores da Embrapa Amazônia Ocidental – Manaus (AM), Ricardo Lopes e Raimundo Nonato da Cunha, por todo o material vegetal da palma de óleo cedido gentilmente para o estudo;

A todos os novos amigos que fiz como “professora” ou aluna durante o doutorado, em especial ao Domingos Magno, Mariana, Felicia, Carol, Tamíris, Cecy, Susy, Rogério, Dwight;

Ao Programa de Pós-Graduação BIONORTE;

Aos funcionários da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia;

Ao Cnpq, pelo fomento à pesquisa e à Capes pela concessão da bolsa;

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho,

MUITO OBRIGADA!

APERFEIÇOAMENTO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA, REPRODUÇÃO E ANÁLISE MOLECULAR DE RETROCRUZAMENTOS INTERESPECÍFICOS EM PALMA DE ÓLEO (*Elaeis spp.*)

RESUMO

Neste trabalho, três capítulos são propostos: 1) Otimização da embriogênese somática em palma de óleo (*Elaeis spp.*) a partir de embriões zigóticos maduros; 2) Influência da espessura inicial de corte sobre a diferenciação de embriões somáticos em palma de óleo utilizando a técnica *Thin Cell Layer* (TCL) e; 3) Reprodução vegetativa de retrocruzamentos interespecíficos de palma de óleo por embriogênese somática. No primeiro capítulo foi desenvolvido um sistema para a indução de embriogênese somática e regeneração de plantas a partir de embriões zigóticos maduros de palma de óleo. Calos embriogênicos (CE) foram induzidos por embriões zigóticos (EZ) maduros em meio de Murashige e Skoog (MS) modificado, com o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) ou picloram e em combinação ou não com carvão ativado. A maior percentagem de indução de CE (97,5%) foi obtida através da cultura de embriões zigóticos maduros no meio de MS modificado com 450 μM de picloram e 2,5 g.L^{-1} de carvão ativado. Os CE proliferaram facilmente em meios com concentrações reduzidas de picloram. Esses CE foram repicados em meio de MS suplementado com 12,3 μM de 2-isopenteniladenina (2iP) e 0,54 μM de ácido naftalenoacético (ANA), com subcultivos em intervalos de 4 semanas. Os embriões somáticos foram convertidos em plantas em meio de MS modificado com macro e micronutrientes, suplementado com 20 g.L^{-1} de sacarose, 2,5 g.L^{-1} de carvão ativado e 2,5 g.L^{-1} de Phytigel®. A análise morfohistológica revelou que morfohistologicamente a embriogênese somática seguiu uma via indireta. Calos primários foram observados após 4-6 semanas de cultura que progrediram para CE em 12 semanas. Células embriogênicas exibiram um protoplasma denso, uma relação nucleoplásmica alta, e pequenos grãos de amido. Proembriões formados após 16-20 semanas de cultura e com sucessivas divisões celulares, têm origem multicelular. Embriões somáticos diferenciados apresentaram haustório, plúmula, e a primeira e segunda bainhas foliares. Nesta fase, a protrusão radicular não foi aparente, pois isso ocorre geralmente após emergência das primeiras folhas verdadeiras. No segundo capítulo, explantes obtidos por cortes de plantas de 1 mm, 2 mm e 3 mm de espessura foram estabelecidos em meio de cultura de MS, com Picloram (450 μM). Utilizando TCL foi

possível induzir eficientemente a embriogênese somática em palma de óleo. Os genótipos e a espessura dos explantes exerceram influência na indução da embriogênese somática, mas explantes de menor espessura (até 2 mm de espessura) se mostram os mais responsivos. Os genótipos também exercem uma forte influência na indução da embriogênese somática, pois mostraram importantes diferenças quanto à percentagem de calos embriogênicos e número de embriões somáticos por calo. Por fim, o terceiro capítulo propôs um método para a reprodução vegetativa de EZ de retrocruzamentos interespecíficos de palma de óleo por embriogênese somática, bem como, analisar a fidelidade genética e epigenética por meio da utilização de marcadores ISSR e AFLP das plantas regeneradas. Para tanto, 195, 281 e 198 embriões zigóticos de sementes maduras dos respectivos retrocruzamentos interespecíficos SQ150, SR78 e SR84 foram cultivados sob as condições do experimento desenvolvido no Capítulo 1, com pequenas modificações. Dos regenerantes, 36 plantas de 3 diferentes embriões zigóticos foram aleatoriamente avaliadas por marcadores ISSR e AFLP (MSAP) quanto a possíveis variações genéticas e epigenéticas. Após 36 meses do início do cultivo, as taxas de regeneração de plantas alcançaram entre 6,2% e 34,2% dos EZ inoculados inicialmente. Quando se avaliou os regenerantes por ISSR foi possível inferir que indivíduos regenerados de EZ podem apresentar entre 97,5% e 100% de similaridade quando avaliadas dentro da mesma matriz que lhe deu origem (intrapopulações). No entanto, quando os indivíduos são comparados com plantas regeneradas de outros EZ utilizados como matrizes, eles podem apresentar variabilidade genética superior a 20%, ou seja, similaridade genética de apenas 80% (interpopulações). Na análise por AFLP (MSAP) verificou-se a amplificação de 357 locos nas 36 plantas avaliadas. Nessas amplificações, constatou-se que 69% destas regiões revelaram-se sensíveis à metilação e, destas, 58% foram ocasionadas pelo ganho de fragmentos, ou seja, pela hipometilação do DNA genômico.

Palavras chaves: *Arecaceae*, *Elaeis guineensis*, *Elaeis oleifera*, embriogênese somática, morfogênese, camada fina de células, melhoramento genético de plantas.

**IMPROVEMENT OF SOMATIC EMBRYOGENESIS, REPRODUCTION AND
MOLECULAR ANALYSIS OF INTERSPECIFIC BACKCROSSES OF OIL
PALM (*Elaeis* spp.)**

ABSTRACT

In this work, three Chapters are proposed: 1) Optimization of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis* spp.) from mature zygotic embryos; 2) Influence of initial cutting thickness on somatic embryos differentiation in oil palm (*Elaeis* spp.) using the thin cell layer technique (TCL), and; 3) Vegetative reproduction and molecular analysis of interspecific backcrosses of oil palm regenerated by somatic embryogenesis. In the first Chapter, we developed an efficient and simple system for inducing somatic embryogenesis and regenerating plantlets from mature zygotic embryos of oil palm. Embryogenic calli were induced from mature zygotic embryos of oil palm on modified Murashige and Skoog medium with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid or picloram, alone or in combination with activated charcoal. The greatest frequency of embryogenic callus induction (97.5%) was obtained by culturing mature zygotic embryos on callus induction medium with 450 μM picloram and 2.5 g.L^{-1} activated charcoal. Embryogenic calli proliferated on a medium with a reduced concentration of picloram. Embryogenic calli were then subcultured on a medium supplemented with 12.3 μM 2-isopentenyladenine and 0.54 μM naphthaleneacetic acid, with subcultures at 4-wk intervals. Somatic embryos were regenerated on a medium with Murashige and Skoog macro- and micronutrients at halfstrength concentrations supplemented with 20 g.L^{-1} sucrose, 2.5 g.L^{-1} activated charcoal, and 2.5 g.L^{-1} Phytigel. Detailed histological analysis revealed that somatic embryogenesis followed an indirect pathway. Primary calli were observed after 4–6 wk of culture and progressed to embryogenic calli at 12 wk. Embryogenic cells exhibited dense protoplasm, a high nucleoplasmic ratio, and small starch grains. Proembryos, which seemed to have a multicellular origin, formed after 16–20 wk of culture and successive cell divisions. Differentiated somatic embryos had a haustorium, a plumule, and the first and second foliar sheaths. In differentiated embryos, the radicular protrusion was not apparent because it generally does not appear until after the first true leaves emerge. In the second Chapter, 1, 2 and 3 mm thick TCL explants obtained from *in vitro* germinated plants were established on MS culture medium with Picloram (450 μM). It was observed that the TCL technique can efficiently

induce somatic embryogenesis in oil palm. Genotypes and thickness of the explants used exert a strong influence on the induction of somatic embryogenesis. Explants with a thickness of up to 2 mm are more responsive. Genotypes also exert a strong influence on the induction of somatic embryogenesis, because shown important differences in the percentage of callus with somatic embryos and number of somatic embryos formed per callus. Finally, the third Chapter proposed a method for the vegetative reproduction of zygotic embryos (ZE) from interspecific backcrosses of palm oil by somatic embryogenesis, as well as to analyze genetically and epigenetically the regenerated plants through ISSR and AFLP markers. To this end, 195, 281 and 198 ZE from the respective interspecific backcrosses SQ150, SR78 and SR84 were cultured *in vitro* under the experimental conditions developed in Chapter 1, with minor modifications. From the regenerated plants, 36 individuals of three different zygotic embryos (considered as matrices) were randomly evaluated by ISSR and AFLP (MSAP) markers for possible genetic and epigenetic variations. After 36 months of cultivation, plant regeneration rates ranged from 6.2% to 34.2%. When the regenerants were evaluated by ISSR, it was possible to infer that regenerated individuals of ZE can present between 97.5% and 100% of similarity when evaluated within the same matrix that originated them (intrapopulations). However, when individuals are compared with regenerated plants from other ZE used as matrices, they showed genetic variability of more than 20%, that is, genetic similarity of only 80% (interpopulations). In the analysis performed by the AFLP (MSAP), 357 loci were amplified. In these amplifications, it was verified that 69% of these regions were sensitive to methylation and of these, 58% were caused by the gain of fragments, that is, by the hypomethylation of the genomic DNA.

Palavras chaves: Arecaceae, *Elaeis guineensis*, *Elaeis oleifera*, somatic embryogenesis, morphogenesis, thin cell layer, plant breeding.

LISTA DE ABREVIATURAS

2-iP – 2- isopentenil-adenina

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

μM – Micromolar

ABA – Ácido absísico

AFLP – Polimorfismo no comprimento de fragmentos amplificados

AIB – Ácido Indol Butírico

AMOVA – Análise de variância molecular

ANA – Ácido naftalenoacético

BAP – N6- Benzilaminopurina

CE – Calos embriogênicos

CP – Calos primários

EET – Embriões em estágio torpedo

ES – Embriões somáticos

ESD – Embriogênese somática direta

ESI – Embriogênese somática indireta

EZ – Embriões zigóticos

GR – Genitor Recorrente

ISSR – Entre sequências simples repetidas

MIC – Meio de indução de calos

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

NaClO – Hipoclorito de sódio

TCL – *Thin Cell Layer* (Fina camada celular)

PCR – Reação em cadeia da polimerase

pH – Potencial hidrogeniônico

Pi – Picloram (4 amino – 3,4,6-ácido tricloro picolínico)

RAPD – DNA polimórfico amplificado ao acaso

RFLP – Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição

RNase – Ribonuclease

rpm – Rotação por minuto

s – Segundo

SNP – Polimorfismo de nucleotídeo único

SSR – Sequências simples repetidas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 ASPECTOS GERAIS DA PALMA DE ÓLEO	3
2.2 ORIGEM E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA	4
2.3 PRODUTIVIDADE DA CULTURA NO BRASIL	6
2.4 MELHORAMENTO GENÉTICO EM PALMA DE ÓLEO	7
2.5 GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS	10
2.6 A EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA	12
2.7 REGENERAÇÃO DE PLANTAS A PARTIR DA TÉCNICA <i>THIN CELL LAYER</i> (TCL)	15
2.8 ANÁLISE MORFO-ANATÔMICA	16
2.9 MARCADORES MOLECULARES	17
2.9.1. MARCADORES ISSR.....	19
2.9.2. MARCADORES AFLP	20
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22

CAPÍTULO 1

OTIMIZAÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM PALMA DE ÓLEO (*Elaeis* spp.) A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS MATUROS

RESUMO	35
ABSTRACT	36
1. INTRODUÇÃO.....	36
2. MATERIAL E MÉTODOS	39
2.1 INDUÇÃO DE CALOS EMBRIOGÊNICOS.....	39
2.2 MULTIPLICAÇÃO E MANUTENÇÃO DE CALOS	40
2.3 DIFERENCIAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS.....	40
2.5 CARACTERÍSTICAS COMUNS DO CULTIVO <i>IN VITRO</i> DA PALMA DE ÓLEO.....	41
2.6 ENRAIZAMENTO DE PLANTAS	41
2.7 ACLIMATAÇÃO DAS PLANTAS	41
2.8 ANÁLISES MORFO-ANATÔMICAS	42

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4. ANÁLISES MORFO-ANATÔMICAS.....	52
5. CONCLUSÕES	53
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

CAPÍTULO 2

INFLUÊNCIA DA ESPESSURA INICIAL DE CORTE SOBRE A DIFERENCIAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS EM PALMA DE ÓLEO (*Elaeis* spp.) UTILIZANDO A TÉCNICA *THIN CELL LAYER* (TCL)

RESUMO	60
ABSTRACT	61
1. INTRODUÇÃO.....	62
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	64
2.1 GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE DIFERENTES GENÓTIPOS DE PALMA DE ÓLEO (<i>Elaeis</i> spp.).....	64
2.2 INFLUÊNCIA DA ESPESSURA INICIAL DE CORTE SOBRE A DIFERENCIAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS EM PALMA DE ÓLEO (<i>Elaeis</i> spp.) UTILIZANDO A TÉCNICA <i>THIN CELL LAYER</i> (TCL)	65
2.3 ANÁLISE MORFO-ANATÔMICA	67
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
3.1 GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE DIFERENTES GENÓTIPOS DE PALMA DE ÓLEO (<i>Elaeis</i> spp.).....	68
3.2 INFLUÊNCIA DA ESPESSURA INICIAL DE CORTE SOBRE A DIFERENCIAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS EM PALMA DE ÓLEO (<i>Elaeis</i> spp.) UTILIZANDO A TÉCNICA <i>THIN CELL LAYER</i> (TCL)	70
3.3 ANÁLISE MORFO-ANATÔMICA	74
4. CONCLUSÕES	76
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

CAPÍTULO 3

REPRODUÇÃO VEGETATIVA E ANÁLISE MOLECULAR DE RETROCRUZAMENTOS INTERESPECÍFICOS DE PALMA DE ÓLEO (*Elaeis* spp.) REGENERADOS POR EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

RESUMO	83
ABSTRACT	84
1. INTRODUÇÃO.....	85
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	87
2.1 REPRODUÇÃO VEGETATIVA DE RETROCRUZAMENTOS INTERESPECÍFICOS DE PALMA DE ÓLEO (<i>Elaeis</i> spp.) POR EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA.....	88
2.1.1 INDUÇÃO DE CALOS EMBRIOGÊNICOS	89
2.1.2 MULTIPLICAÇÃO E MANUTENÇÃO DE CALOS.....	89
2.1.3 DIFERENCIAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS	90
2.1.4 REGENERAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS	90
2.1.5 OTIMIZAÇÃO DO ENRAIZAMENTO <i>IN VITRO</i> DAS PLANTAS.....	91
2.1.6 CARACTERÍSTICAS COMUNS DO CULTIVO <i>IN VITRO</i> DA PALMA DE ÓLEO	91
2.1.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	91
2.2 ANÁLISE MOLECULAR EM PLANTAS DE RETROCRUZAMENTOS INTERESPECÍFICOS DE PALMA DE ÓLEO (<i>Elaeis</i> spp.), REGENERADAS POR EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA.....	91
2.2.1 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO	92
2.2.2 ANÁLISE ISSR (<i>Inter Simple Sequence Repeats</i>)	93
2.2.3 ANÁLISE AFLP (MSAP)	95
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	99
3.1 REPRODUÇÃO VEGETATIVA DE RETROCRUZAMENTOS INTERESPECÍFICOS DE PALMA DE ÓLEO (<i>Elaeis</i> spp.) POR EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA.....	99
3.1.1 FORMAÇÃO DE CALOS PRIMÁRIOS, CALOS EMBRIOGÊNICOS E REGENERAÇÃO DE PLANTAS NO GENÓTIPO SR78.....	99
3.1.2 FORMAÇÃO DE CALOS PRIMÁRIOS, CALOS EMBRIOGÊNICOS E REGENERAÇÃO DE PLANTAS NO GENÓTIPO SR84.....	102

3.1.3 FORMAÇÃO DE CALOS PRIMÁRIOS, CALOS EMBRIOGÊNICOS E REGENERAÇÃO DE PLANTAS PARA O GENÓTIPO SQ150.....	105
3.2 ANÁLISE MOLECULAR EM PLANTAS DE RETROCRUZAMENTOS INTERESPECÍFICOS DE PALMA DE ÓLEO (<i>Elaeis spp.</i>) REGENERADAS POR EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA.....	108
3.2.1 ANÁLISE DA FIDELIDADE GENÉTICA POR MARCADORES ISSR (<i>Inter Simple Sequence Repeats</i>).....	108
3.2.2 Análise da variação epigenética por marcadores AFLP (<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>).....	110
3.3 ANÁLISES MORFO-ANATÔMICAS E MORFOLÓGICAS.....	116
4. CONCLUSÕES.....	118
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	119

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Influência da espessura de corte e genótipo sobre a diferenciação de embriões somáticos em palma de óleo utilizando a técnica *thin cell layer* (TCL) 7

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Lista dos 29 *primers* utilizados na análise da fidelidade genética de plantas de palma de óleo produzidas via embriogênese somática por marcadores ISSR e suas respectivas sequências 94

Tabela 2. Sequências (5'' - 3'') dos adaptadores e *primers* utilizados na análise epigenética de plantas de dendezeiro produzidas via embriogênese somática por marcadores AFLP (MSAP) 96

Tabela 3. Frequência absoluta e relativa da de calos embriogênicos a partir de calos primários no genótipo SR78, aos 150 dias em meio de indução..... 100

Tabela 4. Frequência absoluta e relativa dos 113 explantes do genótipo SR78 que formaram embriões somáticos..... 100

Tabela 5. Valores observados e valores esperados (em parênteses) de ES sob a hipótese nula H_0 de homogeneidade em relação ao número de embriões somáticos de acordo com as classes..... 101

Tabela 6. Valores χ^2 obtidos para cada uma das classes com relação ao número de embriões somáticos por explante do genótipo SR78..... 101

Tabela 7. Formação de calos embriogênicos nos explantes do genótipo SR84 aos 150 dias em meio de indução da embriogênese somática	103
Tabela 8. Frequência absoluta e relativa dos 227 explantes do genótipo SR84 que formaram embriões somáticos.....	103
Tabela 9. Número de embriões somáticos do genótipo SR84, de acordo com as classes	104
Tabela 10. Valores χ^2 obtidos para cada uma das classes com relação ao número de embriões somáticos por explante do genótipo SR84.....	104
Tabela 11. Formação de calos embriogênicos nos explantes do genótipo SQ150, aos 120 dias em meio de indução da embriogênese somática	106
Tabela 12. Frequência absoluta e relativa dos 161 explantes do genótipo SQ150 que formaram embriões somáticos.....	106
Tabela 13. Número de embriões somáticos do genótipo SQ150, de acordo com as classes	107
Tabela 14. Valores χ^2 obtidos para cada uma das classes com relação ao número de embriões somáticos por explante do genótipo SQ150.....	107
Tabela 15. Análise da variação epigenética pelo marcador molecular AFLP em plantas de retrocruzamentos interespecíficos de palma de óleo, regeneradas por embriogênese somática.	111
Tabela 16. Análise de variância molecular (AMOVA) dos locos submetidos ou não ao processo de metilação.....	111

ÍNDICE DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. Cachos com frutos da palma de óleo (<i>Elaeis</i> spp.) apresentando diferenças morfológicas entre <i>E. guineensis</i> var. <i>dura</i> ; <i>E. guineensis</i> var. <i>tenera</i> e <i>E. guineensis</i> var. <i>pisifera</i> . Foto: Jonny Everson Scherwinski-Pereira.	5
Figura 2. Dispersão da palma de óleo pelo mundo.	6
Figura 3. Banco Ativo de Germoplasma do gênero <i>Elaeis</i> (BAGDendê) da Embrapa Amazônia Ocidental, Rio Urubu, Município de Rio Preto da Eva, AM. Foto: Jonny Everson Scherwinski-Pereira.....	8
Figura 4. A) Planta adulta de <i>E. oleífera</i> (Kunth) Cortés; B) Planta adulta de <i>E. guineensis</i> Jacq.; C) Planta adulta do gênero <i>Elaeis</i> , obtida pelo cruzamento interespecífico entre <i>E. oleífera</i> e <i>E. guineensis</i> ; D) Fruto de <i>E. oleífera</i> ; E) Fruto de <i>E. guineensis</i> ; F) fruto obtido pelo cruzamento de plantas entre as espécies <i>E. oleífera</i> e <i>E.</i>	

guineensis. Tanto a planta quanto os frutos obtidos através do cruzamento entre *E. oleífera* e *E. guineensis* apresentam características fenotípicas de ambas as espécies. Fotos: A: Plantsystematics; B, C, D, E e F: Jonny Everson Scherwinski-Pereira. 9

CAPÍTULO 1

Figura 1. Indução de calos embriogênicos a partir de embriões zigóticos maduros de palma de óleo. A) Frequência de indução de calos embriogênicos (%); B) Comprimentos dos calos em sua maior proporção (cm); C) Recobrimento dos explantes por estruturas granulares (%). 44

Figura 2. Crescimento dos calos multigranulares embriogênicos (cm³) de palma de óleo mantidos por 90 dias em meio de multiplicação com Picloram ou 2,4-D. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 47

Figura 3. Efeito das auxinas 2,4-D e Picloram na multiplicação de calos multigranulares embriogênicos de palma de óleo: A) Aspecto de calos multigranulares embriogênicos de palma de óleo aos 45 dias em meio de multiplicação; B) Calos multigranulares embriogênicos aos 60 dias em meio de multiplicação com a presença do meristema apical do embrião zigótico aderido (fonte de explante) (seta); C) Aumento em massa celular dos calos embriogênicos aos 75 dias; D) Aspecto do crescimento dos calos multigranulares embriogênicos aos 90 dias. Barras (A) 1 cm; (B) 0,3 cm e (D) 3 cm. 47

Figura 4. Ganho em massa celular de calos embriogênicos de palma de óleo mantidos por 90 dias em meio de multiplicação com Picloram ou 2,4-D. 48

Figura 5. Estágios morfológicos da indução de calos embriogênicos em dendezeiro a partir de embriões zigóticos. A) Embrião zigótico de dendezeiro utilizado como fonte de explante; B-E) Diferenciação dos embriões zigóticos a partir do desenvolvimento do calo primário na região distal dos explantes; F-G) Aspecto de calos primários com início de formação de estruturas multigranulares embriogênicas recobrando o explante, após cerca de 20 semanas de cultivo em meio de indução; H-I) Aspecto dos calos, após doze semanas em meio de multiplicação; J) Embriões somáticos; K) Regeneração de plantas; L) Individualização de plantas regeneradas; M) Aclimação de plantas regeneradas em estufa; N) Plantas regeneradas aclimatadas em casa de vegetação; O) Plantas de palma de óleo em campo, na Embrapa Cenargen. Barras (A-E) 0,3 cm; (F-J) 0,5 cm; (K-L) 1,5 cm. 51

Figura 6. Secções de explante de *Elaeis guineensis* Jacq. durante a embriogênese somática. A) Região com células meristemáticas, caracterizadas por núcleo volumoso e citoplasma denso e com intensas divisões celulares; B) Células contendo grãos de amido, localizadas próximas às regiões de intensas divisões celulares; C) Início da formação de pró-embriões; D) Explante com formações de embriões em estágio semelhante ao globular (seta); E) Embrião globular (ge) envolvido por células meristemáticas; F) Embrião somático apresentando haustório (ha) e ápice apical do caule com duas bainhas foliares (ls). Barras (A e D) 50 µm; (B e C) 100 µm; (E e F) 10 µm. 53

CAPÍTULO 2

Figura 1. Germinação *in vitro* de embriões zigóticos de genótipos de palma de óleo. (A) Aspecto do embrião zigótico; (B) Formação dos pontos de crescimento; (C) Emissão da bainha foliar e raiz primária; (D) Aspecto de uma plântula em fase de desenvolvimento com 1 mês de idade; (E) Morfologia e início do desenvolvimento da raiz em planta com 2 meses de idade; (F) Aspecto de plantas mantidas *in vitro* aos 10 meses de idade. 68

Figura 2. Taxa de germinação de embriões zigóticos de genótipos de palma de óleo aos 25 e 50 dias de cultivo *in vitro*. 69

Figura 3. Altura das plantas oriundas de embriões zigóticos de genótipos de palma de óleo aos 25 e 50 dias de cultivo *in vitro*. 70

Figura 4. Embriogênese somática utilizando a técnica *Thin Cell Layer* (TCL). A) Visualização das espessuras dos cortes (1 mm, 2 mm e 3 mm); B) Explantes TCL mostrando a formação e multiplicação de calos e aparecimento de embriões (seta); C) Multiplicação em diferentes estágios dos calos, mostrando assincronia em diferentes fases da embriogênese somática e embriões diferenciados. Setas: Embriões na fase torpedo; D) Germinação de embriões somáticos; E) Regeneração de plantas; F) Plantas formada a partir dos agregados de embriões somáticos e cultivada em meio sem fitorreguladores. Barras (B e D) 2,6 cm; (C) 1 cm. 71

Figura 5. Eventos morfo-anatômicos durante a embriogênese somática em palma de óleo. A) Embriões somáticos em fase torpedo; B) Secção longitudinal de um embrião somático em estágio avançando de desenvolvimento, delimitado pela protoderme, evidenciando o eixo embrionário, procâmbio e meristema fundamental; C) Meristema fundamental apresentando divisão celular e, procâmbio com células alongadas; D) Protoderme formada por única camada celular e meristema fundamental formado por células com citoplasma denso. Abreviações: (rp) região proximal; (rd) região distal; (pd) protoderme; (ee) eixo embrionário; (pc) procâmbio; e (mf) meristema fundamental. Barras (A) 2 mm; (B) 500 µm; (C e D) 50 µm. 75

CAPÍTULO 3

Figura 1. Genealogia dos retrocruzamentos de palma de óleo utilizados para a reprodução vegetativa por embriogênese somática. 68

Figura 2. Curva de formação de calo primário e calo embriogênico dos 113 explantes que responderam à indução de calos. 99

Figura 3. Curva de formação de calo primário e calo embriogênico de 227 explantes que responderam à indução de calos. 103

Figura 4. Curva de formação de calo primário e calo embriogênico de 161 explantes que responderam à indução de calos. 105

Figura 5. Aspectos morfológicos da embriogênese somática de retrocruzamentos interespecíficos de palma de óleo. A) Multiplicação de calos; B) Calos e embriões

somáticos em diferentes fases de desenvolvimento; C) Embriões somáticos em estágio torpedo; D) Cluster composto por plantas com raízes; E) Plantas formadas prontas para a individualização; F) Plantas individualizadas; G) Plantas amostrais com raízes desenvolvidas utilizada nas análises moleculares. Barra (D) 1 cm. 108

Figura 6. Dendrograma gerado pelo método de agrupamento UPGMA da relação entre as plantas regeneradas por embriogênese somática em retrocruzamentos interespecíficos de palma de óleo. 109

Figura 7. Análise da fidelidade genética pelo marcador molecular ISSR em plantas de retrocruzamentos interespecíficos de palma de óleo, regeneradas por embriogênese somática. A) Primer 32 zm e B) Primer 59 zm. Setas vermelhas: variação somaclonal. 110

Figura 8. Análise de coordenadas principais (PCoA) dos locos sujeitos a metilação para a diferenciação epigenética das plantas de retrocruzamentos interespecíficos de palma de óleo, regeneradas por embriogênese somática. As coordenadas C1 e C2 são mostradas com a percentagem de variância explicada entre eles. Pontos diferentes representam indivíduos diferentes. O nome de cada grupo mostra o centro da sua nuvem de pontos. A elipse representa a dispersão média dos pontos ao redor de seu centro. O eixo mais comprido da elipse mostra a direção de dispersão máxima e, o eixo menor a direção de dispersão mínima. 113

Figura 9. Variações epigenéticas observadas nas plantas de retrocruzamentos interespecíficos de palma de óleo, regeneradas por embriogênese somática. 114

Figura 10. Análise epigenética de plantas de retrocruzamentos interespecíficos de palma de óleo, regeneradas por embriogênese somática. A) *Primer* Eco-AGG/Hpa-TTA e B) *Primer* Eco-AGG/Msp-TTA na amplificação do DNA das plantas. Setas vermelhas = perda de banda ou hipermetilação (A) e ganho de banda ou hipometilação (B). 115

Figura 11. Caracterização da embriogênese somática em palma de óleo. A) Aspecto de embriões somáticos em estágio torpedo; B) Secção longitudinal dos embriões em estágio torpedo evidenciando o eixo embrionário bem definido; C) Secção anatômica indicando a delimitação dos embriões somáticos pela protoderme, o eixo embrionário, procâmbio e meristema fundamental; D) Eixo embrionário evidenciando o desenvolvimento da plúmula; E) Embriões globulares em desenvolvimento na região periférica dos embriões somáticos; F) Células em intensas divisões com citoplasma denso e formação de pectina (asterisco). Abreviações: (rd) região distal; (rp) região proximal; (mf) meristema fundamental; (ee) eixo embrionário; (pd) protoderme; (pc) procâmbio. Setas: (E): embriões globulares, (F): células proembriogênicas – (*) formação de pectina. 117

1. INTRODUÇÃO GERAL

A crescente demanda mundial por óleos vegetais nas últimas décadas tem sido motivada, principalmente, pelo expressivo aumento populacional em países em desenvolvimento. A substituição do consumo de gorduras de origem animal por óleo vegetal, aliado ao significativo desenvolvimento de tecnologias e custos de produção mais baixos, são fatores que também impulsionaram a expansão da indústria de óleos vegetais (MONTEIRO e HOMMA, 2014).

O Brasil é dotado de condições ideais para se tornar um grande produtor mundial de óleo vegetal, não somente a partir de espécies anuais, mas também a partir de espécies perenes de alto rendimento, pois dispõe de extensas áreas agricultáveis, parte delas não propícias ao cultivo de gêneros alimentícios, mas com solo e clima favoráveis ao plantio de inúmeras oleaginosas perenes (MME, 2012).

Diante disso, a produção de óleo vegetal para utilização como biodiesel apresenta-se como uma alternativa em substituir o consumo de óleos derivados do petróleo. É um combustível biodegradável, obtido a partir de uma mistura reacional contendo de 80 a 90% (em massa) de óleo vegetal ou gordura animal, de 10 a 20% de álcool etílico ou metílico e de 0,35% a 1,5% em massa de catalisador, em um processo denominado transesterificação. Com o objetivo de viabilizar a produção do biodiesel e equacionar questões fundamentais para o país, em dezembro de 2004 foi criado o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB), com metas de fixar níveis crescentes e percentuais mínimos de adição do biodiesel ao óleo diesel (Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005) (KALTNER, 2007). A partir disso, vários projetos foram implantados com o objetivo de viabilizar a produção de bicomcombustível a partir de fontes renováveis (FERREIRA et al. 2012).

Neste contexto, a pesquisa deve buscar atingir novos patamares de rendimento de óleo com maior adensamento energético das espécies oleaginosas, passando o rendimento em óleo do nível atual de 500 a 700 kg/ha (culturas tradicionais, em que se tem domínio tecnológico, como a soja) para àqueles acima de 5.000 kg/ha, proporcionando competitividade crescente ao biodiesel do qual entre 40 e 60% do custo de produção é devido ao custo das matérias-primas (GONTIJO et al. 2011).

De fato, entre as oleaginosas, a palma de óleo (*Elaeis* spp.) ganha destaque por poder apresentar rendimento de óleo em torno de 4 a 7 ton ha⁻¹ ano⁻¹, sendo essa produção a de pelo menos sete a oito vezes maior que a do óleo de soja (o produto de

maior representatividade atual na mistura, com cerca de 75 a 80%), o que o classifica como a primeira fonte de óleo vegetal do planeta (RAJESH et al. 2003; AGRICULTURE, 2011).

Entretanto, a multiplicação de genótipos selecionados se dá exclusivamente por meio de sementes, fato que, na ausência de métodos adequados de reprodução vegetativa por métodos convencionais, torna praticamente impossível a obtenção de culturas uniformes e a perpetuação das características de um indivíduo de alto valor genético selecionado. Por essa razão, há preocupações quanto à multiplicação dos genótipos selecionados, pois além da possibilidade de se obter indivíduos heterogêneos, a multiplicação por sementes requer um período relativamente longo até que novas mudas sejam formadas, ou então, que caracteres de interesse sejam fixados em ciclos de seleção genética (BASIRON, 2007; RIOS, 2012).

Dessa forma, a embriogênese somática em palma de óleo, além de permitir a reprodução de plantas de interesse, pode criar a possibilidade de ser um suporte prático para alcançar resultados mais rápidos nos programas de melhoramento genético, especialmente na fixação de caracteres da geração F₁ nos cruzamentos interespecíficos ou intraespecíficos (GOMES JR et al. 2014).

Porém, para que a embriogênese somática venha a se tornar um processo efetivamente importante para a propagação vegetativa da palma de óleo, é necessário que ocorra o desenvolvimento e aperfeiçoamento de protocolos que permitam o domínio das diferentes etapas do processo e que, por fim, permitam a regeneração em larga escala de plantas completas por embriogênese somática.

Nesse contexto, o trabalho objetivou aperfeiçoar a embriogênese somática em palma de óleo a partir de embriões zigóticos, avaliar a diferenciação e a regeneração de embriões somáticos formados a partir de materiais juvenis germinados *in vitro* pela técnica *thin cell layer* (TCL) em palma de óleo, além de reproduzir vegetativamente retrocruzamentos interespecíficos em palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineensis*) x *E. guineensis*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ASPECTOS GERAIS DA PALMA DE ÓLEO

O gênero *Elaeis* (do grego “*Elaion*”, que significa óleo), pertence à classe *Liliopsida* (*Monocotiledônea*), ordem *Arecales* (*Palmales*), família *Arecaceae* (*Palmae*), subfamília *Arecoideae*, tribo *Cocoseae* (*Cocoinaea*) e, subtribo *Elaeidinae* (DRANSFIELD et al. 2005). A família *Arecaceae* contém cerca de 225 gêneros e 2779 espécies (ZEVEN, 1964; MOORE, 1973). O gênero abrange duas espécies economicamente importantes: *Elaeis guineensis* Jacq., nativo das florestas tropicais da costa oeste do continente africano e *Elaeis oleifera* (Kunth) Cortés nativo do continente americano, onde ocorre principalmente na floresta tropical amazônica, estendendo-se da Colômbia ao Panamá; ambas são espécies de ocorrência comum em áreas antropizadas e ao longo dos cursos hídricos (RAO et al. 1989).

A planta é uma monocotiledônea oleaginosa, perene, alógama com flores completas, possuindo inflorescências masculinas e femininas na mesma planta em grandes panículas envoltas em espatas coriáceas ou lenhosas com folhas paralelinervadas (BONDAR, 1964). Monocaule, que na idade adulta pode atingir de 25 a 30 metros de altura, a base desta palmeira assemelha-se a uma coluna cônica que, a partir do primeiro metro de altura, torna-se constante quanto ao diâmetro, que varia de 22 a 75 cm. Seu sistema radicular, do tipo fasciculado, é composto por milhares de raízes adventícias primárias, que emergem do bulbo radicular, formado a partir dos entrenós da base do estipe (ADAM et al. 2005).

Na parte superior, a palma de óleo possui uma coroa de folhas pinadas formadas pelo meristema apical. Em plantas adultas, esta estrutura possui entre 30 e 45 folhas funcionais que podem atingir até 7 m de comprimento. Estas folhas são compostas por um pecíolo ligeiramente triangular, de aproximadamente 1,5 m de comprimento, com espinhos regularmente dispostos sobre as arestas laterais. A folhas são compostas também por uma raque longa e afilada de aproximadamente 5 m de comprimento, composta de 250 a 350 folíolos, com ângulos de inserção variados, repartidos em ambos os lados (ADAM et al. 2005; GOMES et al. 2015).

Nessa cultura as flores masculinas e femininas apresentam-se separadas em inflorescências masculinas e femininas, que são protegidas por duas brácteas fibrosas denominadas espatas. Estas inflorescências desenvolvem-se em sequências unissexuais

denominadas ciclos, que por não se sobrepujarem, ocasionam a fecundação cruzada (ADAM et al. 2011).

O fruto comercial da palma de óleo se desenvolve em cachos ovais, atingindo um comprimento médio de 50 cm, com largura de cerca de 35 cm e pesando de 20 a 30 kg. Cada cacho é composto por aproximadamente 1500 frutos. O fruto é uma drupa sésil, com formato esférico e alongado, medindo de 2 a 5 cm de comprimento e entre 3 e 30 g de peso (ADAM et al. 2005).

A palma de óleo usada comercialmente ou em programas de melhoramento genético para a formação de variedades comerciais pode ser classificada de acordo com a sua transmissão hereditária de forma, coloração e composição do fruto e forma das folhas (VANDERWEIEN, 1952). A mais importante é aquela que classifica as plantas de acordo com a espessura do endocarpo do fruto, podendo ser de três tipos (Figura 1): *Dura*, com endocarpo de espessura superior a 2 mm e fibras dispersas no mesocarpo; *Pisífera*, que não possui ou possui fino endocarpo, podendo ter em seu lugar um fino anel de fibras, e; *Tenera*, com espessura do endocarpo menor que 2 mm e com um anel de fibras ao seu redor (origina-se do cruzamento entre *Dura* x *Pisífera*, atualmente as variedades comerciais encontradas no mercado). É essencialmente nesses três tipos de fruto que se baseia o melhoramento genético para a produção de óleo contido no mesocarpo (polpa) do fruto (VALLEJO, 1978; RAMALHO FILHO et al. 2010).

Populações naturais do *Elaeis oleifera* (HBK) Cortés, também conhecido como caiaué, palma americana ou dendê nativo, podem ser encontradas desde a América Central até o norte da América do Sul (Suriname, Colômbia e extremo noroeste do Brasil (MEUNIER, 1975; ALVES et al. 2011).

O *E. oleifera* possui tronco tipo estipe, cilíndrico maciço, caracterizado pelo crescimento anual entre 5 a 10 cm, até o máximo de 5 metros de altura quando adulto. Por volta dos 15 anos de idade, o estipe curva-se sobre o solo permanecendo a parte terminal ereta, mantendo a coroa foliar a 2-3 metros de altura, num estágio denominado de procumbência (CORLEY e TINKER, 2003; CUNHA et al. 2009).

Esta espécie produz pouco óleo, porém, o interesse no *E. oleifera* baseia-se em diversos fatores, como o porte reduzido e a alta qualidade do óleo, que possui maior teor de ácidos graxos insaturados que a espécie *E. guineensis* (78% vs. 48%) (RAMOS et al. 2006). Além disso, o *E. oleifera* tem sido muito utilizado na hibridação com *E. guineensis*, para a obtenção de cruzamentos resistentes à doenças como o amarelecimento fatal (CARDOSO, 2010).

O óleo de dendê é usado direta ou indiretamente na alimentação, fazendo parte de margarinas, gorduras, sorvetes, manteigas vegetais, óleos de cozinha, óleos de salada e azeites de dendê. Na indústria, o óleo de dendê é usado na produção de sabões, sabões em pó, sabonetes, xampus, velas, tintas, detergentes e, nos últimos anos, também vêm constituindo um importante insumo para a produção de bicombustíveis, como o biodiesel. Já o óleo de palmiste (obtido essencialmente da amêndoa), é utilizado pela indústria na fabricação de batons, perfumes e nos últimos anos, também vêm constituindo um importante insumo para a produção de bicombustíveis (SUNDRAM et al. 2003; HAMEED et al. 2009; MUKHERJEE e SOVACOO, 2014; OOSTERVEER, 2015; GOMES et al. 2017).

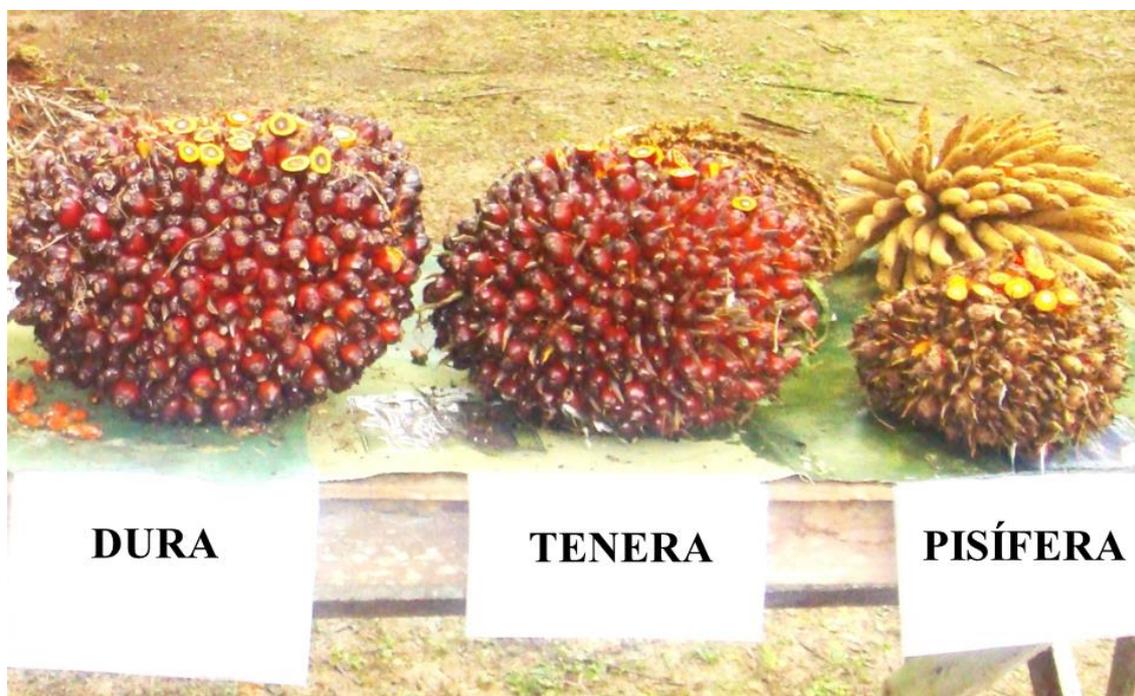


Figura 1. Cachos com frutos da palma de óleo (*Elaeis* spp.) apresentando diferenças morfológicas entre *E. guineensis* var. *dura*; *E. guineensis* var. *tenera* e *E. guineensis* var. *pisifera*. Foto: Jonny Everson Scherwinski-Pereira.

2.2 ORIGEM E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

A palma de óleo é encontrada em populações espontâneas ou cultivadas nas regiões tropicais da África, sudeste asiático, América do sul e Central. Ocorre na África Ocidental e Central, naturalmente dispersa desde o Senegal até Angola, Costa do Marfim, Camarões e Zaire. A espécie ocupa uma faixa litorânea de cerca de 450 km de

largura e, no Congo ocorre também no interior até os limites dos lagos Alberto, Nyanza e Tanganyika (HAYATI et al. 2004).

Em geral, o dendê ocorre em solos do tipo “terras pretas” e “massapé” e a densidade de plantas pode ser superior a 24 indivíduos/ha. Populações naturais ocorrem nas florestas tropicais e em geral, é o tipo arbóreo mais comum nas florestas úmidas e secundárias (AKANI et al. 2007; CAMILLO, 2012).

O dendezeiro foi introduzido no continente americano através do comércio de escravos (ZEVEN, 1964). Há relatos indicando que sua chegada ao Brasil datam do século XVII (Figura 2), sendo cultivado primeiramente na Bahia e no Rio de Janeiro (MULLER e ANDRADE, 2010, NELSON, 2010, RIOS et al. 2012). No Brasil, ocorre de forma subespontânea em uma estreita faixa de 5 a 10 km da ilha de Itaparica, na baía de Salvador até o sul de Maraú, no Estado da Bahia.

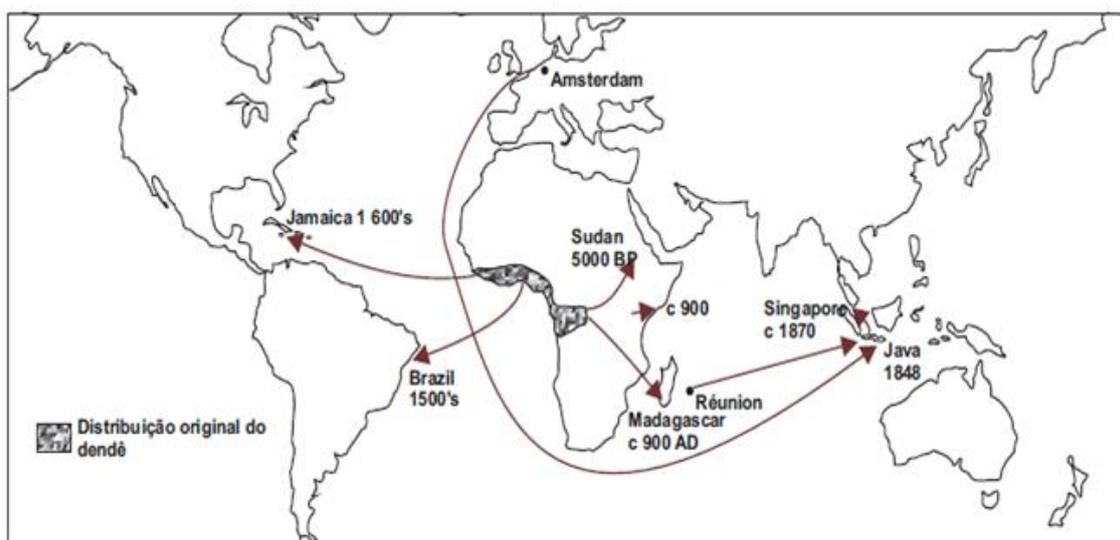


Figura 2. Dispersão da palma de óleo pelo mundo (NELSON, 2010).

2.3 PRODUTIVIDADE DA CULTURA NO BRASIL

No Brasil, as primeiras plantações industriais de palma de óleo são do início da década de 1960, no Estado da Bahia, e logo após, no Pará (GOMES JR. et al. 2014). Na região Norte, a introdução aconteceu em 1951 por meio do antigo Instituto Agrônomo 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; SILVA, 2011).

Na América do Sul, onde a Colômbia e o Equador têm registrado grandes aumentos na produção, o Brasil continua retardatário em óleo de palma. O País praticamente não apresentou aumento na produção nas últimas décadas. No entanto, o Brasil se destaca no cenário mundial por possuir mais de 20% da área agricultável do planeta, mais de 10% da água doce do mundo e mais de 200 espécies de plantas com possibilidade de produção de óleo vegetal (GONTIJO et al. 2011). Entre todas as espécies potenciais de plantas oleaginosas, a palma de óleo ocupa posição de destaque, por ser uma das espécies que apresenta maior produtividade de óleo no mundo (LEVERMANN e SOUZA, 2014). Todavia, o Brasil ocupou a 9º posição no ranking mundial, com uma área plantada, no ano de 2012, de 150.00 hectares. O consumo atual do Brasil supera em muito sua produção – os valores são de 550.000 toneladas e 370.000 toneladas, respectivamente (LEVERMANN e SOUZA, 2014; FAOSTAT, 2014). Onde, o Estado com maior produção é o Pará, responsável por aproximadamente 85% do óleo produzido no país (CHIA et al. 2009). Praticamente toda a produção é destinada à indústria de alimentos, embora atualmente, o mercado de combustíveis seja a mais forte tendência (BRASIL, 2005; BECKER, 2010; CAMILLO, 2012).

2.4 MELHORAMENTO GENÉTICO EM PALMA DE ÓLEO

Até o início de 1990, a dendeicultura brasileira dependia de sementes importadas, o que levou a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) a desenvolver um programa de pesquisas visando dotar o país de infraestrutura de geração de tecnologias para expansão sustentável da cultura. Para atender a necessidade de sementes de alta qualidade, a Embrapa iniciou, em 1982, um Programa de Melhoramento Genético do dendezeiro, sendo estabelecidos bancos de germoplasma da espécie africana *Elaeis guineensis* (dendê) e da americana *Elaeis oleifera* (caiaué). No entanto, o Banco Ativo de Germoplasma (BAGDendê) é mantido exclusivamente em condições de campo, metodologia comumente utilizada para conservar espécies arbóreas e/ou com sementes recalcitrantes (CAMILLO, 2012).

Nesse sentido, a Embrapa tem mantido uma área experimental de aproximadamente 420 ha de palma de óleo no Centro Experimental do Rio Urubu (CERU), município de Rio Preto da Eva - AM. No mesmo local, é mantido um dos Bancos Ativos de Germoplasma (BAG) mais diversos existentes no continente americano (Figura 3), com mais de 50 ha divididos em dois BAGs, sendo 25 ha de *Elaeis guineensis* e 28,7 ha de *E. oleifera* (CAMILLO, 2012). Além da produção de

sementes comerciais, área experimental também é utilizada para a realização de testes de progênes e ensaios agrônômicos de manejo e nutrição mineral.



Figura 3. Banco Ativo de Germoplasma do gênero *Elaeis* (BAGDendê) da Embrapa Amazônia Ocidental, Rio Urubu, Município de Rio Preto da Eva, AM. Foto: Jonny Everson Scherwinski-Pereira.

A produção de sementes comerciais no Brasil iniciou apenas em 1992 pela Embrapa Amazônia Ocidental visando, sobretudo, atender a legislação que permite apenas a comercialização no mercado brasileiro, de cultivares registradas no RNC (Registro Nacional de Cultivares). Cunha et al. (2009) relata que atualmente existem 18 cultivares registradas, sendo dezesseis híbridos intervarietais *tenera* e dois cultivares híbridos interespecíficos *E. oleifera* x *E. guineensis* (Figura 4).

Por ser uma palmeira e ter um único meristema, a propagação da palma de óleo não é possível por métodos convencionais como estaquia, sendo o gênero *Elaeis* reproduzido exclusivamente por sementes, as quais podem apresentar dormência, germinação lenta e, sobretudo, proporcionar plantas heterogêneas em razão da combinação de genitores por meios sexuais (PÁDUA, 2012, GOMES et al. 2015).

Adicionalmente, o cultivo de variedades híbridas intraespecíficas, responsável pelas elevadas produtividades verificadas na dendeicultura internacional, tem como inconveniente uma estreita base genética, apesar da grande disponibilidade de recursos genéticos nas coleções de germoplasma dos programas de melhoramento genético (BARCELOS, 2000).

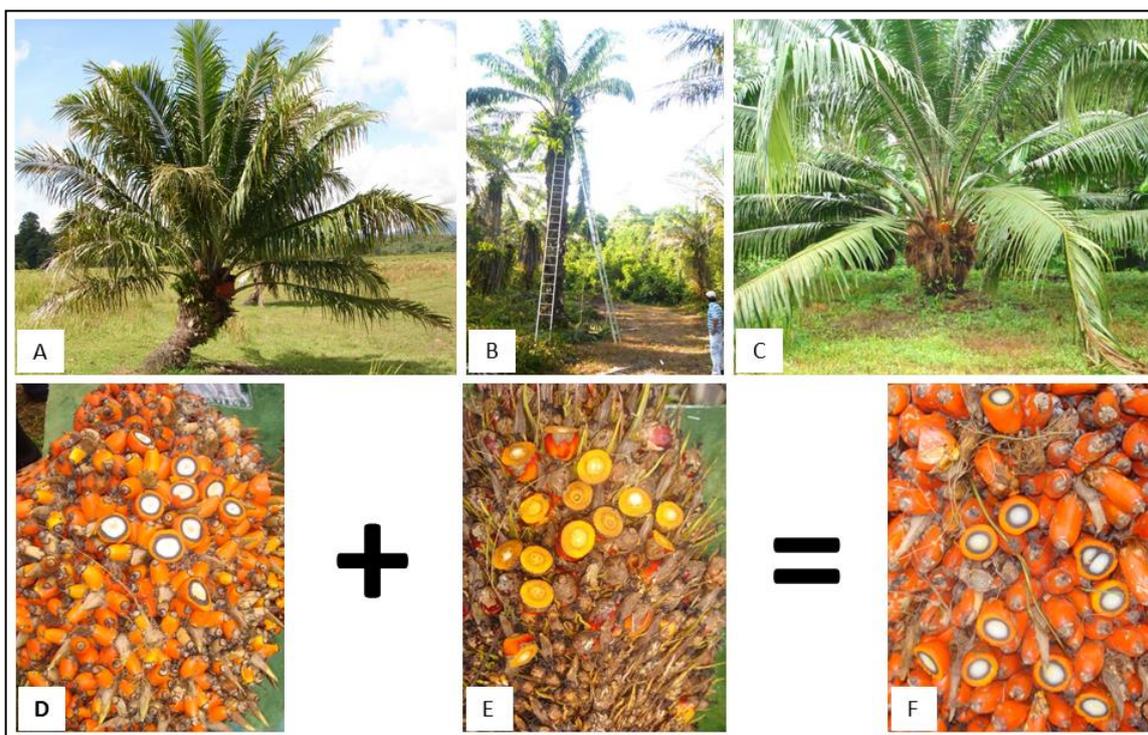


Figura 4. **A)** Planta adulta de *E. oleifera* (Kunth) Cortés; **B)** Planta adulta de *E. guineensis* Jacq.; **C)** Planta adulta do gênero *Elaeis*, obtida pelo cruzamento interespecífico entre *E. oleifera* e *E. guineensis*; **D)** Fruto de *E. oleifera*; **E)** Fruto de *E. guineensis*; **F)** fruto obtido pelo cruzamento de plantas entre as espécies *E. oleifera* e *E. guineensis*. Tanto a planta quanto os frutos obtidos através do cruzamento entre *E. oleifera* e *E. guineensis* apresentam características fenotípicas de ambas as espécies. Fotos: A: Plantsystematics; B, C, D, E e F: Jonny Everson Scherwinski-Pereira.

As avaliações de híbridos interespecíficos (HIE) já realizadas demonstram que é possível desenvolver cultivares tão produtivas quanto as de palma de óleo tipo tenera, com taxa de crescimento vertical do estipe aproximadamente 1/3 inferior, resistentes ao amarelecimento fatal, e com melhor qualidade de óleo. A primeira cultivar híbrida interespecífica entre as espécies *E. guineensis* x *E. oleifera* foi lançada oficialmente pela Embrapa em 2010 (CUNHA et al. 2012). Porém, apesar dos HIE F1 apresentarem produtividade similar a das variedades atuais de palma de óleo, e já estarem sendo explorados comercialmente, eles são uma etapa intermediária do programa de melhoramento genético. Os HIE têm problemas de fertilidade: baixa produção e viabilidade de pólen e baixa atratividade das inflorescências para os insetos polinizadores, sendo necessária a realização da polinização assistida manual nos plantios comerciais, prática que onera e complica o sistema de produção. Nesse sentido, gerações de retrocruzamento estão sendo geradas e avaliadas para desenvolver genótipos que conduzam os genes originários de ambas as espécies e tenham a fertilidade restaurada.

Nas gerações iniciais de retrocruzamentos (RC1 e RC2) é observada ampla variação fenotípica, sendo observadas desde plantas improdutivas até plantas com produtividade comercial economicamente viável, embora inferior a das cultivares de palma de óleo. Contudo, nas gerações iniciais de retrocruzamentos a fertilidade já é restaurada, o que elimina o problema que os produtores têm com a polinização assistida, ao mesmo tempo em que são encontradas plantas que apresentam a resistência ao AF, principal ameaça aos produtores nacionais. Nessas primeiras gerações, a única alternativa para explorar essas plantas superiores para o cultivo comercial é por meio da clonagem, pois os cruzamentos resultam em elevada segregação.

Assim, devido à ampla segregação observada nas gerações iniciais de retrocruzamentos, as estratégias convencionais de avaliação de materiais demandam extensas áreas de plantio. Acrescenta-se o fato de que grande parte de plantas não possuem características de interesse, o que só é verificado na fase adulta. Uma das estratégias para desenvolver plantas mais férteis e produtivas, é selecionar aquelas com maior participação do genoma do genitor recorrente (GR). O GR geralmente é um genótipo com qualidades desejáveis, mas que ainda necessita da incorporação de uma ou algumas características as quais o melhoramento busca inserir a partir do genitor doador. O genitor doador é um genótipo selvagem ou mesmo comercial, que possui a característica de interesse a ser incorporada ao GR. Assim, o híbrido obtido é retrocruzado várias vezes com o GR para recuperar a mesma adaptação, produtividade e demais qualidades que este já possuía, acrescido da nova qualidade introduzida (BESPALHOK et al. 2011). No caso do dendezeiro africano, os genes de interesse do caiaué são mantidos, mas com a menor contribuição possível do genoma dessa espécie. Embora a recuperação média do genoma do GR seja de 50% a cada geração de retrocruzamento, existem plantas com maior proporção do genoma do GR e outras do genitor doador. Definir a exata contribuição do genoma das espécies não é possível pelos métodos de avaliação fenotípica, por isso, tem sido proposto o uso de marcadores moleculares para identificação de indivíduos geneticamente mais próximos ao GR em uma progênie de retrocruzamento (OLIVEIRA et al. 2008).

2.5 GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS

A técnica de cultura de embriões zigóticos é conhecida desde o século XIX, sendo que depois de um longo período de progresso limitado, rapidamente desenvolveu depois de 1937, com significativas aplicações no melhoramento de plantas (COLLINS e

GROSSER, 1984). Bonnet foi o primeiro embriologista a excisar e cultivar embriões maduros de feijão em 1754. Hanning, em 1904, obteve com sucesso o crescimento de embriões de *Raphanus sativus* em um simples meio, e muito de seus resultados são válidos até hoje (MONNIER, 1995).

A cultura de embriões tem sido empregada para descrever os processos de crescimento e desenvolvimento do embrião zigótico *in vitro*, independente da idade, tamanho e estágio de desenvolvimento em que o embrião foi excisado (HU e FERREIRA, 1998).

Essa técnica, além de ter grande importância como um método alternativo para a rápida multiplicação vegetal, possibilita elucidar aspectos da fisiologia do desenvolvimento em condições *in vitro*, podendo ser utilizada como modelo para a otimização dos fatores para crescimento de plantas provenientes da micropropagação (TRIQUES et al. 1997), da mesma forma que fornece plantas em condições uniformes e estéreis para trabalhos de cultura de tecidos. Permite também, superar a dormência em certos tipos de sementes e, como ferramenta primordial para o melhoramento, resgatar embriões híbridos imaturos de cruzamentos incompatíveis, nos quais ocorrem barreiras sexuais na formação de sementes (MONNIER, 1995; HU e FERREIRA, 1998).

No entanto, um importante aspecto da cultura de embriões é definir um meio de cultura que possa sustentar o seu crescimento e desenvolvimento (HU e FERREIRA, 1998). Com isso, tem-se buscado alternativas quanto à composição dos meios nutritivos que se aproximem da composição do endosperma ou do saco embrionário e possibilitem o desenvolvimento dos embriões, independentemente do estágio em que se encontram (ANDREOLI, 1986). O meio de cultura adequado, tanto para a propagação quanto para a cultura de embriões, deve ser adaptado para cada espécie (SCHERWINSKI-PEREIRA et al. 2006).

O meio de cultura é um dos aspectos mais importantes da cultura de embriões zigóticos, uma vez que, quanto mais imaturo for o embrião mais exigente este será em relação ao meio de cultura. Dessa maneira, a seleção do meio é necessária para sustentar o crescimento contínuo do embrião (MONNIER, 1995; HU e FERREIRA, 1998). Nesse sentido, Tabai (1992) utilizou a técnica de cultura de embriões em meio de cultura contendo sais de MS, reduzindo o tempo necessário para a obtenção de plantas.

2.6 A EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

Inúmeras justificativas têm sido reportadas ao uso de técnicas de cultura *in vitro* em palmeiras como uma prática auxiliar para estudos morfogênicos e para acelerar programas de melhoramento genético. Todavia, os programas de melhoramento em palmeiras são demorados e complexos devido ao longo ciclo, hábito de crescimento e ausência de métodos convencionais de propagação vegetativa (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

A embriogênese somática é um processo pelo qual células somáticas se diferenciam em plantas completas seguindo estágios de citodiferenciação embriogênicos característicos (WILLIAMS e MAHESWARAN, 1986; EMONS, 1994). Embriogênese somática adventícia, assexual ou não zigótica são termos usualmente empregados para caracterizar novos indivíduos que se originam a partir de células simples ou embriões bipolares e que não apresentam conexão vascular com o tecido materno (HACCIUS, 1978; CANGAHUALA-INOCENTE et al. 2004). Porém, esses termos são empregados preferencialmente quando tal processo ocorre *in vivo*. Segundo Ammirato (1983), a embriogênese somática é um processo análogo à embriogênese zigótica em que uma única célula ou um grupo de células somáticas são precursores de embriões somáticos e, se eficientemente desenvolvida, podem permitir a obtenção de inúmeros embriões, a partir de um pequeno número de explantes. É um processo de regeneração compreendido por várias etapas começando com a formação de massas pró-embriogênicas de células, seguida pela formação do embrião somático, sua maturação e pela regeneração da planta (VON ARNOLD et al. 2002), passando, em geral, por outros quatro estágios básicos: globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar, dependendo da espécie trabalhada (TEIXEIRA et al. 1989; TITON et al. 2007)

Dois padrões básicos de expressão da embriogênese somática ocorrem *in vitro*. O primeiro corresponde ao modelo direto, no qual os embriões somáticos originam-se dos tecidos matrizes sem a formação de estádios intermediários de calo. O segundo padrão corresponde ao modelo indireto, no qual os embriões somáticos se formam a partir de um calo, que apresenta células em diferentes estádios de diferenciação e, conseqüentemente, com diferentes graus de determinação, as quais podem adquirir novas competências mediadas por mensageiros químicos específicos (SHARP et al. 1980).

De maneira geral, a taxa de embriogênese somática de uma espécie, bem como o número de embriões somáticos produzidos, depende da combinação de uma série de fatores inter-relacionados, entre os quais se destacam: tipos e concentrações adequadas de reguladores de crescimento, duração das etapas envolvidas no processo, origem e idade fisiológica do explante a ser cultivado e do estado fisiológico da planta matriz (DUVAL et al. 1988; DUBLIN, 1991; TEIXEIRA et al. 1993; GUERRA et al. 1999; LEDO et al. 2002 a). Neste sentido, a frequência e a qualidade dos embriões somáticos produzidos são de maneira geral os critérios mais importantes para a otimização de um protocolo de embriogênese somática. A qualidade de um embrião somático é relacionada com sua morfologia, similaridade bioquímica ao embrião zigótico e à habilidade de produzir plantas normais. Os embriões somáticos de alta qualidade possuem uma morfologia idêntica ao zigótico e têm geralmente uma simetria radial (MARUYAMA et al. 2007).

A embriogênese somática *in vitro*, além de útil na clonagem e propagação vegetativa de plantas, pode servir também como modelo para estudar sistemas subjacentes à embriogênese, como os eventos moleculares, citológicos, fisiológicos e de desenvolvimento (DODEMAN et al. 1997). Além disso, culturas embriogênicas representam um sistema bastante eficiente para a aplicação de técnicas de biotecnologia, como transformação genética, indução e seleção de mutações e regeneração de plantas com células haplóides. Mas a grande vantagem do uso de embriões somáticos para micropropagação é a ausência de manipulação do material no sentido de separação de brotos e enraizamento para a aclimação (MOURA, 2007).

Segundo Steinmacher et al. (2007 a), a embriogênese somática é preferida na rota regenerativa *in vitro* das palmeiras, pois esta via morfogênica pode aumentar o número de plantas regeneradas quando comparadas à organogênese.

A indução da embriogênese somática em plantas é normalmente dependente da adição de auxinas ao meio de cultura, como o 2,4-D, Picloram e o Dicamba. Este grupo de reguladores também atua na expansão, alongamento e divisão celular, beneficiando os processos de calogênese, embriogênese e organogênese, além de influenciarem decisivamente o enraizamento de plantas (KRIKORIAN, 1991). Nos sistemas de micropropagação em geral, as auxinas mais usadas são o 2,4-D (49%) seguido pelo ANA (27%), AIA (6%), AIB (6%), Picloram (5%) e Dicamba (5%) (JIMÉNEZ, 2005).

Os reguladores de crescimento de plantas são substâncias que influenciam processos fisiológicos das plantas em concentrações muito baixas, sendo altamente

requeridos para a expressão da citodiferenciação e da morfogênese em sistemas *in vitro* (FRANKENBERGER, JR. e ARSHAD, 1995). As auxinas são consideradas como as mais importantes na regulação da embriogênese somática (COOKE et al. 1993; FEHÉR et al. 2003; GAJ, 2004). Esta sensibilidade pode ser evidenciada pelo fato que somente tecidos responsivos reagem à presença das auxinas (BELL et al. 1993; SOMLEVA et al. 1995). No entanto, diferenças nas respostas podem ocorrer dependendo da espécie, genótipo ou mesmo do tecido do mesmo explante ou em explantes de diferentes origens de uma mesma planta (DUDITS et al. 1995).

A quase totalidade dos experimentos que apresentaram sucesso na propagação vegetativa *in vitro* em palma de óleo, utilizaram a embriogênese somática, partindo-se de calos induzidos em meio de cultura com 2,4-D (JONES, 1974; RABECHAU-LMARTIN, 1976; DUVAL et al. 1988; PARANJOTHY et al. 1989). Uma das explicações da influência do 2,4-D na embriogênese somática de alguns genótipos é que as auxinas promovem a desdiferenciação celular, com reativação de divisões celulares via a coordenação da expressão de genes e modificações pós-transcricionais de proteínas regulatórias envolvidas no controle do ciclo celular (DUDITS et al. 1995). Essas respostas podem depender da fonte de explante usado no experimento (ZIMMERMAN, 1993). No entanto, a maneira complexa com que os reguladores de crescimento e as células interagem indica que, se o tecido não está em um estágio responsivo, ele não irá responder adequadamente aos reguladores de crescimento exógenos, não importando em quais concentrações e combinações esses reguladores são utilizados (CARDIM, 2006).

A multiplicação das culturas embriogênicas visa determinar condições adequadas para o estabelecimento de ciclos repetitivos de divisão celular e controle restrito dos processos de diferenciação, de tal maneira que as culturas sejam constituídas por células pró-embriônicas ou embriões somáticos em estágios globulares iniciais de desenvolvimento (GUERRA et al. 1999). O ponto chave da manutenção dos calos em ciclos repetitivos diz respeito a uma redução nos níveis dos reguladores de crescimento. Observa-se que as concentrações médias destes reguladores na fase de multiplicação estão na faixa de 2 a 5 μM para as auxinas e de 2 a 5 μM para as citocininas (GUPTA et al. 1993), sendo estas culturas normalmente mantidas no escuro, com temperatura média de 25 °C.

De acordo com Guerra et al. (1999), a fase de maturação de culturas embriogênicas consiste em interromper os ciclos repetitivos de divisão celular e

fornecer os estímulos fisiológicos, bioquímicos e ambientais para a diferenciação celular para que os ciclos de desenvolvimento e de maturação originem um grande número de embriões somáticos maduros, de alta qualidade e aptos a converterem em plantas. O conhecimento dos processos e fatores que controlam a embriogênese zigótica é de fundamental importância nesta etapa do cultivo para que se procure reconstituir ao máximo os mesmos durante a embriogênese somática *in vitro*. De acordo com o mesmo autor, o aumento da osmolaridade do meio de cultura na fase de maturação tem proporcionado melhoria nos resultados por estar relacionado com a transição do ciclo de divisão/diferenciação celular. Outros compostos como os agentes osmóticos polietileno glicol (PEG), mio-inositol, sorbitol, manitol e mais comumente a sacarose, podem ser úteis ao desenvolvimento dos embriões. O aumento da osmolaridade causado por estes compostos parece estar relacionado com a transição do ciclo de divisão/diferenciação. (GUERRA et al. 1999; PELEGRINI, 2012).

Nos protocolos de embriogênese somática, a germinação dos embriões somáticos é usualmente realizada em meio de cultura livre de reguladores de crescimento (MONTEIRO et al. 2017). Contudo, alguns trabalhos demonstraram que o uso de alguns tipos de citocininas, como o BAP e a Zeatina, melhorou o desenvolvimento e, conseqüentemente, as taxas de germinação de ES em várias outras espécies de plantas (SILVA et al. 2015).

2.7 REGENERAÇÃO DE PLANTAS A PARTIR DA TÉCNICA *THIN CELL LAYER* (TCL)

A técnica *Thin Cell Layer* (TCL), ou Fina Camada Celular, consiste na utilização de explantes de um tamanho consideravelmente pequeno excisados a partir de diferentes partes da planta como caule, folhas, inflorescências, botão floral, cotilédones, hipocótilos e embriões (TRAN THANH VAN, 1980).

Essa técnica foi desenvolvida para estudar, nos níveis celular, bioquímico e molecular, os mecanismos que controlam a morfogênese *in vitro* das dicotiledôneas (TRAN THANH VAN, 1973). Primeiramente foi utilizada em tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) por Tran Thanh Van (1973) que cultivou cortes transversais de caule (tTCL) de diferentes partes da planta e obteve rapidamente a organogênese direta de botões florais, que se originaram da epiderme dos tTCLs, mostrando a eficiência da técnica na regeneração de órgãos de uma maneira rápida, a partir de diferentes regiões da planta e com uma pequena quantidade de material vegetal inicial. Mais tarde, esse

método ajudou a superar a regeneração recalcitrante em monocotiledôneas (JULLIEN e TRAN THANH VAN, 1994; PADILHA, 2013).

Desde que a regeneração de órgãos específicos pôde eficazmente ser manipulada pela técnica *Thin Cell Layer* (TCL), o uso dos TCLs como explantes tem apresentado a vantagem de que as células tem maior contato com os nutrientes e reguladores vegetais presentes no meio de cultura do que os explantes inteiros (KIM et al. 2009). Nos últimos anos, a técnica TCL vem sendo utilizada com sucesso em palmeiras, como *Bactris gasipaes* (STEINMACHER et al. 2007a) e *Elaeis guineensis* (SCHERWINSKI-PEREIRA et al. 2010), iniciando as culturas com rTCLs foliares de plantas obtidas de germinação *in vitro*.

2.8 ANÁLISE MORFO-ANATÔMICA

A análise anatômica ou histológica permite o detalhamento dos eventos que ocorrem quando espécies vegetais são cultivadas *in vitro*. 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 para a formação de embriões somáticos (RODRIGUES et al. 2004).

Na embriogênese somática, através dos estudos morfo-anatômicos é possível identificar as fases do desenvolvimento das células, tecidos e órgãos tem permitido a elucidação de uma série de fenômenos, entre eles, aqueles relacionados com a desdiferenciação das células, com a aquisição da competência embriogênica, com a ontogênese dos calos (SCHWENDIMAN et al. 1988; SILVA et al. 2011), bem como a maturação e o desenvolvimento de embriões (VIÑAS e JIMÉNEZ, 2011).

O estudo do desenvolvimento de células e tecidos, nas diferentes etapas do processo, também tem ajudado a aprimorar a eficiência dos protocolos de propagação clonal (SANÉ et al. 2006). Neste sentido, o acompanhamento e a identificação das estruturas presentes nos diferentes estágios durante a embriogênese somática, bem como os embriões zigóticos de palma de óleo, por meio de estudos anatômicos são necessários para o melhor entendimento dos processos morfogênicos e maximização de protocolos eficientes de clonagem da espécie.

2.9 MARCADORES MOLECULARES

Até meados da década de 60, as análises genéticas eram realizadas com a utilização de marcadores morfológicos de fácil identificação no organismo e, geralmente, controlados por um único gene (OLIVEIRA et al. 2008). Nesse sentido, Ferreira e Grattapaglia (1998) afirmam que os marcadores moleculares surgiram devido à necessidade da detecção de polimorfismo genético diretamente no DNA.

Marcadores moleculares consistem em fragmentos de DNA obtidos por ferramentas da biotecnologia moderna que, visualizadas geralmente em géis de eletroforese, servem como ferramenta para uma série de estudos genéticos em plantas (HOFFMAN e BARROSO, 2006). Milach (1998) descreve marcadores moleculares como características de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdados geneticamente.

Qualquer forma alélica originária de um genoma pode ser empregada como marcador genético, podendo ser um dado fenotípico, uma proteína ou um fragmento de DNA que codifique ou não um gene, e que possua uma sequência repetida ou única no genoma. Muitos genes e sequências de DNA não codificadoras estão representados em uma espécie por duas ou mais formas alélicas diferentes, correspondentes ao mesmo loco cromossômico, o que caracteriza o fenômeno denominado polimorfismo genético (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Por conveniência, um loco é considerado polimórfico quando a frequência de seu alelo mais comum é igual ou inferior a 99% na população. Logo, teoricamente qualquer fragmento de DNA pode ser empregado como marcador molecular, desde que revele polimorfismo entre indivíduos (BORÉM e CAIXETA, 2009).

Os marcadores de DNA são divididos em três categorias principais: os baseados em hibridização, os baseados em PCR (Reação em cadeia da Polimerase – *Polymerase Chain Reaction*) e por fim, marcadores baseados em sequenciamento. Os marcadores também podem ser classificados de acordo com o tipo de herança alélica em dominantes e codominantes. Os marcadores codominantes possibilitam diferenciar indivíduos homocigotos e heterocigotos, o que não é possível com marcadores dominantes, para os quais apenas é possível identificar a presença ou ausência de um determinado alelo. Esta característica é bem importante dependendo do objetivo do estudo; por exemplo, não é possível realizar análise de paternidade com marcador dominante (TURCHETTO-ZOLET et al. 2017).

Nos programas de melhoramento, a predição de valores genéticos de indivíduos candidatos à seleção tem sido uma estratégia muito útil para obtenção de ganhos com a seleção, seja por meio de métodos que se baseiam em dados fenotípicos (PIEPHO et al. 2008), seja por dados genotípicos como os marcadores moleculares (MOOSE e MUMM, 2008). Muitos estudos já destacaram a importância dos marcadores moleculares como ferramenta para predição de valores genéticos (WILLIAM et al. 2007, MORAIS JR., 2013).

Além de possibilitar a caracterização de germoplasma, os marcadores moleculares podem ser utilizados como ferramenta para estudos de diversidade genética entre indivíduos, dentro e entre populações ou espécies relacionadas, assim como para análise de filogenias, impressão digital de DNA, detecção de ligação gênica com caracteres mono e poligênicos, identificação de variedades, introgressão gênica, seleção indireta de caracteres agrônômicos, dentre outros (SOUZA et al. 2008).

Existem diversas razões para que os marcadores moleculares apresentem vantagens sobre os marcadores morfológicos convencionais. Em contrastes com caracteres morfológicos, os marcadores moleculares exibem neutralidade fenotípica, geralmente são herdados co-dominantemente, raramente exibem interações epistáticas ou pleiotrópicas, podendo ser detectados tanto em tecidos jovens como em adultos (BRAMMER, 2000).

Entre os marcadores moleculares que se baseiam na análise do DNA genômico, estão o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) ou polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição, os Minissatélites ou VNTR (*Variable Number Tandem Repeats*), o RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*), ou polimorfismo de DNA amplificados ao acaso, o ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), ou sequências simples repetitivas internas, o AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) ou polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados, e os Microssatélites SSR (*Simple Sequence Repeat*) ou sequências simples repetidas (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Todavia, esses marcadores moleculares apresentam várias diferenças em termos de custo, velocidade, quantidade de DNA necessária, trabalho técnico, nível de polimorfismo, precisão da distância genética estimada e o alcance estatístico dos testes (AITKEN et al. 2006, DINIZ, 2007)

Para o estudo, utilizamos os marcadores moleculares ISSR e AFLP em indivíduos obtidos por embriogênese somática de retrocruzamentos interespecífico em palma de óleo.

2.9.1. MARCADORES ISSR

Marcadores ISSR são marcadores moleculares baseados na amplificação por PCR de sequências de DNA localizadas entre regiões microssatélites, sem que haja a necessidade do sequenciamento do genoma em estudo. Regiões microssatélites são sequências repetitivas de DNA, com um a seis pares de bases, distribuídas lado a lado (NORDIANA et al. 2014, GOMES, 2016). Essas regiões repetitivas são frequentes tanto em procariotos quanto em eucariotos e também são comuns nos genomas nucleares e organelares (ZANE et al. 2002). Dada a sua natureza repetitiva, o tamanho do fragmento dos locos de SSR tende a aumentar ou diminuir devido ao escorregamento da DNA polimerase durante a replicação (*slippage*), bem como outros eventos mutagênicos tais como crossing over desigual e retrotransposição (SCHLÖTTERER e TAUTZ, 1992). Como consequência, esses locos têm altas taxas de mutação, variando de 1×10^{-7} a 1×10^{-3} mutações por loco por geração em eucariotos em geral (BUSCHIAZZO e GEMMELL, 2006); entretanto, uma heterogeneidade complexa de eventos mutacionais é observada frequentemente em níveis de alelos, lócus e táxon (ZANELLA et al. 2017).

Além de apresentarem alto polimorfismo, os marcadores ISSR possuem diversas outras vantagens, entre elas destacam-se: o fato da técnica ser de fácil execução, não dependerem de equipamentos sofisticados e possuírem um baixo custo de realização. Além disso, os marcadores ISSR ainda apresentam uma boa reprodutibilidade, devido ao fato dos mesmos utilizarem *primers* relativamente longos, com 16 a 25 pares de bases, associados à utilização de temperaturas de anelamento elevadas. Ressalta-se ainda, o fato destes marcadores não necessitarem do desenvolvimento de *primers* específicos e serem aplicáveis a qualquer espécie, ou seja, serem *primers* universais (KUMAR et al. 2009).

A capacidade de distinção entre indivíduos proximamente relacionados é também uma característica que faz deste tipo de marcador um dos mais utilizados em várias áreas da biologia molecular. As principais aplicações dos microssatélites são: 1) genética da conservação, por exemplo, a avaliação da estrutura e diversidade genética de populações naturais, bancos germoplasma *in situ* e *ex situ*, e populações de cativeiro; ecologia molecular e evolução; 2) aplicações forenses, como a identificação de indivíduos e teste de paternidade; 3) mapeamento genético, epidemiologia molecular e patologia (TURCHETTO-ZOLET et al. 2017).

Desde 1994, quando foram inicialmente descritos na literatura por Gupta et al. (1993), os marcadores ISSR vêm sendo utilizados com sucesso em diversos estudos de plantas, tais como: mapeamento genético, biologia evolutiva, diversidade genética de populações, filogenia, além da estimativa dos índices de variantes somaclonais em mudas produzidas pela cultura de tecidos (HAMZA et al. 2013; SOARES et al. 2016, GOMES, 2016).

Análises de ISSRs estão presentes em diferentes áreas da genética molecular entre os mais diferentes organismos, e as perspectivas são de que a variação altamente polimórfica desses sítios continuará sendo utilizadas por muito tempo como uma importante ferramenta investigativa (ZANELLA et al. 2017).

2.9.2. MARCADORES AFLP

Os marcadores AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) se baseiam na amplificação seletiva, via PCR, de fragmentos de DNA genômico total gerados pela clivagem com enzimas de restrição (VOS et al. 1995), originando um número extremamente elevado de fragmentos que, em função da concentração, não são detectados em eletroforese. Pequenas seqüências de DNA (adaptadores) são acopladas às extremidades desses fragmentos de restrição, as quais se anelam com *primers* específicos, durante a PCR (pré-amplificação e amplificação seletiva). Os fragmentos gerados são então separados por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (OLIVEIRA et al. 2005).

A análise de AFLP, de acordo com FERREIRA e GRATTAPAGLIA (1998), consiste em quatro etapas. Na primeira etapa, o DNA genômico total do indivíduo é clivado com duas enzimas de restrição. Na segunda, adaptadores específicos são ligados aos terminais dos fragmentos genômicos gerados pela clivagem. Na terceira etapa, uma fração dos fragmentos gerados é amplificada seletivamente via PCR, utilizando *primers* especificamente desenhados para reconhecer seqüências nos adaptadores. Na quarta e última etapa, a subpopulação de fragmentos amplificados é separada em gel de alta resolução.

As vantagens atribuídas à utilização dos marcadores AFLP são: o fato de possibilitarem a detecção de um grande número de locos, gerar e resolver grandes quantidades de fragmentos em um único gel, possuírem alta especificidade e boa reprodutibilidade, além de terem um alto poder discriminatório. Ressalta-se ainda, o fato destes marcadores moleculares, por meio da utilização de enzimas sensíveis a

metilação, possibilitarem também a distinção de sítios do DNA genômico submetidos ou não à metilação. Dessa maneira, esses marcadores além de permitirem a detecção de variações somaclonais genéticas possibilitam ainda a identificação de variantes somaclonais do tipo epigenéticas (KUMAR et al. 2009).

Já a análise AFLP baseada na utilização de enzimas sensíveis a metilação, denominada também de MSAP (*Methylation sensitive amplified polymorphism* ou Amplificação de polimorfismo sensível a metilação), baseia-se na comparação de fragmentos de DNA gerados pela combinação da enzima de corte raro EcoRI com as enzimas de corte frequente MspI e HpaII, enzimas capazes de distinguir sequências metiladas de sequências não metiladas (RATHORE et al. 2015, GOMES, 2016).

Em palma de óleo (*Elaeis* spp.), Barcelos et al. (2001) observaram que AFLPs são capazes de detectar polimorfismo genético equivalente e maior divergência entre duas espécies do gênero *Elaeis* (*E. guineensis* e *E. Oleífera*) quando comparado a marcadores RFLP. Bem como verificaram que o número de marcadores polimórficos obtidos com apenas três *primers* AFLP foi da mesma ordem de grandeza que o número obtido com 37 análises RFLP, indicando dessa forma, que o AFLP é uma técnica confiável para estudos genéticos e de populações, capaz de fornecer uma maneira viável e rápida de caracterizar grandes coleções de recursos genéticos.

3. 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, Tissues and Organ Culture**, v. 56, p. 53–57, 1999.

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

ADAM, H.; COLLIN, M.; RICHAUD, F.; BEULE, T.; CROS, D.; OMORE, A.; NODICHAO, L.; NOUY, B.; TREGGAR, J. W. Environmental regulation of sex determination in oil palm: current knowledge and insights from other species. **Annals of Botany**, v. 108, p. 1529-1537, 2011.

AGRICULTURE USD The oilseeds group - **World markets and trade 2001-2011**. <https://www.fas.usda.gov/data/oilseeds-world-markets-and-trade>. Accessed 20 Jun 2017

AHÉE, J.; ARTULS, P.; CAS, G.; DUVAL, Y.; GUÉNIN, G.; HANOWER, J.; HANOWER, P.; LIEVOUX, D.; LIRET, C.; MALAURIE, B.; PANNETIER, C.; RAILLOT, D.; VARECHON, C.; ZUCKERMAN, L. La multiplication vegetative *in vitro* du palmier à huile par embryogénese somatique. **Oleagineux**, v. 36, p. 113-115, 1981.

AITKEN, K. S.; JACKSON, P. A.; MCINTYRE, C. L. QTL identificado para características relacionadas com o açúcar em uma cultivar de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) Cultivar × *S. officinarum* . **Genética teórica e aplicada**, v. 112, p. 1306-1317, 2006.

AKANI, G. C.; EBERE, N.; LUISELLI, L.; ENIANG, E. A. Community structure and ecology of snakes in fields of oil palm trees (*Elaeis guineensis*) in the Niger Delta, southern Nigeria. **African Journal of Ecology**, v. 46, p. 500-506, 2007.

ALVES, S. A. O.; LEMOS, O. F.; FILHO, B. G. S.; SILVA, A. L. L. *In vitro* embryo rescue of interspecific hybrids of oil palm (*Elaeis oleifera* x *Elaeis guineensis*). **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 2, n. 2, p. 1-6, 2011.

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

ANITHA, K.; SAJINI, K. K. Plantlet regeneration from leaf explants of oil palm. **Current Science**, v. 71, p. 922–926, 1996.

BARCELOS, E.; NUNES, C. D. M.; CUNHA, R. N. V. da. **Melhoramento Genético e produção de sementes comerciais de dendezeiro**. In.: Viégas, I. J.; Müller, A. A. A cultura do dendezeiro na Amazônia brasileira. Embrapa Amazônia Oriental, Belém. Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus. p. 145-174, 2000.

BARCELOS, E.; SANTOS, J. A. dos. **Sementes de palma /dendê (*Elaeis guineensis* Jacq.)**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 1 folder, 2000.

BARCELOS, E.; CUNHA, R. N. V.; NOUY, B. **Recursos genéticos de dendê {*Elaeis guineensis* Jacq. e *E. oleifera* Kunth (Cortes)}** disponíveis na Embrapa e sua utilização. In: MULLER, A. A. e FURLAN JUNIOR, J. (Eds.) Agronegócio do dendê: uma alternativa social,

econômica e ambiental para o desenvolvimento sustentável da Amazônia. Belém - PA, Embrapa Amazônia Oriental, 2001.

BASIRON, Y. Palm oil production through sustainable plantations. Malaysian. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.** v. 109, p. 289-295, 2007.

BECKER, B. K. Recuperação de áreas desflorestadas da Amazônia: será pertinente o cultivo da palma de óleo (Dendê)? **Revista Franco-Brasileira de Geografia**, v. 10, p. 01-20, 2010.

BELL, L. M.; TRIGIANO, R. N.; CONGER, B. V. Relationship of abscisic acid to somatic embryogenesis in *Dactylis glomerata*. **Environmental Experimental Botany**, v. 33, p. 495–499, 1993.

BELTRÃO, N. E. de M.; OLIVEIRA, M. I. P. de. **Oleaginosas e seus óleos: vantagens e desvantagens para produção de biodiesel**. Embrapa Algodão (Embrapa Algodão. Documentos, 201). Campina Grande, 2008.

BLAKE, J. Tissue culture propagation of coconut, date and oil palm. In: DODDS, J. H. (ed.), **Tissue culture of trees**. Avi Publ. Co. Westport, p. 29-50, 1983.

BONDAR, G. **Palmeiras do Brasil**. São Paulo - SP: Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo - Instituto de Botânica. Editora Gráfica Irmãos Andrioli S/A. 1964.

BRAMMER, S.P. **Marcadores moleculares: princípios básicos e uso em programas de melhoramento genético vegetal**. Passo Fundo - RS: Embrapa Trigo, p. 7, 2000.

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

BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares**. Viçosa, MG: Editora UFV. 2. Ed, 2009.

BUSCHIAZZO, E.; GEMMELL, N. J. The rise, fall and renaissance of microsatellites in eukaryotic genomes. **Bioessays**, v. 28, p. 1040-1050, 2006.

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

CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; STEINER, N.; SANTOS, M.; GUERRA, M. P. Morphohistological analysis and histochemistry of *Feijoa sellowiana* somatic embryogenesis. **Protoplasma**, v. 24, p. 33–40, 2004.

CARDIM, D. C. **Crescimento e desenvolvimento de brotações de progênies de *Eucalyptus grandis* *in vitro***. Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - ESALQ (Dissertação de mestrado) PIRACICABA – SP, 2006.

CARDOSO, O. Obtenção de plantas de híbridos de dendezeiro por cultivo *in vitro*. **Revista Ciências Agrárias**, Piracicaba, v. 53, n. 2, p. 177-181, 2010.

CARDOSO, J. de N. O.; MIRANDA, V. S.; LEMOS, O. F. de. Obtenção de plantas de híbridos de dendezeiro por cultivo *in vitro*. **Revista de Ciências Agrárias** (Belém), v. 2, p. 67-71, 2011.

- CHIA, G. S.; LOPES, R.; CUNHA, R. N. V.; ROCHA, R. N. C.; LOPES, M. T. G. Repetibilidade da produção de cachos de híbridos interespecíficos entre caiaué e dendezeiro. *Acta Amazonica*, v. 39, p. 249-254, 2009.
- COLLINS, G. B.; GROSSER, J. W. Culture of embryos. In: VASIL, I. K. (Ed.). **Cell culture and somatic cell genetics of plants**. New York: Academic Press, v. 1, p. 241-257, 1984.
- COOKE, T. J.; RACUSEN, R. H.; COHEN, J. D. The role of auxin in plant embryogenesis. *Plant Cell*, v. 5, p. 1494-1495, 1993.
- CORLEY, R. H. V. The genus *Elaeis*. In: CORLEY, R. H. V.; HARDON, J. J.; WOOD, B. J. (Eds.) *Oil Palm Research*. 2 ed. New York - EUA, **Elsevier Scientific Publishing Company Inc.** p. 3-5, 1982.
- CORLEY, R. H. V.; TINKER, P. B. **The oil palm**. Great Britain: Blackwell Science, 4. Ed, 2003.
- CUNHA, R. N. V.; LOPES, R.; BARCELOS, E. **Domesticação e Melhoramento de caiaué**. In: BORÉM, A.; LOPES, M. T. G.; CLEMENT, C. R. (Eds.) *Domesticação e melhoramento: espécies amazônicas*. 23 ed. Viçosa - MG, Editora Universidade Federal de Viçosa. p. 275-296, 2009.
- CUNHA, R. N. V.; LOPES, R.; ROCHA, R. N. C.; LIMA, W. A. A.; TEIXEIRA, P. C.; BARCELOS, E.; RODRIGUES, M. R. L.; RIOS, A. S. **Domestication and Breeding of the American Oil Palm**. In: BORÉM A, LOPES, M. T. G.; CLEMENT C. R. (Ed). *Domestication and Breeding: Amazon species*. Suprema Editora Ltda, Viçosa, p. 275-296, 2012.
- DE TOUCHET, B.; DUVAL, Y.; PANNETIER, C. Plant regeneration from embryogenic suspension cultures of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq). **Plant Cell Reports**, v. 10, p. 529-532, 1991.
- DINIZ, M. C. **Associação de marcadores (AFLP) com caracteres de interesse agrônomico em clones elite de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)**. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal de Pernambuco, 2007.
- DODEMAN, V. L.; DUCREUX, G. e KREIS, M. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. **Journal of Experimental Botany**, v. 48, n. 313, p. 1493-1509, 1997.
- DRANSFIELD J.; DEICKMANN, V.; BARFOD, A. S.; PINTAUD, J. C.; BAKER, W. J. A New subfamily classification of the palm family (*Arecaceae*). **Kew Bulletin**, Richmond, v. 60, n. 4, p. 559-569, 2005.
- DUBLIN, P. **Multiplicación vegetativa de café, hevea e cacao**. In ROCA, N. M.; MROGINSKI, L. A. (eds). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura, Fundamentos e Aplicaciones*, p. 612-642, 1991.
- DUDITS, D.; GYORGYEY, J.; BOGRE, L.; BAKO, L. Molecular biology of somatic embryogenesis. In: THORPE T. A. (Eds), ***In vitro Embryogenesis in Plants***. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 276-308, 1995.
- DUVAL, Y.; DURAND-GASSELIN, T.; KONAN, K.; PANNETIER, C. *In vitro* vegetative propagation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Oléagineux**, v. 43, n. 2, p. 45-47, 1988.

ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behaviour? II. Effects of provenance, immaturity, and imbibition on desiccation tolerance in coffee. **Journal of Experimental Botany**, v. 42, p. 653-657, 1991.

EMONS, A. M. C. Somatic embryogenesis: cell biological aspects. **Acta Botanica Neerlandica**, Stuttgart, v. 41, n. 1, p. 1-14, 1994.

ENGELMANN, F. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm- a review. **Euphytica**, v. 57, p. 227-243, 1991.

ENGELMANN, F. Importance of desiccation for the cryopreservation of recalcitrant seed and vegetatively propagated species. **Plant Genetic Resources Newsletter**, v. 112, p. 9-18, 1997.

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In vitro Cell Development and Biology**, v. 47, p. 5-16, 2011.

FAOSTAT – **Production/Crops** 2014. Disponível em: <http://faostat.fao.org>. Acessado em: 16 de Agosto de 2017.

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

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 220 p, 3. Ed, 1998.

FERREIRA, C. B. B.; LOPES, M. T. G.; LOPES, R.; CUNHA, R. N. V.; MOREIRA, D. A.; ARROS, W. S.; MATIELLO, R. R. Molecular genetic diversity of oil palm progenies. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, p. 378-384, 2012.

FRANKENBERGER JR.; ARSHAD N. **Phytohormones in soils: microbial production and function**. Marcel Dekker, Inc. New York, 1995.

GAJ, M. D. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Growth Regulator**, v. 43, p. 27–47, 2004.

GHEQUIÈRE, M.; BARCELOS, E.; SANTOS, M. M.; AMBLARD, P. Polymorphisme enzymatique chez *Elaeis oleifera* H. B. K. Cortés (*Elaeis melanococca*): analyse des populations du bassin amazonien. **Oléagineux**, Montpellier, v. 42, p. 143-153, 1987.

GOMES, H. T.; BARTOS, P. M. C.; MARTINS, A. E.; OLIVEIRA, S. O. D.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Assessment of mint (*Mentha* spp.) species for large-scale production of plantlets by micropropagation. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 37, p. 405-410, 2015.

GOMES, H. T. **Análise morfoanatômica, bioquímica e molecular de dendezeiros (*Elaeis guineensis* Jacq.) regenerados por embriogênese somática em sistema de imersão temporária**. Tese (Doutorado em Botânica) - Universidade de Brasília, Brasília, 189 p., 2016.

GOMES, H. T.; BARTOS, P. M. C.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Dynamics of morphological and anatomical changes in leaf tissues of an interspecific hybrid of oil palm during acquisition and development of somatic embryogenesis. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 130, p. 1-14, 2017.

- GOMES JR., R. A.; GURGEL, F. de L.; PEIXOTO, L. de A.; BHERING, L. L.; CUNHA, R. N. V. da; LOPES, R.; PINA, A. J. de A.; VEIGA, A. S. Evaluation of interspecific hybrids of palm oil reveals great genetic variability and potential selection gain. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 512-518, 2014.
- GONTIJO, T. S.; FERNANDES, E. A.; SARAIVA, M. B. Análise da volatilidade do retorno da *commodity* dendê: 1980-2008. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 49, p. 857-874, 2011.
- GUEDES, R. S. **Embriogênese somática e regeneração de plantas de dendezeiro**. Universidade Federal do Acre - UFAC (Dissertação de mestrado). Rio Branco, 126 p., 2008.
- GUEDES, R. S.; MACIEL, S. A.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. **Indução da embriogênese somática em açaizeiro a partir de embriões zigóticos imaturos**. In: XIX Congresso Brasileiro de Fruticultura, Cabo Frio. Anais. Rio de Janeiro: UFRRJ. v. 1, p. 354-354, 2006.
- GUERRA, M. P. **Embriogênese somática em *Euterpe edulis* Mart. (Palmae)**. TESE. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. São Paulo, 1989.
- GUERRA, M. P.; DAL VESCO, L. L.; DUCROQUET, J. P. H. J.; NODARI, R. O.; REIS, M. S. dos. Somatic embryogenesis in goiabeira serrana: genotype response, auxinic shock and synthetic seeds. **Revista Brasileira Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 2, p. 117-128, 2001.
- GUERRA, P. G.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. **Embriogênese somática e sementes sintéticas**. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, I. A. (Eds). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. EMBRAPA, v. 2, p. 533-568, 1999.
- GUPTA, P. K.; TIMMIS, R.; CARLSON, W. C. Somatic embryogenesis: a possible tool for large-scale propagation of forestry species. In: SOH, W. Y.; LIU, J. R.; KOMAMINE, A. (Eds). Advances in Developmental Biology and Biotechnology of Higher Plants. Korean Soc. **Plant Tissue Culture**, p. 18- 37, 1993.
- HACCIUS, B. Question of unicellular origin of non-zygotic embryos in callus cultures. **Phytomorphology**, v. 28, p. 74-81, 1978.
- HAMEED, H. B.; LAI, L. F.; CHIN, L. H. Production of biodiesel from palm oil (*Elaeis guineensis*) using heterogeneous catalyst: An optimized process. **Fuel Processing Technology**, v. 90, p. 606-610, 2009.
- HAYATI, A.; WICKNESWARI, R.; MAIZURA, I.; RAJANAIDU, N. Genetic diversity of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) germplasm collections from Africa: implications for improvement and conservation of genetic resources. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 108, p. 1274-1284, 2004.
- HOFFMAN, L. V.; BARROSO, P. A. **Marcadores Moleculares como Ferramentas para Estudos de Genética de Plantas**. EMBRAPA. Campina Grande, p. 36, 2006
- HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. Cultura de embriões. 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. 1, p. 371-393, 1998.
- HUONG, L. T. L.; BAIOTTO, M.; HUY, B. P.; MEZZETTI, B.; SANTILLOCCHI, R.; ROSATI, P. Somatic embryogenesis in canary Island date palm. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 56, p. 1-7, 1999.

- JIMÉNEZ V. M.; GUEVARA E.; HERRERA J.; BANGERTH F. Evolution of endogenous hormone concentration in embryogenic cultures of carrot during early expression of somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**, v. 23, p. 567–572, 2005.
- JONES, L. H. Propagation of clonal palms by tissue culture. **Oil Palm News**, v. 17, p. 1-8, 1974.
- JULLIEN, F.; TRAN THANH VAN, K. Micropropagation and embryoid formation from young leaves of *Bambusa glaucescens* 'Golden goddess'. **Plant Science**, v. 98, p. 199-207, 1994.
- KALTNER, F. **A Expansão da Agro-Energia e seus Impactos sobre os Ecossistemas Brasileiros**. O biodiesel no Brasil. Rio de Janeiro, 2007.
- KAMADA, H.; TACHIKAWA, Y.; SAITOU, T.; HARADA, H. Heat stresses induction of carrot somatic embryogenesis. **Plant Cell Tissue Culture Letter**, v. 11, n. 3, p. 229-232, 1994.
- KIM T. D.; AHN C. H.; BAE K. H.; CHOI Y. E. The embryogenic competency and morphological changes during somatic embryogenesis in *Iris pseudacorus*. **Plant Biotechnology Reports**, v. 3, p. 251-257, 2009.
- KIYOSUE, T.; OHAD, N.; YADEGARI, R.; HANNON, M.; DINNENY, J.; WELLS, D.; KATZ, A.; MARGOSSIAN, L.; HARADA, J.; GOLDBERG, R.B.; FISCHER, R. L. Control of fertilization-independent endosperm development by the *MEDEA* polycomb gene in *Arabidopsis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, p. 4186–4191, 1999.
- KRIKORIAN, A. D. **Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación**. In: ROCA, W. M.; MROGINSKY, L. A. (Eds.). Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Cali: CIAT, p. 41-77. 1991.
- KUMAR, P.; GUPTA, J. K.; MISRA, A. K.; MODI, D. R.; PANDEY, B. K. Potential of molecular markers in plant biotechnology. **Plant Omics Journal**, v. 2, p. 141-162, 2009.
- LARA, M. A. C.; MONTER, A. V. Potencial osmótico del medio de cultivo com diferentes componentes para la propagación *in vitro*. **Revista Fitotecnia Mexicana**, v. 25, n. 2, p. 213-217, 2002.
- LEDO, A. da S.; LAMEIRA, O. A.; MENEZES, I. C. **Embriogênese somática e regeneração de plantas em açaizeiro**. Rio Branco: Embrapa Acre, (Boletim de Pesquisa) v. 34, p. 22, 2002 a.
- 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**, v. 24, n. 3, 2002 b.
- LEDO, A da S.; GOMES, K. K. P.; BARBOZA, S. B. S. C.; VIEIRA, G. S. S.; TUPINAMBÁ, E. A.; ARAGÃO, W. M. de. Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos e aclimação de plantas de coqueiro-anão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 2, p. 147-154, 2007 a.
- LEDO, A. da S.; TUPINAMBÁ, E. A.; ARAGÃO, W. M. de. **Cultura *In vitro* de Embriões Zigóticos de Coqueiro Anão Verde do Brasil de Jiqui**. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento/Embrapa Tabuleiros Costeiros, p. 1678-1961, 2007 b.
- LEVERMANN, R. A.; SOUZA, J. P .M. de. Óleo de palma: O crescimento da indústria global. Agroanalysis. **Revista de agronegócio da FGV**. p. 13-15, 2014.

- LIN H. C, MORCILLO F, DUSSERT S. Transcriptome analysis during somatic embryogenesis of the tropical monocot *Elaeis guineensis*: Evidence for conserved gene functions in early development. **Plant Mol Biol** v. 70, p. 173–192, 2009.
- MARUYAMA, E.; HOSOI, Y.; ISHII, K. Somatic embryogenesis and plant regeneration in yakutanegoyou, *Pinus armandii* Franch. var. *amamiana* (Koidz.) Hatusima, an endemic and endangered species in Japan. **In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 43, 2007.
- MEUNIER, J. Le palmier de huile American, *Elaeis melanococca*. **Oléagineux**, Paris, v. 30, n. 2, p. 51-62, 1975.
- MILACH, S. C. K. Marcadores de DNA. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 5, p. 14-17, 1998.
- MME - MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Biodiesel. O novo combustível do Brasil**. 2012. Disponível em: http://www.mme.gov.br/programas/biodiesel/galerias/arquivos/biodiesel/cartilha_biodiesel_portugues.pdf. Acessado em: 02 de agosto de 2015.
- MONNIER, M. Culture of zygotic embryos. In: THORPE, T. A. (Ed.). **In vitro embryogenesis in plants**. Calgary: University of Calgary, p. 117-153, 1995.
- MOORE H. E. Jr. The major groups of palms and their distribution. **Gentes Herbarum** v. 11, p. 27-141, 1973.
- MOOSE, S. P.; MUMM, R. H. Molecular plant breeding as the foundation for 21st century crop improvement. **Plant Physiology**, v. 147, n. 3, p. 969-77, 2008.
- MORAIS JR., O. P. **Variabilidade e progresso genético com seleção recorrente em arroz de terras altas**. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas), Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 163 p., 2013.
- MOURA, E. F. **Embriogênese somática em macaúba: indução, regeneração e caracterização anatômica**. Universidade Federal de Viçosa - UFV (Dissertação de mestrado). Minas gerais, 66 p., 2007.
- MONTEIRO, T. R.; FREITAS, E. O.; NOGUEIRA, G. F.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Assessing the influence of subcultures and liquid medium during somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm (Jacq.). **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v. 92, p. 1-8, 2017.
- MONTEIRO, K. F. G.; HOMMA, A. K. O. Diferentes sistemas de produção com palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.) e a participação do Brasil no cenário internacional. **Observatorio de la Economía Latinoamericana**, v. 200, p. 1-16, 2014
- MUKHERJEE, I.; SOVACOOOL, B.K. Palm oil-based biofuels and sustainability in southeast Asia: A review of Indonesia, Malaysia, and Thailand. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 37, p. 1-12, 2014.
- MULLER, A. A.; ANDRADE, E. B. **Aspectos gerais sobre a fenologia da cultura da palma de óleo**. In: RAMALHO FILHO, A. (Ed.) Zoneamento agroecológico, produção e manejo para a cultura da palma de óleo na Amazônia. Rio de Janeiro - RJ, Embrapa Solos, 2010.

NELSON, P. Palm oil: scourge on the environment? 2010. Disponível em <<https://www.internal.jcu.edu.au>>. Acessado em 08 de agosto de 2017.

NORDIANA, H. M. N.; NGOOT-CHIN, T.; SINGH, R.; CLYDE, M. M.; MADON, M. Evaluation of inter-simple sequence repeat (ISSR) markers for genetic mapping of an oil palm interspecific hybrid mapping population. **Journal of Oil Palm Research**, v. 26, p.214-225, 2014.

NWANKWO, B. A.; KRIKORIAN, A. D. Morphogenetic potential of embryo and seedling-derived callus of *Elaeis guineensis* Jacq. var. Pisifera Becc. **Annual Botany**, v. 51, p. 65-76, 1983.

OLIVEIRA, L. K.; MELO, L. C.; BRONDANI, C.; PELOS, M. J. D.; BRONDANI, R. P. V. Backcross assisted by microsatellite markers in common bean. **Genetic and Molecular Research**, v. 7, p. 1000-1010, 2008.

OOSTERVEER, P. Promoting sustainable palm oil: viewed from a global networks and flows perspective. **Journal of Cleaner Production**, v. 107, p. 146-153, 2015.

PADILHA, J. H. D. **Embriogênese somática em *Acrocomia aculeata* (Jacq.). lodd. ex. mart. utilizando a técnica do tcl (*thin cell layer*)**. Dissertação de Mestrado em Botânica. Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 68 p., 2013.

PÁDUA, M. S. **Germinação *in vitro*, indução e caracterização de massas pró-embriogênicas de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.)**. Lavras: Universidade Federal de Lavras. Tese de mestrado, 118 p, 2012.

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

PARANJOTHY, K.; OTHMAN, R. **"*In vitro*" propagation of oil palm**. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT TISSUE CULTURE. Proceedings Tokio: Japanese Association for Plant Tissue Culture, v. 5, p. 747-748, 1982.

PARANJOTHY, K.; ROHANI, O.; TARMIZI, A. H.; TAN, C. S.; TAN, C. C. **Current status and strategies of oil palm research**. Palm Oil Research Institute of Malaysia, Bangi. p. 109-125, 1989.

PELEGRINI, L. L. **Embriogênese somática de *Ocotea porosa* (Ness e Mart.) Barroso (Imbuia)**. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal do Paraná – Curitiba, 96 p., 2012.

PLANTSYSTEMATICS ORGANIZATION Disponível em:
<http://www.plantsystematics.org/imgs/sv22/r/Arecaceae_Elaeis_oleifera_36074.html>
Acessado em 12 de outubro de 2017.

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' Academie des Sciences**, v. 283, p. 1735-7, 1976.

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 Organ Cult** v. 75, p. 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, p. 17–20, 1989.

RAMALHO FILHO, A.; MOTTA, P. E. F.; NAIME, U. J.; GONÇALVES, A. O.; TEIXEIRA, W. G. **Zoneamento agroecológico para a cultura de palma de óleo nas áreas desmatadas da Amazônia legal**. In: RAMALHO FILHO, A. (Eds) *Zoneamento agroecológico, produção e manejo para a cultura da palma de óleo na Amazônia*. Rio de Janeiro - RJ, Embrapa Solos, 2010.

RAMOS, E. J.; VEIGA, A. S.; FURLAN JUNIOR, J. **Comportamento do dendezeiro ao amarelecimento fatal em área de replantio, sob diferentes formas de manejo**. Belém - PA, Embrapa Amazonia Oriental, 2006.

RAO, Y.; WENG, C. C.; RAJANAIDU, N. **Biology and performance of Surinam *Elaeis oleifera* (H.B.K.) Cortes**. v. 1, p. 109-118, 1989.

RATHORE, M. S.; MASTAN, S. G.; AGARWAL, P. K. Evaluation of DNA methylation using methylation-sensitive amplification polymorphism in plant tissues grown *in vivo* and *in vitro*. **Plant Growth Regulation**, v. 75, p. 11-19, 2015.

RIOS, S. A.; CUNHA, R. N. V. da.; LOPES, R. BARCELOS E. **Recursos genéticos de palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.) e caiaué (*Elaeis oleifera* (H. B. K) Cortés)**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, Documentos: 96, p. 39, 2012.

RIVAS, M., BARBIERI, R. L. & MAIA, L. C. Plant breeding and in situ utilization of palm trees. **Ciência Rural**, v. 42, n. 2, p. 261-269, 2012.

RODRIGUES, L. R.; OLIVEIRA, J. M. S. de.; MARIATH, J. E. de A. Anatomia vegetal aplicada ao estudo de sistemas androgênicos *in vitro*. **Revista Brasileira de Biociências - Porto Alegre**, v. 2, n. 3/4, p. 159-167, 2004.

SAHRAWAT, A. K.; CHAND, S. Continuous somatic embryogenesis and plant regeneration from hypocotyl segments of *Psoralea corylifolia* Linn., an endangered and medicinally important Fabaceae plant. **Current Science**, v. 81, n. 10, 2001.

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

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. S. **Parada do crescimento de plantas do porta-enxerto de macieira Marubakaido (*Malus prunifolia*) durante a aclimatização: efeito de baixa temperatura e do ácido giberélico**. Universidade Federal de Pelotas - UFPEL (Dissertação de mestrado). Rio Grande do Sul, 93 p., 1999.

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

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. S.; FRANÇA, R. B. de; DANTAS, A. C. de M.; FORTES, G. R. L. Influência do número de gemas, presença ou ausência de folhas e posição do explante na multiplicação *in vitro* da batata. **Horticultura Brasileira, Brasília**, v. 23, n. 1, p. 86-89, 2005.

- SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. S.; MACIEL, T. M. S.; COSTA, F. H. da S.; PEREIRA, M. A. A.. Germinação *in vitro* de embriões zigóticos de mururu (*Astrocaryum ulei*). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 2, p. 251-256, 2006.
- SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. S.; MACIEL, S. de A.; FERMINO JÚNIOR, P. C. P. Indução da embriogênese somática em pupunheira (*Bactris gasipaes* H. B. K.) a partir de embriões zigóticos imaturos In: Revista Brasileira de Horticultura Ornamental. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**. v. 1, p. 849-852, 2007.
- SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; GUEDES, R. S.; SILVA T. L.; FERMINO, J. R. P. C. P.; COSTA, F. H. S. Somatic embryogenesis and plant regeneration from oil palm thin cell layer technique. **In vitro Cellular and Development Biology - Plant**, v. 46, n. 4, p. 378-385, 2010.
- SCHLÖTTERER, C.; TAUTZ, D. Slippage synthesis of simple sequence DNA. **Nucleic acids research**, v. 20, p. 211-215, 1992.
- SCHULTES, R. E. **Taxonomic, nomenclatural and ethnobotanic notes on *Elaeis***. v. 2, p. 172-187, 1990.
- SHARP, W. R.; SONDAHL, M.; CALDAS, L. S.; MARAFFA, S. B. The physiology on *in vitro* asexual embryogenesis. **Horticultural Review**, v. 2, p. 268-310, 1980.
- SILVA, R. de C. **Expressão genotípica, ontogênese e análise proteômica de etapas envolvidas na embriogênese somática de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.)**. Universidade Federal do Amazonas – UFAM (Dissertação de mestrado). Manaus - AM, 127 p., 2011.
- SILVA, S.; FERREIRA, F. F.; GATO, A. M. G. Efeitos de diferentes concentrações de 6-Benzilamiopurina no cultivo *in vitro* de *Manihot esculenta* Crantz. **Scientia Amazonia**, v. 4, n. 1, p. 105-111, 2015.
- SOMLEVA, M. M.; KAPCHINA, V.; ALEXIEVA, V.; GOLOVINSKY, E. Anticytokinin effects on *in vitro* response of embryogenic and nonembryogenic genotypes of *Dactylois glomerata* L. **Plant Growth Regulator**, v. 16, p. 109-112, 1995.
- SOUZA, G. A. de. Diversidade genética estimada com marcadores ISSR em populações brasileiras de *Zabrotes subfasciatus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 7, p. 843-49, 2008.
- SOUZA, D. C. L. Técnicas moleculares para caracterização e conservação de plantas medicinais e aromáticas: uma revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 3, p. 495-503, 2015.
- STEINMACHER, D. A. **Germinação *in vitro*, criopreservação e embriogênese somática em pupunha**. Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC (Dissertação de mestrado). Florianópolis – SC, 124 p., 2005.
- STEINMACHER, D. A.; CLEMENT. C. R.; GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis from immature peach palm inflorescence explants: towards development of an efficient protocol. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 89, p. 15-22, 2007 a.
- STEINMACHER, D. A.; KROHN, N. G.; DANTAS, A. C. M.; STEFENON, V. M.; CLEMENT. C. R.; GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis in peach palm using the Thin Cell Layer Technique: Induction, morpho-histological aspects and AFLP analysis of somaclonal variation. **Annals of Botany**, p. 1-11, 2007 b.

- SUFRAMA. Instituto Superior de Administração e Economia ISAE/Fundação Getúlio Vargas (FGV). **Potencialidades Regionais Estudos de Viabilidade Econômica - Sumários Executivos**, v. 5, 2003.
- SUNDRAM, K.; SAMBANTHAMURTHI, R.; TAN, Y. Palm fruit chemistry and nutrition. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 12, p. 355-362, 2003.
- SWATI, J.; ALOK, V.; KOTHARY, S. L. JAIN, S.; VARSHNEY, A. **Cereal Res. Commun.** v. 19, p. 230-231, 2001.
- TEIXEIRA, J. B. **Development of *in vitro* techniques of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.)**. (Dissertation of Doctor of Philosophy). Graduate Program in Plant Biology. New Brunswick, New Jersey. U.S.A, 1989.
- TEIXEIRA, J. B.; SONDAHLL, M. R.; KIRBY, E. G. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of oil palm. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 34, p. 227-233, 1993.
- TEIXEIRA, J. B.; SONDAHLL, M. R.; KIRBY, E. G. Somatic embryogenesis from immature inflorescences of oil palm. **Plant Cell Reports**. v. 13, p. 247-250, 1994.
- TEIXEIRA, J. B.; SONDAHL, M. R.; NAKAMURA, T.; KIRBY, E. G. Establishment of oil palm cell suspensions and plant regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 40, p. 105-111, 1995.
- TEIXEIRA, J. B. **Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas**. Brasília: Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília, 2005.
- TITON, M.; XAVIER, A.; OTONI, W. C.; MOTOIKE, S. Y. Efeito dos reguladores de crescimento dicamba e picloram na embriogênese somática em *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, v. 31, n. 3. p. 417-426, 2007.
- TRAN THANH VAN M. Direct flower neof ormation from superficial tissue of small explant of *Nicotiana tabacum*. **Planta**, v. 115, p. 87-92, 1973.
- TRAN THANH VAN K. Control of morphogenesis by inherent and exogenously applied factors in thin cell layers. **International Review of Cytology** v. 32, p. 291-311, 1980.
- TRIQUES, K.; RIVAL, A.; BEULE, T.; PUARD, M.; ROY, J.; NATO, A.; LAVERGNE, D.; HAVAUX, M.; VERDEIL, J.L.; SANGARE, A.; HAMON, S. Photosynthetic ability of *in vitro* grown coconut (*Cocos nucifera* L.) plantlets derived from zygotic embryos. **Plant Science**, v. 127, p. 39-51, 1997.
- TURCHETTO-ZOLET, A. C.; TURCHETTO, C.; ZANELLA, C. M.; PASSAIA, G. **Marcadores Moleculares na Era Genômica: Metodologias e Aplicações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 181 p., 2017.
- VALLEJO, G. Botanica. In: VALLEJO, G.; FIGUEREDO, P.; ROJAS, L.; MUÑOZ, R.; MENA, E.; CRUZ, R.; GENTY, P.; SANCHES, A.; LOWE, J.; ARAGON, J. **Palma Africana de aceite**. Palmira: ICA (Manual de Asistencia Técnica, 22) p. 25-53, 1978.
- VANDERWEYEN, R. **Notions de culture de l'elaeis au Congo Belge**. Bruxelles: Direction de l'Agriculture, dès Forets, dès Elevages et de La Colonization. p. 292, 1952.
- VON ARNOLD, S.; SABALA, I.; BOZHKO V, P.; KYACHOK, J.; FILONOVA, L. Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 69, p. 233-249, 2002.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN, T. de L.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 23, p. 4407-4414, 1995.

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

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 1-16, 2002.

ZANELLA, C. M.; TURCHETTO-ZOLET, A. C.; PALMA-SILVA, C. **Marcadores Moleculares na Era genômica: Metodologias e Aplicações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, p. 181, 2017.

ZEVEN, A. C. On the origin of the Oil Palm. **Ghana Palynologica**. v. 5, p. 121-123, 1964.

ZIMMERMAN, J. L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 5, p. 1411-1423, 1993.

CAPÍTULO 1

OTIMIZAÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM PALMA DE ÓLEO (*Elaeis* spp.) A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS MATUROS

OTIMIZAÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM PALMA DE ÓLEO (*Elaeis spp.*) A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS MATUROS

RESUMO

Neste trabalho foi desenvolvido um sistema simples e eficiente para a indução de embriogênese somática e regeneração de plantas a partir de embriões zigóticos maduros de palma de óleo (*Elaeis spp.*). Calos embriogênicos (CE) foram induzidos a partir de embriões zigóticos maduros de palma de óleo em meio de Murashige e Skoog (MS) modificado, com o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) ou picloram e em combinação ou não com carvão ativado. A maior percentagem de indução de CE (97,5 %) foi obtida através da cultura de embriões zigóticos maduros no meio de MS modificado com 450 μM de picloram e 2,5 g.L^{-1} de carvão ativado. Os CE proliferaram facilmente em meios com concentrações reduzidas de picloram. Esses CE foram repicados em meio de MS suplementado com 12,3 μM 2-isopenteniladenina (2iP) e 0,54 μM de ácido naftalenoacético (ANA), com subculturas em intervalos de 4 semanas. Os embriões somáticos foram convertidos em plantas em meio MS modificado com macro e micronutrientes, suplementado com 20 g.L^{-1} de sacarose, 2,5 g.L^{-1} de carvão ativado e 2,5 g.L^{-1} de Phytigel®. A análise detalhada revelou que morfohistologicamente a embriogênese somática seguiu uma via indireta. Calos primários foram observados após 4-6 semanas de cultura que progrediram para CE em 12 semanas. Células embriogênicas exibiram um protoplasma denso, uma relação nucleoplásmica alta, e pequenos grãos de amido. Proembriões formados após 16-20 semanas de cultura e com sucessivas divisões celulares, pareceram ter uma origem multicelular. Embriões somáticos diferenciados apresentaram um haustório, uma plúmula, e a primeira e segunda bainhas foliares. Nesta fase, a protrusão radicular não foi aparente, pois isso ocorre geralmente após emergência das primeiras folhas verdadeiras.

Palavras-chave: Calos embriogênicos, cultura de tecidos *in vitro*, embrião zigótico, micropropagação, ontogênese, morfogênese.

OPTIMIZATION OF SOMATIC EMBRYOGENESIS IN OIL PALM (*Elaeis* spp.) FROM MATURE ZYGOTIC EMBRYOS

ABSTRACT

We developed an efficient and simple system for inducing somatic embryogenesis and regenerating plantlets from mature zygotic embryos of oil palm. Embryogenic calli were induced from mature zygotic embryos of oil palm on modified Murashige and Skoog medium with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid or picloram, alone or in combination with activated charcoal. The greatest frequency of embryogenic callus induction (97.5%) was obtained by culturing mature zygotic embryos on callus induction medium with 450 μM picloram and 2.5 gL^{-1} activated charcoal. Embryogenic calli proliferated on a medium with a reduced concentration of picloram. Embryogenic calli were then subcultured on a medium supplemented with 12.3 μM 2-isopentenyladenine and 0.54 μM naphthaleneacetic acid, with subcultures at 4-wk intervals. Somatic embryos were regenerated on a medium with Murashige and Skoog macro- and micronutrients at halfstrength concentrations supplemented with 20 gL^{-1} sucrose, 2.5 gL^{-1} activated charcoal, and 2.5 gL^{-1} Phytigel. Detailed histological analysis revealed that somatic embryogenesis followed an indirect pathway. Primary calli were observed after 4–6 wk of culture and progressed to embryogenic calli at 12 wk. Embryogenic cells exhibited dense protoplasm, a high nucleoplasmic ratio, and small starch grains. Proembryos, which seemed to have a multicellular origin, formed after 16–20 wk of culture and successive cell divisions. Differentiated somatic embryos had a haustorium, a plumule, and the first and second foliar sheaths. In differentiated embryos, the radicular protrusion was not apparent because it generally does not appear until after the first true leaves emerge.

Keywords: *Elaeis guineensis*, embryogenic calli, zygotic embryo, micropropagation, morphogenesis.

1. INTRODUÇÃO

A palma de óleo (*Elaeis spp.*) é uma monocotiledônea oleaginosa, perene, predominantemente cultivada em regiões tropicais úmidas. A importância agrônômica da palma de óleo é um resultado de sua alta capacidade de produção de óleo, atingindo entre 5 e 7 toneladas por hectare em ótimas condições, caracterizando-se, dessa forma, como a maior fonte de óleo entre as todas as espécies produtoras de óleo vegetal do mundo (RAJESH et al. 2003; LIN et al. 2009).

No Brasil, as cultivares de palma de óleo utilizadas para o plantio comercial são principalmente dos genótipos tenera (as sementes apresentam a espessura do endocarpo inferior a 2 mm), obtidos a partir de cruzamentos entre dura (as sementes apresentam a espessura de endocarpo superior a 2 mm) e pisifera (os frutos possuem endocarpo e endosperma aderidos, não havendo uma separação direta entre o diásporo e a amêndoa). Os híbridos apresentam grande variabilidade na produção de óleo, com as melhores plantas rendendo 20-30% a mais do que a média. No entanto, o melhoramento genético convencional de palma de óleo, é extremamente lento e caro, pois o ciclo reprodutivo pode levar até 10 anos (LOW et al. 2008).

Desde a introdução da palma de óleo na cultura de tecidos, na década de 1970, a propagação clonal provou ser útil não só na produção de materiais de plantios uniformes, mas também no desenvolvimento de programas de engenharia genética, pois, antes disso, não era possível realizar a propagação vegetativa em palma de óleo, devido ao fato de ela ter apenas um vértice vegetativo dominante e não produzir brotações ou gemas axilares. Através da cultura de tecidos, a produção de materiais uniformes para os programas de plantio passou a ser possível (LIN et al. 2009; LUIS et al. 2010; BEULÉ et al. 2011). De acordo com Jones (1974), o coeficiente de variação de rendimento nas plantações de palma de óleo é de 20-30% por se tratar de populações de híbridos intervartais. Tal variação é devido às diferenças genéticas que poderiam ser evitadas se a palma de óleo fosse propagada por clonagem.

Além do potencial aumento de rendimento, a propagação clonal também tem a vantagem de que as características secundárias desejáveis, tais como, a redução da altura da planta e a qualidade superior do óleo, encontradas em determinados indivíduos da cultura, pudessem ser uniformemente expressas em todos eles (PARANJOTHY et al. 1989). No entanto, existem vários fatores a considerar para garantir antecipadamente o sucesso, incluindo o tamanho do explante, a facilidade de esterilização, o grau de

desenvolvimento do tecido, o estado fisiológico e nutricional do explante e o genótipo (FIUK e RYBCZYNSKI, 2008).

Explantes de embriões são convenientes porque os frutos do dendezeiro são facilmente disponíveis, possuem um elevado grau de uniformidade fisiológico e podem ser enviados a longas distâncias (TEIXEIRA et al. 1993; SCHERWINSKI-PEREIRA et al. 2012). Como resultado, a utilização de embriões facilita o estudo detalhado de vários fatores envolvidos no estabelecimento da cultura e indução embriogênica: considerando-se que vários tratamentos podem ser testados simultaneamente e resultados mais precisos podem ser obtidos. Por exemplo, o cultivo *in vitro* do palma de óleo apresenta problemas relacionados com a oxidação de compostos fenólicos. No entanto, estudos relatam que os efeitos do carvão ativado, que é amplamente utilizado na embriogênese somática de dendezeiro, são limitados. Assim, os protocolos básicos para o estabelecimento de culturas através da indução de calos a partir de embriões zigóticos de dendê poderia, eventualmente, ser útil também para tecidos somáticos maduros (SILVA et al. 2012).

A embriogênese somática é um sistema ideal para o estudo de eventos morfológicos, fisiológicos, moleculares e bioquímicos que ocorrem durante o início e desenvolvimento da embriogênese em plantas superiores (QUIROZ-FIGUEROA et al. 2006). Em plantas monocotiledôneas, a morfologia do desenvolvimento embrionário varia de acordo com as espécies (HARTMANN et al. 1997). Em dendezeiro, as informações detalhadas sobre as características morfológicas envolvidas na embriogênese somática a partir de embriões zigóticos são muito limitadas, no entanto, é uma ferramenta potencialmente importante como um marcador morfológico das diferentes etapas que ocorrem durante o processo de embriogênese das espécies (KIM et al. 2009).

No presente estudo, descrevemos um eficiente e simplificado sistema de indução à embriogênese somática a partir de embriões zigóticos maduros de um híbrido de dendezeiro. As alterações anatômicas durante a embriogênese somática são também descritas em detalhes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCT-II) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, situado em Brasília – DF, Brasil.

A embriogênese somática em palma de óleo a partir de embriões zigóticos maduros foi dividida em quatro fases: indução de calos, multiplicação de calos, maturação de embriões somáticos e regeneração de plantas. As sementes maduras foram gentilmente cedidas pela Embrapa Amazônia Ocidental (estação de coleta do Rio Urubu), localizada em Rio Preto da Eva, Amazonas, Brasil.

Embriões zigóticos de palma de óleo foram excisados a partir de sementes maduras do híbrido FACM-589, variedade tenera. Em câmara de fluxo laminar, as sementes foram esterilizadas pela imersão em álcool 70° GL durante 3 minutos, seguida de imersão por 40 minutos em solução de alvejante comercial a 100% (2 a 2,5% de cloro ativo), adicionado de uma gota de Tween-20 (Sigma, St. Louis, MO) para cada 100 mL dessa solução. Posteriormente foram efetuados três enxagues com água destilada, deionizada e devidamente autoclavada para a remoção do alvejante. Para facilitar a retirada do embrião, as sementes foram imersas em água esterilizada durante 24 h antes da excisão do embrião. Uma vez retirados sob fluxo laminar, com a ajuda de um bisturi, os embriões foram re-hidratados em água estéril durante 1-2 horas e estabelecidos em meio de cultura.

2.1 INDUÇÃO DE CALOS EMBRIOGÊNICOS

A fase de indução de calos foi realizada em tubos de ensaio (25 mm de diâmetro) com 10 ml de meio de cultura. O meio de indução de calos (MIC) consistiu em meio MS modificado (MURASHIGE e SKOOG, 1962), com 20 g.L⁻¹ de sacarose, acrescido ou não de 2,5 g.L⁻¹ de carvão ativado.

Neste experimento, os efeitos de 450 µM de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e picloram foram avaliados e comparados com os resultados obtidos por Scherwinski-Pereira et al. (2010). Os tratamentos consistiram de dez explantes por repetição. Durante todo o período de indução de calo, as culturas foram acondicionadas no escuro, em sala de crescimento, com temperatura de 25 ± 2 °C e, sub-cultivadas a cada 4 semanas no mesmo meio de cultura. A frequência de formação de calos granulares foi determinada pela contagem do número de embriões zigóticos maduros,

formação de calos em relação ao número total de embriões cultivados em meio de indução de calos e multiplicação do número por 100. Além disso, os comprimentos dos calos na sua maior parte e a percentagem de cobertura de explante por estruturas granulares embrionárias foram medidas para melhor caracterizar os tratamentos; todas as medições foram feitas usando o software 4.5 (MEDIA CYBERNETICS, 2001) Image-Pro Plus. A análise dos dados foi realizada utilizando o software Sanest, um programa de análise estatística de dados (ZONTA e MACHADO, 1984).

2.2 MULTIPLICAÇÃO E MANUTENÇÃO DE CALOS

Para a multiplicação de calos e manutenção, as culturas embriogênicas induzidas no meio de indução de calos foram transferidas para o meio MS modificado, com 20 g.L⁻¹ de sacarose, acrescido de 0,5 g.L⁻¹ de glutamina, 0,5 g.L⁻¹ de caseína hidrolisada, 10 µM de 2-isopenteniladenine (2iP) e 40 µM de picloram ou 2,4-D, sem carvão.

Para cada cultura, o mesmo regulador de crescimento foi usado, como no meio de indução de calos. As culturas foram mantidas no escuro, em sala de crescimento, com temperatura de 25 ± 2 °C, por 90 dias, até serem transferidas para o meio de diferenciação.

2.3 DIFERENCIAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS

Para a diferenciação embrionária e maturação dos embriões somáticos, materiais nas fases de multiplicação e de manutenção foram cultivados em meio MS suplementado com 1 g.L⁻¹ de glutamina, 12,3 µM de 2-isopenteniladenina (2iP) e 0,54 µM de ácido naftalenoacético (ANA). Para o desenvolvimento das plantas, calos contendo embriões diferenciados em fase de torpedo foram transferidos para o mesmo meio de MS modificado, com a metade da concentração de sais, sem reguladores de crescimento, acrescido de 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativado. Nesta fase, 12 calos de cada tratamento, onde as auxinas foram combinadas com carvão ativado, foram escolhidos ao acaso e, os números de embriões somáticos em fase de torpedo foram avaliados ao longo de um período de 2 anos.

2.4 REGENERAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS

Os embriões somáticos em fase de regeneração, formados a partir de aglomerados de calos, foram isolados e transferidos para tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 10 mL de meio de MS modificado, com a metade da concentração de sais e 20 g.L⁻¹ de sacarose, sem reguladores de crescimento, acrescido de 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativado.

Nesta fase, as culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 horas e radiação luminosa de 52 μmol.m⁻².s⁻¹ fornecida por lâmpadas LED (Philips® - Green Power 20W 60Hz), onde permaneceram até estarem aptas para o enraizamento.

2.5 CARACTERÍSTICAS COMUNS DO CULTIVO *IN VITRO* DA PALMA DE ÓLEO

Todos os meios utilizados no estudo foram geleificados com 2,5 g.L⁻¹ de Phytigel (Sigma®) e o pH foi ajustado para 5,8 ± 0,1, antes da adição do geleificante Phytigel (Sigma®). Os meios foram autoclavados a 121 °C durante 20 min.

2.6 ENRAIZAMENTO DE PLANTAS

Após a etapa de regeneração, as plantas desprovidas de raízes foram cultivadas em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 10 mL de meio de MS, com 30 g.L⁻¹ de sacarose, suplementado de 53,7 μM de AIB (ácido indolbutírico) para a indução do enraizamento.

As plantas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 horas e radiação luminosa de 52 μmol.m⁻².s⁻¹ fornecida por lâmpadas LED (Philips® - Green Power 20W 60Hz), onde permaneceram até o surgimento de pelo menos duas raízes para, posteriormente, serem aclimatadas em casa de vegetação.

2.7 ACLIMATAÇÃO DAS PLANTAS

Para a aclimação, as plantas regeneradas e enraizadas *in vitro*, que eram de aproximadamente 6-8 cm de altura com raízes desenvolvidas (ao menos duas raízes) foram removidas dos tubos de ensaio, lavadas abundantemente com água, e plantadas em estufa, em sacos plásticos contendo uma mistura de substrato comercial (Plantmax®) e areia (1:1 v/v).

2.8 ANÁLISES MORFO-ANATÔMICAS

Para a análise morfo-anatômica, foram selecionadas amostras de embriões somáticos obtidos por embriogênese somática e cultivados *in vitro*.

As amostras foram selecionadas e fixadas por um período mínimo de 24 horas em solução de paraformaldeído (4%, p/v), glutaraldeído (2%, v/v) e cacodilato de sódio 0,05 M, pH 7,2 sob vácuo. Os tecidos fixados foram lentamente desidratados à temperatura ambiente em uma série crescente de etanol (30% a 100%), seguido de imersão em solução de etanol (100%): meio de infiltração (1:1 v/v) durante 12 horas. Em seguida, as amostras foram transferidas para meio de infiltração por 24 horas, ou até que as amostras ficassem translúcidas e no fundo do recipiente. Para a infiltração e emblocagem, utilizou-se o kit Historesina® (hidroxietilmetacrilato, Leica, Heidelberg). A polimerização foi feita à temperatura ambiente por 24 a 48 horas.

Cortes seriados (7 a 10 μm) foram obtidos em micrótomo rotatório (Leica® RM2125RT), distendidos em chapa aquecedora a 45 °C e aderidos às lâminas microscópicas. Os cortes foram corados com Azul de Toluidina (1%) (O'BRIEN et al. 1964) em solução salina tamponada com fosfato e ácido cítrico e, fixados em lâminas histológicas com resina sintética (Entellan). Os resultados foram registrados em fotomicroscópio Motic acoplado a um sistema digital de captura de imagens (Image-Pro Plus 4.5).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após 150 dias de cultivo dos embriões zigóticos em meio de indução à embriogênese somática, verificou-se diferenças significativas entre os tipos de auxinas utilizadas e adição ou não de carvão ativado no meio de cultura (Figura 1). De maneira geral, o tratamento com Picloram proporcionou a formação média de calo granular embriogênico em 97,5% dos embriões zigóticos em cultivo, enquanto que com 2,4-D a média de formação de calos granulares embriogênicos foi inferior a 79,4% (Figura 1 A).

Assim como observado para os tipos de auxinas, verificou-se que de maneira geral, a adição de carvão ativado no meio de cultura de indução foi determinante para que a taxa de formação de calo granular embriogênico fosse significativamente melhorada. Assim, independentemente do tipo de auxina utilizada, os tratamentos com carvão ativado proporcionaram uma taxa média de 88,4% de formação de calos granulares embriogênicos, a partir dos embriões zigóticos colocados em cultura, um valor significativamente superior ao meio de cultura onde o carvão ativado não foi adicionado, que foi de 32,7% (Figura 1 A).

Para a variável comprimento dos calos em sua maior proporção (Figura 1 B) não foram observadas diferenças significativas quanto ao tipo de auxina utilizado. Diferenças significativas só foram observadas entre os tratamentos com ou sem carvão. Assim, verificou-se que o tratamento com carvão proporcionou calos granulares medindo na sua maior proporção 1,2 cm, enquanto que no tratamento sem carvão ativado, esta média foi de apenas 0,2 cm (Figura 1 B).

Com relação à percentagem de recobrimento dos embriões por estruturas granulares embriogênicas (Figura 1 C), assim como observado na indução, verificou-se que o tratamento com Picloram foi o que proporcionou os melhores resultados. Com esta auxina, 71,6% dos calos estavam recobertos com estruturas granulares, contra 41,8% quando se usou o 2,4-D.

A adição de carvão ativado no meio de cultura também influenciou de forma positiva as médias, uma vez em meio com carvão a percentagem de recobrimento dos explantes por estruturas granulares foi de 84,1% enquanto que na ausência deste antioxidante, a média foi inferior a 29,2% (Figura 1 C).

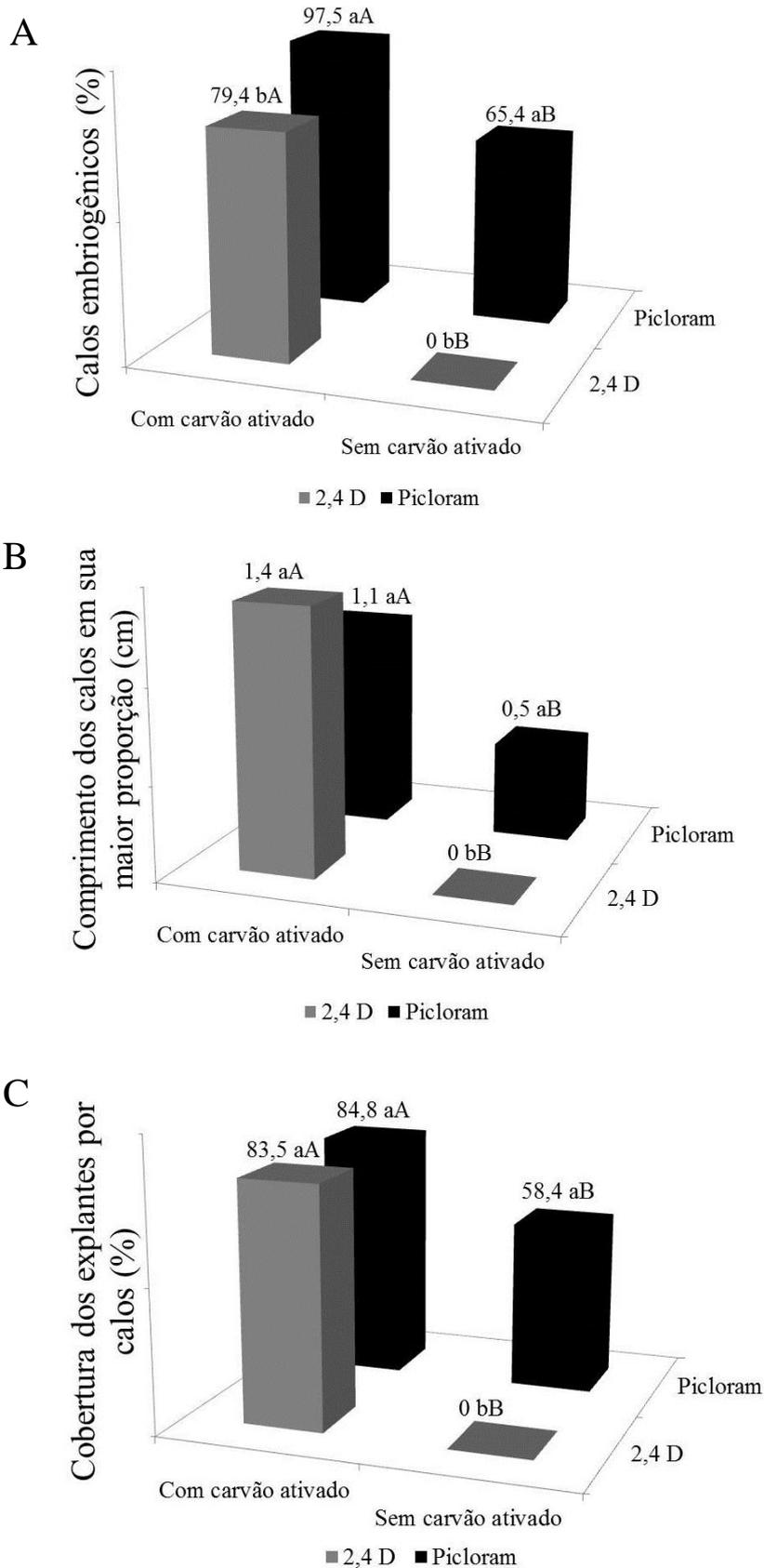


Figura 1. Indução de calos embriogênicos a partir de embriões zigóticos maduros de palma de óleo. A) Frequência de indução de calos embriogênicos (%); B) Comprimentos dos calos em sua maior proporção (cm); C) Recobrimento dos explantes por estruturas granulares (%).

A utilização de embriões maduros e imaturos de *E. guineensis* como fonte de explante foi proposta por Teixeira (1993) pelas vantagens que tais embriões podem apresentar como possível utilização em larga escala, uniformização, facilidade de colheita, possibilidade de transporte em grandes distâncias e a proteção do embrião contra fungos e bactérias por parte dos frutos, resultando numa diminuição de contaminações. Adicionalmente, cita-se o fato de embriões zigóticos apresentarem uma elevada capacidade de expressar sua totipotência. Além disso, num programa de melhoramento genético, a clonagem a partir de embriões zigóticos torna-se de grande importância por poder acelerar ciclos de seleção da cultura, em especial nas gerações de retrocruzamentos, onde cada semente/embrião é considerado um indivíduo que podem ser mais bem avaliados em razão do aumento do número de indivíduos por repetição em experimentos em campo.

O tipo de auxina adicionado ao meio de cultura exerce papel fundamental na competência embriogênica e para alguns autores o efeito benéfico do carvão ativado pode ser atribuído a sua capacidade de remoção de inibidores e da quantidade excessiva de reguladores de crescimento no meio de cultura que poderiam ser tóxicos aos cultivos (ADERKAS et al. 2002). A adsorção do excesso de auxina no meio de cultura pelo carvão ativado também foi relatada nos trabalhos desenvolvidos por Ebert e Taylor (1990) e Verdeil e Buffard-Morel (1995), os quais afirmam que fica indefinida a concentração disponível de auxina aos explantes em cultivo, quando da presença do carvão ativado no meio de cultura. Neste sentido, Teixeira et al. (1993) utilizando embriões zigóticos imaturos de dendezeiro em meio de cultura para obter a proliferação de calos, relatou que a presença de 0,3% de carvão ativado não só minimizou a oxidação, como foi responsável pela adsorção de parte do 2,4-D contido no meio de cultura. Devido a isso, a concentração de 2,4-D foi aumentada de 10 para 450 μM para o pleno e satisfatório desenvolvimento das culturas embriogênicas. Quanto ao tipo de auxina testada, diversos autores relatam a utilização de auxinas ditas “fortes” como o dicamba, 2,4-D e Picloram na indução de embriogênese somática em espécies agrônomicas em concentrações que podem variar geralmente entre 0,1 e 500 μM (AKUTSU e SATO, 2002; KAUR e KOTHARI, 2004; PEREIRA et al. 2009). De acordo com George (1993), o Picloram pode ser usado para induzir e, ou, manter calos ou cultura de suspensão tanto em dicotiledôneas quanto em monocotiledôneas, ou para induzir a formação de calos embriogênicos, podendo, em alguns casos, ser mais efetivo que o 2,4-D. Esta auxina também induziu a competência embriogênica em pupunha

(VALVERDE et al. 1987), além de ter sido a auxina mais efetiva na embriogênese somática em arecanut palm (*Areca catechu* L.) (KARUN et al. 2004). Mais recentemente, Scherwinski-Pereira et al. (2010) demonstraram que o Picloram foi significativamente melhor que o 2,4-D na indução de calos embriogênicos em folhas imaturas de dendezeiro (*thin cell layer* technique). Isso sugere que essa auxina pode ser mais efetiva na indução da embriogênese somática em determinadas espécies, que outras auxinas utilizadas no processo, como as palmeiras, embora de modo geral, acima de 60% dos protocolos atuais de indução da embriogênese somática em monocotiledôneas utilizem o 2,4-D, e no caso das palmeiras, esta percentagem seja ainda maior (GUERRA e HANDRO, 1998; KARAMI e SAIDI, 2010), sendo seu uso nos trabalhos de dendezeiros quase que uma referência.

Após 150 dias dos explantes na fase de indução de calos, calos embriogênicos evidenciados pelas análises histológicas, foram transferidos para o meio de cultura de MS modificado e suplementado com 40 μ M de Picloram, tendo sua primeira avaliação nesse meio de multiplicação aos 45 dias, sendo avaliados por um período de 90 dias (Figuras 2).

Esta etapa teve como objetivo a proliferação e manutenção dos calos obtidos na fase anterior, visto que a redução dos níveis de auxinas de 450 μ M para 40 μ M foi crucial para o estabelecimento de ciclos repetitivos de divisão celular e repressão dos processos de diferenciação, proporcionando a multiplicação dos calos.

Após 45 dias em meio de multiplicação, verificou-se um comportamento linear ascendente em relação ao crescimento e multiplicação dos calos multigranulares embriogênicos para o tratamento com Picloram, com uma tendência de aumento desse crescimento com o aumento no tempo de tratamento (Figura 2). Após serem colocados em meio de multiplicação, o volume inicial dos calos que era de 2,2 cm³ em média, passou para 4,6 cm³, ou seja, um acréscimo de volume celular de cerca de 109% (Figuras 2 e 3). Porém, para o tratamento com 2,4 D, não houve ajuste significativo quando se estudou o crescimento dos embriões durante a fase de multiplicação.

Assim, nesta fase foi possível observar o aumento dos calos embriogênicos com aspectos nodulares, compactos e de coloração amarelo-claro, caracterizando-se calos do tipo II, embora após 12 semanas de permanência dos calos nesse meio de cultura também tenha sido possível observar o início da formação de pequenas regiões apresentando calo friável de coloração branca e fracamente conectado ao resto do calo nodular embriogênico.

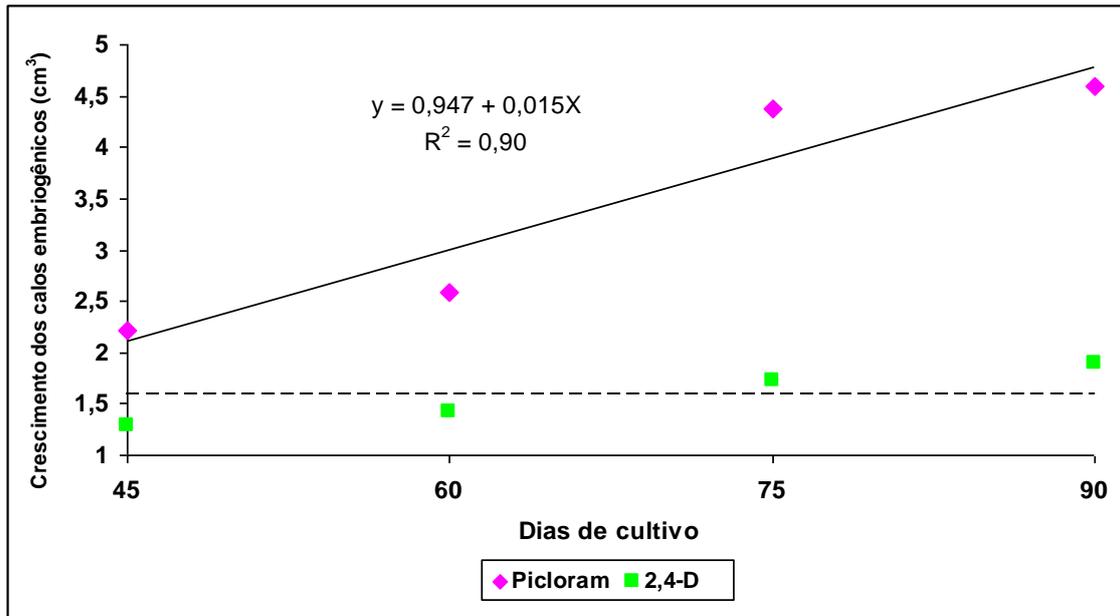


Figura 2. Crescimento dos calos multigranulares embriogênicos (cm³) de palma de óleo mantidos por 90 dias em meio de multiplicação com Picloram ou 2,4-D. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

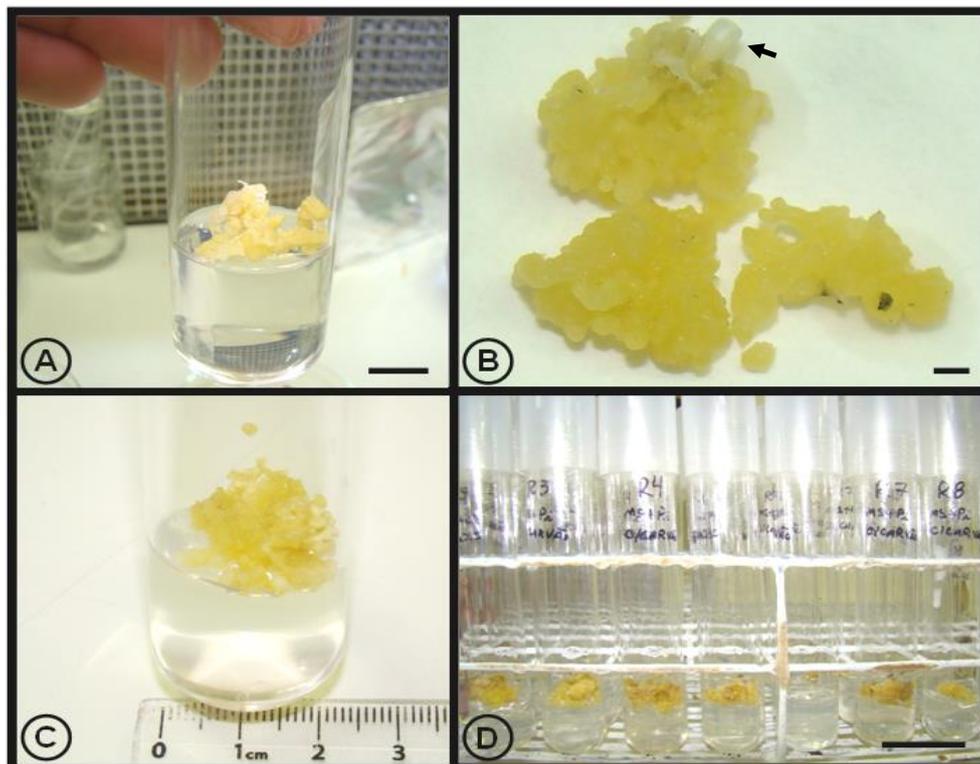


Figura 3. Efeito das auxinas 2,4-D e Picloram na multiplicação de calos multigranulares embriogênicos de palma de óleo. A) Aspecto de calos multigranulares embriogênicos de palma de óleo aos 45 dias em meio de multiplicação; B) Calos multigranulares embriogênicos aos 60 dias em meio de multiplicação com a presença do meristema apical do embrião zigótico aderido (fonte de explante) (seta); C) Aumento em massa celular dos calos embriogênicos aos 75 dias; D) Aspecto do crescimento dos calos multigranulares embriogênicos aos 90 dias. Barras: A, B, D: 1 cm, 0,3 cm e 3 cm, respectivamente.

Michoux-Ferriere et al. (1992), trabalhando com *Hevea brasiliense*, afirmaram que nodulações presentes nos calos mostraram, através de posterior evolução serem unidades embriogênicas, identificadas como pró-embriões globulares de origem multicelular. Os calos embriogênicos a nível celular são compostos, em sua maioria, por células meristemáticas com dimensões relativamente pequenas e com citoplasma denso (TOMES, 1985). Em milho, estes calos são classificados como calos compactos ou do tipo I, como relatado em nosso trabalho, e calos friáveis ou do tipo II (ARMSTRONG e GREEN, 1985).

Ao avaliar-se o ganho em massa celular de calos embriogênicos de dendezeiro em razão do tempo (Figura 4), observou-se que houve diferença significativa entre as médias dos tratamentos com baixas concentrações de Picloram e 2,4-D, pois a porcentagem de massa celular com Picloram que era de 18% dos 45 aos 60 dias em meio de multiplicação, passou a obter ganho em massa celular de 109% aos 90 dias. Porém, para o tratamento com 2,4-D observou-se resultados de ganho de massa celular de 7,7% entre 45 e 60 dias em meio de multiplicação e, aos 90 dias, a porcentagem de ganho de massa celular dos calos embriogênicos não ultrapassou a 50%.

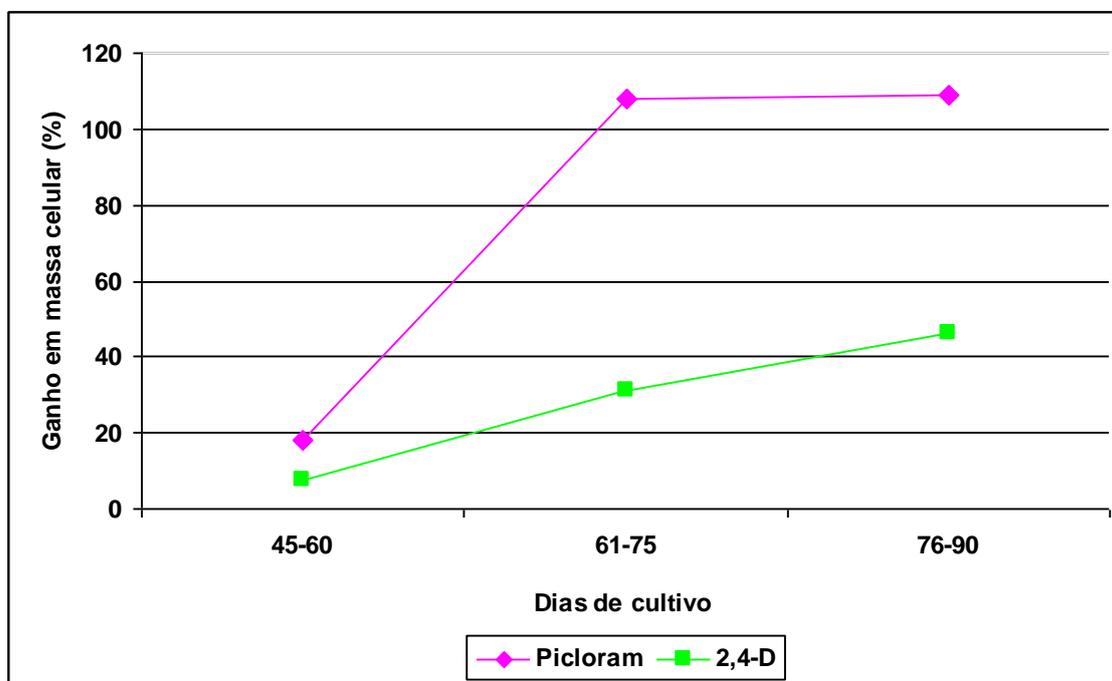


Figura 4. Ganho em massa celular de calos embriogênicos de palma de óleo mantidos por 90 dias em meio de multiplicação com Picloram ou 2,4-D. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Após esse período, os calos embriogênicos (Figura 5 H-I) foram então transferidos para o meio de cultura de MS modificado, suplementando com 0,6 μM de ANA e 12,30 μM de 2-iP para as fases de diferenciação e maturação. A passagem dos calos embriogênicos para esta etapa permitiu observar entre 12 – 24 semanas a diferenciação de embriões somáticos, progredindo ao estágio de torpedo, caracterizados pelo alongamento do cotilédone, e embriões maduros, com características bipolares (Figura 5 J). Uma vez com estas características, os *clusters* formados por aglomerados de embriões somáticos diferenciados foram transferidos para novo meio de cultura de MS modificado, desta vez livre de reguladores de crescimento e acrescido de carvão ativado para a germinação dos embriões somáticos diferenciados em plantas, evidenciado pela emergência da bainha foliar (Figura 5 K).

Neste trabalho, as plantas formadas a partir dos agregados de embriões somáticos foram sendo individualizadas de acordo com sua diferenciação, ou seja, pela formação de brotos e diferenciação das folhas do embrião somático, sendo transferidos individualmente para novo meio de cultura de MS modificado e desprovido de reguladores de crescimento para completo desenvolvimento (Figura 5 L). É importante relatar também que o isolamento dos embriões somáticos regenerados somente após sua diferenciação é uma prática importante por permitir uma contínua proliferação e diferenciação de plantas a partir dos *clusters* de embriões somáticos formados, sugerindo ser esse o caminho para a obtenção de plantas em larga escala da espécie. Apesar de muitos trabalhos em dendezeiros relatar a necessidade de enraizamento dos brotos regenerados (KONAN et al. 2010), neste trabalho, os resultados apontam que a simples manutenção dos brotos originários dos embriões somáticos individualizados foi suficiente para promover o enraizamento, após 8-24 semanas nesse meio de cultura (sem reguladores de crescimento), período necessário para as plantas atingirem um crescimento suficiente para a aclimação em estufa e, posteriormente, aclimação em casa de vegetação (Figura 5 M-N). Após a aclimação, plantas clonadas de dendezeiro foram plantadas em uma área de exposição, na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – Embrapa Cenargen (Figura 5 O).

O efeito das citocininas na embriogênese somática de palmeiras ainda não é completamente entendido, quando comparada aos efeitos das auxinas na indução de calos. No entanto, resultados contraditórios na literatura têm mostrado as diferentes funções das citocininas na embriogênese somática de palmeiras, como os relatos de Guerra e Handro (1998) que citam a melhoria das taxas de indução da embriogênese

somática em *Euterpe edulis* com o uso de citocininas no meio de indução de calos, embora Steinmacher et al. (2007) não tenha observado nenhuma melhoria na eficiência da indução da embriogênese somática em pupunha quando o 2iP foi adicionado ao meio de indução. Em outros casos, o aumento das concentrações de citocininas em determinadas etapas da embriogênese de palmeiras pode acelerar a oxidação e escurecimento dos tecidos em cultivo (SARASAN et al. 2002). Já em dendezeiro, Aberlenc-Bertossi et al. (1999) relatam que a adição de BAP parece ser essencial para a melhorar a germinação de embriões somáticos de culturas em suspensão de dendezeiro, embora resultados obtidos por Scherwinski-Pereira et al. (2010) mostrem que o uso de citocininas em fases mais avançadas seja importante para a completa diferenciação bipolar dos embriões somáticos, sendo recomendável seu uso ainda na fase de diferenciação e maturação dos embriões somáticos dessa espécie. No entanto, embora seja desconhecido para outras palmeiras, o uso de citocininas nas diferentes etapas da embriogênese somática em dendezeiro parece ser de uso restrito, em especial na regeneração, uma vez que este regulador tem sido indicado como um dos possíveis fatores que poderiam estar ligados nos problemas de floração anormal da espécie (*mantled*), sendo, portanto necessário o completo acompanhamento das plantas regeneradas em condições de campo.

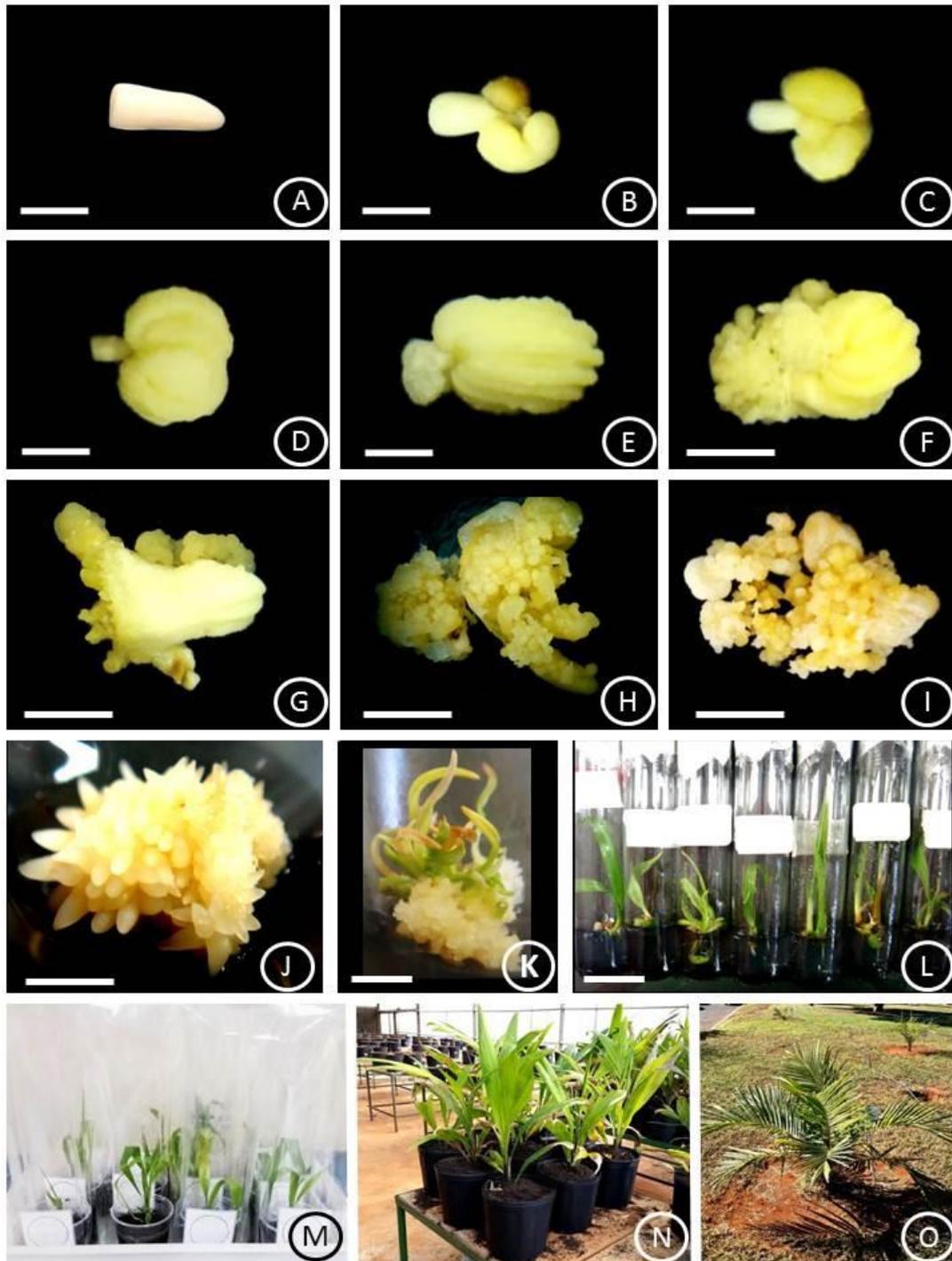


Figura 5. Estágios morfológicos da indução de calos embriogênicos em dendezeiro a partir de embriões zigóticos. A) Embrião zigótico de dendezeiro utilizado como fonte de explante; B-E) Diferenciação dos embriões zigóticos a partir do desenvolvimento do calo primário na região distal dos explantes; F-G) Aspecto de calos primários com início de formação de estruturas multigranulares embriogênicas recobrando o explante, após cerca de 20 semanas de cultivo em meio de indução; H-I) Aspecto dos calos, após doze semanas em meio de multiplicação; J) Embriões somáticos; K) Regeneração de plantas; L) Individualização de plantas regeneradas; M) Aclimação de plantas regeneradas em estufa; N) Plantas regeneradas aclimatadas em casa de vegetação; O) Plantas de palma de óleo em campo, na Embrapa Cenargen. Barras (A-E) 0,3 cm; (F-J) 0,5 cm; (K-L) 1,5 cm.

4. ANÁLISES MORFO-ANATÔMICAS

As análises morfo-anatômicas evidenciaram que após cerca de 20 semanas de cultivo, os explantes apresentavam calos com aspecto nodular. Na parte mais interna do calo, observaram-se regiões com intensas divisões celulares que resultaram em massas embriogênicas com células pequenas, isodiamétricas, de citoplasma denso, núcleo volumoso caracterizando células meristemáticas (Figura 6 A). A partir do desenvolvimento da massa embriogênica, observou-se a formação de agrupamentos de células caracterizados como pró-embriões (Figura 6 C) e posteriormente, embriões com células em arranjo esférico caracterizando embriões somáticos em estágio globular inicial de origem multicelular (Figura 6 D). De acordo com Williams e Maheswaran (1986), embriões de origem multicelular apresentam-se fusionados ao tecido de origem, possuem protoderme comum e originaram de calos nodulares constituídos por massas embriogênicas levando a formação de embriões globulares. Saénz et al. (2006) também observaram que embriões somáticos de *Cocos nucifera* apresentaram origem multicelular, formados a partir de calos nodulares. Nestes locais, também foi possível observar embriões em fase globular mais avançada (Figura 6 E), apresentando células com núcleo proeminente contendo de um a três nucléolos. Estes embriões apresentavam-se individualizados por um aparente espessamento de parede, causado possivelmente pela dissolução da lamela média. O espessamento de parede ao redor dos embriões também foi verificado por Sané et al. (2006) na indução de embriogênese somática em calos de *Phoenix dactylifera*.

Na região externa do calo e próximo aos locais com intensas divisões celulares verificaram-se células grandes contendo amido evidenciado pela coloração marrom (Figura 6 B). Os grãos de amido se acumularam principalmente nas células próximas aos centros de intensa divisão celular, especialmente naquelas com citoplasma menos denso, enquanto que nas células com divisão intensa e os pró-embriões não apresentaram grãos de amido.

O acúmulo de amido, seja nas células embriogênicas ou em células adjacentes do explante, parece ser um fenômeno ligado à aquisição de competência embriogênica. Kanchanapoom e Domyoas (1999) também detectaram a acumulação de amido nos calos e nos embrióides bipolares de *E. guineensis*, indicando que o amido acompanha a formação de embriões somáticos. Adicionalmente, o amido em células embriogênicas de calos de *Gentiana punctata* L. foi relacionada com fonte de energia para a intensa

divisão celular e posterior desenvolvimento dos embriões (MIKULA et al. 2004). De acordo com Silveira et al. (2004), o nível desta molécula pode mudar dependendo da fase de crescimento do embrião, uma vez que a divisão e diferenciação celular demandam grande quantidade de carbono e ATP. Por fim, embriões somáticos totalmente regenerados foram observados, apresentando haustório, plúmula e início do desenvolvimento da primeira e segunda bainha foliar (Figura 3 F). Nesta fase não foi possível visualizar o primórdio radicular, pois segundo Camillo et al. (2009), a protusão da radícula só ocorre após a emergência das primeiras folhas verdadeiras.

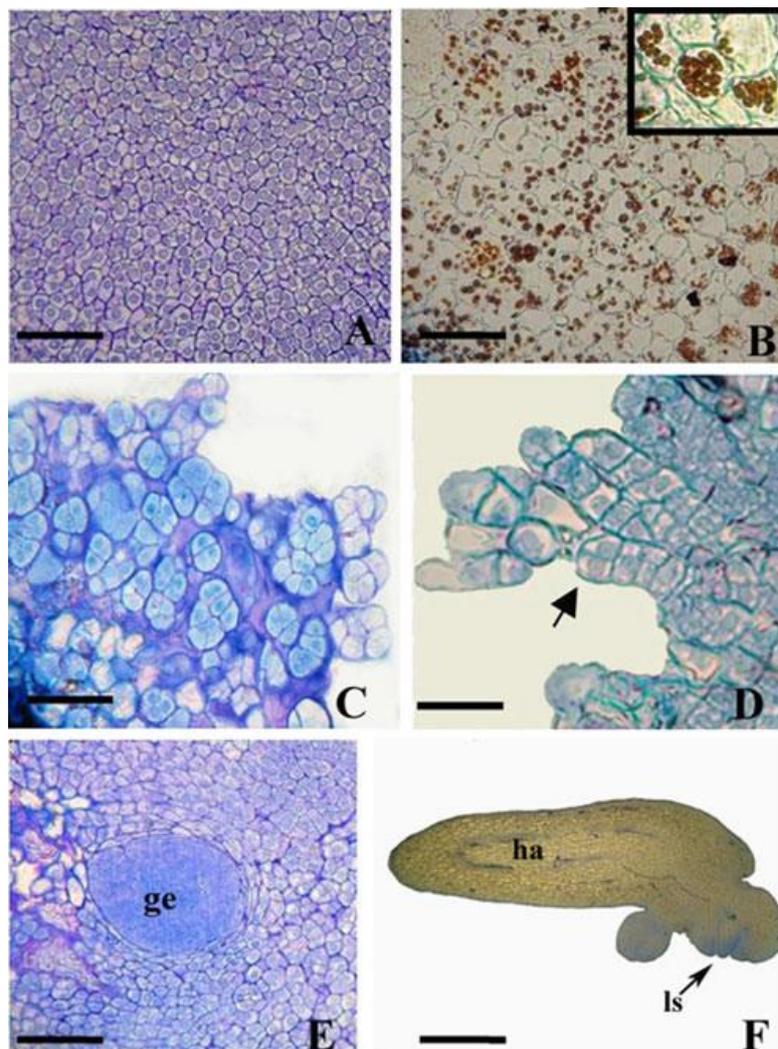


Figura 6. Secções de explante de *Elaeis guineensis* Jacq. durante a embriogênese somática. A) Região com células meristemáticas, caracterizadas por núcleo volumoso e citoplasma denso e com intensas divisões celulares; B) Células contendo grãos de amido, localizadas próximas às regiões de intensas divisões celulares; C) Início da formação de pró-embriões; D) Explante com formações de embriões em estágio semelhante ao globular (seta); E) Embrião globular (ge) envolvido por células meristemáticas; F) Embrião somático apresentando haustório (ha) e ápice apical do caule com duas bainhas foliares (ls). Barras (A e D) 50 μ m; (B e C) 100 μ m; (E e F) 10 μ m.

5. CONCLUSÕES

O trabalho permitiu estabelecer um protocolo para a obtenção em alta frequência de calos embriogênicos a partir de embriões zigóticos de palma de óleo. Também foi possível observar o papel determinante da auxina picloram e do carvão ativado na melhoria significativa dos resultados de indução de calos embriogênicos. Por meio de análises morfo-anatômicas foi possível caracterizar as mudanças ocorridas durante os diferentes estágios da embriogênese somática. O protocolo descrito neste estudo se constitui como uma importante ferramenta para futuros trabalhos com a espécie, pois a descrição detalhada das rotas morfológicas envolvidas nas diferentes etapas do processo cria possibilidades para que outros pesquisadores possam se guiar para atingir mais facilmente seus objetivos de clonar esta espécie a partir de embriões zigóticos maduros.

6. 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 Tiss Org Cult.** v. 56, p. 53-57, 1999.

AKUTSU M, SATO H. Induction of proembryos in liquid culture increases the efficiency of plant regeneration from *Alstroemeria* calli. **Plant Sci**, v. 163 p. 475-479, 2002.

ARMSTRONG, C. L.; GREEN, C. E. Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. **Planta**, v. 164, p. 207-214, 1985.

BESSE I.; VERDEI 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**, v. 252, p. 983-989, 1992.

BEULÉ T.; CAMPS C.; DEBIESSE S.; TRANCHANT C.; DUSSERT S.; SABAU X.; JALIGOT E.; TREGGAR J. W. Transcriptome analysis reveals differentially expressed genes associated with the mantled homeotic flowering abnormality in oil palm (*Elaeis guineensis*). **Tree Genet Genomes**, v. 7, p. 169-182, 2011.

CAMILLO J.; LUIS Z. G.; SCHERWISKI-PEREIRA J. E. Tolerância de sementes de dendezeiro à criopreservação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p. 211-215, 2009.

EBERT A.; TAYLOR H. F. Assessment of the changes of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentrations in plant tissue culture media in presence of activated charcoal. **Plant Cell Tissue Org Cult**, v. 20, p. 165-172, 1990.

FEHÉR A.; PASTERNAK T. P.; DUDITS D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell Tiss Org Cult**, v. 74, p. 201-228, 2003.

FIUK A.; RYBCZYNSKI J. J. Genotype and plant growth regulatordependent response of somatic embryogenesis from *Gentiana* spp. leaf explants. **In vitro Cell Dev Biol Plant**, v. 44, p. 90-99, 2008.

GELDNER N.; HAMANN T.; JURGENS G. Is there a role for auxin in early embryogenesis? **Plant Growth Regul**, v. 32, p. 187-191, 2000.

GEORGE E. F. Plant propagation by tissue culture - the technology. Exegetics, Edington, UK, 1993.

GUERRA, M. P.; HANDRO, W. Somatic embryogenesis and plant regeneration in embryo cultures of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae). **Plant Cell Report**, v. 7, p. 550-552, 1998.

HARTMANN H. T.; KESTER D. E.; DAVIES J. F. T.; GENEVE R. L. Plant propagation, principles and practices, 6th edn. Prentice Hall, Englewood Cliffs Jayanthi M, MOHAN N. M.; MANDAL P. K. (2011) Direct somatic embryogenesis and plantlet regeneration in oil palm. **Plant Biochem Biotechnol**, v. 20, p. 249-251, 1997.

JONES L. H. Propagation of clonal palms by tissue culture. **Oil Palm News**, v. 17, p. 1-8, 1974.

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

- KANCHANAPOOM K.; DOMYOAS P. The origin and development of embryoids in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq) embryo culture. **Sci Asia**, v. 25, p. 195-202, 1999.
- KARAMI O.; SAIDI A. The molecular basis for stress-induced acquisition of somatic embryogenesis. **Mol Biol Rep**, v. 37, p. 2493-2507, 2010.
- KARUN A.; SIRIL E. A.; RADHA A.; PARTHASARATHY V. A. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from leaf and inflorescence explants of arecanut (*Areca catechu* L.). **Curr Sci**, v. 86, p. 1623-1628, 2004.
- KAUR P.; KOTHARI S. L. *In vitro* culture of kodo millet: influence of 2,4-D and picloram in combination with kinetin on callus initiation and regeneration. **Plant Cell Tiss Org Cult**, v. 77, p. 73-79, 2004.
- KIM T. D.; AHN C. H.; BAE K. H.; CHOI Y. E. The embryogenic competency and morphological changes during somatic embryogenesis in *Iris pseudacorus*. **Plant Biotechnol Rep**, v. 3, p. 251-257, 2009.
- KONAN K. E.; DURANT-GASSELIN T.; KOUADIO Y. J.; FLORI A.; RIVAL A.; DUVAL Y.; PANNETIER C. *In vitro* conservation of oil palm somatic embryo for 20 yr on a hormone-free culture medium: characteristics of the embryogenic cultures, derived plantlets and adult palms. **Plant Cell Rep**, v. 29, p. 1-13, 2010.
- LIN H. C.; MORCILLO F.; DUSSERT S.; TRANCHANT-DUBREUIL C.; TREGEAR J. W.; TRANBARGER T. J. Transcriptome analysis during somatic embryogenesis of the tropical monocot *Elaeis guineensis*: evidence for conserved gene functions in early development. **Plant Mol Biol**, v. 70, p. 173-192, 2009.
- 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. **BMC Plant Biol**, v. 8, p. 62, 2008.
- LUIS Z. G.; BEZERRA K. M. B.; SCHERWINSKI-PEREIRA J. E. Adaptability and leaf anatomical features in oil palm seedlings produced by embryo rescue and pre-germinated seeds. **Braz J Plant Physiol**, v. 22, p. 209-215, 2010.
- MEDIA CYBERNETICS. **Image Pro Plus: images database user guide for Windows**, version 4.5. Media Cybernetics, Silver Spring, 2001.
- MICHOUX-FERRIERE, N.; GROUT, H.; CARRON, M.P. Origen and ontogenesis of somatic embryos in *Hevea brasiliensis* (Euphorbiaceae). **American Journal of Botany**, v.79, p.174-180, 1992.
- MIKULA A.; TYKARSKA T.; ZIELINSKA M.; KURAS M.; RYBCZYNSKI J. J. Ultrastructural changes in zygotic embryos of *Gentiana punctata* L. during callus formation and somatic embryogenesis. **Acta Biol Cracov**, v. 46, p. 109-120, 2004.
- MURASHIGE T, SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. **Physiol Plant** v. 15, p. 473-497, 1962.
- O' BRIEN TP, FEDER N, MCCULLY ME. (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. **O. Protoplasma**, v. 59, p. 368-373, 1964.
- PARANJOTHY K.; ROHANI O.; TARMIZI A. H.; TAN C. S.; TAN C. C. **Current status and strategies of oil palm tissue culture research**, 1989.

PORIM **International Palm Oil Development Conference**, pp. 109-121

PEREIRA P. I. P.; VIDHANAARACHCHI V. R. M.; GUNATHILAKE T. R.; YAKANDAWALA D. M. D.; HOCHER V.; VERDEIL J. L.; WEERAKOON L. K. Effect of plant growth regulators on ovary culture of coconut (*Cocos nucifera* L.). **Plant Cell Tiss Org Cult**, v. 99, p. 73-81, 2009.

QUIROZ-FIGUEROA F. R.; ROJAS-HERRERA R.; GALAZ-AVALOS R. M.; LOYOLA-VARGAS V. M. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. **Plant Cell Tiss Org Cult**, v. 86, p. 285-301, 2006.

RAJESH M. K.; RADHA E.; KARUN A.; PARTHASARATHY V. A. Plant regeneration from embryo-derived callus of oil palm—the effect of exogenous polyamines. **Plant Cell Tiss Org Cult**, v. 75, p. 41-47, 2003.

SAÉNZ L.; AZPEITIA A.; CHUC-ARMENDARIZ B.; CHAND 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**, v. 42, p. 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*). **Ann Bot**, v. 98, p. 301–308, 2006.

SARASAN V.; RAMSAY M. M.; ROBERTS A. V. **In vitro germination and induction of direct somatic embryogenesis in ‘bottle palm’**, 2002.

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

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

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

SILVEIRA, V.; FLOH, E. I. S.; HANDRO, W.; GUERRA, M. P. Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 76, p. 53-60, 2004.

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

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

TOMES, D. T. Cell culture, somatic embryogenesis and plant regeneration in maize, rice, sorghum and millets. In: BRIGHT, S. W.; JONES, M. G. K. (Ed.) **Advances in agricultural biotechnology, cereal tissue and cell culture**, p. 175-203, 1985.

VALVERDE, R.; ARIAS, O.; THORPE, T. A. Picloram-induced somatic embryogenesis in pejobaye palm (*Bactris gasipaes* H.B.K.). **Plant Cell Tiss Org Cult**, v. 10, p. 149-156, 1987.

VERDEIL, J. L.; BUFFARD-MOREL, J. Somatic embryogenesis in coconut (*Cocos nucifera* L.). In: Bajaj YPS (ed) Somatic embryogenesis and synthetic seed. **Biotechnology in agriculture and forestry**, v. 30, p. 299-317, 1995.

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

ZONTA, E. P.; MACHADO, A. A. **SANEST - Sistema de Análise Estatística para Microcomputadores**. Registrado na Secretaria Especial de Informática sob n 066060 - categoria A. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brazil, 1998.

CAPÍTULO 2

**INFLUÊNCIA DA ESPESSURA INICIAL DE CORTE SOBRE A
DIFERENCIAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS EM PALMA DE ÓLEO
(*Elaeis spp.*) UTILIZANDO A TÉCNICA *THIN CELL LAYER* (TCL)**

**INFLUÊNCIA DA ESPESSURA INICIAL DE CORTE SOBRE A
DIFERENCIAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS EM PALMA DE ÓLEO
(*Elaeis* spp.) UTILIZANDO A TÉCNICA *THIN CELL LAYER* (TCL)**

RESUMO

A palma de óleo apresenta alto potencial para a produção de biodiesel podendo alcançar até 7 toneladas de óleo vegetal por hectare. Porém, os métodos de propagação vegetativa são inexistentes, não permitindo perpetuar características agronômicas de interesse, a não ser por meios sexuais, o que pode causar a segregação de caracteres. Por este motivo técnicas visando à multiplicação clonal vem sendo empregadas. A técnica *thin cell layer* (TCL) pode proporcionar a multiplicação precoce de genótipos selecionados de palma de óleo (*Elaeis* spp.). O trabalho objetivou avaliar a influência da espessura de corte sobre a diferenciação de embriões somáticos de palma de óleo utilizando a técnica TCL. Em plantas dos genótipos FACM-589 e BRSC 2001 germinadas *in vitro* a partir de embriões zigóticos, com altura entre 8 a 10 cm, foram realizados cortes de 1 mm, 2 mm e 3 mm de espessura. Esses explantes foram estabelecidos em meio de cultura de MS, com auxina Picloram (450 µM), adicionado de 30 g.L⁻¹ sacarose, 500 mg.L⁻¹ de glutamina, 3 g.L⁻¹ de carvão ativado. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado formando um fatorial 2x3, com 2 genótipos (589 e 2001) e 3 espessuras de explantes (1 mm, 2 mm e 3 mm de espessura). Cada tratamento foi formado por pelo menos 6 repetições e 12 explantes por parcela. Verificou-se que utilizando-se a técnica TCL foi possível induzir eficientemente a embriogênese somática em palma de óleo. Os genótipos e a espessura dos explantes iniciais exercem forte influência na indução da embriogênese somática, pois mostraram importantes diferenças quanto à percentagem de calos com embriões somáticos e número de embriões somáticos por calo. Explantes de menor espessura (até 2 mm) foram os mais responsivos em relação à diferenciação de embriões somáticos.

Palavras-chave: *Arecaceae*, *Elaeis guineensis*, morfogênese, embriogênese somática, regeneração, camada fina de células.

**INFLUENCE OF INITIAL CUTTING THICKNESS ON SOMATIC EMBRYOS
DIFFERENTIATION IN OIL PALM (*Elaeis spp.*) USING THE THIN CELL
LAYER TECHNIQUE (TCL)**

ABSTRACT

Palm oil has a high potential for biodiesel production and can reach up to seven tons per hectare productivity. Currently, its methods of propagation are practically nonexistent, not allowing perpetuates agronomic traits of interest, except through sexual means, which may cause the segregation of characters. Therefore, techniques aiming clonal multiplication has been employed. The thin cell layer technique (TCL) can provide early multiplication of selected varieties of oil palm. The objective of this study was to evaluate the influence of cutting thickness on the differentiation of somatic embryos in oil palm using the TCL technique. In plants of genotypes FACM-589 and BRSC 2001 germinated *in vitro* from zygotic embryos, with height between 8 and 10 cm, cuts of 1 mm, 2 mm and 3 mm thickness were performed. These explants were established on MS medium with Picloram (450 μM), added with 30 g.L^{-1} sucrose, 500 mg.L^{-1} L-glutamine and 3 g.L^{-1} activated charcoal. The experimental design was a completely randomized 2x3 factorial, with two genotypes (FACM 589 and BRSC 2001) and three explants thicknesses (1 mm, 2 mm and 3 mm). Each treatment consisted of at least 6 replicates and 12 explants per plot. It was observed that the TCL technique can efficiently induce somatic embryogenesis in oil palm. Genotypes and thickness of the explants used exert a strong influence on the induction of somatic embryogenesis. Explants with a thickness of up to 2 mm are more responsive. Genotypes also exert a strong influence on the induction of somatic embryogenesis, because shown important differences in the percentage of callus with somatic embryos and number of somatic embryos formed per callus.

Keywords: Tissue Culture; Somatic Embryogenesis; Micropropagation

1. INTRODUÇÃO

A busca por fontes de energia alternativas vem crescendo nos últimos anos, principalmente em países que consomem grandes quantidades de combustíveis derivados do petróleo (MIRAGAYA, 2005; OLIVEIRA et al. 2008).

O biodiesel é uma alternativa para combustíveis que advém de fontes renováveis tais como, o óleo de soja e de dendê. Entre as plantas oleaginosas, a palma de óleo apresenta grande produção podendo alcançar de 4-7 toneladas de óleo vegetal por hectare (RAJESH et al. 2003), mostrando-se , como uma planta com importante potencial produtivo dentre as consideradas capazes de produzir biocombustíveis (SILVA e FREITAS, 2008).

O dendezeiro é uma planta perene, pertencente à família Arecaceae cuja área mundial cultivada supera os 17 milhões de hectares com produção de mais de 61.800 milhões/ton (KONAN et al. 2006; USDA, 2014). É uma espécie tropical que necessita de clima quente e úmido e abundância de chuvas para pleno desenvolvimento. Adaptou-se bem à região Norte do Brasil, que apresenta características ideais para seu cultivo e desenvolvimento (ALVES et al. 2011). Apresenta polinização cruzada, e por este motivo, os indivíduos possuem alta heterozigose, podendo ocorrer cruzamentos sem controle, o que pode causar uma variação no rendimento de óleo e trazer dificuldades na sua disseminação. A planta também apresenta crescimento monopodial, possuindo um único meristema apical (TEIXEIRA et al. 1995; RAJESH et al. 2003).

A propagação natural ocorre via sexuada (sementes) e, diferentemente de outras palmeiras como o açazeiro (LEDO, et al. 2002) e a pupunheira (SCHERWINSKI-PEREIRA et al. 2007; STEINMACHER et al. 2007b), o dendezeiro não produz perfilhos, dificultando passar suas características genéticas de interesse uniformemente. Atualmente, nos programas de melhoramento genético implementados no Brasil a multiplicação se dá exclusivamente por meio de sementes, fato que dificulta a produção de indivíduos com características selecionadas de alto valor genético (VIEGAS e MULLER, 2000). Desta forma, a cultura de tecidos surge como uma excelente alternativa para a multiplicação clonal de genótipos selecionados de dendezeiro. Os benefícios da propagação clonal estão relacionados principalmente, com a uniformidade dos plantios, a precocidade na produção, a maior produtividade e facilidade de manejo dos cultivos (KONAN et al. 2010).

Nesse contexto, a embriogênese somática é um dos métodos da cultura de tecidos mais utilizados para tornar o processo de propagação do dendezeiro mais eficiente. Trata-se de uma técnica de micropropagação de plantas em larga escala que envolve a regeneração de plantas, podendo ser induzidas a partir de vários tipos de explantes como, embriões zigóticos, inflorescências, ápices caulinares, folhas imaturas podendo proporcionar resultados significativos (GUERRA et al. 1999; STEINMACHER et al. 2007a, b; BISWAS et al. 2007; PESCADOR et al. 2008).

De maneira geral, pode-se conceituar explante como uma mistura de células em variados estados fisiológicos e bioquímicos de desenvolvimento, que quando expostos a um ambiente *in vitro*, sofrem reações diversificadas nos diferentes tipos celulares que o compõem, fazendo com que somente algumas células competentes respondam a um determinado estímulo, normalmente à reguladores de crescimento (MANTELL et al. 1994). Assim, a retirada de um fragmento de tecido (explante) de um organismo íntegro e seu cultivo num meio de cultura, pode conduzir os explantes a diferentes respostas, devido aos diferentes tipos de células e estádios de diferenciação (AMARAL, 2003; SCHERWINSKI-PEREIRA et al. 2010)

De acordo com Guerra (1989), competência celular é a capacidade de um explante de expressar um potencial de indução, isto é, uma mudança na competência de determinadas células (indução diretiva) ou a iniciação de uma resposta particular de diferenciação (indução permissiva). Isto é demonstrado quando um explante isolado, que não é intrinsecamente responsivo, adquire competência quando é ativado por um sinal (FINSTAD et al. 1993). Pierik (1990) afirma que, quando a planta envelhece, sua capacidade regenerativa costuma diminuir, por isso tende-se a utilizar material procedente de plantas jovens, especialmente no caso de árvores e arbustos. Os tecidos embrionários e meristemáticos, geralmente, apresentam maior competência organogênica devido ao elevado potencial de regeneração, preferencialmente os localizados nas gemas caulinares apicais e axilares (CARVALHO, 2006). Além disso, explantes juvenis geralmente possuem tecidos mais tenros e poucos lignificados, embora tecidos maduros de folhas e flores sejam igualmente utilizados para o estabelecimento *in vitro*. Porém, de modo geral, quanto maior a determinação de um explante para a formação de um órgão específico, menor é sua competência para originar outro órgão, por via alternativa do desenvolvimento (AMARAL, 2005; GUEDES et al. 2011).

Com o intuito de aperfeiçoar o processo de embriogênese, têm-se utilizado a técnica *Thin Cell Layer* (TCL), que consiste na utilização de explantes minúsculos excisados longitudinalmente ou transversalmente dos tecidos das plantas, incluindo geralmente tecidos da epiderme, subepiderme e de finas lâminas foliares (NHUT et al. 2001; KLERK, 2004; GUEDES et al. 2011). Resultados mostram que utilizando TCL é possível multiplicar eficientemente diversas espécies vegetais, onde outros métodos da cultura de tecidos são considerados falhos (NHUT et al. 2003), sendo uma técnica recomendada para programas de melhoramento genético de espécies onde a seleção é feita precocemente, pois plantas em estado juvenil podem ser clonadas, sem que as mesmas sejam mortas (SCHERWINSKI-PEREIRA et al. 2010).

No entanto, apesar da importância, não existem muitos trabalhos sendo desenvolvidos em palmeiras visando à regeneração de plantas utilizando a técnica TCL. Os poucos trabalhos existentes (STEINMACHER et al. 2007c; SCHERWINSKI-PEREIRA et al. 2010) têm mostrado resultados promissores para a produção de plantas clonadas a partir dessa técnica.

Nesse sentido, o objetivo do trabalho foi avaliar a influência da espessura inicial de corte sobre a diferenciação de embriões somáticos em palma de óleo utilizando a técnica TCL.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCT-II) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, situado em Brasília – DF, Brasil.

2.1 GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE DIFERENTES GENÓTIPOS DE PALMA DE ÓLEO (*Elaeis* spp.)

Para avaliar a germinação *in vitro* da palma de óleo, cinco genótipos foram testados: BRSC 2001, BRSC 2501, BRSC 2528, BRSC 7201 e FACM-589. Inicialmente, realizou-se a desinfestação das sementes pela imersão em álcool 70° GL durante 3 minutos em câmara de fluxo laminar, seguida de outra imersão, de 20 minutos, em solução de alvejante comercial a 100% (2 a 2,5% de cloro ativo), adicionado de uma gota de Tween-20 para cada 100 mL dessa solução. Posteriormente

foram efetuados três enxagues com água destilada, deionizada e devidamente autoclavada para a remoção do excesso de alvejante.

Após o processo de desinfestação, as sementes ficaram imersas em água destilada, deionizada e estéril por 24 horas para facilitar a remoção dos embriões das sementes. Para a extração dos embriões, com o auxílio de pinça e bisturi, foram realizados dois cortes num ângulo aproximado de 45° em direções opostas ao embrião.

Após a extração, os embriões foram imediatamente inoculados em meio de MS 1/2, acrescido de biotina e ácido pantotênico, 30 g.L⁻¹ sacarose e 2,5 g.L⁻¹ de Phytigel (Sigma®). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 ± 0,1, antes da adição do geleificante. O meio de cultura foi autoclavado a 121 °C em 1,3 atm de pressão por 20 minutos.

Os tubos de ensaio (150 x 25 mm) contendo 10 mL de meio de cultura foram fechados com papel alumínio e selados com filme transparente de PVC e acondicionados no escuro, em sala de crescimento, com temperatura de 25 ± 2 °C até o início da formação dos primórdios foliares (1 – 2 cm de comprimento).

Após 25 e 50 dias de cultivo *in vitro*, os genótipos foram avaliados quanto à taxa de germinação dos embriões (%) e a altura das plantas (cm).

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com dois tratamentos (25 e 50 dias), cada tratamento contendo quatro repetições. Cada repetição foi formada por 10 tubos de ensaio com um embrião zigóticos cada. Os dados obtidos foram analisados com o emprego do programa de análises estatísticas SANEST (Zonta e Machado, 1984), com as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Dados expressos em percentagem (x) foram transformados segundo arco seno (x/100)^{0,5}.

2.2 INFLUÊNCIA DA ESPESSURA INICIAL DE CORTE SOBRE A DIFERENCIAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS EM PALMA DE ÓLEO (*Elaeis* spp.) UTILIZANDO A TÉCNICA *THIN CELL LAYER* (TCL)

Para o experimento, as fontes de explantes TCL foram obtidas da porção basal (próximo ao meristema) e mediana de plantas dos genótipos FACM-589 (589) e BRSC 2001 (2001) com altura entre 8 a 10 cm. As plantas utilizadas nesta etapa foram obtidas a partir da etapa 2.1 do experimento. A escolha dos genótipos foi ao acaso. Para tal, as plantas tiveram as folhas mais externas e desenvolvidas removidas, juntamente com as

raízes, deixando-se somente o segmento caulinar, que se caracteriza por possuir folhas imaturas e aclorofiladas. Deste material, foram realizados cortes transversais de aproximadamente 1 mm, 2 mm e 3mm de espessura para a obtenção dos explantes.

Uma vez obtidos, os explantes TCL foram estabelecidos em placas de petri (15 x 90 mm), contendo 25 mL meio de cultura de MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) modificado, adicionado de 30 g.L⁻¹ sacarose, 500 mg.L⁻¹ de glutamina, 3 g.L⁻¹ de carvão ativado. A este meio de cultura foi adicionado ainda a auxina Picloram na concentração de 450 µM, de acordo com metodologia proposta por Scherwinski-Pereira et al. (2010). Em seguida, os explantes TCL com calos primários formados foram transferidos para meio de cultura com a mesma formulação salina, mas com a concentração da auxina Picloram reduzida para 40 µM, onde permaneceram por até três meses, para proliferação das massas e formação de calos embriogênicos.

Visando a diferenciação de embriões somáticos, os calos embriogênicos formados na etapa anterior foram transferidos para novo meio de cultura de MS modificado, desta vez contendo 0,6 µM de ácido naftaleno acético (ANA) e 12,30 µM de 2-isopenteniladenina (2iP), onde permaneceram por mais 3 meses. Após o início da diferenciação dos embriões somáticos, estes foram novamente transferidos para meio de cultura, desta vez, de regeneração das plantas, constituído pela metade da concentração dos sais de MS modificado, 20 g.L⁻¹ de sacarose e 1,5 g.L⁻¹ de carvão.

Durante as fases de indução, proliferação de calos e diferenciação de embriões somáticos, as culturas foram mantidas em placas de petri (15 x 90 mm) no escuro, em temperatura de 25 °C ± 2 °C. Já para a germinação dos embriões somáticos diferenciados e crescimento das plantas, as culturas foram mantidas em frascos de cultura com capacidade de 250 ml e, posteriormente em tubos de ensaio (25 x 150 mm), em sala de crescimento a 25 °C ± 2 °C, e sob fotoperíodo de 16 horas, com aproximadamente 30 µmol.m⁻².s⁻¹ de intensidade luminosa.

Neste experimento, todos os meios de cultura foram geleificados com 2,5 g.L⁻¹ de Phytigel (Sigma®) e tiveram o pH ajustado para 5,8 ± 0,1, antes da adição do geleificante Phytigel (Sigma®). Além disso, todos foram esterilizados por autoclavagem à uma temperatura de 121 °C por 20 minutos e 1,3 atm de pressão.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado formando um fatorial 2x3, com 2 genótipos (589 e 2001) e 3 espessuras de explantes (1 mm, 2 mm e 3 mm). Cada tratamento foi formado por pelo menos 6 repetições e 12 explantes por parcela. Para padronizar a amostragem e obter o máximo de calos primários,

visando a embriogênese somática, a amostragem dos explantes seguiu a metodologia descrita por Scherwinski-Pereira et al. (2010), sendo obtidos de cada plântula no máximo 6 explantes TCL de 1 mm, 3 explantes de 2 mm e 2 explantes de 3 mm, observando que todas as espessuras tiveram cortes tanto da região basal quanto da mediana.

Os dados obtidos foram analisados com o emprego do programa de análises estatísticas SISVAR (FERREIRA, 2003), com as médias comparadas pelo teste SNK (Student-Newman-Keuls) a 5% de probabilidade. Os dados referentes ao número de embriões somáticos foram obtidos por contagem, sendo os mesmos transformados segundo $x^{0,5} + 1$.

2.3 ANÁLISE MORFO-ANATÔMICA

Para a análise morfo-anatômica, foram selecionadas amostras de embriões somáticos obtidos por embriogênese somática e cultivados *in vitro*.

As amostras foram fixadas por um período mínimo de 24 horas em solução de paraformaldeído (4%, p/v), glutaraldeído (2%, v/v) e cacodilato de sódio 0,05 M, pH 7,2 sob vácuo. Os tecidos fixados foram lentamente desidratados à temperatura ambiente em uma série crescente de etanol (30% a 100%), seguido de imersão em solução de etanol (100%): meio de infiltração (1:1 v/v) durante 12 horas. Em seguida, as amostras foram transferidas para meio de infiltração por 24 horas, ou até que as amostras ficassem translúcidas e no fundo do recipiente. Para a infiltração e emblocagem, utilizou-se o kit Historesina® (hidroxietilmetacrilato, Leica, Heidelberg), segundo as especificações dos fabricantes. A polimerização foi feita à temperatura ambiente por 24 a 48 horas.

Cortes seriados (3 a 5 μm) foram obtidos em micrótomo rotatório (Leica® RM2125RT), distendidos em chapa aquecedora a 45 °C e aderidos às lâminas microscópicas. Os cortes foram corados com Azul de Toluidina (1%) (O'BRIEN et al. 1964) em solução salina tamponada com fosfato e ácido cítrico. As lâminas foram montadas com resina sintética (Entellan). Os resultados foram registrados em fotomicroscópio Motic acoplado a um sistema digital de captura de imagens (Image-Pro Plus 4.5).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE DIFERENTES GENÓTIPOS DE PALMA DE ÓLEO (*Elaeis* spp.)

Uma semana após a inoculação foi possível observar intumescimento dos embriões zigóticos (Figura 1 A). Após três semanas observou-se a formação de pontos de crescimento: radícula e plúmula (Figura 1 B). Posteriormente, foi observado o início da emissão da bainha foliar e raiz primária (Figura 1 C). Em seguida, observou-se o desenvolvimento da bainha foliar e raiz (Figura 1 D). Após 60 dias plantas completas foram obtidas (Figura 1 E). Posteriormente, plantas com novas folhas e raízes secundárias foram obtidas (Figura 1 F).

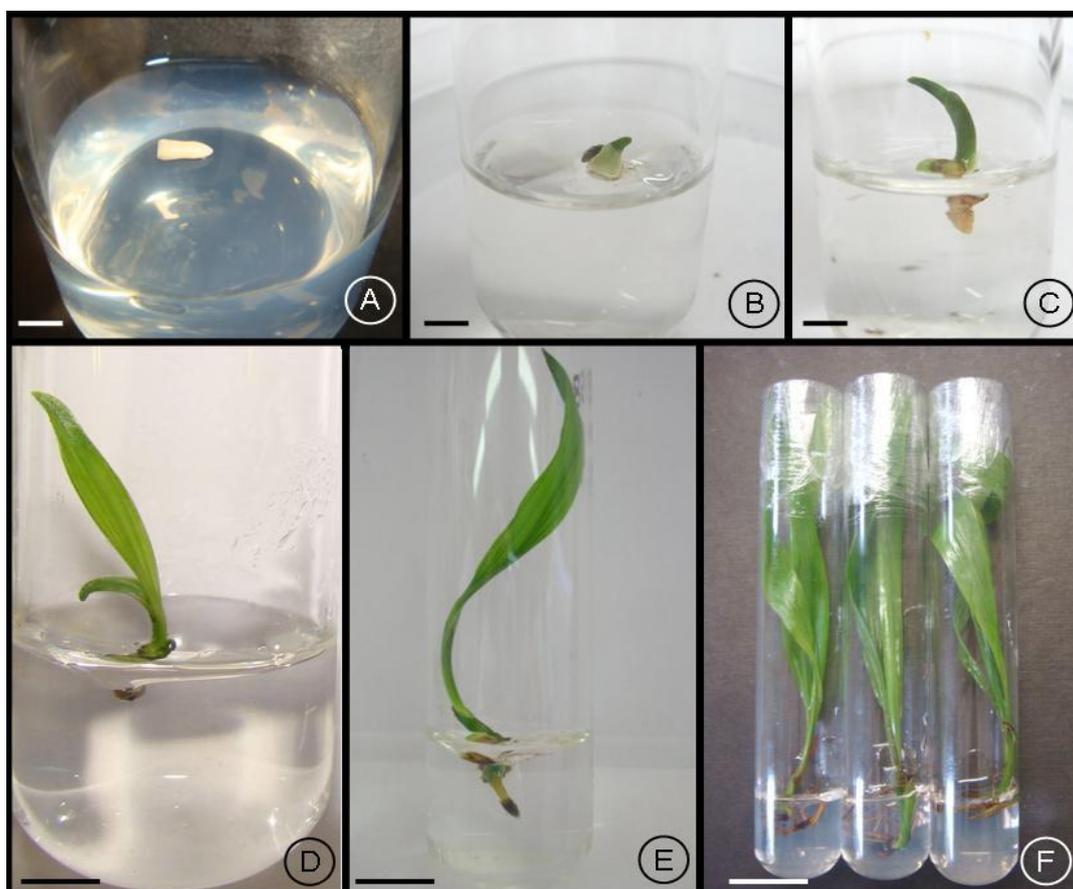


Figura 1. Germinação *in vitro* de embriões zigóticos de genótipos de palma de óleo. A) Aspecto do embrião zigótico; B) Formação dos pontos de crescimento; C) Emissão da bainha foliar e raiz primária; D) Aspecto de uma plântula em fase de desenvolvimento com 1 mês de idade; E) Morfologia e início do desenvolvimento da raiz em planta com 2 meses de idade; F) Aspecto de plantas mantidas *in vitro* aos 10 meses de idade.

Aos 25 dias de cultivo os genótipos BRSC 2501 e BRSC 7201 apresentaram taxas de germinação superiores a 90%, seguidos dos genótipos FACM-589 e BRSC 2001 com médias de germinação de 87%, enquanto que o genótipo BRSC 2528 apresentou 73% de germinação.

Aos 50 dias, o genótipo BRSC 2501 apresentou 100% dos embriões zigóticos germinados. O genótipo FACM-589 apresentou 90% da taxa de germinação dos embriões. Porém, nos genótipos BRSC 7201, BRSC 2001 e BRSC 2528 a média de germinação se manteve a mesma (96%, 87% e 73%, respectivamente), após este período (Figura 2).

Steinmacher (2007) ao avaliar a germinação de embriões zigóticos de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth) em meios de cultura de MS e Y3 na presença de carvão ativado aos 90 dias de cultivo *in vitro*, obteve médias de 90,0% e 96,5%, respectivamente. Scherwinski-Pereira et al. (2006) obtiveram 86% de germinação de embriões imaturos de murmurú (*Astrocarym ulei*) cultivados em meio de MS suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose, após 30 dias de cultivo *in vitro*.

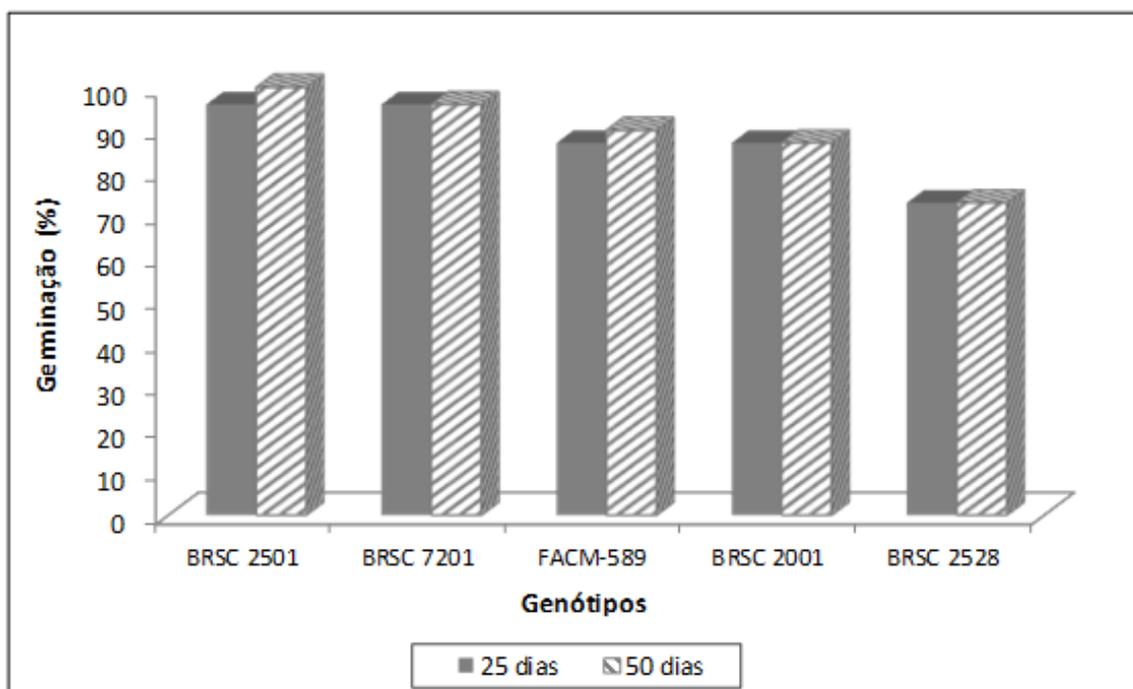


Figura 2. Taxa de germinação de embriões zigóticos de genótipos de palma de óleo aos 25 e 50 dias de cultivo *in vitro*.

Para a variável altura de plantas em fase de desenvolvimento (Figura 3), não houve diferença significativa entre os genótipos, tanto aos 25 dias quanto aos 50 dias de cultivo.

Aos 25 dias, as plantas do genótipo BRSC 7201 apresentaram altura média superior a 1 cm, porém, os genótipos BRSC 2501 e BRSC 2528 apresentaram médias intermediárias idênticas de cerca de 0,9 cm. Contudo, as plantas dos genótipos FACM-589 e BRSC 2001 apresentaram altura média não superior a 0,8 cm.

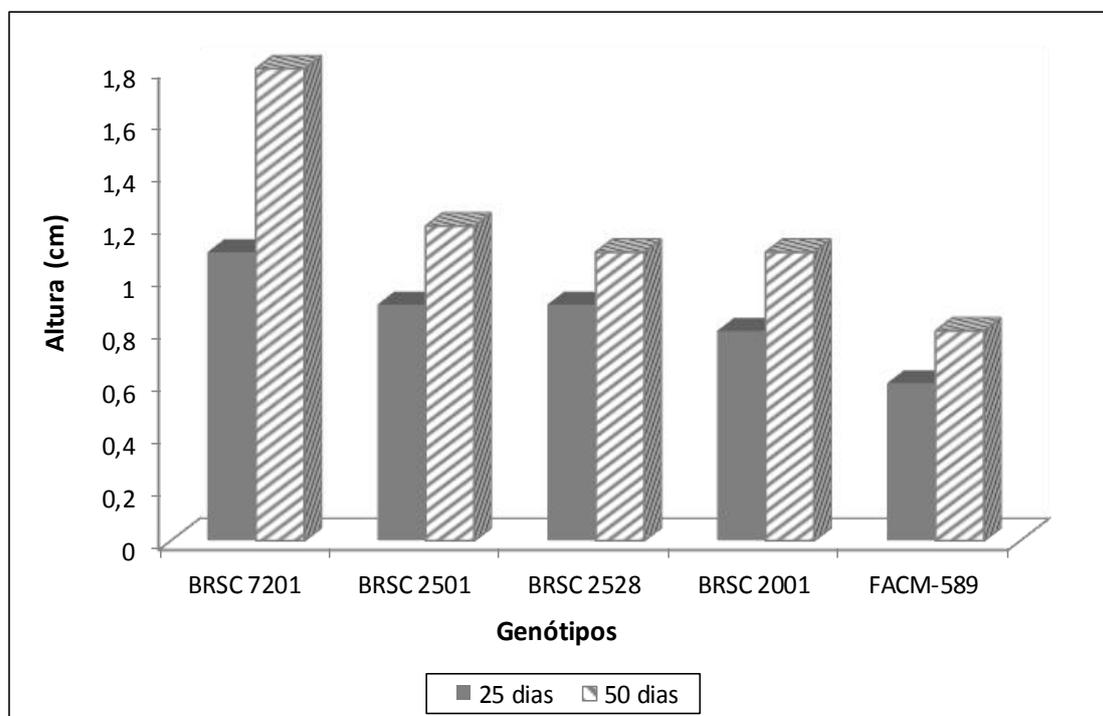


Figura 3. Altura das plantas oriundas de embriões zigóticos de genótipos de palma de óleo aos 25 e 50 dias de cultivo *in vitro*.

Já quando se avaliou a altura aos 50 dias, os genótipos BRSC7201, BRSC 2501, BRSC 2528 e BRSC 2001 apresentaram altura média superior a 1 cm. Contudo, o genótipo FACM-589 apresentou crescimento mais lento, com altura média inferior a 1 cm. Plantas do genótipo BRSC7201 apresentaram crescimento médio de 1,8 cm, seguido do genótipo BRSC 2501 com plantas de 1,2 cm. Os genótipos BRSC 2528 e BRSC 2001 foram os que apresentaram crescimento intermediário, com média de 1,1 cm seguidos do genótipo FACM-589, com média de altura das plantas em torno de 0,8 cm.

3.2 INFLUÊNCIA DA ESPESSURA INICIAL DE CORTE SOBRE A DIFERENCIAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS EM PALMA DE ÓLEO (*Elaeis* spp.) UTILIZANDO A TÉCNICA *THIN CELL LAYER* (TCL)

Após seis meses de permanência dos explantes no meio de cultura foram obtidos os primeiros calos primários. Após três meses foi possível verificar a proliferação das

massas celulares e, após o início da formação de calos com características embriogênicas, foi possível observar o início da diferenciação dos calos em embriões somáticos (Figura 4 B). Com a mudança do meio de cultura, observou-se o surgimento de embriões secundários formados sobre os embriões já existentes, evidenciando o desenvolvimento não sincronizado da embriogênese somática em palma de óleo (Figura 4 C). Posteriormente, os embriões somáticos foram convertidos em plantas (Figura 4 D e E) que, por sua vez, foram individualizadas e mantidas em meio de cultura de MS, sem a adição de fitorreguladores (Figura 4 F).

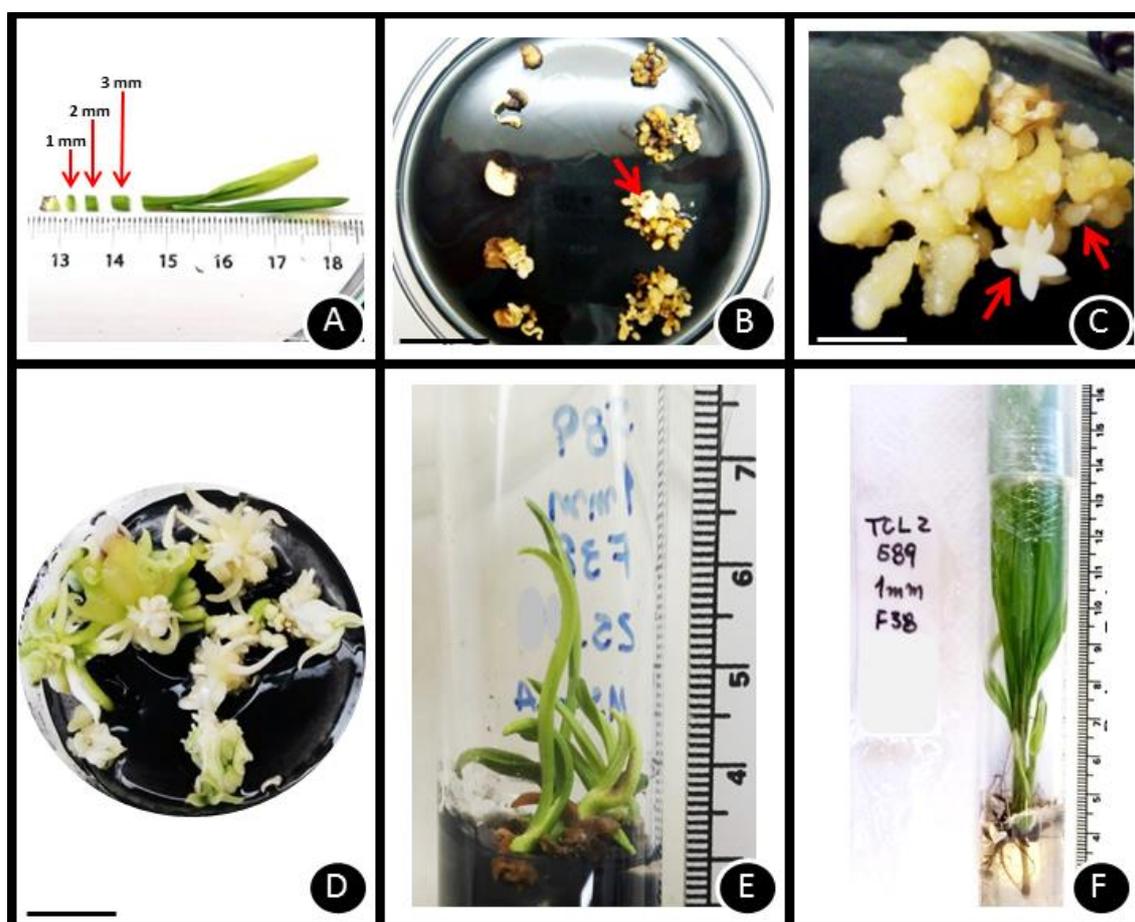


Figura 4. Embriogênese somática utilizando a técnica *Thin Cell Layer* (TCL). A) Visualização das espessuras dos cortes (1 mm, 2 mm e 3 mm); B) Explantes TCL mostrando a formação e multiplicação de calos e aparecimento de embriões (seta); C) Multiplicação em diferentes estágios dos calos, mostrando assincronia em diferentes fases da embriogênese somática e embriões diferenciados. Setas: Embriões na fase torpeda; D) Germinação de embriões somáticos; E) Regeneração de plantas; F) Plantas formada a partir dos agregados de embriões somáticos e cultivada em meio sem fitorreguladores. Barras: B e D: 2,6 cm; C: 1 cm.

Na indução da embriogênese somática, os genótipos C-589 e C-2001 apresentaram resultados diferenciados para ambas as variáveis testadas: formação de

calos com embriões somáticos e número de embriões somáticos por calo por intermédio da técnica de TCL (Tabela 1). Na média, o genótipo C-2001 apresentou uma taxa de calos com embriões somáticos de 4,2%, enquanto que o genótipo C-589 apresentou resultado significativo maior, com 24,3% de calos com embriões somáticos diferenciados.

Nas três espessuras avaliadas (1 mm, 2 mm e 3 mm), os explantes com 1 mm e 2 mm apresentaram resultados significativamente melhores, uma vez que 46,8% e 26,1% dos calos apresentaram formação de embriões somáticos, respectivamente, na variedade C-589, enquanto que para a variedade C-2001 somente nos explantes com 1 mm os calos apresentaram embriões somáticos (12,5%). Assim, na média geral e independentemente da variedade, os explantes com 1 mm e 2 mm apresentaram 29,6% e 13% dos calos com embriões somáticos diferenciados. Os explantes com 3 mm não apresentaram resultados para nenhuma das genótipos testados (Tabela 1).

Tabela 1. Influência da espessura de corte e genótipo sobre a diferenciação de embriões somáticos em palma de óleo utilizando a técnica *thin cell layer* (TCL)

Genótipo	Calo com E.S (%)			Média do genótipo	Nº E.S por calo			Média de formação de embriões
	Tamanho do explante TCL				Tamanho do explante TCL			
	1 mm	2 mm	3 mm		1 mm	2 mm	3 mm	
589	46,8	26,1	0,0	24,3 a	6,9	2,6	0,0	3,2 a
2001	12,5	0,0	0,0	4,2 b	1,2	0,0	0,0	0,4 b
Média do tamanho do explante	29,6 A	13,0 A	0,0 B		4,0 A	1,3 B	0,0	

Médias seguidas por letras distintas, minúscula na vertical e maiúscula na horizontal, dentro de cada variável diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de SNK (Student-Newman-Keuls).

Juntamente com o percentual de formação de calos contendo embriões somáticos, também foi avaliado o número de embriões somáticos por calo (Tabela 1). Para a variedade C-589 os explantes de 1 mm apresentaram diferenciação de 6,9 embriões. Já nos explantes de 2 mm foi observado 2,6 embriões somáticos diferenciados por calo, com média da variedade de 3,2 embriões por calo. A variedade C-2001 apresentou calos com 1,2 embrião somático nos explantes de 1 mm, não tendo sido observado diferenciação de embriões nos explantes de 2 mm de espessura. Assim, nesta variedade

a média observada foi de 0,4 embriões somáticos por calo. Os explantes de 3 mm não apresentaram embriões diferenciados em nenhum dos genótipos.

Explantes maiores mantêm interações com seus tecidos, diminuindo o contato com o meio de cultura e este fato pode acarretar a diminuição da divisão celular e a predominância de interações simplásticas (BENKIRANE et al. 2000; BOUGET et al. 1998; HAYWOOD et al. 2002). Explantes de menor tamanho mostraram síntese de componentes da parede celular, como oligossacarídeos e podem atuar como sinais para a célula reiniciar seu ciclo mitótico, além de manter maior contato com o meio de cultura, o que pode deixar os explantes mais estressados fazendo assim com que aumentem seu metabolismo (TRAN THANH VAN e BUI, 2000; FEHER et al. 2003).

Para um protocolo de TCL ser incorporado a um programa de multiplicação de plantas depende de muitos fatores, incluindo a percepção correta do sinal e o processo de diferenciação no explante, a capacidade genética do explante em responder e reagir a este estímulo e também o estado e a origem fisiológica do tecido ou do órgão escolhido (SILVA e DOBRÁNSZKI, 2013).

A técnica TCL vem sendo largamente utilizada com bastante eficácia em algumas espécies de leguminosas e ornamentais (ROUT et al. 2006; HUANG et al. 2007). Porém, na cultura de tecidos em palmeiras praticamente não se tem trabalhos com algumas exceções. Steinmacher et al. (2007c) utilizaram a técnica TCL em pupunheira (*Bactris gasipaes* L.) e os resultados obtidos foram significativos, principalmente quanto a utilização de Picloram em altas concentrações para a indução da embriogênese somática (ES), tendo sido observado elevado número de calos primários. Scherwinski-Pereira et al. (2010) também observaram calos primários e após calos embriogênicos com a utilização de Picloram em altas concentrações (450 μ M). O presente trabalho também utilizou auxina Picloram para a indução da formação de calos primários e para sua proliferação e formação de calos com características embriogênicas.

O desenvolvimento dos embriões somáticos aconteceu de forma assincronizada, onde, em um mesmo grupo identificou-se diferentes estágios de desenvolvimento embriogênicos, incluindo os diferentes estádios de embriões somáticos (Figura 1C). Tais características foram encontradas também por Steinmacher et al. (2007a), que relataram que após os calos embriogênicos serem transferidos para o meio de regeneração ocorreu a formação de embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento.

Outros trabalhos visando a ES em palmeiras comprovaram que o Picloram em altas concentrações pode possuir um grande potencial e alta eficácia (KARUN et al. 2004; GUEDES et al. 2006; FERMINO JR. et al. 2007). Estes resultados contrastam com outros que mostram que o 2,4 ácido diclofenoxiacético (2,4 D) é a auxina mais importante na cultura de tecidos em palmeiras. Em outras espécies de plantas, o Picloram também se mostrou eficaz na indução da ES comparando com 2,4 D (SCHERWINSKI-PEREIRA et al. 2007). Ptak e Bach (2007) utilizaram hastes florais de *Tulipa gesneriana* L. cultivadas em meio MS com diferentes concentrações de Picloram, 2,4-D e ANA e verificaram que o Picloram foi à auxina mais eficiente na indução e formação de calos embriogênicos.

Para obter respostas satisfatórias na micropropagação também deve levar em conta o genótipo utilizado. O genótipo da planta mãe doadora tem um papel muito importante na resposta à indução da embriogênese somática (GUERRA et al. 2001). A avaliação dos genótipos apresentaram diferenças estatísticas importantes, mostrando uma grande diferença de porcentagem quanto à formação de calos com embriões somáticos e também quanto ao número de embriões formados por calos. Este mesmo perfil foi observado por Steinmacher et al. (2007b), onde observaram diferença significativa na comparação de dois genótipos de pupunheira na indução da ES a partir de inflorescências em diferentes estágios.

3.3 ANÁLISE MORFO-ANATÔMICA

A análise morfo-anatômica evidenciou que, após 64 semanas de cultivo, embriões somáticos em fase torpedo (Figura 5 A) obtidos a partir da técnica TCL, encontravam-se delimitados por uma protoderme bem definida (Figura 5 B) caracterizada por uma camada de células justapostas (Figura 5 D), bem como apresentaram a formação de células do procâmbio. Essas células procambiais caracterizaram-se como alongadas, formando o cordão procambial, apresentando dessa forma, seu maior eixo paralelo ao maior eixo do embrião (Figura C). Santos et al. (2006) observaram que o início da formação do procâmbio ocorreu somente quando os embriões somáticos estavam no estágio embriogênico mais avançado. Os embriões apresentaram duas estruturas anatômicas distintas: uma região distal alongada e o eixo

embrionário. O meristema fundamental apresentou células em intensas divisões caracterizadas por citoplasma denso e núcleos proeminentes.

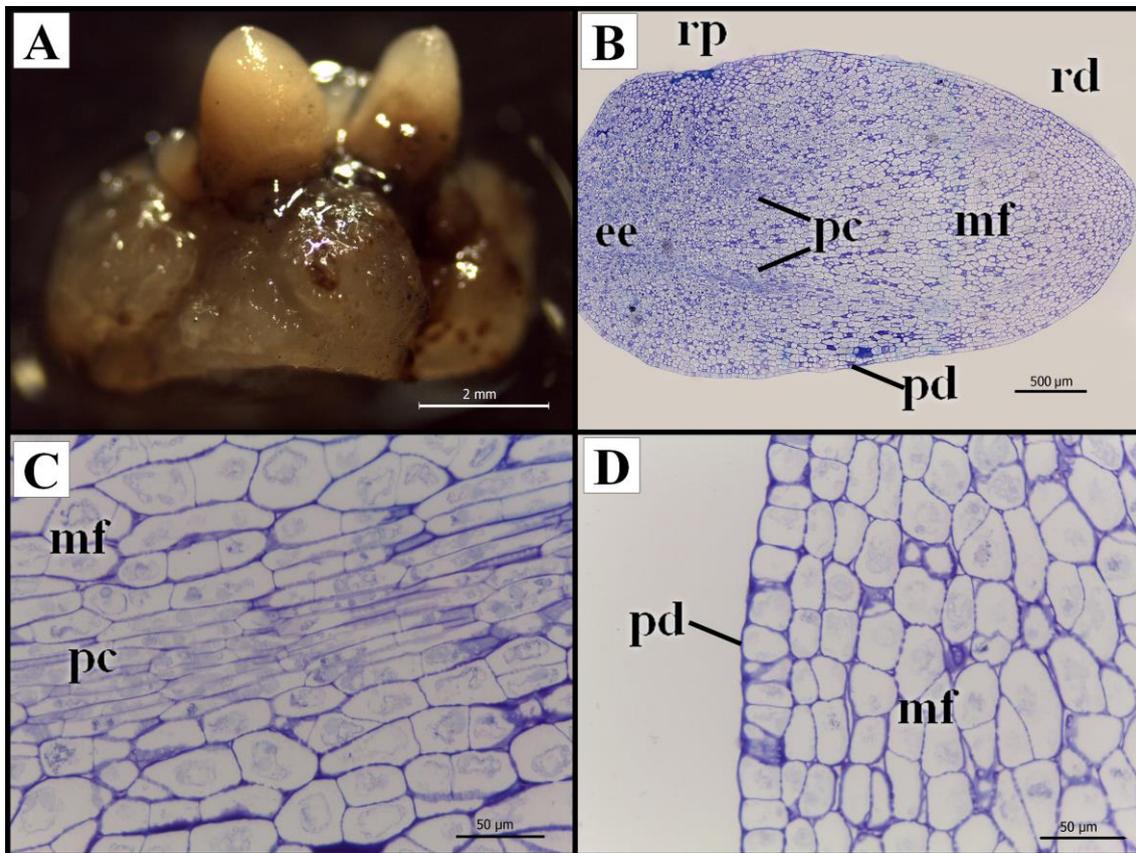


Figura 5. Eventos morfo-anatômicos durante a embriogênese somática em palma de óleo. A) Embriões somáticos em fase torpedo; B) Secção longitudinal de um embrião somático em estágio avançando de desenvolvimento, delimitado pela protoderme, evidenciando o eixo embrionário, procâmbio e meristema fundamental; C) Meristema fundamental apresentando divisão celular e, procâmbio com células alongadas; D) Protoderme formada por única camada celular e meristema fundamental formado por células com citoplasma denso. Abreviações: (rp) região proximal; (rd) região distal; (pd) protoderme; (ee) eixo embrionário; (pc) procâmbio; e (mf) meristema fundamental. Barras (A) 2 mm; (B) 500 µm; (C e D) 50 µm.

4. CONCLUSÕES

A técnica *Thin Cell Layer* (TCL) permite induzir a embriogênese somática em palma de óleo. A espessura do explante apresenta influência na resposta de indução e diferenciação de embriões somáticos, onde explantes de menor espessura (até 2 mm) se mostram os mais responsivos. Os genótipos também exercem influência na indução da embriogênese somática, pois se encontram sob mesmas condições de cultivo e mostraram importantes diferenças quanto à percentagem de calos com embriões somáticos e número de embriões somáticos por calo. Desta forma é preciso desenvolver novos trabalhos com o intuito de aperfeiçoar e também buscar compreender melhor todo o processo de embriogênese somática tentando otimizar seus protocolos e diferentes etapas envolvidas no processo, uma vez que um eficiente protocolo pode proporcionar trabalhos de reclone de indivíduos. Esse fato poderia facilitar a multiplicação de genótipos elite já estabelecidos em laboratório, além de simplificar sobremaneira o acesso de materiais de interesse e isentos de contaminação, justificando, assim, a criação de coleções *in vitro*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, S. A. O.; LEMOS, O. F.; FILHO, B. G. S.; SILVA, A. L. L. *In vitro* embryo rescue of interspecific hybrids of oil palm (*Elaeis oleifera* x *Elaeis guineensis*). **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 2, n. 2, p. 1-6, 2011.

AMARAL, A. F. C. **Comportamento *in vitro* de explantes de matrizes de cenoura (*Daucus carota* L.) tratadas com variáveis níveis de potássio**. Dissertação (mestrado) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, 103 p., 2003.

AMARAL, L. **Conservação e propagação *in vitro* de três cultivares híbridas de amarílis**. Dissertação (mestrado) Instituto Agronômico (IAC), Campinas, 2005.

BALZON, T. A.; CAMILLO, J.; LUIS, G. Z.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. **Resgate de embriões e análise comparativa da germinação *in vitro* de germoplasma de dendezeiro**. 6º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel, 2007, Montes Claros, MG. Anais do 6º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel, 2007.

BENKIRANE, H.; SABOUNJI, K.; CHLYAH, A.; CHLYAH, H. Somatic embryogenesis and plant regeneration from fragments of immature inflorescences and coleoptiles of durum wheat. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 61, p. 107-113, 2000.

BISWAS, M. K.; ISLAM, R.; HOSSAIN, M. Somatic embryogenesis in strawberry (*Fragaria* sp.) through callus culture. **Plant Cell, and Tissue Organ Culture**, v. 90, p. 49-54, 2007.

BOUGET, F. Y.; BERGER, F.; BROWNLEE, C. Position dependent control of cell fate in the *Fucus* embryo: role of intercellular communication. **Development**, v. 125, p. 1999-2008, 1998.

CARVALHO, A. V. de; ALVES, B. J. R. e REIS, V. M. Resposta do dendezeiro à adição de nitrogênio e sua influência na população de bactérias diazotróficas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 2, p. 293-300, 2006.

CUNHA, R. N. V.; LOPES, R.; ROCHA, R. N. C.; LIMA, W. A. A.; TEIXEIRA, P. C.; BARCELOS, E.; RODRIGUES, M. R. L.; RIOS, A. S. **Domestication and Breeding of the American Oil Palm**. In: BORÉM A, LOPES, M. T. G.; CLEMENT C. R. (Ed). Domestication and Breeding: Amazon species. Suprema Editora Ltda, Viçosa, p. 275-296, 2012.

DELPORTE, F.; MOSTADE, O.; JACQUEMIN, J. M. Plant regeneration through callus initiation from thin mature embryo fragments of wheat. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 67, p. 73-80, 2001.

FEHER, 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.

FERMINO, JR. P. C. P.; SILVA, R. A.; MACIEL, S. A.; GUEDES R. S.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Análises morfo-histológicas da embriogênese somática de açaizeiro (*Euterpe oleraceae* Mart.). **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 1, p. 845-848, 2007.

FERREIRA, D. F. **Programa de análises estatísticas (statistical analysis software) e planejamento de experimentos – SISVAR 5.0 (Build 67)**. Lavras: DEX/UFLA, 2003.

FINSTAD, K.; BROWN, D. C. W.; JOY, K. Characterization of competence during induction of somatic embryogenesis in alfalfa tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 34, p. 125-132, 1993.

- GUEDES, R. S.; MACIEL, S. A.; PEREIRA, J. E. S. **Indução da embriogênese somática em açaizeiro a partir de embriões zigóticos imaturos**. XIX Congresso Brasileiro de Fruticultura, Cabo Frio. Anais. Rio de Janeiro: UFRRJ. v. 1, p. 354-354, 2006.
- GUEDES, R. S.; SILVA, T. L.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Initial requirements for embryogenic calluses initiation in *thin cell layers* explants from immature female oil palm inflorescences. **African Journal of Biotechnology**, 2011.
- GUERRA, M. P. **Embriogênese somática em *Euterpe edulis* Mart. (Palmae)**. TESE. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. São Paulo. 1989.
- GUERRA, M. P.; HANDRO, W. Somatic embryogenesis and plant regeneration in embryo cultures of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae). **Plant Cell Report**, v. 7, p. 550-552, 1998.
- GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. **Embriogênese somática e sementes sintéticas**. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; (Ed.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: EMBRAPA, v. 2, p. 533-568, 1999.
- GUERRA, M. P.; DAL VESCO, L. L.; DUCROQUET, J. P. H. J.; NODARI, R. O.; REIS, M. S. Somatic embryogenesis in goiabeira serrana: genotype response, auxinic hock and synthetic seeds. **Revista Brasileira Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 2, p. 117-128, 2001.
- HAYWOOD, V.; KRAGLER, F.; LUCAS, W. J. Plasmodesmata: pathways for protein and ribonucleoprotein signaling. **Plant Cell**, v. 14, p. 303-325, 2002.
- HUANG, X.; NABIPOUR, A.; GENTZBITTEL, L.; SARRAFI, A. Somatic embryogenesis from thin epidermal layers in sunflower and chromosomal regions controlling the response. **Plant Science**, v. 173, p. 247-252, 2007.
- KARUN, A.; SIRIL, E. A.; RADHA, E.; PARTHASARATHY, V. A. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from leaf and inflorescence explants of arecanut (*Areca catechu* L.). **Current Science**, v. 86, p. 1623-1628, 2004.
- KONAN, E. E.; DURAND-GASSELIN, T.; KOUADIO, J. Y.; FLORI, A.; RIVAL, A. A modeling approach of the *in vitro* conversion of oil palm (*Elaeis guineensis*) somatic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 84, p. 99-112, 2006.
- KONAN, K. E.; DURANT-GASSELIN, T.; KOUADIO, Y. J.; FLORI, A.; RIVAL, A.; DUVAL, Y.; PANNETIER, C. *In vitro* conservation of oil palm somatic embryo for 20 years on a hormone-free culture medium: characteristics of the embryogenic cultures, derived plantlets and adult palms. **Plant Cell Reports**, v. 29, n. 1, p. 1-13, 2010.
- LEDO, A. S.; LAMEIRA, O. A.; e MENEZES, I. C. **Embriogênese somática e regeneração de plantas em açaizeiro**. Rio Branco: Embrapa Acre (Boletim de Pesquisa), v. 34, p. 22, 2002.
- MANTELL, S. H.; MATTHEWS, J. A. e Mc KEE, R. A. **Princípios da Biotecnologia em Plantas - uma introdução à engenharia genética em plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, p. 344, 1994.
- MICHOUX-FERRIERE, N.; GROUT, H.; CARRON, M.P. Origen and ontogenesis of somatic embryos in *Hevea brasiliensis* (Euphorbiaceae). **American Journal of Botany**, v.79, p.174-180, 1992.
- MIRAGAYA, J. C. G. **Biodiesel: tendências no mundo e no Brasil**. Informe Agropecuário, v. 26, p. 7-13, 2005.

- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plant**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NHUT D. T.; BUI V. L.; TEIXEIRA DA SILVA J. A.; ASWATH C. R. Thin cell layer culture system in *Lilium*: regeneration and transformation perspectives. **In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 37, p. 516-523, 2001.
- NHUT, D. T.; SILVA, J. A. T.; ASWATH, C. R. The importance of the explants on regeneration in thin cell layer technology. **In vitro Cellular Developmental Biology - Plant**, v. 39, p. 266-276, 2003.
- O' BRIEN T. P.; FEDER N.; MCCULLY M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. **O Protoplasma**. V. 59, p. 368-373, 1964.
- OLIVEIRA, F. C. C.; SUAREZ, P. A. Z.; SANTOS, W. L. P. **Biodiesel: possibilidades e desafios**. Química Nova na Escola, n. 8, p. 3-8, 2008.
- PTAK, A.; BACH, A. Somatic embryogenesis in tulip (*Tulipa gesneriana* L.) flower stem cultures. **In vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, v. 43, p. 35-39, 2007.
- PESCADOR R.; KERBAUY, G. B.; VIVIANI, D.; KRAUS, J. E. Anomalous somatic embryos in *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret (Myrtaceae)¹. **Revista Brasil Bot**, v. 31, n. 1, p. 155-164, 2008.
- PIERIK, R. L. M. **Cultivo in vitro de las plantas superiores. Tradução por Luís Ayerbe Mateo-Sagasta**. *In vitro* culture of higher plants, cap.12, 326 p., 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**, v. 75, p. 41-47, 2003.
- ROUT, G. R.; MOHAPATRA, A.; JAIN, S. M. Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 531-560, 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 Biology Technology**, v. 49, p. 49-55, 2006.
- SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. S.; MACIEL, T. M. S.; COSTA, F. H da S.; PEREIRA, M. A. A.. Germinação *in vitro* de embriões zigóticos de murmuru (*Astrocaryum ulei*). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 2, p. 251-256, 2006.
- SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; MACIEL, S. A.; FERMINO JR, P. C. P. Indução da embriogênese somática em pupunheira (*Bactris gasipaes* H. B. K.) a partir de embriões zigóticos imaturos. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 1, p. 849-852, 2007.
- SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; GUEDES, R. S.; SILVA T. L.; FERMINO, J. R. P. C. P.; COSTA, F. H. S. Somatic embryogenesis and plant regeneration from oil palm thin cell layer technique. **In vitro Cellular and Development Biology - Plant**, v. 46, n. 4, p. 378-385, 2010.
- SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; GUEDES, R. S.; SILVA, R.A.; FERMINO, P. C. P. JR.; LUIS, Z. G.; FREITAS, E. O. Somatic embryogenesis and plant regeneration in açai palm (*Euterpe oleracea*). **Plant Cell Tiss Org Cult**, v. 109, p. 501-508, 2012.

- SILVA, J. A. T. Thin cell layer technology in ornamental plant micropropagation and biotechnology. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, p. 683–691, 2003.
- SILVA, P. R. F.; FREITAS, T. F. S. Biodiesel: o ônus e o bônus de produzir combustível. **Ciência Rural**, v. 38, n. 3, p. 843-851, 2008.
- SILVA, R. C.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA J. E. Differential responses to somatic embryogenesis of different genotypes of Brazilian oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Plant Cell Tiss Org Cult**, v. 111, p. 59-67, 2012.
- SILVA, J. A. T.; DOBRÁNSZKI, J. Plant *Thin Cell Layers*: a 40-year celebration. **The Journal of Plant Growth Regulation**, v. 32, p. 922-943, 2013
- STEINMACHER, D. A.; CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; CLEMENT, C. R.; GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis from peach palm zygotic embryos. **In vitro Cellular Development Biology-Plant**, 2007 a.
- STEINMACHER, D. A.; CLEMENT, C. R. e GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis from immature peach palm inflorescence explants: towards development of an efficient protocol. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 89, p. 15-22, 2007 b.
- STEINMACHER, D. A.; KROHN, N. G.; DANTAS, A. C. M.; STEFENON, V. M.; CLEMENT, C. R. e GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis in peach palm using the Thin Cell Layer Technique: Induction, morpho-histological aspects and AFLP analysis of somaclonal variation. **Annals of Botany**, p. 1-11. 2007 c.
- TEIXEIRA, J. B.; SONDAHL, M. R.; NAKAMURA, T. e KIRBY, E. G., Establishment of oil palm cell suspensions and plant regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 40, p. 105-111. 1995.
- TOMES, D. T. Cell culture, somatic embryogenesis and plant regeneration in maize, rice, sorghum and millets. In: BRIGHT, S. W.; JONES, M. G. K. (Ed.) **Advances in agricultural biotechnology, cereal tissue and cell culture**, p. 175-203, 1985.
- TRAN THANH VAN K.; BUI, V. L. **Curent status of thin cell layer method for the induction of organogenesis or somatic embryogenesis**. In: Mohan SJ, Gupta PK, Newton RJ, eds. Somatic embryogenesis in woody plants. Dordrecht: Kluwer Academic, v. 6, p. 51-92, 2000.
- TRAN THANH VAN, M.; DIEN, N. T.; CHLYAH, A. Regulation of organogenesis in small explants of superficial tissue of *Nicotiana tabacum*. **L. Planta**, v. 119, p. 149-159, 1974.
- USDA - **Serviço de Pesquisa Econômicado Departamento de Agricultura dos Estados Unidos**, 2014. Disponível em: <https://www.ers.usda.gov/> Acessado em: 20 de setembro de 2017.
- VALVERDE, R.; ARIAS, O.; THORPE, T. A. Picloram-induced somatic embryogenesis in pejobaye palm (*Bactris gasipaes* H.B.K.). **Plant Cell Tiss Org Cult**, v. 10, p. 149-156, 1987.
- VERDEIL, J. L.; BUFFARD-MOREL, J. Somatic embryogenesis in coconut (*Cocos nucifera* L.). In: Bajaj YPS (ed) Somatic embryogenesis and synthetic seed. **Biotechnology in agriculture and forestry**, v. 30, p. 299-317, 1995.
- VIÉGAS, I. J. M.; MÜLLER, A. A. **A cultura do dendezeiro na Amazônia Brasileira**. Belém: EMBRAPA/CPATU, p. 374, 2000.

YANG, X.; ZHANG, X. Regulation of Somatic Embryogenesis in Higher Plants. **Plant Science**, v. 29, p. 36-57, 2010.

ZIMMERMAN, J. L. Somatic Embryogenesis: A Model for Early Development in Higher Plants. **The Plant Cell**, v. 5, p. 1411-1423, 1993.

ZONTA, E. P.; MACHADO, A. A. **SANEST - Sistema de Análise Estatística para Microcomputadores**. Registrado na Secretaria Especial de Informática sob n 066060 - categoria A. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brazil, 1998.

CAPÍTULO 3

REPRODUÇÃO VEGETATIVA E ANÁLISE MOLECULAR DE RETROCRUZAMENTOS INTERESPECÍFICOS DE PALMA DE ÓLEO (*Elaeis* spp.) REGENERADOS POR EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

REPRODUÇÃO VEGETATIVA E ANÁLISE MOLECULAR DE RETROCRUZAMENTOS INTERESPECÍFICOS DE PALMA DE ÓLEO (*Elaeis* *spp.*) REGENERADOS POR EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo descrever um método para a reprodução vegetativa por embriogênese somática de retrocruzamentos interespecíficos de palma de óleo (*Elaeis spp.*), bem como, analisar a fidelidade genética e epigenética dos regenerantes por meio da utilização de marcadores ISSR e AFLP (MSAP). A partir de 195, 281 e 198 embriões zigóticos (EZ) de sementes maduras dos respectivos retrocruzamentos interespecíficos SQ150, SR78 e SR84, calos primários (CP) e embriogênicos (CE) foram obtidos e regenerados, sob as mesmas condições do protocolo desenvolvido no Capítulo 1, com algumas modificações. Para a análise molecular, 36 plantas de 3 diferentes embriões zigóticos considerados como matrizes foram aleatoriamente avaliadas por marcadores ISSR e AFLP (MSAP) quanto a possíveis variações genéticas e epigenéticas. Após 36 meses do início do cultivo, as taxas de regeneração alcançaram entre 6,2% e 34,2% dos EZ inoculados inicialmente. Quando se avaliou os regenerantes por ISSR foi possível inferir que os indivíduos regenerados de EZ podem apresentar entre 97,5% e 100% de similaridade quando avaliadas dentro da mesma matriz que lhe deram origem (intrapopulações). No entanto, quando os indivíduos são comparados com plantas regeneradas de outros EZ utilizados como matrizes, a variabilidade genética entre os indivíduos é superior a 20%, ou seja, com similaridade genética de apenas 80% (interpopulações). Na análise por AFLP (MSAP) verificou-se a amplificação de 357 locos nas 36 plantas avaliadas. Nessas amplificações, constatou-se que 69% destas regiões revelaram-se sensíveis à metilação e, destas, 58% foram ocasionadas pelo ganho de fragmentos, ou seja, pela hipometilação do DNA genômico.

Palavras chaves: *Arecaceae*, *Elaeis guineensis*, *Elaeis oleifera*, embriogênese somática, ISSR, AFLP (MSAP), metilação do DNA.

**VEGETATIVE REPRODUCTION AND MOLECULAR ANALYSIS OF
INTERSPECIFIC BACKCROSSES OF OIL PALM (*Elaeis* spp.)
REGENERATED BY SOMATIC EMBRYOGENESIS**

ABSTRACT

The present work aimed to describe a method for vegetative reproduction of zygotic embryos (ZE) from interspecific backcrosses of oil palm by somatic embryogenesis, as well as to analyze genetically and epigenetically the regenerated plants through ISSR and AFLP markers. From 195, 281 and 198 ZE of the respective interspecific backcrosses SQ150, SR78 and SR84, primary and embryogenic calli were obtained and regenerated under the same experimental conditions developed in Chapter 1, with minor modifications. Additionally, 36 regenerated plants from three different zygotic embryos (considered as matrices) were randomly evaluated by ISSR and AFLP (MSAP) markers. After 36 months of culture, plant regeneration rates ranged from 6.2% to 34.2%. When the regenerants were evaluated by ISSR, it was possible to infer that regenerated individuals of ZE can present between 97.5% and 100% of similarity when evaluated within the same matrix that originated them (intrapopulations). However, when individuals are compared with regenerated plants from other ZE used as matrices, they showed genetic variability of more than 20%, that is, genetic similarity of only 80% (interpopulations). In the analysis performed by the AFLP (MSAP), 357 loci were amplified. In these amplifications, it was verified that 69% of these regions were sensitive to methylation and of these, 58% were caused by the gain of fragments, that is, by the hypomethylation of the genomic DNA.

Keywords: *Arecaceae*, *Elaeis guineensis*, *Elaeis oleifera*, somatic embryogenesis, ISSR, AFLP (MSAP), DNA methylation.

1. INTRODUÇÃO

Os impactos sobre o clima devido à emissão de gases causadores do efeito estufa, bem como o esgotamento dos recursos naturais, surgem como a principal restrição imposta à sustentabilidade dos atuais padrões de utilização de combustíveis fósseis - petróleo, carvão mineral, gás natural e seus derivados - no longo prazo (INTERACADEMY COUNCIL, 2007).

Dessa forma, o conceito de biocombustíveis (combustíveis à base de biomassa vegetal) produzidos a partir de fontes renováveis, tem ganhado especial atenção internacional por apresentar uma importante oportunidade para substituir os combustíveis convencionais pelos biocombustíveis (TOLMASQUIM, 2012). À exceção de outros países, em substituição à gasolina, o Brasil tem utilizado consideráveis quantidades do biocombustível etanol como combustível veicular. Todavia, os sistemas de transporte em todo o resto do mundo continuam dependendo quase que exclusivamente dos derivados de petróleo (KOHLHERPP, 2010).

Além do etanol, o Brasil também é produtor e consumidor de biodiesel. O biodiesel é um combustível renovável capaz de substituir total ou parcialmente o óleo diesel, tanto nos setores de transporte, como nos de energia, reduzindo, assim, a dependência dos combustíveis fósseis e colaborando para o desenvolvimento sustentável (COSTA et al. 2013).

Entre as culturas oleaginosas potenciais, a palma de óleo apresenta grande destaque, por ser uma cultura com elevada produtividade de óleo vegetal (5 a 7 ton/ha/ano) em comparação a outras espécies, sendo atualmente a principal fonte de óleo vegetal no mundo (FEROLDI et al. 2014). No entanto, a produção mundial do óleo de palma se concentra em sua grande maioria no Sudeste Asiático, especialmente Malásia e a Indonésia, enquanto a produção brasileira, no mercado mundial, representa somente 0,6% (OIL WORLD, 2012).

De acordo com Lopes et al. (2012), o principal entrave à expansão do cultivo e exploração da palma de óleo na América do Sul e Central é uma anomalia de etiologia desconhecida denominada amarelecimento fatal (AF). Tal anomalia ocorre em quase todos os países produtores da palma de óleo no continente e seu método de controle ainda é inexistente.

Apesar dos estudos realizados nas últimas décadas, ainda não se encontrou um método de controle eficaz do AF, mas sabe-se que o Caiuê, ou palma de óleo

americana [*E. oleifera* (Kunth) Cortés] e seu híbrido com o dendezeiro (*E. guineensis*) produzem descendentes viáveis que geralmente não são afetados pela anomalia (BARCELOS et al. 2002).

Nesse sentido, é importante estabelecer genótipos que possuam características intermediárias aos dois parentais, além de uma ampla base genética para maior estabilidade às pressões bióticas existentes e possibilidades de progresso a partir da seleção desses genótipos (RIOS et al. 2012). Para tanto, a transferência ou introgressão de genes de uma espécie silvestre para um genótipo-elite é comumente realizada pelo método de retrocruzamento (CAIXETA et al. 2015).

Retrocruzamento é um método utilizado no melhoramento genético de plantas que consiste na hibridação entre uma planta F1 (descendente de um cruzamento) com um de seus genitores. Este método permite transferir um ou poucos genes de um dos genitores, denominado genitor doador, para o GR (BESPALHOK et al. 2011).

Nesse sentido, o programa de melhoramento genético da palma de óleo no Brasil tem seguido duas linhas: a) melhoramento de híbridos F1 buscando-se identificar combinações entre caiaué (*E. oleifera*) x dendê (*E. guineensis*) para produção de híbridos com potencial de cultivo comercial e (CUNHA et al. 2005), b) retrocruzamentos sucessivos de híbridos F1 (*E. oleifera* x *E. guineensis*) com *E. guineensis*.

Todavia, não é possível realizar a propagação dos híbridos interespecíficos da palma de óleo por métodos convencionais, sendo o gênero *Elaeis* reproduzido exclusivamente por sementes, as quais podem apresentar dormência, germinação lenta e, sobretudo, proporcionar plantas com alta variabilidade genética em razão da combinação de genitores por meios sexuais (PÁDUA, 2012, GOMES et al. 2017). Adicionalmente, a partir de retrocruzamentos controlados, as hibridações interespecíficas formam indivíduos únicos (cada semente é considerada um indivíduo geneticamente diferente), impedindo que repetições possam ser formadas e avaliadas com maior precisão em campo, fatores que podem levar a erros de interpretações nas avaliações fenotípicas ao longo dos anos.

A cultura de tecidos aliada ao melhoramento genético convencional, pode permitir a reprodução de mudas por embriogênese somática, criando assim, a possibilidade de ser um suporte prático para alcançar resultados mais rápidos nos programas de melhoramento genético, especialmente no relacionado à fixação de caracteres da geração F₁ através dos cruzamentos de híbridos interespecíficos, ou

mesmo nos retrocruzamentos entre híbridos F1 (*E. oleífera* x *E. guineensis*) x *E. guineensis* (GOMES JR et al. 2014).

Estudos relacionados à reprodução vegetativa de retrocruzamentos interespecíficos em palma de óleo ainda são incipientes, não havendo no Brasil estudos a respeito. Dessa forma, torna-se essencial a elaboração de eficientes métodos de reprodução vegetativa destes genótipos, tanto para se avançar com as primeiras gerações de retrocruzamentos, como para aqueles indivíduos já selecionados em populações de cruzamentos que apresentam alta eficiência na produção de óleo, mas que, por serem indivíduos únicos, não podem ser multiplicados por técnicas convencionais devido à segregação genética.

Visando identificar o potencial genético de um genótipo antes da expressão de um fenótipo, o uso de marcadores moleculares é indicado como uma importante ferramenta para a identificação e o acesso a variações genéticas entre os indivíduos. Além disso, eles também podem ser usados para associar tais variações a uma característica de interesse ao melhoramento (CAIXETA et al. 2015). Para a detecção de possíveis variações genômicas e epigenéticas, diversos marcadores moleculares vêm sendo utilizados com sucesso (LEI et al. 2006; GANTAIT et al. 2015). Entre eles, os marcadores ISSR e AFLP vêm se destacando devido ao seu elevado grau de polimorfismo e reprodutibilidade. Além disso, esses marcadores não necessitam do desenvolvimento de *primers* específicos e nem do conhecimento prévio do genoma da espécie em estudo (KUMAR et al. 2009; ARIF et al. 2010).

Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo descrever um método para a reprodução vegetativa por embriogênese somática de retrocruzamentos interespecíficos de palma de óleo, a partir de embriões zigóticos, bem como, analisar a fidelidade genética e epigenética dos regenerantes por meio da utilização de marcadores ISSR e AFLP (MSAP).

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCT-II) (ensaios de embriogênese somática e análises ISSR) e no Laboratório de Genética Vegetal (LGV) (análises AFLP) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - Cenargen, em Brasília – DF, Brasil.

2.1 REPRODUÇÃO VEGETATIVA DE RETROCRUZAMENTOS INTERESPECÍFICOS DE PALMA DE ÓLEO (*Elaeis* spp.) POR EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

Para a indução da embriogênese somática foram utilizados embriões zigóticos de sementes maduras de retrocruzamentos interespecíficos de palma de óleo (*Elaeis oleifera* x *Elaeis guineensis*), genótipos SQ150, SR78 e SR84 (Figura 1). As sementes foram cedidas pelo Programa de Melhoramento Genético de Palma de Óleo, conduzido pela Embrapa Amazônia Ocidental (Estação Experimental do Rio Urubu), localizada em Rio Preto da Eva, Amazonas - AM, Brasil.

<p>SQ 150:</p> <ul style="list-style-type: none">- Matrícula de campo do Genitor Materno: B35 31 3;- Código do Genitor Materno: RU 3724 D;- Código do Genitor Paterno: RU 2681 P;- Origem do Genitor Materno: CAC 48 x LM 2032 T;- Origem do Genitor Paterno: LM 2 T AF. <p>SR 84:</p> <ul style="list-style-type: none">- Matrícula de campo do Genitor Materno: B35 26 5;- Código do Genitor Materno: RU 3720 D;- Código do Genitor Paterno: RU 2709 P;- Origem do Genitor Materno: CAC 33 x LM 3038 D;- Origem do Genitor Paterno: LM 2 T AF. <p>SR 78:</p> <ul style="list-style-type: none">- Matrícula de campo do Genitor Materno: B35 20 514;- Código do Genitor Materno: RU 3713 D;- Código do Genitor Paterno: RU 34 P;- Origem do Genitor Materno: LM 3323 D x CAI 110;- Origem do Genitor Paterno: LM 2 T AF.
--

Figura 1. Genealogia dos retrocruzamentos de palma de óleo utilizados para a reprodução vegetativa por embriogênese somática.

Inicialmente, o endocarpo das sementes foi removido com o auxílio de um torno mecânico para a obtenção das amêndoas. Em câmara de fluxo laminar, as amêndoas foram submetidas a um processo de desinfestação pela imersão em álcool 70% durante 3 minutos, seguida de imersão de 40 minutos, em solução de alvejante comercial a 100% (2 a 2,5% de cloro ativo), adicionado de uma gota de Tween-20 (Sigma, St. Louis, MO) para cada 100 mL dessa solução. Posteriormente foram efetuados três enxagues com água destilada autoclavada para a remoção residual dos agentes desinfestantes usados nesse processo. Para facilitar a excisão do embrião, as sementes foram imersas em água esterilizada durante 24 h antes da excisão do embrião. Uma vez excisados sob fluxo laminar, com a ajuda de pinças e bisturis, os embriões foram re-

hidratados em água estéril durante 1-2 horas e, posteriormente, inoculados em meio de cultura.

O número total de embriões zigóticos utilizados em cada um dos retrocruzamentos foi de 195, 281, 198, para os genótipos SR78, SR84 e SQ150, respectivamente. Em cada placa de petri (15 x 90 mm) foram colocados em média 10 embriões zigóticos. Cada embrião zigótico (EZ) foi considerado como único indivíduo.

A reprodução vegetativa e a obtenção de plantas foram avaliadas em dois períodos de tempo distintos: aos cinco meses e aos 36 meses após o início do cultivo.

Neste experimento, a metodologia utilizada seguiu aquela estabelecida no cap 1, com algumas modificações.

2.1.1 INDUÇÃO DE CALOS EMBRIOGÊNICOS

A indução de calos foi realizada em placas de petri (15 x 90 mm), com 25 mL de MS modificado (MURASHIGE e SKOOG, 1962), acrescido de 20 g.L⁻¹ de sacarose, 0,5 g.L⁻¹ de L-glutamina e 2,5 g.L⁻¹ de carvão ativado. A este meio de cultura foi adicionado ainda a auxina Picloram (4 amino – 3,4,6-ácido tricloro picolínico) na concentração de 450 µM, de acordo com a metodologia proposta por Scherwinski-Pereira et al. (2010).

Durante o período de indução de calos, as culturas foram acondicionadas no escuro, em sala de crescimento, com temperatura de 25 ± 2 °C e subcultivadas a cada quatro semanas no mesmo meio de cultura, onde permaneceram por um período de 150 dias até serem transferidas para o meio de multiplicação de calos.

Nesta primeira etapa do estudo, as avaliações referentes a formação de calos primários e calos embriogênicos foram feitas a cada 30 dias, por um período de até 150 dias. Para tal, as seguintes variáveis foram avaliadas: formação de calos primários e formação de calos embriogênicos.

A formação de calos primários foi determinada pelo aparecimento ou não aparecimento de calos primários, bem como o número de embriões formados a partir de calos primários.

2.1.2 MULTIPLICAÇÃO E MANUTENÇÃO DE CALOS

Para a multiplicação de calos, após cerca de 150 dias em meio de indução, as culturas foram transferidas para meio de MS modificado com 20 g.L⁻¹ de sacarose, acrescido de 0,5 g.L⁻¹ de glutamina, 0,5 g.L⁻¹ de caseína hidrolisada, 10 µM 2-isopenteniladenine (2iP) e 40 µM de Picloram, sem carvão ativado.

Em ambas as etapas (indução e multiplicação de calos), as culturas foram acondicionadas no escuro, em sala de crescimento, com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e subcultivadas a cada quatro semanas para o mesmo meio de cultura, onde permaneceram até estarem morfológicamente prontas para passarem para o meio de diferenciação (cerca de três meses).

2.1.3 DIFERENCIAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS

Para a diferenciação de embriões somáticos, os calos formados e multiplicados foram cultivados em meio de MS modificado, com 30 g.L^{-1} de sacarose, 1 g.L^{-1} de glutamina, $12,3 \mu\text{M}$ de 2iP (2-isopenteniladenina) e $0,54 \mu\text{M}$ de ANA (ácido naftalenoacético), desprovido de carvão ativado.

Nesta etapa, o material foi mantido em sala de crescimento nas mesmas condições de temperatura e ausência de luz (descritas nas duas fases anteriores), até a etapa de início da regeneração dos embriões somáticos diferenciados.

2.1.4 REGENERAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS

Para o desenvolvimento das plantas, calos contendo embriões diferenciados foram transferidos para tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 10 mL do meio de MS modificado, com a metade da concentração de sais e vitaminas totais, 20 g.L^{-1} de sacarose e $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ de carvão ativado, desprovido de reguladores de crescimento.

Nesta etapa, as culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e radiação luminosa de $52 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas LED (Philips® - Green Power 20W 60Hz), onde permaneceram até estarem aptas para a fase de enraizamento.

Na segunda etapa do estudo, aos 36 meses, as culturas foram avaliadas com relação ao número de embriões somáticos formados a partir de calos primários, número de plantas em fase de desenvolvimento e plantas regeneradas.

O número de embriões somáticos formados por calo foi determinado em 5 classes: classe 0: nenhum embrião somático produzido; classe 1: 1 a 3 embriões somáticos por explante; classe 2: 4 a 10 embriões somáticos por explante; classe 3: > 10 embriões somáticos por explante e, por fim, a classe x: morte ou contaminação do material vegetal. Para as variáveis plantas em fase de desenvolvimento e plantas regeneradas, as mesmas foram contabilizadas individualmente.

2.1.5 OTIMIZAÇÃO DO ENRAIZAMENTO *IN VITRO* DAS PLANTAS

Após a etapa de regeneração, as plantas desprovidas de raízes foram inicialmente individualizadas e, posteriormente, induzidas ao enraizamento *in vitro*, seguindo a metodologia descrita por Gomes et al. (2016). Para tanto, as plantas incompletas foram cultivadas em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 10 mL de meio de MS, com 30 g.L⁻¹ de sacarose, suplementado de 53,7 µM de AIB (ácido indolbutírico).

As plantas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 horas e radiação luminosa de 52 µmol.m⁻².s⁻¹ fornecida por lâmpadas LED (Philips® - Green Power 20W 60Hz), onde permaneceram até o surgimento de pelo menos duas raízes para posteriormente serem aclimatadas em casa de vegetação.

2.1.6 CARACTERÍSTICAS COMUNS DO CULTIVO *IN VITRO* DA PALMA DE ÓLEO

Todos os meios utilizados no estudo foram geleificados com 2,5 g.L⁻¹ de Phytigel (Sigma®) e o pH foi ajustado para 5,8 ± 0,1, antes da adição do geleificante. Os meios foram esterilizados por meio de autoclavagem a 121 °C durante 20 min.

2.1.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software livre estatístico R.

Para o teste χ^2 , considerou-se hipótese nula H_0 = quando a proporção de réplicas entre as classes 1, 2 e 3 foi homogênea e para hipótese alternativa H_a = quando ao menos um par de classes apresentou diferença significativa com relação ao número de embriões somáticos obtidos via embriogênese somática. $\chi^2 = (P < 0,001)$, significativo ao nível $\alpha = 5\%$.

2.2 ANÁLISE MOLECULAR EM PLANTAS DE RETROCRUZAMENTOS INTERESPECÍFICOS DE PALMA DE ÓLEO (*Elaeis* spp.), REGENERADAS POR EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

Para as análises moleculares, folhas jovens de plantas regeneradas a partir de três indivíduos/matrizes, identificados como 1, 2 e 3, foram utilizados como fontes doadoras

de DNA genômico. Nessa amostragem, para cada um dos três indivíduos/matrizes foram utilizadas 12 plantas regeneradas por embriogênese somática do retrocruzamentos interespecíficos SQ150, totalizando, dessa forma, 36 indivíduos. A escolha do genótipo para as análises moleculares se deu pelo fato do genótipo SQ150 apresentar maior disponibilidade de material para as amostragens e com maior homogeneidade de desenvolvimento.

2.2.1 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

A extração do DNA genômico seguiu a metodologia modificada de Doyle e Doyle (1990). Para isso, o material vegetal foi colocado em microtubos de 2 mL de capacidade contendo duas *beads* de porcelana e 700 µL da solução CTBA + 2-mercaptoetanol. Em seguida, as amostras foram trituradas por 40 segundos em *TissueLyser* e então incubadas por uma hora em banho-maria a 65 °C sob agitação ocasional a cada 10 minutos. Após a incubação foram adicionados à mistura 600 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) para auxiliar na purificação do DNA. Posteriormente, os microtubos foram centrifugados a 11.000 rpm por 10 minutos e a fase sobrenadante resultante transferida para novos microtubos, onde 400 µL de isopropanol frio foram adicionados para precipitação do DNA.

Em seguida, os microtubos foram incubados a -20 °C por 1 hora sob agitação ocasional a cada 15 minutos. Após a incubação, o isopropanol foi descartado e o *pellet* de DNA lavado duas vezes com 500 µL de etanol 70% e uma vez em 500 µL de etanol 100%. Após as lavagens, o DNA foi seco em temperatura ambiente por 12 horas, ressuspendido em 100 µL de tampão TE com RNase (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA e 10 mg ML21 RNase A).

O DNA foi quantificado por i) estimativa em espectrofotômetro e ii) em gel de agarose 1% com brometo de etídio (10 uL/100mL de TBE). Os géis foram fotografados em luz UV em fotodocumentador. Para amplificação do DNA foram utilizadas as concentrações finais de 3 e 20 ng.µL⁻¹, obtidas pela Eq. 1.

$$V_i \cdot C_i = V_f \cdot C_f$$

Sendo: V_i = volume inicial; C_i = concentração inicial; V_f = volume final; C_f = concentração final.

Após o processo de quantificação, o DNA foi armazenado a -20 °C até o momento da utilização.

2.2.2 ANÁLISE ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*)

Para a análise da fidelidade genética por marcadores ISSR foram inicialmente selecionados 29 *primers* aleatórios (Sigma-Aldrich®), tendo como critério de seleção a quantidade de bandas amplificadas e a qualidade dos fragmentos gerados (Tabela 1).

As reações ISSR foram realizadas a partir de uma solução de 13 µL contendo: 2,84 µL de água ultrapura, 1,3 µL de tampão IB 10X, 1,3 µL de BSA (2,5 µg.µL⁻¹), 1,3 µL de dNTPs (2,5 mM), 0,26 µL de Taq DNA polimerase (5 U.µL⁻¹), 3 µL de *primer* (1,2 mM) e 3 µL de DNA genômico (3 ng.µL⁻¹).

As amplificações por PCR foram realizadas em termocicladores Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems®), com o aquecimento inicial da solução a 94 °C por cinco minutos para a desnaturação de toda a fita dupla de DNA, 35 ciclos de 45 segundos a 94 °C para desnaturação, 45 segundos a 56 °C para o anelamento dos *primers* e um minuto a 72 °C para a síntese da cadeia complementar pela DNA polimerase, seguido de sete minutos a 72 °C para a completa extensão de todas as cadeias complementares.

Por fim, os fragmentos de DNA amplificados via PCR foram separados por eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% acrescido de brometo de etídio. Os fragmentos obtidos foram então observados sob luz ultravioleta e fotodocumentados por sistema eletrônico de captura de imagens. Nesse processo, foi utilizado como padrão o DNA 1Kb “ladder” (Invitrogen®), contendo fragmentos de DNA de tamanhos conhecidos, além de uma amostra sem DNA para controle negativo.

Tabela 1. Lista dos 29 *primers* utilizados na análise da fidelidade genética de plantas de palma de óleo produzidas via embriogênese somática por marcadores ISSR e suas respectivas seqüências

<i>Primer</i>	Seqüência 5' - 3'	<i>Primer</i>	Seqüência 5' - 3'
2 zm	CACACACACACACAGG*	52 zm	GGCACCACACACACACACACA
3 zm	CACACACACACACAAT	53 zm	CGCAACACACACACACACACA
4 zm	CACACACACACACAAC	54 zm	GGCTACACACACACACACACA
6 zm	CACACACACACACAGC	55 zm	CCTCCACACACACACACACA
7 zm	CACACACACACAATCT	56 zm	GCTACCACACACACACACACA
8 zm	CACACACACACAATCC	57 zm	CGTCCACACACACACACACA
11 zm	TGTCACACACACACAC	58 zm	CGAACCACACACACACACACA
12 zm	GGTCACACACACACAC	59 zm	GGCCAGCTGCTGCTGCTGCT
15 zm	GTGCACACACACACAC	60 zm	GCCACGCTGCTGCTGCTGCT
16 zm	CGGCACACACACACAC	5 pv	ACTGACTGACTGRG
17 zm	CAGCTCTCTCTCTCTC	9 ps	ACACACACACACACACYA
18 zm	GTGCTCTCTCTCTCTC	10 ps	AGAGAGAGAGAGAGAGYT
32 zm	AGCAGCAGCAGC	11ps	GTGTGTGTGTGTGTGYC
39 zm	AGCAGCAGCAGCAC	12 ps	CACACACACACACA
51 zm	GCACCCACACACACACACA		

Os nucleotídeos R e Y, inseridos nas seqüências dos *primers* 5 pv e 9, 10 e 11 ps, representam a utilização de ambas as pirimidinas (T e C) e ambas as purinas (G e A), respectivamente. *Seqüências sublinhadas representam os nucleotídeos ancorados nas extremidades 5'' ou 3''. Fonte: GOMES, 2016.

2.2.2.1 Análise dos dados dos marcadores ISSR

Para a análise dos dados dos marcadores ISSR, cada fragmento visualizado foi considerado um loco de DNA. Estes marcadores foram então avaliados como dados binários, utilizando-se "1" para indicar a presença e "0" para indicar a ausência do fragmento. Em seguida, os dados binários foram utilizados para estimar os níveis de alteração genômica ocasionados em decorrência do cultivo *in vitro*.

Para tanto, o número de mutações observadas (fragmentos polimórficos) foi dividido pelo número total de fragmentos amplificados. Para a determinação do número de mutações, utilizou-se o princípio de que um fragmento é considerado polimórfico se

ele estiver ausente em pelo menos um dos indivíduos e presente nos demais ou presente em pelo menos um indivíduo e ausente nos demais.

Para maior consistência dos resultados da análise de fidelidade genética das plantas de palma de óleo micropropagadas via embriogênese somática, as reações ISSR dos locos que detectaram variações somaclonais, bem como, as reações das bandas que apresentaram baixa fluorescência, foram repetidas por 3 vezes.

2.2.3 ANÁLISE AFLP (MSAP)

Para a análise por marcadores AFLP (MSAP), inicialmente 100 ng de DNA genômico foram digeridos com a enzima de corte raro EcoRI combinada com as enzimas de corte frequente sensíveis a metilação HpaII e MspI. Nessa etapa, o processo de digestão foi realizado simultaneamente à etapa de ligação dos adaptadores. Para tanto, foi realizada uma reação de 20 µL contendo: 2 µL de tampão ligase 10X, 0,2 µL de NaCl (5 M), 0,1 µL de BSA (10 mg.mL⁻¹), 0,21 µL de T4 DNA ligase (5 U.µL⁻¹), 1 µL do mix dos adaptadores EcoA⁺ e EcoA⁻ (5 µM), 1 µL do mix dos adaptadores Mse/HpaA⁺ e Mse/HpaA⁻ (50 µM), 0,25 µL da enzima EcoRI-HF (20 U.µL⁻¹), 0,5 µL da enzima MspI ou HpaII (10 U.µL⁻¹), 5 µL de DNA genômico (20 ng.µL⁻¹), além de 9,74 µL de H₂O ultrapura. A reação foi então incubada a 37 °C por 2 horas, seguida de uma hora de incubação a 17 °C. Por fim, à solução de digestão/ligação foram acrescentados 80 µL de H₂O ultra pura.

Para a amplificação dos fragmentos clivados pelas duas combinações de enzimas, primeiramente foi realizado uma amplificação pré-seletiva utilizando-se *primers* específicos acrescentados de apenas uma base seletiva, sendo a base A para o *primer* EcoRI e a base C para os *primers* HpaII/MspI (Tabela 2). Nessa fase, a reação foi realizada em volume de 20 µL contendo 4 µL de betaine (5 M), 2 µL de tampão IB 10X, 2 µL de dNTPs (2,5 mM), 0,2 µL de Taq DNA polimerase (5 U.µL⁻¹), 2 µL do *primer* Eco+A (5 µM), 2 µL do *primer* MH+T (5 µM), 2 µL da solução de digestão/ligação diluída e 5,8 µL de H₂O ultrapura.

Os isosquizômeros HpaII e MspI apresentam o mesmo sítio de restrição (5'-CCGG-3'), porém exibem sensibilidade diferente à metilação: MspI reconhece esse sítio e corta, mesmo se a citosina interna estiver metilada (5'-CCmGG-3'), mas é incapaz de cortar se a citosina externa estiver metilada (5'-mCCGG-3'), enquanto o corte pela HpaII é realizado quando a citosina externa está semimetilada (5'-mCCGG-

3' / 3'-CCGG-5') e é bloqueado se a citosina interna estiver metilada (5'-CCmGG-3') (FRANCISCHINI, 2013).

Tabela 2. Sequências (5' - 3') dos adaptadores e *primers* utilizados na análise epigenética de plantas de dendezeiro produzidas via embriogênese somática por marcadores AFLP (MSAP)

Nome	Enzima	Tipo	Sequência (5' - 3')
EcoA+	EcoRI	Adaptador (+)	CTCGTAGACTGCGTACC
EcoA-	EcoRI	Adaptador (-)	AATTGGTACGCAGTCTAC
Mse/HpaA+	MspI/HpaII	Adaptador (+)	GACGATGAGTCTAGAA
Mse/HpaA-	MspI/HpaII	Adaptador (-)	CGTTCTAGACTCATC
Eco+A	EcoRI	<i>Primer</i> +1	GACTGCGTACCAATT <u>CA</u>
MH+T	MspI/HpaII	<i>Primer</i> +1	GATGAGTCTAGAACGG <u>T</u>
Eco+AAG	EcoRI	<i>Primer</i> +3	*GACTGCGTACCAATT <u>CAAG</u>
Eco+AGG	EcoRI	<i>Primer</i> +3	*GACTGCGTACCAATT <u>CAGG</u>
Eco+ACG	EcoRI	<i>Primer</i> +3	*GACTGCGTACCAATT <u>CACG</u>
MH+TAA	MspI/HpaII	<i>Primer</i> +3	GATGAGTCTAGAACGGT <u>AA</u>
MH+TCC	MspI/HpaII	<i>Primer</i> +3	GATGAGTCTAGAACGGT <u>TCC</u>
MH+TAG	MspI/HpaII	<i>Primer</i> +3	GATGAGTCTAGAACGGT <u>AG</u>
MH+TAC	MspI/HpaII	<i>Primer</i> +3	GATGAGTCTAGAACGGT <u>TAC</u>
MH+TGA	MspI/HpaII	<i>Primer</i> +3	GATGAGTCTAGAACGGT <u>TGA</u>
MH+TGG	MspI/HpaII	<i>Primer</i> +3	GATGAGTCTAGAACGGT <u>TGG</u>
MH+TTA	MspI/HpaII	<i>Primer</i> +3	GATGAGTCTAGAACGGT <u>TTA</u>

**Primers* marcados com a utilização do fluorocromo VIC[®]. Sequências sublinhadas representam as bases seletivas dos *primers* utilizados.

A amplificação por PCR foi então realizada em termocicladores Veriti[®] Thermal Cycler (Applied Biosystems[®]), com o aquecimento inicial da solução a 72 °C por dois minutos, seguido de 20 ciclos de 30 segundos a 94 °C para desnaturação, 1 minuto a 56 °C para o anelamento dos *primers* e 2 minutos a 72 °C para a síntese da cadeia complementar pela DNA polimerase, além de dois minutos a 72 °C e 30 minutos a 60 °C. Após a amplificação pré-seletiva, também foram acrescentados 80 µL de H₂O ultra pura à solução resultante.

Em seguida, a amplificação seletiva foi realizada pelas seguintes combinações dos *primers* EcoRI/HpaII e EcoRI/MspI: AAG-TAA, AAG-TCC, AAG-TAG, AAG-TAC, AAG-TGA, ACG-TGG e AGG-TTA. Para tanto, as reações foram realizadas a partir de uma solução de 10 µL, contendo 1 µL de tampão IB 10X, 0,1 µL de Taq DNA polimerase (5 U.µL⁻¹), 0,3 µL de *primer* Eco+3 (5 µM), marcados com a utilização do

fluorocromo VIC®, 0,3 µL de *primer* MH+3 (5 µM), 0,8 µL de dNTPs (2,5 mM), 2 µL de DNA pré-amplificado diluído e 5,5 µL de H₂O ultra pura.

Nessas ampliações, a PCR foi iniciada com 2 minutos a 94 °C, seguidos por 10 ciclos constituídos de: desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 66 °C por 30 segundos, com redução de 1 °C a cada ciclo, e extensão a 72 °C por 1 minuto, além de 25 ciclos compostos por: 30 segundos a 94 °C para desnaturação, 30 segundos a 56 °C para anelamento e 1 minuto a 72 °C para extensão, finalizados por 3 minutos a 72 °C e 30 minutos a 60 °C.

Após essa PCR, 1 µL das amostras amplificadas seletivamente foi acrescido a 9,5 µL de formamida Hi-Di (agente desnaturante), juntamente com 0,5 µL de um marcador de peso molecular com amplitude de 50 a 550 pares de base. Posteriormente, essa mistura foi submetida à incubação a 95 °C por 5 minutos para desnaturação das fitas duplas amplificadas, que foram então separadas em sequenciador automático 3730 DNA Analyzer da Thermo Fisher Scientific®, por meio de eletroforese em capilares.

2.2.3.1 Análise dos dados dos marcadores AFLP (MSAP)

Para a análise dos dados dos marcadores AFLP (MSAP) foi utilizado inicialmente o programa Genographer 2.1, onde foram gerados géis digitais utilizados para a avaliação da qualidade das ampliações realizadas. Após essa etapa foram então empregados os programas Peak Scanner 2 e R 3.3.0, com pacote RawGeno AFLP scoring 2.0, para a conversão dos eletroferogramas em uma matriz de dados binários, onde também foram utilizados "1" para indicar a presença e "0" para indicar a ausência de banda. Nesse processo, foram considerados apenas fragmentos com comprimentos entre 50 e 550 pares de base. Nele, para aumentar a consistência dos dados, a análise automática dos picos foi posteriormente refinada com a realização de uma análise manual.

Finalmente, para a avaliação da distância epigenética dos indivíduos obtidos pela embriogênese somática do dendezeiro, os dados obtidos pela utilização dos marcadores AFLP (MSAP) foram então submetidos à análise de coordenadas principais (PCoA) e análise de variância molecular – AMOVA (EXCOFFIER et al. 1992), empregando-se novamente o programa R 3.3.0 com o pacote RawGeno AFLP scoring 2.0 (PÉREZ e FIGUEROA, 2013). Nessa análise foi avaliada também a percentagem de locos susceptíveis ou não a metilação.

Os dados binários foram utilizados ainda para a quantificação do número de sequências HpaII e MspI perdidas e ganhas pelos indivíduos micropropagados. Nesse caso, utilizou-se também o princípio de que um fragmento é considerado polimórfico se ele estiver presente em pelo menos um dos indivíduos e ausente nos demais ou ausente em pelo menos um clone e presente nos demais.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 REPRODUÇÃO VEGETATIVA DE RETROCRUZAMENTOS INTERESPECÍFICOS DE PALMA DE ÓLEO (*Elaeis* spp.) POR EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

3.1.1 FORMAÇÃO DE CALOS PRIMÁRIOS, CALOS EMBRIOGÊNICOS E REGENERAÇÃO DE PLANTAS NO GENÓTIPO SR78

Dos 195 embriões zigóticos do genótipo SR78 inoculados para a indução de calos, 136 apresentaram entumescimento aos 15 dias de cultivo. Aos 30 dias, 113 embriões apresentaram a formação de calos primários e destes, apenas 23 não se mostraram responsivos à fase de indução. Além da formação dos calos primários, nesta fase também foi possível observar o aparecimento de cerca de 1% de calos já com aspecto embriogênico a partir dos calos primários (Figura 2). Aos 60 dias em MIC, observou-se um aumento na formação de calos primários, passando de cerca de 85% (aos 30 dias) para ao redor de 90%. Nesta avaliação, a formação de calos embriogênicos ficou em torno de 13%. Aos 90 dias em MIC, 100% dos 113 embriões zigóticos responsivos (explantes) apresentavam formação de calo primário. Além disso, a formação de calos embriogênicos a partir dos calos primários aumentou em mais de 3 vezes a sua percentagem, passando de 13% (aos 60 dias) para 43% dos calos.

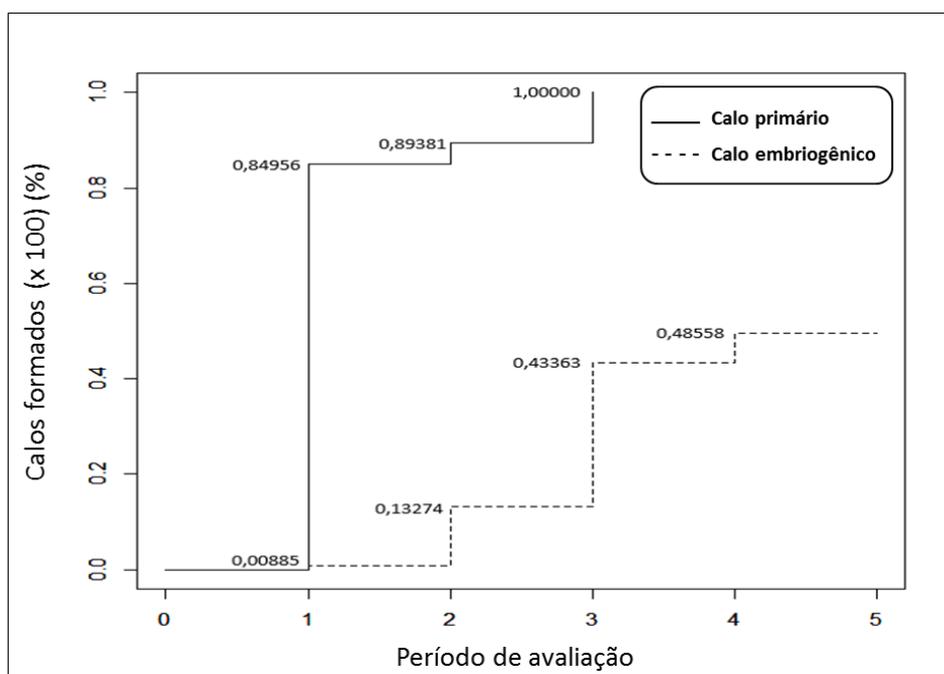


Figura 2. Curva de formação de calo primário e calo embriogênico dos 113 explantes que responderam à indução de calos.

A análise da frequência absoluta e relativa revelou que, aos 150 dias em MIC, 56 dos 113 calos primários, ou seja, quase 50% dos explantes apresentavam a formação de calos embriogênicos (Tabela 3).

Tabela 3. Frequência absoluta e relativa da de calos embriogênicos a partir de calos primários no genótipo SR78, aos 150 dias em meio de indução

Calos embriogênicos formados	Calos embriogênicos não formados	Total
56 (49%)	57 (51%)	113 (100%)

Uma vez formados os calos em meio de indução, os mesmos foram transferidos para meio de multiplicação onde permaneceram por pelo menos mais quatro meses. Então foram transferidos para meio de diferenciação por três meses, quando então foram cultivados em meio de regeneração quando, aos 36 meses após o início do cultivo foram avaliados. Assim, analisando-se as frequências absoluta e relativa (Tabela 4) do número de embriões somáticos gerados a partir dos explantes, verificou-se que 16 explantes (14%) formaram entre 1 e 3 embriões somáticos, 8 explantes (7%) formaram entre 4 e 10 embriões e 7 explantes (6%) formaram acima de 10 embriões somáticos por explante. De maneira geral, fatores como oxidação e contaminação dos explantes podem ocorrer, causando dessa forma, perdas aos experimentos devido à morte dos explantes. Para o genótipo SR78 em torno de 73% dos calos formados não diferenciaram embriões somáticos até o momento da avaliação.

Tabela 4. Frequência absoluta e relativa dos 113 explantes do genótipo SR78 que formaram embriões somáticos

Número de embriões somáticos por explante em cada classe				
Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4*	Total
1-3	4-10	>10	X	
16 (14,2 %)	8 (7,1 %)	7 (6,2 %)	82 (72,6 %)	113 (100 %)

*A classe 4 foi caracterizada pelos calos que não apresentaram diferenciação de embriões somáticos.

Para verificar se a proporção de embriões somáticos por explante entre as classes 1, 2 e 3 do referido genótipo eram homogêneas ou não, uma vez que os valores

absolutos de ocorrência nas classes 1 e 2 mostraram-se relativamente baixos para o genótipo SR78, foi realizado o teste estatístico χ^2 . Na análise, considerou-se no teste χ^2 como hipótese nula (H_0) sendo a proporção de embriões somáticos entre as classes 1, 2 e 3 como homogênea. A hipótese alternativa (H_a) considerado foi quando ao menos um par de classes apresentava diferenças estatísticas significativas da proporção de embriões somáticos entre as classes (Tabela 5).

Tabela 5. Valores observados e valores esperados (em parênteses) de ES sob a hipótese nula H_0 de homogeneidade em relação ao número de embriões somáticos de acordo com as classes

	Número de embriões por explante			Total
	Classe 1 1-3	Classe 2 4-10	Classe 3 >10	
Observado	16	8	7	31
Esperado	(10,33)	(10,33)	(10,33)	31

Dessa forma, verificou-se para o teste χ^2 que a hipótese nula H_0 foi aceita, pois, de acordo com os resultados apresentados na Tabela 5, a proporção entre as classes 1, 2 e 3 foi homogênea e, portanto, não significativa (Tabela 6).

Tabela 6. Valores χ^2 obtidos para cada uma das classes com relação ao número de embriões somáticos por explante do genótipo SR78.

	Número de embriões por explante			Total
	Classe 1 1-3	Classe 2 4-10	Classe 3 >10	
χ^2	3,107	0,527	1,075	4,709

O teste χ^2 foi executado usando-se o software livre estatístico R. O resultado obtido foi $\chi^2 = 4.709$ e o p-valor desta análise estatística foi 0,095, não sendo o teste significativo ao nível $\alpha = 5\%$.

Ao se avaliar o número de plantas regeneradas para o genótipo SR78, observou-se uma média inferior a 5 plantas regeneradas, a partir dos 113 explantes que responderam à indução de calos. Todavia, a possibilidade de regeneração de plantas para este genótipo pode ser considerado maior, uma vez que ainda existem embriões em fase de desenvolvimento (maturação) para este genótipo. Além disso, esta média pode estar subestimada pelo fato de muitos embriões somáticos do genótipo SR 78 ainda estarem em fase de diferenciação e estes, provavelmente se desenvolvam em novas plantas.

3.1.2 FORMAÇÃO DE CALOS PRIMÁRIOS, CALOS EMBRIOGÊNICOS E REGENERAÇÃO DE PLANTAS NO GENÓTIPO SR84

Dos 281 embriões zigóticos do genótipo SR84 inoculados para a indução de calos, 227 apresentaram entumescimento aos 15 dias de cultivo. Aos 30 dias após a inoculação em meio de indução de calos (MIC), cerca de 80% dos explantes em cultivo já apresentavam formação de calo primário (Figura 3) e apenas 54 (19%) deles não se mostraram responsivos. Para este genótipo, não se observou a formação de calos embriogênicos no primeiro mês de avaliação do estudo. Aos 60 dias em MIC, observou-se um aumento na formação de calos primários, passando de 80% (aos 30 dias) para 94%. Nesta avaliação, além da formação dos calos primários, também foi possível observar o aparecimento de cerca de 22% de calos com aspecto embriogênico nos calos primários. Aos 90 dias em MIC, 97% dos 227 embriões zigóticos (explantes) apresentavam formação de calo primário. Além disso, a formação de calos embriogênicos nos calos primários aumentou para cerca de 32%.

Aos 120 dias, cerca de 98% dos 227 explantes apresentavam formação de calo primário. Além disso, 34% dos calos primários apresentavam a formação de calos embriogênicos nesta fase.

Aos 150 dias, 100% dos explantes apresentaram formação de calo primário, bem como 37% dos calos primários apresentavam a formação de calos embriogênicos, para o este período.

Assim como para o genótipo anterior, uma vez formados os calos em meio de indução, os mesmos foram transferidos para meio de multiplicação onde permaneceram por pelo menos mais quatro meses. Então foram transferidos para meio de diferenciação por três meses, quando então foram cultivados em meio de regeneração quando, aos 36 meses após o início do cultivo foram avaliados. Dessa forma, analisando-se as frequências absoluta e relativa (Tabela 8) do número de embriões somáticos gerados a partir dos explantes, verificou-se que 1 deles não apresentou formação de embriões somáticos (ES), 18 calos (7,9%) formaram entre 1 e 3 ES, 13 explantes (5,7%) formaram entre 4 e 10 ES e 17 (7,5%) formaram acima de 10 ES por explante. Para este genótipo, a não diferenciação de ES, até o momento da avaliação, foi de 178 explantes, o que correspondeu a 78,5% do total de calos formados em cultura.

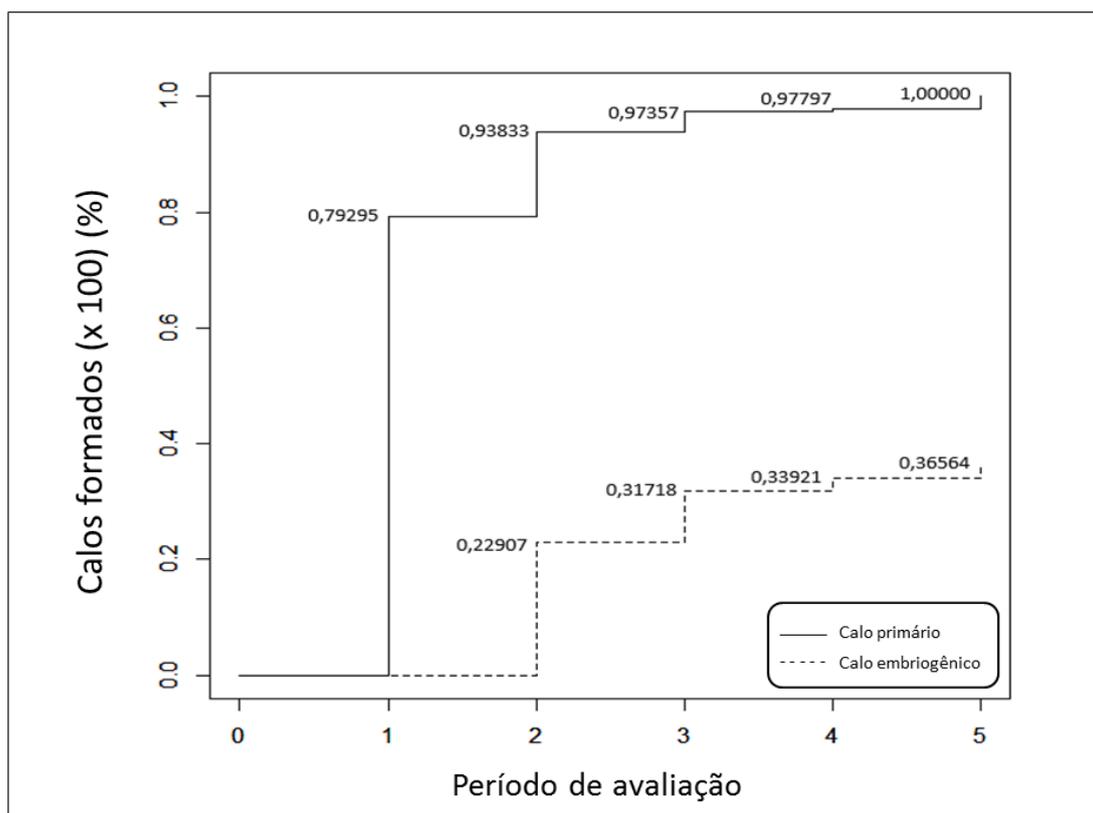


Figura 3. Curva de formação de calo primário e calo embriogênico de 227 explantes que responderam à indução de calos.

Tabela 7. Formação de calos embriogênicos nos explantes do genótipo SR84 aos 150 dias em meio de indução da embriogênese somática

Calos embriogênicos formados	Calos embriogênicos não formados	Total
83 (36,6 %)	144 (63,4 %)	227 (100 %)

Tabela 8. Frequência absoluta e relativa dos 227 explantes do genótipo SR84 que formaram embriões somáticos

Número de embriões somáticos por explante					
Classe 0	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4*	Total
0	1-3	4-10	>10	X	
1 (0,4 %)	18 (7,9 %)	13 (5,7 %)	17 (7,5 %)	178 (78,5 %)	227 (100 %)

*A classe 4 foi caracterizada pelos calos que não apresentaram diferenciação de embriões somáticos.

Para verificar se a proporção de embriões somáticos por explante entre as classes 1, 2 e 3 do referido genótipo eram homogêneas ou não, uma vez que os valores

absolutos de ocorrência nas classes 1 e 2 mostraram-se relativamente baixos para o genótipo SR84, foi realizado o teste estatístico χ^2 . Na análise, considerou-se no teste χ^2 como hipótese nula (H_0) sendo a proporção de embriões somáticos entre as classes 1, 2 e 3 como homogênea. A hipótese alternativa (H_a) considerado foi quando ao menos um par de classes apresentava diferenças estatísticas significativas da proporção de embriões somáticos entre as classes (Tabela 9).

Tabela 9. Número de embriões somáticos do genótipo SR84, de acordo com as classes

	Número de embriões somáticos por explante			Total
	Classe 1 1-3	Classe 2 4-10	Classe 3 >10	
Observado	18	13	17	48
Esperado	(16)	(16)	(16)	48

Verificou-se para o teste χ^2 que a hipótese nula H_0 foi aceita, pois, de acordo com os resultados apresentados na Tabela 10, a proporção entre as classes 1, 2 e 3 foi homogênea e, portanto, não significativa (Tabela 5). Verificou-se ainda que o número de embriões somáticos obtidos para o genótipo SR84 via embriogênese somática esteve dentro da média esperada (Tabela 4).

Tabela 10. Valores χ^2 obtidos para cada uma das classes com relação ao número de embriões somáticos por explante do genótipo SR84

	Número de embriões somáticos por explante			Total
	Classe 1 1-3	Classe 2 4-10	Classe 3 >10	
χ^2	0,250	0,562	0,063	0,875

O teste χ^2 foi executado usando-se o software livre estatístico R. O resultado obtido foi $\chi^2 = 0.875$ e o p-valor desta análise estatística foi 0.6456 não sendo o teste significativo ao nível $\alpha = 5\%$.

Para o número de plantas regeneradas do genótipo SR84, observou-se uma média de 35 plantas regeneradas a partir dos 227 explantes que responderam à indução da embriogênese somática. Todavia, assim como descrito para o genótipo anterior, a possibilidade de regeneração de novas plantas para este genótipo demonstra que o mesmo ainda pode formar novas plantas, uma vez que vários explantes atualmente em cultivo ainda apresentam continuamente a regeneração de embriões somáticos.

3.1.3 FORMAÇÃO DE CALOS PRIMÁRIOS, CALOS EMBRIOGÊNICOS E REGENERAÇÃO DE PLANTAS PARA O GENÓTIPO SQ150

Dos 198 embriões zigóticos do genótipo SQ150 inoculados para a indução de calos, 161 apresentaram entumescimento aos 15 dias de cultivo. Aos 30 dias após a inoculação em meio de indução de calos (MIC), 161 (76,3%) embriões zigóticos apresentaram formação de calos primários e apenas 37 (23,7%) embriões zigóticos não se mostraram responsivos à fase de indução nesse período. Assim como observado no genótipo SR84, para o genótipo SQ150 não se observou a formação de calos embriogênicos no primeiro mês de avaliação. Aos 60 dias em MIC, 88% dos explantes apresentaram formação de calos primários. Nesta avaliação, também foi possível observar ao redor de 48% de calos com aspecto embriogênico a partir dos calos primários (Figura 4). Já aos 90 dias em MIC, 93% dos 161 embriões zigóticos apresentavam formação de calo primário. Além disso, obervou-se a formação de 56% de calos embriogênicos.

Aos 120 dias, 98% dos explantes apresentaram formação de calo primário, chegando a 100% no mês posterior. Além disso, 59% dos calos primários apresentavam-se embriogênicos, bem como aos 150 dias, cerca de 78% dos calos apresentavam-se embriogênicos em MIC.

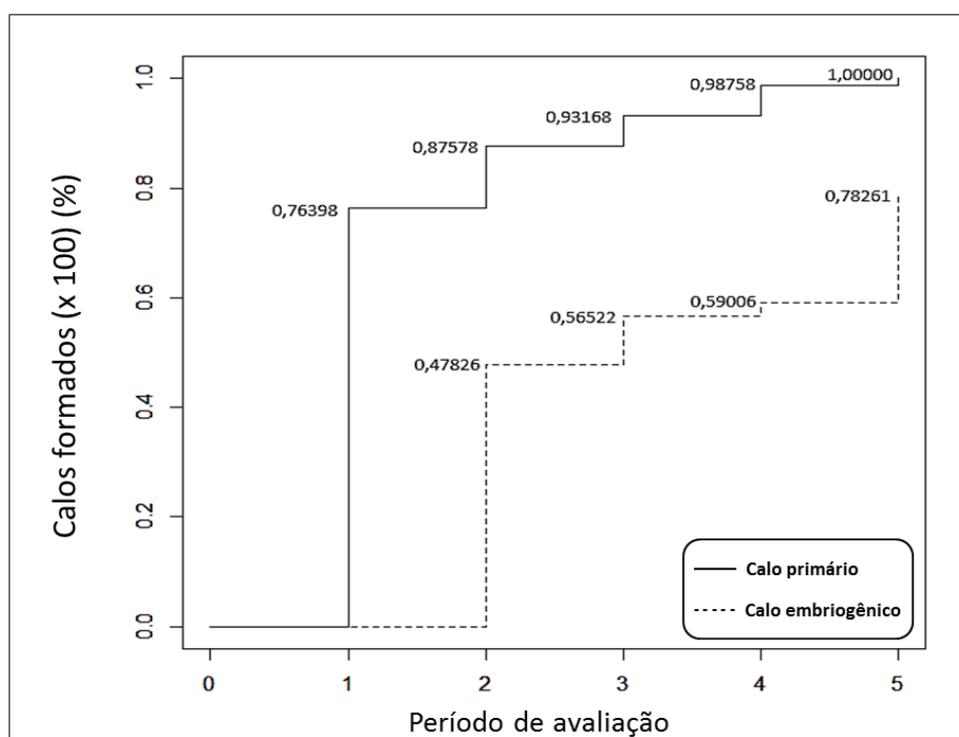


Figura 4. Curva de formação de calo primário e calo embriogênico de 161 explantes que responderam à indução de calos.

Tabela 11. Formação de calos embriogênicos nos explantes do genótipo SQ 150, aos 120 dias em meio de indução da embriogênese somática

Calos embriogênicos formados	Calos embriogênicos não formados	Total
126 (78,3%)	35 (21,7%)	161 (100%)

Assim como para os genótipos anteriores, uma vez formados os calos em meio de indução, os mesmos foram transferidos para meio de multiplicação onde permaneceram por pelo menos mais quatro meses. Então foram transferidos para meio de diferenciação por três meses, quando então foram cultivados em meio de regeneração quando, aos 36 meses após o início do cultivo foram avaliados. Dessa forma, analisando-se as frequências absoluta e relativa (Tabela 12) do número de embriões somáticos gerados a partir dos explantes, verificou-se que um deles não apresentou nenhum tipo de ES, 55 explantes (34,2%) formaram entre 1 e 3 ES, 29 explantes (18%) formaram entre 4 e 10 ES e 17 explantes (10,6%) formaram acima de 10 ES por explante. Para este genótipo, 59 explantes não apresentaram diferenciação de ES, o que correspondeu a 36,6% do número total de explantes estabelecidos em cultura. Verificou-se ainda que o número o número de embriões somáticos obtidos para o genótipo SQ150 via embriogênese somática estava dentro da média esperada (Tabela 12).

Tabela 12. Frequência absoluta e relativa dos 161 explantes do genótipo SQ150 que formaram embriões somáticos

Número de embriões somáticos por explante					
Classe 0	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4*	Total
0	1-3	4-10	>10	X	
1 (0,6 %)	55 (34,2%)	29 (18%)	17 (10,6%)	59 (36,6%)	161 (100 %)

*A classe 4 foi caracterizada pelos calos que não apresentaram diferenciação de embriões somáticos.

Para verificar se a proporção de embriões somáticos por explante entre as classes 1, 2 e 3 do referido genótipo eram homogêneas ou não, uma vez que os valores absolutos de ocorrência nas classes 1 e 2 mostraram-se relativamente baixos para o genótipo SQ150, foi realizado o teste estatístico χ^2 . Na análise, considerou-se no teste χ^2 como hipótese nula (H_0) sendo a proporção de embriões somáticos entre as classes 1, 2

e 3 como homogênea. A hipótese alternativa (H_a) considerado foi quando ao menos um par de classes apresentava diferenças estatísticas significativas da proporção de embriões somáticos entre as classes (Tabela 13)

Tabela 13. Número de embriões somáticos do genótipo SQ150, de acordo com as classes

	Número de embriões somáticos por explante			Total
	Classe 1 1-3	Classe 2 4-10	Classe 3 >10	
Observado	55	29	17	101
Esperado	(33,7)	(33,7)	(33,7)	101

O teste χ^2 executado e o resultado obtido foi $\chi^2 = 22.416$ e o p-valor desta estatística foi 1.357×10^{-5} , sendo portanto o teste significativo ao nível $\alpha = 0,1\%$. Em outras palavras, contrariamente ao outros dois genótipos anteriores, neste, foi rejeitada a hipótese de nulidade (H_0) e aceita a hipótese (H_a) de que para o indivíduo SQ150 ao menos um par de classes apresentou diferença estatisticamente significativa de proporção de indivíduos responsivos (Tabela 14).

Tabela 14. Valores χ^2 obtidos para cada uma das classes com relação ao número de embriões somáticos por explante do genótipo SQ150

	Número de embriões somáticos por explante			Total
	Classe 1 1-3	Classe 2 4-10	Classe 3 >10	
χ^2	13,518	0,647	8,251	22,416

O teste χ^2 foi executado usando-se o software livre estatístico R. O resultado obtido foi $\chi^2 = 22.416$ e o p-valor desta análise estatística foi 1.357×10^{-5} sendo o teste significativo ao nível $\alpha = 0,1\%$.

Assim, dos 161 explantes do indivíduo SQ150, pode-se conjecturar que uma das classes tenha mais chances de se enquadrar na classe 1-3 e menos chance de se enquadrar na classe >10, pois o mesmo produziu significativamente mais explantes com 1 a 3 embriões por calo em relação às demais classes e produziu significativamente menos calos com 10 ou mais embriões somáticos se comparados às demais classes. Adicionalmente, observou-se que o genótipo SQ150 apresentou uma média de 88 (55%) plantas regeneradas a partir dos 161 explantes que responderam à indução da embriogênese somática.

Na Figura 5, podem ser observados os aspectos morfológicos durante a embriogênese somática em retrocruzamentos interespecíficos de palma de óleo, que caracterizam as etapas seguidas neste estudo.

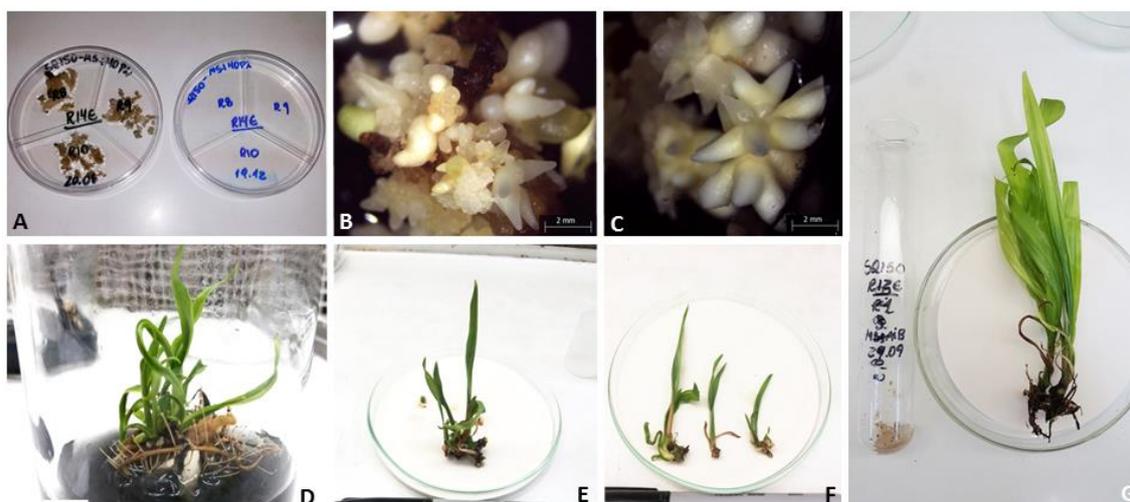


Figura 5. Aspectos morfológicos da embriogênese somática de retrocruzamentos interespecíficos de palma de óleo. A) Multiplicação de calos; B) Calos e embriões somáticos em diferentes fases de desenvolvimento; C) Embriões somáticos em estágio torpedão; D) Cluster composto por plantas com raízes; E) Plantas formadas prontas para a individualização; F) Plantas individualizadas; G) Plantas amostrais com raízes desenvolvidas utilizada nas análises moleculares. Barra (D) 1 cm.

3.2 ANÁLISE MOLECULAR EM PLANTAS DE RETOCRUZAMENTOS INTERESPECÍFICOS DE PALMA DE ÓLEO (*Elaeis* spp.) REGENERADAS POR EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

3.2.1 ANÁLISE DA FIDELIDADE GENÉTICA POR MARCADORES ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*)

Na Figura 6 é apresentado o dendrograma gerado pelo método de agrupamento UPGMA (agrupamento aos pares pela média aritmética não ponderada) para a avaliação da relação genética entre as plantas regeneradas por embriogênese somática em retrocruzamentos interespecíficos de palma de óleo.

As análises mostraram uma clara tendência de agrupamento entre as plantas regeneradas, de acordo com o respectivo indivíduo matriz utilizado como fonte de explante para a regeneração das mesmas. A tendência de materiais genéticos se agruparem em grupos gênicos distintos que podem ser explorados para fins de melhoramento, também foi verificada em outra palmeira, como o açazeiro (OLIVEIRA et al. 2003, DOMICIANO et al. 2015).

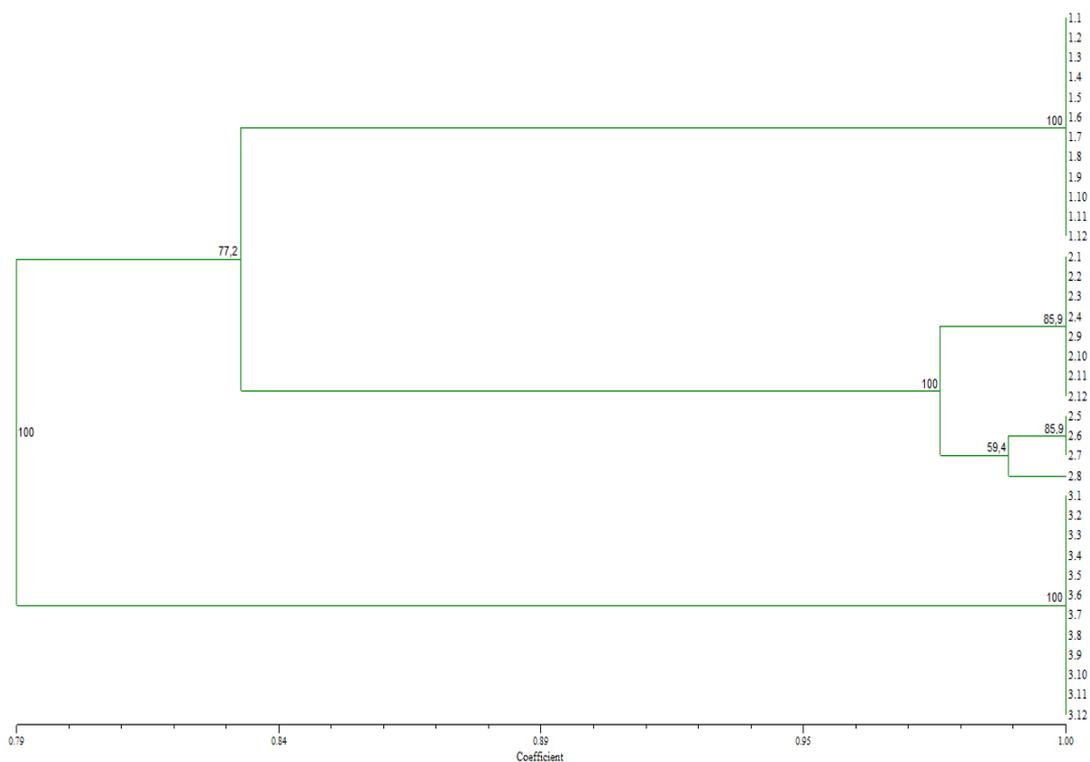


Figura 6. Dendrograma gerado pelo método de agrupamento UPGMA da relação entre as plantas regeneradas por embriogênese somática em retrocruzamentos interespecíficos de palma de óleo.

De acordo com as análises, não houve variação genética entre as plantas regeneradas a partir do indivíduo matriz 1, bem como para as plantas regeneradas a partir do indivíduo matriz 3. Todavia, as análises indicaram variação genética (Figura 6 e Figura 7 A) em plantas obtidas do indivíduo matriz 2, quando se utilizou o *primer* 32 zm, bem como no *primer* 59 zm (Figura 7 B). Assim, de acordo com os resultados obtidos neste trabalho, é possível inferir que a regeneração de plantas por embriogênese somática, a partir de embriões zigóticos, pode apresentar até 97,5% de similaridade quando as plantas são regeneradas e avaliadas dentro do mesma matriz que lhe deu origem. No entanto, plantas regeneradas por esse mesmo sistema, quando comparadas com plantas regeneradas de outros embriões zigóticos utilizados como matrizes, podem apresentar variabilidade genética superior a 20%, ou seja, similaridade genética de apenas 80%. Esse fato pode comprometer trabalhos que pensam em utilizar embriões zigóticos como fonte de explantes para a clonagem de genótipos adultos.

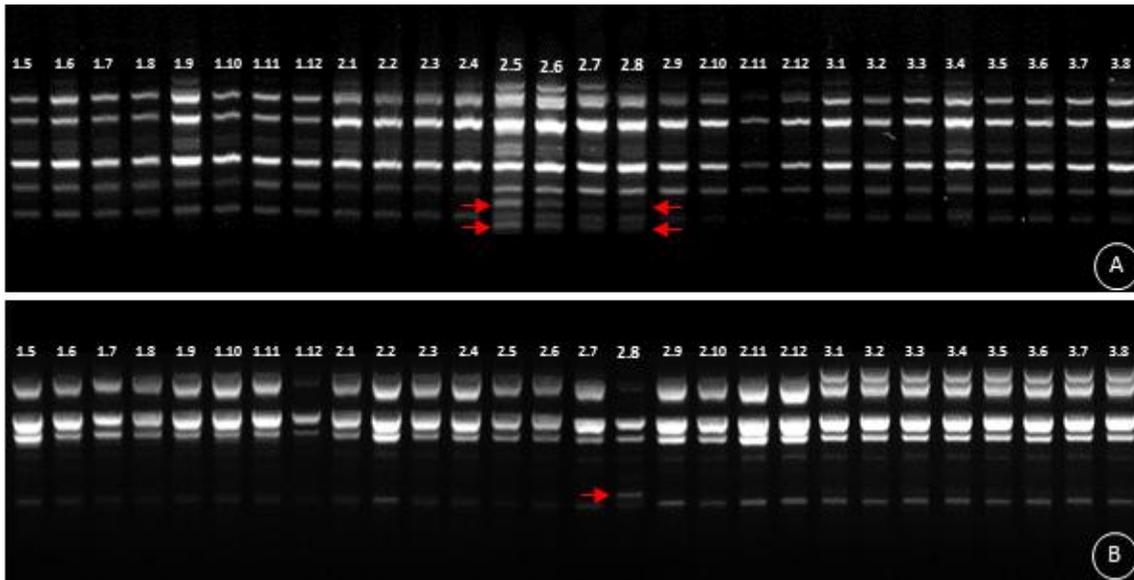


Figura 7. Análise da fidelidade genética pelo marcador molecular ISSR em plantas de retrocruzamentos interespecíficos de palma de óleo, regeneradas por embriogênese somática. A) *Primer 32 zm* e B) *Primer 59 zm*. Setas vermelhas: variação somaclonal.

Tregear et al. (2002) afirmam que em plantas da palma de óleo, a presença de auxinas no meio de cultura leva à expressão de genes relacionados com a variação somaclonal “*mantled*”. Neste caso, ocorrem em resposta ao estresse induzido pelas próprias condições do meio *in vitro*, como por exemplo, o meio de cultura, os inúmeros subcultivos consecutivos e, principalmente os reguladores de crescimento. Neste contexto, muitos estudos estão sendo realizados com plantas da palma de óleo obtidas *in vitro*, levando-se em consideração a fidelidade genética dos indivíduos, bem como os fatores epigenéticos envolvendo a metilação do DNA (JALIGOT et al. 2000, TREGEAR et al. 2011, PÁDUA 2015)

3.2.2 Análise da variação epigenética por marcadores AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*)

Os resultados referentes à análise da fidelidade epigenética das plantas de retrocruzamentos interespecíficos de palma de óleo (*Elaeis spp.*) regeneradas por embriogênese somática e realizada pelo emprego dos marcadores AFLP (MASP) são apresentados na Tabela 15. Nessa análise, verificou-se ao todo a amplificação de 357 sítios do genoma nas 36 plantas avaliadas. Nessas amplificações, constatou-se que, no geral, cerca de 69% destas regiões revelaram-se sensíveis à metilação, enquanto que 31% não se mostraram susceptíveis a esta alteração química.

Tabela 15. Análise da variação epigenética pelo marcador molecular AFLP em plantas de retrocruzamentos interespecíficos de palma de óleo, regeneradas por embriogênese somática

Análise AFLP			
Nº de Indivíduos avaliados	Locos amplificados	Locos com metilação	Locos sem metilação
36	357	245	112

Ademais, com a análise de variância molecular (AMOVA) dos locos sujeitos à metilação, constatou-se ainda que 17,8% da variação epigenética total dos regenerantes está localizada dentro dos grupos (indivíduos matrizes 1, 2 e 3), enquanto que apenas 3,9% encontram-se entre os mesmos (Tabela 16).

Tabela 16. Análise de variância molecular (AMOVA) dos locos submetidos ou não ao processo de metilação

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Componentes de variância	Porcentagem de variação
<i>MSL</i> *				
Entre os grupos	2	125.8	62.89	3.866
Dentro dos grupos	32	570.4	17.82	17.82
Total	34	696.1	20.47	

*Locos submetidos à metilação ($P < 0,0001$).

Na representação da análise de coordenadas principais (PCoA) dos 245 locos sujeitos a metilação (Figura 8), observou-se, assim como constatado nos marcadores ISSR, que as plantas avaliadas exibiram em seu epigenoma algum nível de alteração, fazendo com que os mesmos apresentassem entre si pequenos índices de dissimilaridade. Nessa análise, verificou-se também que as plantas provenientes do indivíduo matriz 1, quando comparadas àquelas provenientes dos indivíduos 2 e 3, apresentaram entre si os menores índices de variação. Em contrapartida, plantas regeneradas do indivíduo matriz 3 apresentaram maior variação em relação aos indivíduos das matrizes 1 e 2.

Jaligot et al. (2004) verificaram que a presença de auxinas no meio de cultura leva à expressão de genes relacionados com a variação somaclonal “mantled” em plantas de palma de óleo obtidas por embriogênese somática. Todavia, a presença tanto das auxinas quanto das citocininas em meio de cultura é essencial na regulação de vários aspectos da desdiferenciação e diferenciação celular em plantas (WOODWARD e BARTEL, 2005; SAKAKIBARA, 2006). Esses reguladores são utilizados para

indução (WANG et al. 2008, DALAGNOL, 2010), multiplicação, diferenciação dos embriões, bem como no enraizamento das plantas regeneradas *in vitro*. Estudos tanto ao nível global de metilação, como de locais específicos de metilação, demonstram que a variação na metilação do DNA ocorre com frequência no processo de cultura de tecidos (KAEPLER et al. 2000, FRANCISCHINI, 2013).

De acordo com Francischini et al. (2017), a metilação do DNA caracteriza-se como um evento epigenético em que não ocorre a modificação na sequência genética. Mas sim, na modificação da estrutura da cromatina pela adição covalente de um grupo metil, catalisado pela DNA methyltransferase (DNMT) ao carbono 5` da citosina em um dinucleotídeo CpG, alterando, dessa forma, os níveis de compactação da cromatina e, conseqüentemente, a expressão gênica. Os mesmos autores observaram em seus estudos que para os tratamentos “plantas *in vitro* normais” (sem sintomas de variação somaclonal), foi possível detectar diferenças no perfil molecular em comparação à sua matriz, indicando, dessa forma, que nem todas as alterações causadas pelo processo de cultura de tecidos no genoma e no epigenoma associadas à metilação do DNA podem gerar plantas anormais. Esses resultados foram semelhantes ao descrito por Matthes et al. (2001) para palma de óleo, ao verificarem que as mudanças na metilação não foram necessariamente associadas com o fenótipo anormal proveniente da cultura de tecidos.

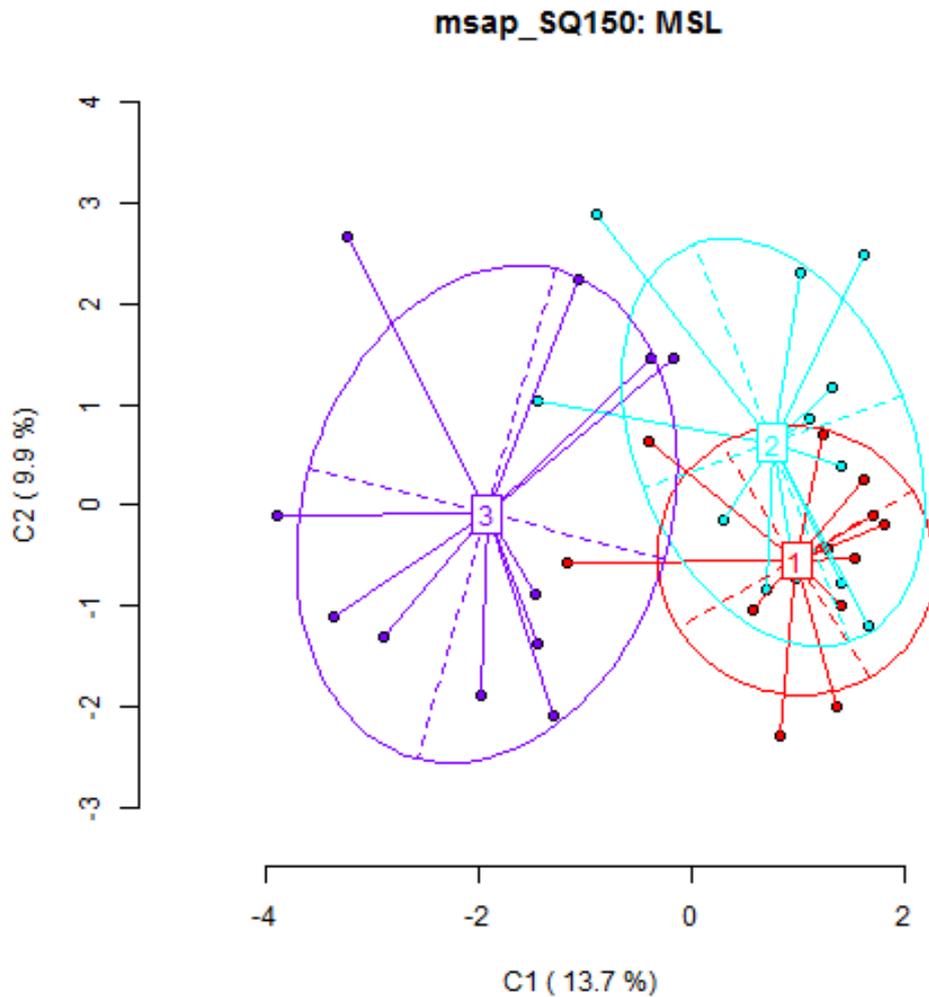


Figura 8. Análise de coordenadas principais (PCoA) dos locos sujeitos a metilação para a diferenciação epigenética das plantas de retrocruzamentos interespecíficos de palma de óleo, regeneradas por embriogênese somática. As coordenadas C1 e C2 são mostradas com a percentagem de variância explicada entre eles. Pontos diferentes representam indivíduos diferentes. O nome de cada grupo mostra o centro da sua nuvem de pontos. A elipse representa a dispersão média dos pontos ao redor de seu centro. O eixo mais comprido da elipse mostra a direção de dispersão máxima e, o eixo menor a direção de dispersão mínima.

Liddle e Jirtle (2006) afirmam que a hipometilação do DNA desencadeia um aumento na expressão gênica, enquanto a hipermetilação diminui a expressão dos genes-alvo. Neste estudo, verificou-se que, de modo geral, cerca de 58% das alterações epigenéticas observadas nas plantas de retrocruzamentos interespecíficos de palma de óleo regeneradas por embriogênese somática foram ocasionadas pelo ganho de fragmentos (Figuras 9 e 10 B), ou seja, pela hipometilação do DNA genômico. Além disso, foi observado que as taxas da perda de fragmentos (hipermetilação) giraram em

torno dos 42% (Figura 9 e 10 A). Tais resultados estão de acordo com os obtidos por Matthes et al. (2001), ao observarem a perda de metilação durante a embriogênese somática em palma de óleo em regenerantes normais, embora Jaligot et al. (2000) afirmem que a hipometilação tenha algum tipo de influência em material vegetal anormal.

A Perda de metilação associada com a cultura de tecidos também foi observada em culturas como o milho (KAEPLER e PHILLIPS, 1993). Recentemente, Stroud et al. (2013) relataram perdas significativas de metilação em plantas de arroz regeneradas por cultura de tecidos em comparação com as plantas não regeneradas. Francischini et al. (2017) também obtiveram resultados similares aos encontrados neste trabalho, ao verificarem 51% de hipometilação e 36% de hipermetilação em plantas de cana de açúcar obtidas via embriogênese somática.

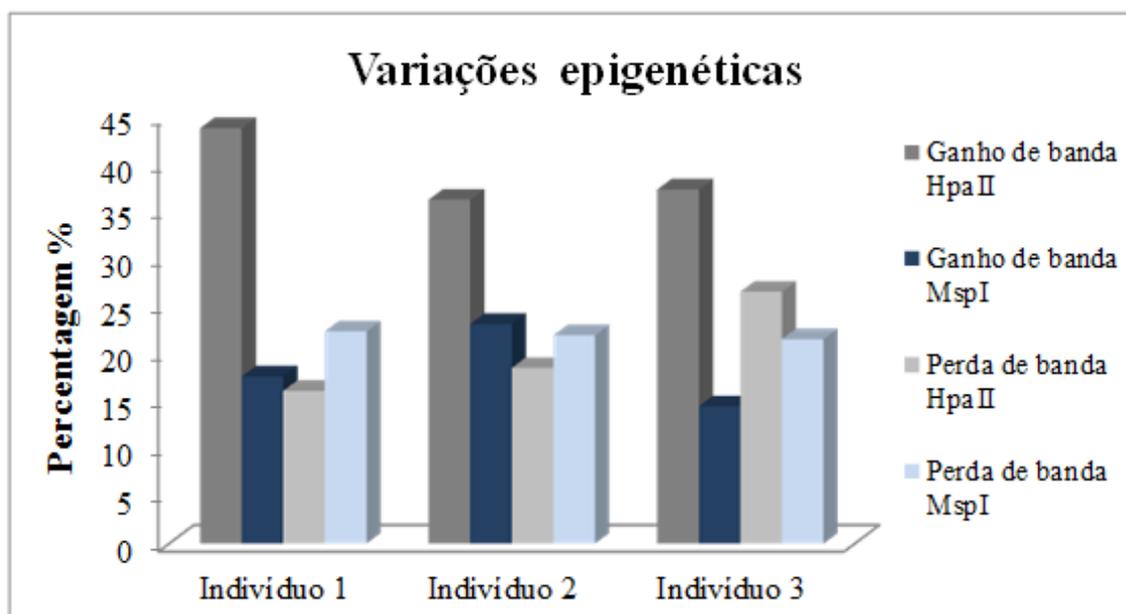


Figura 9. Variações epigenéticas observadas nas plantas de retrocruzamentos interespecíficos de palma de óleo, regeneradas por embriogênese somática.

A influência da hipometilação do DNA (perda da metilação) na capacidade de conversão dos embriões somáticos foi reportada por FRAGA et al. (2002), quando embriões somáticos de *Acca sellowiana* formados em meios de cultura com drogas hipometilantes como a Azac (5-Azacidina) apresentaram baixas taxas de conversão, considerando-se como um evento decorrente do desbalanço na metilação gerado por esta droga.

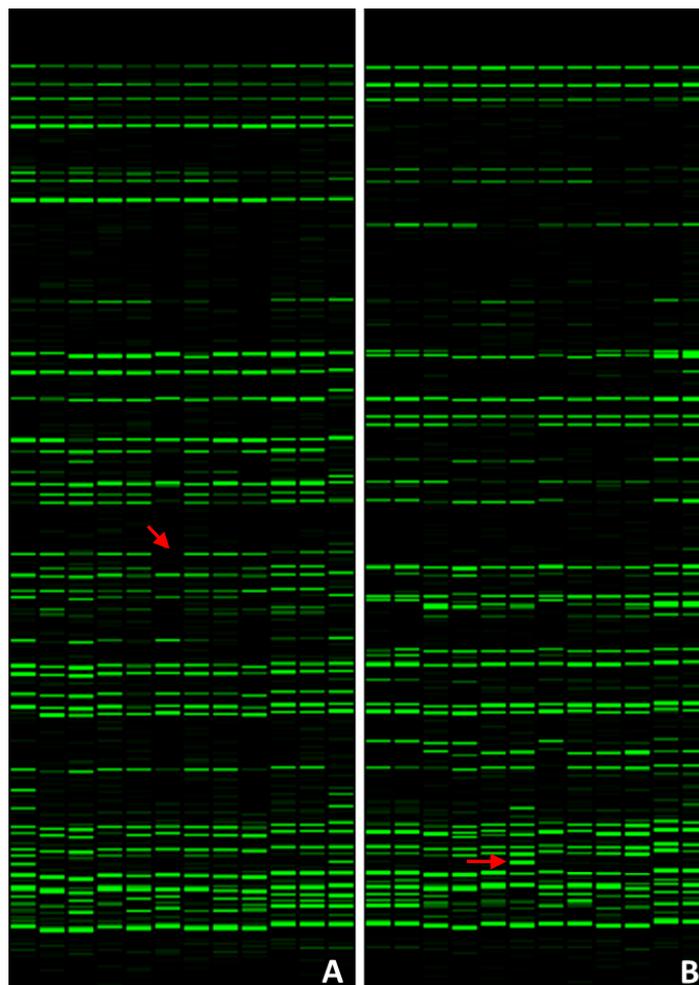


Figura 10. Análise epigenética de plantas de retrocruzamentos interespecíficos de palma de óleo, regeneradas por embriogênese somática. **A)** *Primer Eco-AGG/Hpa-TTA* e **B)** *Primer Eco-AGG/Msp-TTA* na amplificação do DNA das plantas. Setas vermelhas = perda de banda ou hipermetilação (A) e ganho de banda ou hipometilação (B).

Em trabalhos desenvolvidos em *Arabidopsis*, as plantas que mostraram diminuição da metilação exibiram uma série de anormalidades fenotípicas e no desenvolvimento, incluindo redução da dominância apical, menor tamanho das plantas, tamanho e forma da folha alterada, diminuição da fertilidade e alteração no tempo da floração. Estas observações sugeriram que a metilação do DNA desempenha um papel importante na regulação de muitas vias de desenvolvimento em plantas e que, as anormalidades do desenvolvimento vistas nas plantas podem ser devido a uma desregulação da expressão gênica (FINNEGAN et al. 1996; DALAGNOL, 2010). Tais afirmativas estão de acordo com os estudos realizados por Lei et al. (2006) ao verificarem que nenhum dos polimorfismos promovidos pela cultura de tecidos da palma de óleo foi consistentemente diferente quando se comparou plantas normais com plantas anormais. Para os autores, estes resultados revelam que, embora o processo de

embriogênese somática da espécie induza diversas mudanças na metilação do DNA dos propágulos, nem todas elas estão associadas com o desenvolvimento do fenótipo envolvido (*mantled*). Em dendezeiro, verifica-se que, em média, apenas 5% dos clones derivados da embriogênese somática desenvolvem flores anormais (*mantled*) em consequência da ocorrência de variantes somaclonais. Essas anomalias são caracterizadas pela feminização das partes masculinas das flores de ambos os sexos. Nesses indivíduos, nenhum pólen é produzido nas flores masculinas, enquanto que nas flores femininas, um anel de pseudocarpelos rodeia o gineceu, impedindo o amadurecimento dos frutos ou, nos casos mais graves, ocasionando o seu aborto (CORLEY et al. 1986; ONG-ABDULLAH et al. 2015, GOMES, 2016).

3.3 ANÁLISES MORFO-ANATÔMICAS E MORFOLÓGICAS

Embora o aparecimento de calos com estruturas embriogênicas tenha ocorrido já aos dois meses em meio de indução da embriogênese somática e, embriões em estágio torpedo tenham sido observados após cerca de 32 semanas após a implementação do experimento, estes foram submetidos à análise morfo-anatômica no mesmo tempo de avaliação dos regenerantes, aos 36 meses. Para análise foram utilizados *clusters* formados por embriões em estágio torpedo (EET) e calos em diferentes etapas da embriogênese (Figura 11).

As secções histológicas evidenciaram que os embriões em estágio torpedo apresentavam uma protoderme bem delimitada, composta por uma camada unisseriada de células com formato tabular, fortemente unidas e com núcleo evidente. Além disso, os EET eram formados por regiões distal e proximal bem definidas, assim como por um meristema fundamental composto por um aglomerado de células meristemáticas, bem como apresentaram um eixo embrionário distinto, formando assim, a plúmula. Verificou-se também a presença de cordões procambiais, além da formação de proembriões, indicando a formação de embriões secundários, bem como a formação de células em intensas divisões, com citoplasma denso e vários nucléolos, além de vacúolos proeminentes separando as células em divisão.

Resultados semelhantes aos obtidos por Scherwinski-Pereira et al. (2010) na análise morfo-histológica de embriões torpedos de *Elaeis guineensis* oriundos do final da embriogênese somática. Nestes, a presença de regiões procambiais, constituídas por células alongadas, com citoplasma denso e núcleo proeminente, também foi relatada

como uma das principais características anatômicas dessa fase do embrião somático para a espécie.

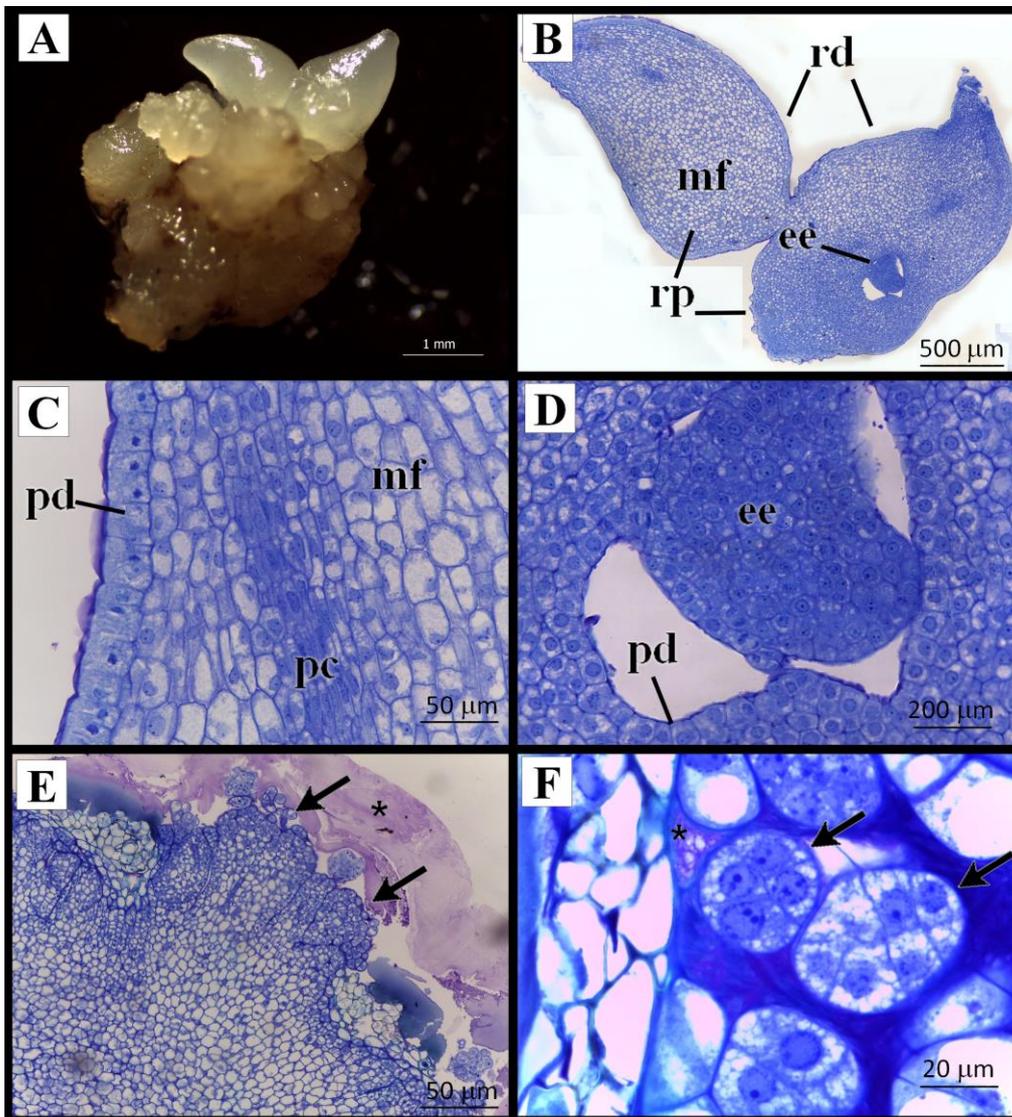


Figura 11. Caracterização da embriogênese somática em palma de óleo. A) Aspecto de embriões somáticos em estágio torpeda; B) Secção longitudinal dos embriões em estágio torpeda evidenciando o eixo embrionário bem definido; C) Secção anatômica indicando a delimitação dos embriões somáticos pela protoderme, o eixo embrionário, procâmbio e meristema fundamental; D) Eixo embrionário evidenciando o desenvolvimento da plúmula; E) Embriões globulares em desenvolvimento na região periférica dos embriões somáticos; F) Células em intensas divisões com citoplasma denso e formação de pectina (asterisco). Abreviações: (rd) região distal; (rp) região proximal; (mf) meristema fundamental; (ee) eixo embrionário; (pd) protoderme; (pc) procâmbio. Setas: (E): embriões globulares, (F): células proembriogênicas – (*) formação de pectina.

4. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados no presente capítulo indicam que a embriogênese somática pode ser uma ferramenta útil para o programa de melhoramento genético da palma de óleo, uma vez que é possível regenerar plantas a partir de retrocruzamentos específicos. Notadamente, o número de plantas regeneradas para cada embrião zigóticos em cultivo até esse momento da realização da avaliação final foi relativamente baixo, pois o mecanismo de diferenciação das plameiras em geral, incluindo-se a palma de óleo, é heterogêneo e não sincronizado, sugerindo a necessidade de maior tempo para a completa etapa de regeneração de plantas.

Plantas regeneradas por embriogênese somática apresentaram um programa de expressão gênica parcialmente controlado pelos mecanismos epigenéticos que estão diretamente ligados à metilação/demetilação do DNA. O trabalho desenvolvido evidenciou que quando o processo de regeneração de plantas é eficiente, podem ocorrer eventos de metilação/demetilação, uma vez que vários autores reportam esses eventos como sendo algo intrínseco ao processo da embriogênese somática, bem como ao posterior desenvolvimento das plantas. Dessa forma, durante todo o processo de regeneração de plantas via embriogênese somática, as atividades de metilação/demetilação do DNA poderiam controlar a integridade do genoma dessas plantas.

Diante destes resultados, sugere-se a realização de estudos a respeito do fenótipo das plantas da palma de óleo regeneradas por embriogênese somática que apresentaram algum tipo de indicação de variação somaclonal e/ou variação epigenética para confirmar se essas variações serão expressas através de polimorfismos. Caso tais variações sejam expressas nos fenótipos destes indivíduos, deve-se analisar se elas afetarão às características agronômicas de interesse das culturas, principalmente, aquelas relacionadas à produtividade de óleo, além de verificar se as mesmas poderão ser, de alguma forma, aproveitadas em programas de melhoramento genético da espécie.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARIF, I. A.; BAKIR, M. A.; KHAN, H. A.; FARHAN, A. H. A.; HOMAIDAN, A. A. A.; BAHKALI, A. H.; SADOON, M. A.; SHOBRAK, M. A brief review of molecular techniques to assess plant diversity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, p. 2079-2096, 2010.
- BARCELOS, E.; DURÃES, F. **Dendê: uma nova opção agrícola**. Brasília, DF: Embrapa, 1986.
- BARCELOS, E. Genetic diversity and relationship in American and African oil palm as revealed by RFLP and AFLP molecular markers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, DF, v. 37, n. 8, p. 1105-1114, 2002.
- BESPALHOK F. J. C.; GUERRA, E. P.; OLIVEIRA, R. **Métodos dos retrocruzamentos**. In: BESPALHOK F. J. C.; GUERRA, E. P.; OLIVEIRA, R. **Melhoramento de Plantas**. p. 11-17, 2011.
- BOTELHO, E.; ROCHA, J. **Avaliação de híbridos interespecíficos de *Elaeis guineensis* x *Elaeis oleífera***. Belém: Embrapa, 1983.
- BORBA, R. S.; GARCIA, M. S.; KOVALLESKI, A.; OLIVEIRA, A. C.; ZIMMER, P. D.; BRANCO, J. S. C.; MALONE, G. Dissimilaridade genética de linhagens de *Trichogramma Westwood* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) através de marcadores moleculares ISSR. **Neotropical Entomology**, v. 34, p. 565-569, 2005.
- BRAMMER, S.P. **Marcadores moleculares: princípios básicos e uso em programas de melhoramento genético vegetal**. Passo Fundo - RS: Embrapa Trigo, p. 7, 2000.
- CAIXETA, E. T.; PESTANA, K. N.; PESTANA, R. K. N. **Melhoramento do cafeeiro: ênfase na aplicação dos marcadores moleculares**. In: GARCIA, G. de O.; REIS, E. F. dos; LIMA, J. S. de S.; XAVIER, A. C.; RODRIGUES, W. N. (Org.). **Tópicos Especiais em produção vegetal V**. Alegre: CCAUFES, 2015.
- CARVALHO J. M. C. F.; ARAÚJO S. de S. **Aplicação do Cultivo de Embrião Zigótico ou Imaturo no Melhoramento Vegetal**. p. 1-36, 2007.
- CORLEY, R. V. H.; BARRET, J. N.; JONES, L. H. Vegetative propagation of oil palm via tissue culture. **Oil Palm News**, v. 22, p. 2-7, 1977.
- CORLEY, R. H. V.; LEE, C. H.; LAW, I. M.; WONG, C. Y. Abnormal flower development in oil palm clones. **Planter**, v. 62, p. 233-240, 1986.
- COSTA, A. O.; OLIVEIRA, L. B.; LINS, M. P. E.; SILVA, A. C.; ARAUJO, M. S. M.; JUNIOR, A. O. P.; ROSA, L. P. **Sustainability analysis of biodiesel production: A review on different resources in Brazil**. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Colorado, v. 27, p. 2-3, 2013.
- CUNHA, R. N. V. da; LOPES, R.; BARCELOS, E.; RODRIGUES, M. R. L.; TEXEIRA, P.C.; ROCHA, R. N. C. **Produção de híbridos interespecíficos dendê (*Elaeis guineensis*) x caiaué (*Elaeis oleífera*)**. In: III Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, Gramado - RS, 2005.

DALAGNOL, G. L. **Caracterização da variação genética e epigenética em plantas de macieira e morangueiro obtidas por meio de propagação vegetativa convencional e micropropagação**. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, 2010.

DOMICIANO, G. P.; ALVES, A. A.; LAVIOLA, B. G.; CONCEIÇÃO, L. D. H. C. S. da. Parâmetros genéticos e diversidade em progênies de Macaúba com base em características morfológicas e fisiológicas. **Ciência Rural**, v. 45, p. 1599-1605, 2015.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v. 131, p. 479-491, 1992.

FEROLDI, M.; CREMONEZ, P. A., ESTEVAM, A. **Dendê: do cultivo da palma à produção de biodiesel**. REMOA, Santa Maria, v. 13, n. 5, p. 3800-3808, 2014.

FINNEGAN, E.J.; GENGER, R.K.; PEACOCK, W.J. & DENNIS, E.S. DNA methylation in plants. **Annual. Review of Physiology Plant Molecular Biology**, v. 49, p. 223-248, 1998.

FRAGA, M. F.; CAÑAL, M. J.; RODRIGUES, R. Phase-changed related epigenetic and physiological changes in *Pinus radiata* D. Don., **Planta**, v. 215, n. 4, p. 672 – 678, 2002.

FRANCISCHINI, J. H. M. B. Caracterização molecular de variantes somaclonais em cana-de-açúcar (*Master's thesis*). Dissertação de mestrado, Instituto Agrônomo de Campinas – SP, 59 p., 2013.

FRANCISCHINI, J. H. M. B.; KEMPER, E. L.; COSTA, J. B.; MANECHINI, J. R. V.; Pinto, L. R. DNA methylation in sugarcane somaclonal variants assessed through methylation-sensitive amplified polymorphism. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, 2017.

GANTAIT, S.; SINNIH, U. R.; SURANTHRAN, P.; PALANYANDY, S. R.; SUBRAMANIAM, S. Improved cryopreservation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) polyembryoids using droplet vitrification approach and assessment of genetic fidelity. **Protoplasma**, v. 252, p. 89-101, 2015.

GOMES, H. T.; BARTOS, P. M. C.; MARTINS, A. E.; OLIVEIRA, S. O. D.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Assessment of mint (*Mentha* spp.) species for large-scale production of plantlets by micropropagation. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 37, p. 405-410, 2015.

GOMES, H. T. **Análise morfoanatômica, bioquímica e molecular de dendezeiros (*Elaeis guineensis* Jacq.) regenerados por embriogênese somática em sistema de imersão temporária**. Tese (Doutorado em Botânica) - Universidade de Brasília, Brasília, 189 p., 2016.

GOMES, H. T.; BARTOS, P. M. C.; BALZON, T. A.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Regeneration of somatic embryos of oil palm (*Elaeis guineensis*) using temporary immersion bioreactors. **Industrial Crops and Products**, v. 89, p. 244-249, 2016.

GOMES, H. T.; BARTOS, P. M. C.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Dynamics of morphological and anatomical changes in leaf tissues of an interspecific hybrid of oil palm during acquisition and development of somatic embryogenesis. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 130, p. 1-14, 2017.

GOMES JR., R. A.; GURGEL, F. de L.; PEIXOTO, L. de A.; BHERING, L. L.; CUNHA, R. N. V. da; LOPES, R.; PINA, A. J. de A.; VEIGA, A. S. Evaluation of interspecific hybrids of palm

oil reveals great genetic variability and potential selection gain. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 512-518, 2014.

GOULÃO, L.; OLIVEIRA, C. M. Molecular characterisation of cultivars of apple (*Malus domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. **Euphytica**, v. 122, p. 81-89, 2001.

GUPTA, M.; CHYI, Y. S.; ROMERO-SEVERSON, J.; OWEN, J. L. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single *primers* of simple-sequence repeats. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 89, p. 998-1006, 1994.

HAMZA, H.; ABEDERRAHIM, M. A. B.; ELBEKKAY, M.; FERCHICHI, A. Comparison of the effectiveness of ISSR and SSR markers in determination of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) agronomic traits. **Australian Journal of Crop Science**, v. 7, p. 763-769, 2013.

INTERACADEMY COUNCIL. Lighting the way - Toward a sustainable energy future. Amsterdam, Holanda: **Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences**, p. 174, 2007.

JALIGOT, E.; RIVAL, A.; BEULE, T.; DUSSERT, S.; VERDEIL, J. L. Variação somaclonal na palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.): A hipótese de metilação do DNA. **Plant Cell Rep.** v. 19, p. 684-690, 2000.

JALIGOT, E.; BEULÉ, T.; BAURENS, F. C.; BILLOTTE, N.; RIVAL, A. Search for methylation-sensitive amplification polymorphisms associated with the "mantled" variant phenotype in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Genome**, v. 47, p. 224-228, 2004.

KAEPLER, S. M. **Molecular and genetic studies of tissue-culture induced variation in maize**. PhD thesis. St. Paul University, St. Paul, Minnesota, 1992.

KAEPLER, S.M.; KAEPLER, H.F.; RHEE, Y. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. **Plant Molecular Biology**, v. 43, p. 179-188, 2000.

KOHLHERPP, G. **Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil**. **Revista Estudos Avançados**, n. 68, p. 223-253, 2010.

KUMAR, P.; GUPTA, J. K.; MISRA, A. K.; MODI, D. R.; PANDEY, B. K. Potential of molecular markers in plant biotechnology. **Plant Omics Journal**, v. 2, p. 141-162, 2009.

LEI, C. P.; JIUN, K. S.; CHOO, C. S.; SINGH, R. Analysis of tissue culture-derived regenerants using methylation sensitive AFLP. **Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology**, v. 14, p. 47-55, 2006.

LOPES, R.; NONATO, R.; DEON, M.; RESENDE, V de. Produção de cachos e parâmetros genéticos de híbridos de Caiapé com Dendezeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, p. 1496-1503, 2012.

LIDDLE, R. A.; JIRTLE, R. L. **Epigenetic silencing of genes in human colon cancer**. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 131, p. 960-962, 2006.

MATTHES, M.; SINGH, R.; CHEAH, S. C.; KARP, A. Variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) tissue culture-derived regenerants revealed by AFLPs with methylation-sensitive enzymes. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 102, p. 971-979, 2001.

MIGUEL C.; MARUM, L. (2011). An epigenetic view of plant cells cultured *in vitro*: somaclonal variation and beyond. **J. Exp. Bot.** v. 62, p. 3713-3725, 2011

NORDIANA, H. M. N.; NGOOT-CHIN, T.; SINGH, R.; CLYDE, M. M.; MADON, M. Evaluation of inter-simple sequence repeat (ISSR) markers for genetic mapping of an oil palm interspecific hybrid mapping population. **Journal of Oil Palm Research**, v. 26, p. 214-225, 2014.

OIL WORLD. Forecasts, 2012. Disponível em www.rspo.org. Acessado em 23 agosto de 2017.

OLIVEIRA M. S. P.; FARIAS-NETO J. T, Nascimento W. M. O. Parâmetros genéticos para caracteres germinativos em vinte progênies de acalazeiro promissoras para palmito. **Bol Pesqui Flor** v. 46, p. 105-113, 2003.

ONG-ABDULLAH, M.; ORDWAY, J. M.; JIANG, N.; OOI, S. E.; KOK, S. Y.; SARPAN, N.; MARTIENSSSEN, R. A. Loss of *Karma* transposon methylation underlies the mantled somaclonal variant of oil palm. **Nature**, v. 525, p. 533-537, 2015.

PÁDUA, M. S. **Embriogênese somática e transformação genética em dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.)**. Tese (doutorado). UFLA - Universidade Federal de Lavras. Lavras – MG, 135 p., 2015.

PÁDUA, M. S. **Germinação *in vitro*, indução e caracterização de massas pró-embriogênicas de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.)**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Lavras. Lavras – MG, 118 p., 2012.

PÉREZ-FIGUEROA, A. MSAP: a tool for the statistical analysis of methylation-sensitive amplified polymorphism data. **Molecular ecology resources**, v. 13, p. 522-527, 2013.

REGITANO, L. C. A.; COUTINHO, L. L. **Biologia molecular aplicada à produção animal**. Brasília, DF: EMBRAPA, 213 p, 2001.

SAKAKIBARA, H. Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. **Annual Review Plant Biology**, v. 57, p. 431-449, 2006.

SARTORETTO, M. L. Transformação genética: estratégias e aplicações para o melhoramento genético de espécies florestais. **Ciência Rural**, v. 38, n. 3, p. 861-871, 2008.

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

SMULDERS , M. J. M.; KLERK, G. J. Epigenetics in plant tissue culture. **Plant Growth Regulation**, v. 63, n. 2, p. 137-146, 2011.

SOARES, D. M. M.; SATTTLER, M. C.; FERREIRA, M. F. S.; PRAÇA-FONTES, M. M. Assessment of genetic stability in three generations of *in vitro* propagated *Jatropha curcas* L. plantlets using ISSR markers. **Tropical Plant Biology**, v. 9, n. 4, p. 229- 238, 2016.

STROUD, H.; DING, B.; SIMON, S. A.; FENG, S.; BELLIZZI, M.; PELLEGRINI, M.; WANG, G. L.; MEYERS, B. C.; JACOBSEN, S. E. **Plants regenerated from tissue culture contain stable epigenome changes in rice**. 2013. Disponível em: <<http://elife.elifesciences.org>>. Acesso em: 12 agosto 2017.

TOPPA, E. V. B.; JADOSKI, C. J. O uso dos marcadores moleculares no melhoramento genético de plantas. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 12, n. 1, p. 1-5, 2013.

TREGGAR, J.W.; MORCILLO, F.; RICHAUD, F.; GERGER, A.; SINGH, R.; CHEAH, S.C.; HARTMANN, C.; RIVAL, A.; DUVAL, Y. Characterization of a defensin gene expressed in oil palm inflorescences: induction during tissue culture and possible association with epigenetic somaclonal variation events. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 373, p. 1387-1396, 2002.

TREGGAR, J. W.; RIVAL, A.; PINTAUD, J. C. A family portrait: unravelling the complexities of palms. **Annals of Botany**, v. 108, p. 1387-1389, 2011.

TOLMASQUIM, M. T. **Perspectivas e planejamento do setor energético no Brasil**. Estudos Avançados, v. 26, p. 14, 2012.

TURCHETTO-ZOLET, A. C.; TURCHETTO, C.; ZANELLA, C. M.; PASSAIA, G. **Marcadores Moleculares na Era genômica: Metodologias e Aplicações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, p. 181, 2017.

USDA - **Serviço de Pesquisa Econômico Departamento de Agricultura dos Estados Unidos**, 2014. Disponível em: <https://www.ers.usda.gov/> Acessado em: 20 de setembro de 2017.

WANG, W.; ZHAO, X.; ZHUANG, G.; WANG S.; CHEN, F. Simple hormonal regulation of somatic embryogenesis and/or shoot organogenesis in caryopsis cultures of *Pogonatherum paniceum* (Poaceae). **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 95, n. 1, p. 57-67, 2008.

WOODWARD, A.; W, BARTEL B. O receptor PEX7 de sinal de focagem peroxisomal de *Arabidopsis* PEX7 é necessário para a função peroxisoma e dependente da PEX5. **Biologia molecular da célula**, v. 16, p. 573-583, 2005.

ZANELLA, C. M.; TURCHETTO-ZOLET, A. C.; PALMA-SILVA, C. **Marcadores Moleculares na Era genômica: Metodologias e Aplicações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 181 p., 2017.