

RODRIGO DA SILVA GUEDES



RIO BRANCO

2008

RODRIGO DA SILVA GUEDES

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E REGENERAÇÃO DE PLANTAS DE
DENDEZEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, da Universidade Federal do Acre, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Jonny Everson Scherwinski Pereira

RIO BRANCO

2008

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E REGENERAÇÃO DE PLANTAS DE DENDEZEIRO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, da Universidade Federal do Acre, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia.

APROVADA em 04 de abril de 2008

Prof. Dr. Jonny Everson Scherwinski Pereira

EMBRAPA

Givanildo Roncato

Dr. Givanildo Roncato

EMBRAPA

Antônio Gilson Gomes Mesquita

Prof. Dr. Antônio Gilson Gomes Mesquita

UFAC

Prof. Dr. Jonny Everson Scherwinski Pereira
(EMBRAPA)
(Orientador)

RIO BRANCO
ACRE - BRASIL

A photograph of a green plant, possibly a bamboo or similar, growing in a clear glass vase filled with water. The plant has several long, slender leaves and is positioned in the center of the frame. The background is dark, making the plant and the vase stand out. The vase is placed on a light-colored surface.

OFEREÇO

**Aos meus irmãos, Renato e Roberto Guedes,
como incentivo em busca cada vez mais do conhecimento.**

**À minha avó “Dona Guiomard” por lembrar do neto
“estudioso” e pelo exemplo de vida.**

**Aos meus pais João Guedes Filho e Marlucci da Silva Guedes
exemplos inigualáveis de dedicação, empenho e apoio
em minha luta para alcançar o sucesso.**

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me proporcionar a saúde, a sabedoria e a dedicação necessária para que fosse possível a elaboração desta dissertação.

Em especial à minha lutadora e incomparável mãe Marluci Guedes, por acompanhar dia-a-dia, desde a graduação, a árdua e intensa tarefa em busca de minha formação acadêmica e profissional.

Ao meu orientador e amigo Jonny Everson Scherwinski Pereira pela dedicação, paciência, compreensão, boa vontade e incentivo em me inserir profissionalmente na pesquisa científica antes e durante a Pós-Graduação.

Ao MCT/CNPq/CT-Amazônia e MCT/CNPq/CT-Energ. pelo apoio financeiro e pela bolsa de estudo concedida.

A Universidade Federal do Acre, especialmente ao Programa de Pós – graduação em Agronomia: Produção Vegetal e todo corpo docente pela oportunidade concedida para minha formação profissional.

A Embrapa Acre, e em especial ao Laboratório de Morfogênese e Biologia Molecular (LABMOL) pela oportunidade da utilização das suas instalações para realização de meus experimentos.

À toda equipe do LABMOL, nas pessoas de: Simone Maciel, Janiffe Oliveira, Tatiane Loureiro, Lívia Renata, Vanessa Silva, Luis Gustavo (bolsistas) Karina Martins Daniela Bittencourt (pesquisadoras).

Aos meus colegas do curso, Ana Suzete, Felicia Leite, Lya Beiruth, Luanna Almeida, Marco Aurelio, Robson Galvão, Charles e Wally Stanley, pelos trabalhos em grupo, incentivo, e troca de experiências ao longo do curso.

Ao laboratorista Bianor Jr. Alves pela ajuda nos trabalhos de rotina do laboratório.

À mestranda em Ciências biológicas Tatiane Loureiro da Silva por me auxiliar ao longo de todos os experimentos abordados nessa dissertação, principalmente nas avaliações e análises estatísticas.

Aos meus grandes amigos e doutorandos Frederico Henrique e Paulo César Fermio Jr por me incentivar, apoiar e me ajudar na obtenção de resumos simples, expandidos submetidos em vários Congressos, estudos anatômicos e em especial, à ajuda concedida para a elaboração dos artigos científicos advindos desta dissertação.

Aos professores do curso de Mestrado, em especial Jorge Ferreira Kusdra, Sebastião Elviro de Araújo Neto, Gilson Mesquita, Amauri Siviero e Tadário de Oliveira Kamel pelos ensinamentos, sugestões e informações adquiridas em suas disciplinas.

À pesquisadora Karina Martins pelas palestras, cursos, participações em disciplinas e contribuições significativas nesta dissertação.

E a todas as pessoas que participaram, diretamente ou indiretamente, da conquista.

Meus sinceros agradecimentos!!!

“O homem que não lê bons livros não tem nenhuma vantagem sobre o homem que não sabe ler”.

Mark Twain

RESUMO

O dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) é uma palmeira promissora para a produção de óleo combustível devido ao elevado rendimento. Mas para que a cultura possa proporcionar alto retorno em produtividade, genótipos melhorados devem ser multiplicados vegetativamente de forma a garantir a perpetuação das características agrônômicas de interesse. A micropropagação do dendezeiro pela embriogênese somática pode aumentar a produção de indivíduos de alta produtividade e/ou resistentes a doenças em larga escala para novas plantações. O trabalho objetivou estabelecer um protocolo de indução da embriogênese somática (ES) e regeneração de plantas de dendezeiro (*E. guineensis*, var. *dura*), a partir de diferentes explantes, meios de cultura e combinações de reguladores de crescimento, bem como avaliar aspectos morfo-histológicos estruturais dos tecidos embriogênicos formados. Plantas de dendezeiro var. *dura* foram coletadas no Campo Experimental da Embrapa Acre e levadas ao Laboratório de Morfogênese e Biologia Molecular (LABMOL) onde os experimentos foram desenvolvidos. Num primeiro experimento foi avaliada a eficiência da técnica *thin cell layer* (TCL) na indução da ES a partir de três tipos de explantes oriundos de segmentos caulinares de mudas de dendezeiro em meio de cultura contendo 2,4-D e Picloram (225 e 450 μM). Resultados significativos foram obtidos para o corte TCL basal, sendo que as melhores respostas embriogênicas foram alcançadas com 450 μM de Picloram. Plantas completas foram regeneradas em meio de cultura diluído pela metade dos sais de MS e desprovido de reguladores de crescimento, após cerca de 150 dias de cultivo. As análises histológicas das estruturas dos embriões zigóticos e somáticos demonstraram semelhanças entre si, como a presença de meristema apical e primórdios foliares. Num segundo experimento, a ES foi induzida em explantes foliares de três genótipos de dendezeiro (GES3, GES4 e GES6), em meio de cultura de MS adicionado de 225 μM de 2,4-D e Picloram. Verificou-se que os genótipos testados apresentaram diferenças estatísticas significativas em relação às variáveis percentagem de explantes com embriões somáticos e número de embriões somáticos formados. O genótipo GS4 proporcionou resultados significativamente melhores que os demais e o Picloram foi estatisticamente superior ao 2,4-D na indução da ES. Por fim, foi avaliada a capacidade de reversão de inflorescências femininas imaturas de dendezeiro ao estado vegetativo embriogênico. Para tanto, a

Influência de tipos de meios de cultura, reguladores de crescimento, posição do explante na inflorescência, bem como o uso de substâncias antioxidantes foram testados. De maneira geral, verificou-se que o meio de MS foi superior ao meio Y3 na indução da ES em inflorescências imaturas de dendezeiro, var. dura, sendo o Picloram a auxina que, de modo geral, proporcionou os melhores resultados para as variáveis estudadas. Quando se avaliou a posição (basal ou apical) do explante na ráquila, não foram observadas diferenças nas respostas embriogênicas. Por fim, verificou-se que o carvão ativado e altas concentrações de auxinas no meio de cultura são de fundamental importância para a diminuição nos níveis de oxidação e morte dos explantes e melhorar a indução da ES em inflorescências imaturas de dendezeiro, var. dura.

Palavras-chave: *Elaeis* sp.. Micropropagação. Camada fina de células. Biodisel. Bioenergia. Agroenergia. Biocombustíveis.

ABSTRACT

Oil palm is promising palm specie for production of biofuel oil due to the high yield. Although the culture can provide high return in productivity, improved genotypes should be multiplied to guarantee the perpetuation of agronomic characteristics. Micropropagation of oil palm through somatic embryogenesis may enable the mass production of elite high-yielding or disease-resistant plants in large scale for new plantations. This work objectified to establish a protocol of somatic embryogenesis (SE) induction and plant regeneration of oil palm (*E. guineensis*, var. *dura*), from different explants, culture media and combinations of growth regulators, as well as to evaluate morpho-histological aspects of embryogenic tissues. Plants of oil palm, var. *dura*, were collected of the field at Embrapa Acre and taken to the Laboratory of Morphogenesis and Molecular Biology (LABMOL) where the experiments were carried out. In a first experiment the efficiency of *thin cell layer* (TCL) technique was evaluated for SE induction from three explants of young plants of oil palm in culture media with 2,4-D and Picloran (225 μ M and 450 μ M). Significant results were obtained for basal explant, and best results for SE were reached with 450 μ M of Picloran. Complete plants were regenerate from culture medium with half salts of MS and without growth regulators after about 150 days. The histological analyses the zygotic and somatic embryos demonstrated likeness to each other, as the presence of apical meristems and foliar primordia. In a second experiment, SE was induced in foliar explants of three genotypes of oil palm (GES3, GES4 and GES6), in MS culture medium added of 2,4-D and Picloran at 225 μ M. It was verified that the genotypes presented statistical differences to percentage of explants with somatic embryos and number of somatic embryos. The genotype GS4 provided the best results when compared with the others and Picloran was better than 2,4-D in the induction of SE. Finally, it was evaluate the capacity of reversion of oil palm female immature inflorescences to the vegetative embryogenic state. For that, the influence of types of culture media, growth regulators, position of the explant in the inflorescence, as well as the use of antioxidant substances was evaluated. In general, it was verified that the MS medium was superior to Y3 in the induction of SE in immature inflorescences of oil palm, var. *dura*, and Picloran was the auxin that provided the best results. When the position of the explants in the rachillae was evaluated (basal or apical) for SE, differences were not observed. Finally, it was verified that active charcoal and

high auxins concentrations in culture media are fundamental for decrease the oxidation levels and death of the explants and improve the induction of SE in immature inflorescences of oil palm, var. dura.

Keywords: *Elaeis* sp.. Micropropagation. *Thin cell layer*. Biodiesel. Bioenergy. Agroenergy. Biofuels.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Aspectos gerais da planta do dendezeiro *Elaeis guineensis* Jacq. var. dura utilizada nos experimentos. Planta adulta de dendezeiro (A); Frutos em diferentes estágios de desenvolvimento (B); Inflorescências masculinas (C); principal característica do fruto maduro de plantas de dendezeiro variedade dura, com mais de 2 mm de espessura da semente (D); Inflorescências femininas (E) 26
- FIGURA 2 - Influência da posição do explante (Basal, Mediano e Apical) na planta doadora e diferentes tratamentos com auxinas (2,4-D e Picloram) na indução de calos embriogênicos em dendezeiro. *T1: 0 μ M (Testemunha); T2: 225 μ M de 2,4-D; T3: 450 μ M de 2,4-D; T4: 225 μ M de Picloram; T5: 450 μ M de Picloram. Embrapa, 2007..... 62
- FIGURA 3 - Embriogênese somática e regeneração de plantas de dendezeiro pela técnica *Thin Cell Layer* (TCL). (A) Ilustração esquemática dos cortes TCL das porções apical, mediana e basal de plantas de dendezeiro utilizadas no experimento de embriogênese somática (ES); (B) início da formação de calo primário, após 7 dias de cultivo em meio com Picloram; (C) Início da progressão do calo primário em calo embriogênico; (D) Calo embriogênico no início da etapa de diferenciação de embriões somáticos; (E) Início da formação de embriões somáticos a partir do calo embriogênico; (F) Aglomerado de embriões somáticos originados a partir dos calos embriogênicos; (G) embriões somáticos maduros; (H) Comparação entre um embrião zigótico (EZ) extraído de um fruto maduro de dendê e um embrião somático (ES) maduro produzido por TCL; (I) embriões somáticos no início da germinação e aspecto da assincronização do desenvolvimento (setas); (J) aspecto da formação de embriões secundários a partir dos embriões somáticos pré-existent; (K) plantas de dendezeiro regeneradas em meio de cultura com carvão ativado. Embrapa 2007..... 64

- FIGURA 4 - Plantas de dendezeiro após 3 meses de crescimento, após início da germinação dos embriões somáticos em meio de cultura sem carvão ativado para rápido crescimento. Embrapa, 2007..... 65
- FIGURA 5 - Aspecto morfo-histológico de calos primários embriogênicos de dendezeiro, var. dura, a partir de explantes do tipo *thin cell layer* (TCL). Morfologia do calo utilizado nos estudos morfo-histológicos (Barra= 1 cm) (A); explante (ex) em secção transversal do calo mostrando a proliferação da zona meristemática (zm) e tecido parenquimático (Barra= 30 µm)(tp). (B); Secção transversal do calo com visualização de tecido vascular (tv) na conexão com o explante, zona meristemática (zm) e células de revestimento do calo (cr) (Barra= 50 µm) (C). Embrapa, 2007. Abreviações: ex, explante; zm, zona meristemática; tp, tecido parenquimático; TV, tecido vascular, Cr, células de revestimento do calo. Escala das barras: A = 1 cm; B = 30 µm; C = 50 µm 70
- FIGURA 6 - Aspectos morfológicos e histológicos dos embriões somáticos e zigótico de dendezeiro var. Dura. Morfologia externa do cluster oriundo de *thin cell layer*, mostrando embriões somáticos em desenvolvimento assincrônico (A); Secção longitudinal de um embrião somático evidenciando o meristema apical, cordão procambial e protoderme (B); Detalhe do cordão procambial destacando células com citoplasma denso e núcleos proeminentes (C); Morfologia externa de embrião zigótico (D); Secção longitudinal de embrião zigótico evidenciando o meristema apical e primórdios foliares (E). Embrapa, 2007.
Abreviações: *ma*, meristema apical; *cpc*, cordão procambial; *pd*, protoderme; *cd*, citoplasma denso; *np*, núcleos proeminentes; *pf*, primórdios foliares. Escala das barras: A = 1 cm; B = 50 µm; C = 10 µm; D = 1 cm; E = 30 µm 57
- FIGURA 6 - Aspectos morfológicos e histológicos dos embriões somáticos e zigótico de dendezeiro var. Dura. Morfologia externa do cluster oriundo de *thin cell layer*, mostrando embriões

somáticos em desenvolvimento assincrônico (A); Secção longitudinal de um embrião somático evidenciando o meristema apical, cordão procambial e protoderme (B); Detalhe do cordão procambial destacando células com citoplasma denso e núcleos proeminentes (C); Morfologia externa de embrião zigótico (D); Secção longitudinal de embrião zigótico evidenciando o meristema apical e primórdios foliares (E). Embrapa, 2007.

Abreviações: *ma*, meristema apical; *cpc*, cordão procambial; *pd*, protoderme; *cd*, citoplasma denso; *np*, núcleos proeminentes; *pf*, primórdios foliares. Escala das barras: A = 1 cm; B = 50 µm; C = 10 µm; D = 1 cm; E = 30 µm 72

FIGURA 7 - Indução da embriogênese somática em dendezeiro a partir de folhas imaturas: (A) Sequência ilustrativa mostrando o segmento caulinar de mudas de dendezeiro, o seccionamento do segmento caulinar logo acima do meristema em pequenas partes e os explantes de folhas imaturas aclorofiladas medindo cerca de 1 cm² obtidos; (B) calos multi-granulares obtidos com Picloram; (C) calos granulares obtidos com 2,4-D; (D) início da formação de embriões somáticos em estágio globular induzidos em 225 µM de 2,4-D e; (E,F) embriões somáticos obtidos dos genótipos GES4 e GES6 de dendezeiro cultivados meio de MS com 225 µM de Picloram. Embrapa, 2007 79

FIGURA 8 - Aspecto geral da inflorescência utilizada como fonte de explantes. (A) inflorescência de dendezeiro dentro da espata; (B) detalhamento dos cortes apical e basal na ráquila de dendezeiro; (C) Segmentos transversais de inflorescências; (D) *cluster* com vários embriões somáticos no estágio torpedo, após 3 meses de cultivo em meio com 2,4-D. Embrapa, 2007 .. 87

FIGURA 9 - Início da formação de embriões somáticos aos 40 dias de cultivo em meio MS com carvão ativado (A) embriões somáticos após 90 dias (B). Embrapa, 2007..... 91

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	- Composição dos meios de cultura usados nas diferentes etapas da embriogênese somática em explantes TCL de dendezeiro	53
TABELA 2	- Influência do Picloram (Pi) e 2,4-D nas concentração de 225 μ M em meio de MS na formação de embriões somáticos em diferentes genótipos de dendezeiro, aos dois meses de cultivo. Embrapa, 2007	78
TABELA 3	- Influência de diferentes meios de cultura primários e concentrações de BAP associados à presença de 2,4-D (450 μ M) na indução da embriogênese somática em inflorescências femininas imaturas de dendezeiro, após 90 dias de cultivo	80
TABELA 4	- Influência da posição do explante na ráquila (basal e apical) e diferentes concentrações de 2,4-D, em meio de cultura Y3, na indução da embriogênese somática em inflorescências imaturas femininas de dendezeiro, após 90 dias de cultivo. Embrapa 2007	83
TABELA 5	- Influência do carvão ativado e PVP-40 na resposta de explantes de dendezeiro à indução de características embriogênicas, cultivados com 450 μ M de 2,4-D, aos 90 dias de cultivo. Embrapa, 2007	89

LISTA DE ABREVIATURAS

2-iP – 2- isopentenil-adenina

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

μM – Micromolar

ANA – Ácido naftalenoacético

BAP – N⁶- Benzilaminopurina

ESD – Embriogênese somática direta

ESI – Embriogênese somática indireta

KIN - Cinetina - furfurilaminopurina

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

TDZ – Tidiazuron

TCL – *Thin Cell Layer* (Fina camada de células)

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

PVP-40 – Polivinilpirrolidona

Y3 – Meio de cultura formulado por Eeuwens

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1 A CULTURA DO DENDE.....	24
2.2 MÉTODOS DE PROPAGAÇÃO.....	27
2.2.1 Propagação sexuada.....	27
2.2.2 Propagação assexuada ou micropropagação.....	28
2.3 MEIOS DE CULTURA.....	30
2.4 REGULADORES DE CRESCIMENTO.....	34
2.5 FONTE DE EXPLANTE.....	36
2.6 OXIDAÇÃO DOS EXPLANTES.....	39
2.7 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA.....	40
2.8 ETAPAS DE OBTENÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA.....	43
2.8.1 Indução da embriogênese somática.....	43
2.8.2 Multiplicação de culturas embriogênicas.....	44
2.8.3 Maturação dos embriões somáticos.....	44
2.8.4 Germinação dos embriões somáticos.....	45
2.9 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DIRETA E INDIRETA.....	46
2.9.1 Embriogênese somática secundária ou repetitiva.....	47
2.9.2 Fatores que afetam a embriogênese somática.....	48
2.10 PROPAGAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO DENDEZEIRO.....	48
2.11 ESTUDOS MORFOANATÔMICOS E HISTOLÓGICOS.....	50
3 MATERIAL E MÉTODOS	52
3.1 EFICIÊNCIA NA INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E REGENERAÇÃO DE PLANTAS EM DENDEZEIRO PELA TÉCNICA <i>THIN CELL LAYER</i> (TCL).....	52
3.1.1 Fonte de explante e condições de cultivo.....	52
3.1.2 Delineamento estatístico.....	54
3.1.3 Estudos morfo-histológicos.....	54
3.1.3.1 Obtenção do material para as análises.....	54
3.2 INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM DIFERENTES GENÓTIPOS DE DENDEZEIRO A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES	

IMATUROS.....	55
3.2.1 Fonte de explante e condições de cultivo.....	55
3.2.2 Delineamento estatístico.....	56
3.3 RESPOSTAS MORFOGÊNICAS <i>IN VITRO</i> DE INFLORESCÊNCIAS FEMININAS IMATURAS DE DENDEZEIRO QUANTO A REVERSÃO DO ESTADO FLORAL AO VEGETATIVO EMBRIOGÊNICO.....	57
3.3.1 Influência de tipos de meios de cultura e reguladores de crescimento na indução da embriogênese somática em inflorescências femininas imaturas de dendezeiro, var. dura.....	57
3.3.1.1 Fonte de explante e condições de cultivo.....	57
3.3.1.2 Delineamento experimental.....	58
3.3.2 Influência da posição do explante e concentrações de 2,4-D na indução da embriogênese somática em inflorescências femininas imaturas de dendezeiro, var. dura.....	58
3.3.2.1 Fonte de explante e condições de cultivo.....	58
3.3.2.2 Delineamento estatístico.....	59
3.3.3 Efeito de substâncias antioxidantes e 2,4-D na indução da embriogênese somática em inflorescências femininas imaturas de dendezeiro, var. dura.....	59
3.3.3.1 Fonte de explante e condições de cultivo.....	59
3.3.3.2 Delineamento estatístico.....	60
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
4.1 EFICIÊNCIA NA INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E REGENERAÇÃO DE PLANTAS EM DENDEZEIRO PELA TÉCNICA <i>THIN CELL LAYER</i> (TCL).....	61
4.1.2 Estudos morfo-histológicos.....	69
4.2 INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM DIFERENTES GENÓTIPOS DE DENDEZEIRO A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES IMATUROS.....	72
4.3 RESPOSTAS MORFOGÊNICAS <i>IN VITRO</i> DE INFLORESCÊNCIAS FEMININAS IMATURAS DE DENDEZEIRO QUANTO A REVERSÃO DO ESTADO FLORAL AO VEGETATIVO EMBRIOGÊNICO.....	80
4.3.1 Influência de tipos de meios de cultura e reguladores de crescimento na indução da embriogênese somática em inflorescências femininas imaturas de	

dendezeiro, var. dura.....	80
4.3.2 Influência da posição do explante e concentrações de 2,4-D na indução da embriogênese somática em inflorescências femininas imaturas de dendezeiro, var. dura.....	82
4.3.3 Efeito de substâncias antioxidantes e 2,4-D na indução da embriogênese somática em inflorescências femininas imaturas de dendezeiro, var. dura.....	87
5 CONCLUSÃO	92
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	93
REFERENCIAS	94

1 INTRODUÇÃO

A maior parte da energia consumida no mundo provém do petróleo, do carvão e do gás natural. Essas fontes são limitadas e com previsão de esgotamento no futuro próximo (FERRARI et al., 2005). Neste contexto, a busca por alternativas de energias, em especial as renováveis, é cada vez mais crescente no mundo. A demanda mundial por combustíveis renováveis tem se expandido de forma muito rápida nos últimos anos e deverá acelerar ainda mais, principalmente nos países que são grandes consumidores de combustíveis (MIRAGAYA, 2005).

O Brasil é um país que pode se destacar na produção de biocombustíveis para atender tanto o mercado nacional quanto o mundial. O país possui mais de 20% da área agricultável do planeta, mais de 10% da água doce do mundo e mais de 200 espécies de plantas com condições de produzir óleo (BELTRÃO, 2005). O 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. Em 2002 o governo federal lançou o Programa Brasileiro de Biocombustíveis, com o objetivo de viabilizar a produção do biodiesel e equacionar questões fundamentais para o país. As metas estabelecidas pelo programa fixaram em 2% (B2) o percentual mínimo de adição do biodiesel ao óleo diesel em qualquer parte do território nacional em 2008, e em 5% (B5) até 2013 (Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005) (AGROANALYSIS, 2007; KALTNER, 2007).

De acordo com o Plano Nacional de Agroenergia 2006-2011 (MAPA, 2006), 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 soja e mamona) para aproximadamente 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.

Nesta busca de patamares mais elevados de produtividade em termos de quantidade de óleo produzida por hectare, têm-se buscado espécies potenciais,

como por exemplo, palmeiras como o dendê, com rendimento que pode atingir de 4 a 6 ton. de óleo/hectare, correspondendo a 1,5 vez a produtividade do óleo de côco, a 2 vezes a do óleo de oliva e 10 vezes a do óleo de soja, fato que a caracteriza como a espécie de maior produtividade de óleo vegetal do mundo, com a vantagem de poder ser explorada num prazo não inferior a 25 anos (SUFRAMA, 2003; MIRAGAYA, 2005).

O dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) é uma monocotiledônea oleaginosa, perene e alógama, predominantemente cultivada em regiões de clima tropical como a América Latina, Sudeste da Ásia e África (CARVALHO et al., 2001). É originária da Região Noroeste da África (Guiné-Bissau) e pertence à família Arecaceae que contém cerca de 230 gêneros e 2779 espécies, sendo 1147 neotropicais (ZEVEN, 1964; MOORE, 1973). Outra espécie importante de dendezeiro, mas esta de origem americana, é a *Elaeis oleifera* (H.B.K), comum na floresta Amazônica e chamada no Brasil como palmeira “Caiué”. Apesar de possuir algumas características agrônômicas desejáveis, como porte baixo e resistência ao mal do amarelecimento fatal e *Fusarium*, as duas principais doenças da cultura, o *E. oleifera* (H.B.K.) não é considerado viável economicamente quando comparado ao *E. guineensis* (Jacq.), pelo seu rendimento de óleo ser inferior (RENARD et al., 1980; HARDON et al., 1985; LE GUEN et al., 1991; SANTOS, 1991; BERGAMIN FILHO et al., 1998; MORETZSOHN et al., 2002). No entanto, *E. oleifera* é bastante indicada e utilizada em programas de melhoramento da espécie (BARCELOS et al., 2002; REY et al., 2004) uma vez que, mesmo com centros de origem geograficamente distantes, estas duas espécies são compatíveis no cruzamento, podendo gerar híbridos férteis (HARDON; TAN, 1969; AMBLARD et al., 1995).

Contudo, por ser uma espécie alógama e propagada exclusivamente pela via sexuada (sementes), apresenta o inconveniente de formação de plantios heterogêneos, causando desuniformidade na produção e dificuldades nas práticas de cultivo e manejo, devido a variabilidade das plantas. Ressalte-se que por se tratar de uma espécie monocotiledônea típica, o dendezeiro possui um único ápice crescente, impedindo que sua multiplicação vegetativa seja feita por meios convencionais (RIVAL et al., 1998; JALIGOT et al., 2000; KUBIS et al., 2003). Nos poucos programas de melhoramento genético da espécie existente no Brasil, a multiplicação de genótipos selecionados também se dá exclusivamente por meio de sementes, fato que, na ausência de métodos adequados de clonagem 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 isso, tal como tem sido observado nos programas de melhoramento da espécie, há preocupações quanto à multiplicação dos genótipos selecionadas, pois além da possibilidade de se obter indivíduos heterogêneos, a multiplicação por sementes requer um período relativamente longo até que novas mudas sejam formadas. Portanto, torna-se imperativo que se avance nas pesquisas para a obtenção de protocolos seguros e confiáveis para a propagação clonal em larga escala de materiais superiores.

No Brasil, embora a técnica de cultura de tecidos já tenha proporcionado bons resultados para algumas espécies de palmeiras, sobretudo tamareira (NUNES, 1998; COSTA; ALOUFA, 2006), coqueiro (GOMES et al, 2004), açazeiro (LEDO et al., 2002 a,b; GUEDES et al., 2006; FERMINO JR et al., 2007) e pupunheira (SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2007; STEINMACHER, 2007 a,b,c), para a cultura do dendezeiro praticamente inexistem grupos de pesquisadores e, conseqüentemente, resultados de pesquisa capazes de serem usados visando a clonagem de materiais elite. Neste contexto, a cultura de tecidos de plantas surge como uma excelente alternativa para a multiplicação clonal da espécie, pois o dendezeiro encaixa-se perfeitamente no grupo de espécies de plantas desejáveis à micropropagação por possuir plantas altamente heterozigotas, populações desuniformes e crescimento monopodial (DURAND-GASSELIN et al., 1990; TEIXEIRA et al. 1995; RAJESH et al., 2003).

De modo geral, entre as diversas técnicas de clonagem de plantas *in vitro*, a embriogênese somática, também denominada de embriogênese assexual ou adventícia, é sem dúvida a mais indicada e perseguida cientificamente pelos pesquisadores visando à clonagem das palmeiras *in vitro*. A embriogênese somática apresenta a vantagem de poder ser induzida a partir de diferentes tipos de explantes (propágulos), tais como embriões zigóticos, inflorescências, ápices caulinares, folhas imaturas, etc., podendo proporcionar a multiplicação de milhares de plantas idênticas (GUERRA et al., 1999; BISWAS et al. 2007; STEINMACHER et al. 2007 a), desde que condições especiais de crescimento, como meios de cultura, reguladores de crescimento e condições ambientais sejam fornecidos adequadamente aos cultivos.

Este trabalho teve por objetivo estabelecer um protocolo de indução da embriogênese somática e regeneração de plantas de dendezeiro (*E. guineensis*, var. *dura*), a partir de diferentes explantes, meios de cultura e combinações de reguladores de crescimento, bem como avaliar aspectos morfo-histológicos estruturais dos tecidos embriogênicos formados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A CULTURA DO DENDÊ

O dendezeiro pertence à família Arecaceae que contém cerca de 225 gêneros e 2779 espécies, sendo 1147 neotropicais (ZEVEN, 1964; MOORE, 1973). 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), que podem distinguí-las de qualquer outro vegetal (NEGRÃO, 1999) (FIGURA 1).

A cultura apresenta melhor desenvolvimento em regiões tropicais, tornando-se perfeitamente adaptável ao clima equatorial quente e úmido, com precipitação pluviométrica elevada e bem distribuída ao longo do ano (CARVALHO et al. 2001). O clima ideal inclui 2.000 milímetros de chuvas uniformemente distribuídas ao longo do ano, e sem estações secas marcantes (BERGERT, 2000). É predominantemente cultivada na América Latina, África e Sudoeste da Ásia. A Malásia é o maior produtor e exportador de óleo e derivados do dendê, com produção total no ano de 2007 de 15.823,746 milhões de toneladas e aumento na área plantada no mesmo ano de 3,4%, passando para 4,3 milhões de hectares. O cultivo do dendezeiro ocupa 67% da terra agricultável total da Malásia, com perspectivas de produção para o ano de 2020 de 20 milhões toneladas (MPOBS, 2008).

No Brasil, o dendezeiro foi introduzido pelos escravos no litoral sul da Bahia ainda no século XVI. Atualmente, a produção brasileira deste óleo gira em torno de 115 mil toneladas/ano, não chegando, portanto, a 1% do total produzido pela Malásia e 0,5% da produção mundial. Ao nível internacional, o Brasil ocupa o 13º lugar na produção desta oleaginosa. O Estado com maior produção é o Pará, responsável por aproximadamente 85% do óleo produzido no país. Na América Latina, o Brasil ocupa o 3º lugar, logo após as produções da Colômbia e Equador (SUFRAMA, 2003). No entanto, considerando-se apenas dois estados da Amazônia, estima-se que atualmente o Brasil disponha de cerca de 70 milhões de hectares adequados para essa cultura, sendo 50 milhões no Estado do Amazonas e 20 milhões no Pará. Essas áreas têm condições de produzir dendê para absorver grandes demandas internas e externas, o que tornaria o Brasil um dos maiores

produtores mundiais (CARVALHO et. al., 2006). A expectativa em relação à cultura do dendezeiro advém de sua relevância para o cenário energético e ecológico. Boddey (1993) salientou que se 30% da área desflorestada da Amazônia brasileira fosse utilizada para o plantio dessa palmeira oleaginosa, haveria possibilidade de suprir a demanda diária de 460 mil barris de óleo diesel consumidos no país, com a vantagem de gerar empregos para a população daquela região. O óleo combustível gerado pelo dendezeiro é renovável e não contribui para o aumento do efeito estufa. De acordo com Viegas e Muller (2000), o dendezeiro é o segundo cultivo do mundo em importância na mitigação do efeito estufa, só perdendo para o cultivo de eucalipto.

Atualmente, estima-se que a área de dendezeais no Brasil atinja cerca de 60.000 ha, todos implantados na Região Norte brasileira, especialmente no estado do Pará. No entanto, o dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) tem sido considerado uma cultura de grande potencial agrícola ao País, pelo fato de seu óleo possuir alto poder calorífico, abrindo possibilidades de ser utilizado como biocombustível. Neste contexto, com o propósito de antecipar os efeitos de uma futura crise no suprimento de petróleo, como também de reduzir as emissões de gases tóxicos para a atmosfera, em 2002 o governo federal lançou o Programa Brasileiro de Biocombustíveis, com o objetivo de viabilizar a produção do biodiesel e equacionar questões fundamentais para o país.

A geração de energia através de modelos alternativos, via produção de biodiesel extraído de espécies como o dendê, vem de encontro a estes anseios, especialmente por ser uma das oleaginosas mais produtivas que se tem conhecimento. Além disso, quando cultivada sob condições edafoclimáticas ideais, constitui-se como uma cultura permanente, normalmente de produção continuada e com possibilidade de ser explorada num prazo de até 25 anos (SUFRAMA, 2003). Quando no estágio adulto, a planta oferece considerável proteção ao solo, podendo ser cultivada isoladamente ou em consorciação, sendo uma espécie altamente recomendada para plantios em áreas com solo degradado, como os da Amazônia (JUNIOR; MULLER, 2004). Programas de melhoramento desta espécie têm sido estrategicamente implementados por algumas poucas instituições de pesquisa, com ênfase na introdução, seleção e melhoramento genético de materiais com características agrônômicas de interesse, especialmente relacionadas à obtenção de cultivares mais produtivas e resistentes a doenças.

A biotecnologia agrícola surge como uma ferramenta importante ao melhoramento, uma vez que pode possibilitar a multiplicação clonal de genótipos elite selecionados em larga escala, ainda nos primeiros ciclos de seleção, sendo que para a cultura do dendezeiro oferece vantagens significativas em comparação à propagação convencional, principalmente quando se emprega a embriogênese somática. A produção em larga escala de genótipos superiores é sem dúvida a técnica mais estudada e procurada cientificamente pelos pesquisadores visando à clonagem das palmeiras *in vitro*, pois por meio deste processo, é possível obter milhares de novas plantas idênticas (DUVAL et al., 1988; LEDO et al., 2002 a), assim como também conferir maior estabilidade genética aos propágulos obtidos (STEINMACHER, 2005).



FIGURA 1- Aspectos gerais da planta do dendezeiro *Elaeis guineensis* Jacq. var. dura utilizada nos experimentos. Planta adulta de dendezeiro (A); Frutos em diferentes estágios de desenvolvimento (B); Inflorescências masculinas (C); principal característica do fruto maduro de plantas de dendezeiro variedade dura, com mais de 5 mm de espessura da semente (D); Inflorescências femininas (E). Embrapa, 2007

2.2 MÉTODOS DE PROPAGAÇÃO

2.2.1 Propagação sexuada

De modo geral, as palmeiras possuem um único ápice crescente, denominado meristema apical, fato que dificulta enormemente a multiplicação vegetativa destas espécies por técnicas convencionais. Além disso, muitas palmeiras, como é o caso do dendezeiro, não apresentam perfilhamento no campo, tornando a multiplicação vegetativa praticamente impossível de ser realizada por métodos convencionais. Por esse motivo, as palmeiras são multiplicadas quase que exclusivamente por sementes, o que leva a obtenção de plantas desuniformes geneticamente, devido à segregação e a recombinação de genes que ocorrem durante a reprodução sexual (SUMIANAH et al. 1984) e constituindo-se num dos principais fatores relacionados à produtividade da maioria dos plantios comerciais (RODRIGUES, 1989). No dendezeiro, além desses inconvenientes, nos programas de melhoramento, a multiplicação de genótipos também ocorre via germinação de sementes. Esta metodologia impede com que algumas características agronômicas desejáveis sejam expressadas e perpetuadas em um determinado genótipo. Como o ciclo para a produção do dendezeiro é muito longo, o cruzamento das progênes pode representar grande variação no rendimento de óleo nos diferentes ciclos de seleção.

A maioria dos dendezeiros comerciais conhecidos atualmente são híbridos F1 entre seleções de sementes (*dura*) e (*pisifera*), dando origem ao híbrido (*tenera*). As variedades de dendezeiro são diferenciadas pela espessura da amêndoa que é governada por um gene denominado (*Sh*). O tipo *dura*, de genótipo homozigoto com genes Sh^+/Sh^+ , possui frutos com espessura de amêndoa de 2 a 8 milímetros, dependendo das progênes. O tipo *pisifera*, de genótipo homozigoto com genes Sh^-/Sh^- , geralmente produz frutos com espessura de amêndoa reduzida ou até mesmo ausente. O tipo *tenera* é o híbrido resultante do cruzamento das espécies *pisifera* e *dura*, possuindo genótipo heterozigoto com genes Sh^+/Sh^- , e frutos com espessura de amêndoa que variam entre 0.5 a 4 milímetros, dependendo do genótipo (BILLOTTE et al, 1999). Porém, os híbridos (*tenera*) resultantes do cruzamento mostram variação elevada no rendimento de óleo com as melhores plantas podendo render até 50% mais do que a média obtida pelas outras variedades (KUBIS et al. 2003).

2.2.2 Propagação assexuada ou micropropagação

A propagação vegetativa *in vitro*, também denominada de micropropagação ou propagação *in vitro* devido ao tamanho dos propágulos utilizados, é considerada como a de aplicação mais prática da cultura de tecidos e de maior impacto na obtenção de plantas livres de doenças (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Este processo pode ser uma alternativa para a produção de plantas que produzem poucas sementes, e/ou cujas sementes são recalcitrantes e para aquelas cuja propagação por sementes tenha um alto custo, como no caso das palmeiras (HIGASHI; SILVEIRA, 2000). Além disso, plantas clonadas de dendezeiro podem apresentar aumento no rendimento de até 30% se comparadas a materiais propagados convencionalmente (LUBIS et al., 1993).

O princípio básico da cultura de tecidos de plantas é a totipotencialidade das células, ou seja, a capacidade de qualquer célula da planta poder originar um novo indivíduo, em razão de a célula conter toda a informação genética necessária para a regeneração completa de outra planta (HABERLANDT, 1902¹ citado por CID, 2001).

De modo geral, são incomparáveis os benefícios e a superioridade da micropropagação frente à propagação convencional para a grande maioria das plantas propagadas vegetativamente, tais como: a) A micropropagação pode ser usada como alternativa aos métodos convencionais de propagação vegetativa com o objetivo de aumentar a taxa da multiplicação; b) Na propagação clonal *in vitro*, grandes quantidades de plantas podem ser obtidas a partir de uma única fonte de explante ou qualquer outro tecido da planta potencialmente responsivo; c) Na grande maioria dos casos onde é feita a retirada dos explantes, a planta original não é destruída no processo, um fator de considerável importância em se tratando da raridade da planta; d) Plantas micropropagadas pela cultura de tecidos são obtidas em um espaço de tempo mais curto quanto a propagação convencional; e) A cultura de ápices caulinares em muitos trabalhos já demonstrou ser eficaz na limpeza clonal de vírus, bactérias e outros agentes patogênicos através de tratamentos térmicos ou quimioterápicos; f) A propagação é contínua ao longo do ano, não levando em consideração espécies de curto ou longo (perene ou anual); g) Melhoramento de

¹ HABERLANDT, G. Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. Sitzungsber. Acad. Wiss. Wien. Math. Naturwiss. Kl., Abt. 1. 111, 69–92, 1902.

espécies de plantas que possuem dormência nas sementes, através da cultura de embriões imaturos *in vitro*, acelerando a germinação; h) Enquanto que o melhoramento convencional permite a fixação dos ganhos genéticos nas gerações subseqüentes, a micropropagação permite a exploração da variação genética na geração corrente, através da clonagem de genótipos superiores; i) Custo baixo uma vez estabelecido e otimizado o protocolo de micropropagação; j) Armazenamento a longo prazo de germoplasma, além da possibilidade de troca e intercâmbio entre as instituições de pesquisas; l) Utilizando métodos de micropropagação, o produtor pode rapidamente introduzir clones selecionados de plantas com produtividade aumentada em quantidades suficientes, com isso para causar impacto no mercado de plantas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Além das vantagens citadas acima, deve-se considerar que a velocidade de multiplicação de plantas propagadas vegetativamente por meio da propagação *in vitro* é normalmente superior aos métodos convencionais de propagação, servindo de ferramenta para se obter material de plantio em larga escala. Nas técnicas de cultivo *in vitro*, o estabelecimento de células, tecidos ou órgãos vegetais sob condições controladas tem como conseqüência a interrupção do controle hormonal a que estas células estavam submetidas. Sendo expostas a uma nova condição ambiental, as células vegetais podem expressar um potencial morfogênico que não se expressaria *in vivo* (KERBAUY, 1999; RODRIGUES et al., 2004).

De modo geral, as células cultivadas *in vitro* podem manifestar sua totipotência, segundo duas rotas alternativas: a) organogênese, que conduz à diferenciação de meristemas caulinares e/ou radiculares, originando caules e raízes, respectivamente; b) embriogênese somática, que conduz a formação de embriões somáticos, seguindo as fases do embrião zigótico, embora, obviamente, sem fecundação (SEGURA, 1993). No entanto, deve-se atentar para as diferenças nas respostas morfogênicas *in vitro* entre gêneros e mesmo entre espécies de uma mesma família. Mesmo dentro de uma espécie, há diferenças notáveis entre subespécies e cultivares, de modo que uma única formulação do meio de cultura para o crescimento da planta seja frequentemente inadequada para a morfogênese (LITZ, 1993).

2.3 MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura, por constituírem parte essencial da cultura de tecidos, constantemente sofrem modificações na composição salina e de vitaminas, de acordo com a especificidade, necessidade e o objetivo da micropropagação (CORREIA et al., 1995). Na literatura, existem vários meios de cultura propostos, porém, as formulações mais empregadas compreendem os meios de MS Murashige e Skoog (1962) (WU et al. 2007; TAKEDA et al. 2007), WPM (Woody Plant Medium), Lloyd ; Mccown, (1980) (RENYING et al. 2007; YOU et al, 2007); LS Linsmaier e Skoog, (1965), Y3 Eeuwens, (1976) (LEDO et al. 2007; SAENZ et al. 2006; FUENTES et al. 2005).

Os diferentes meios de cultura usados para a micropropagação diferem essencialmente na concentração dos macro e micronutrientes, vitaminas, compostos orgânicos, fonte de carbono e outras substâncias complexas, normalmente específicas para uma espécie ou etapa da micropropagação.

A baixa capacidade fotossintética das plantas cultivadas *in vitro* requerem a adição de carboidratos no meio de cultura para suprir as necessidades metabólicas, quer participando na geração de energia ou como fontes de esqueletos carbônicos para os vários processos biossintéticos implicados na diferenciação e crescimento celular (LEIFERT et al., 1995). Murashige e Skoog (1974) afirmam que vários carboidratos têm sido usados, mas não têm mostrado superioridade sobre a sacarose, utilizada geralmente a 3% (p/v), que suporta as mais altas taxas de crescimento da maioria das espécies. Os carboidratos também desempenham papel importante na manutenção da osmolaridade adequada do meio de cultura e promoção do crescimento embrionário (HU; FERREIRA, 1998). O aumento, a redução ou a eliminação da sacarose no meio de cultivo podem ser determinantes no sucesso do enraizamento *in vitro* para muitas plantas, sendo um fator importante para obter crescimento satisfatório, dependendo do meio de cultura e do explante (CALAMAR; KLERK, 2002; CYSNE, 2006). A quantidade de sacarose também afeta a assimilação de nutrientes, o efeito de reguladores de crescimento, a produção de metabólitos secundários, de grande importância nos processos metabólicos e na composição da parede celular (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Nicoloso et al. (2003) avaliou o efeito de doses (15, 30, 45 e 60 g.L⁻¹) e fontes de carboidratos (sacarose, frutose, glicose, maltose e lactose) no crescimento de *Pfaffia glomerata*

(Spreng.) Pedersen cultivadas *in vitro*. Os parâmetros avaliados aos 41 dias após a inoculação foram: o número de brotações, o número total de segmentos nodais por planta, a altura média das brotações, a altura da maior brotação, a massa fresca e seca da parte aérea e a massa seca das raízes. A melhor fonte de carbono para o crescimento *in vitro* foi a sacarose, sendo a lactose considerada inapropriada para o cultivo desta espécie.

Os níveis de nutrientes orgânicos e inorgânicos nos meios de cultivo *in vitro* influenciam sobremaneira os vários processos metabólicos, apresentando efeito sobre o crescimento e diferenciação dos tecidos (MALDANER et al., 2006). Presume-se que os componentes minerais do meio de cultura têm um papel primeiramente de suporte no processo de regeneração (RAMAGE; WILLIAMS, 2002). Segundo Epstein e Bloom (2005), são treze os elementos minerais essenciais para o crescimento das plantas *in vitro* e a determinação dos níveis ótimos dos nutrientes nos experimentos é considerada complexa. No caso das formas orgânicas de nitrogênio utilizadas em cultura de tecidos, se inclui as misturas complexas de compostos nitrogenados, como extrato de levedura, extrato de malte e caseína hidrolisada. Estas misturas fornecem um conjunto de aminoácidos que estimulam o crescimento de muitas espécies *in vitro* e dependendo da espécie, pode ser observada inibição do crescimento e desenvolvimento, quando um aminoácido é acrescido isoladamente ou em mistura (TORRES et al. 1998).

O ferro, considerado elemento essencial nas transformações energéticas, está diretamente implicado no metabolismo de ácidos nucléicos e atua como ativador enzimático, podendo influenciar o desenvolvimento *in vitro* e promover oxidação dos explantes (CALDAS et al., 1998; UTINO et al., 2001). Para que o ferro seja absorvido pelas plantas cultivadas *in vitro*, a solução estoque é preparada para disponibilizar o ferro na forma de quelato com EDTA. Na forma não complexada, o ferro formaria quelatos com substâncias orgânicas que são liberadas naturalmente pelo explante no meio de cultura, o que acarretaria maiores taxas de oxidação. Diferentes concentrações de $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, têm sido utilizadas em meios nutritivos Y3 e MS, para o cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de variedades de coqueiro anão e coqueiro-gigante, com variação nas respostas morfogenéticas (ENGELMANN; BATUGAL, 2002).

O cálcio apresenta limitações na sua translocação na planta intacta, que, às vezes, são observadas também *in vitro*. Como o cálcio depende da transpiração da

planta para seu transporte no xilema, as condições de alta umidade do ar que se estabelecem *in vitro* podem induzir deficiência de cálcio em partes aéreas sob micropropagação (CALDAS et al., 1998).

O magnésio é um micronutriente integrante da molécula de clorofila, responsável pela ativação enzimática dentro da célula. Participa dos processos de emergência de plântulas e no crescimento de raízes, fotossíntese, respiração, armazenamento, transferência de energia e sínteses orgânicas (MENGEL; KIRKBY, 1979).

Considerado como elemento chave no meio de cultura MS, o nitrogênio na forma de NH_4^+ e NO_3^- afetam numerosas respostas *in vitro*, incluindo a organogênese e a embriogênese somática (AMMIRATO, 1983; LELJAK-LEVANIC' et al. 2004; ELKONIN; PAKHOMOVA 2000; PODDAR et al. 1997). Por ser constituinte de várias biomoléculas essenciais como: aminoácidos, ácidos nucléicos, proteínas, enzimas e outros, sua assimilação se dá em diversos processos metabólicos da planta. (MAGALHÃES; WILCOX, 1987). Donato et al. (1999) avaliaram o comportamento de três variedades de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* em diferentes fontes de nitrogênio em meio MS, com as fontes de nitrogênio modificadas de acordo com o tratamento, sendo que os meios de cultura elaborados foram o M1 constituído dos sais MS integral (controle); M2 no qual a fonte de nitrogênio do meio MS foi substituída por $4,39 \text{ g.L}^{-1}$ de glutamina; M3 com KNO_3 como única fonte de nitrogênio e M4 com KNO_3 do MS + $3,0 \text{ g/l}$ de glutamina. A estes meios foram submetidas três variedades de cana-de-açúcar e de acordo com os resultados, a combinação entre o nitrato de potássio e o nitrato de amônio (sais "MS" integral) foi a mais adequada para a micropropagação da cana-de-açúcar. A concentração de

Formas orgânicas de nitrogênio, como a caseína hidrolizada, podem ser usadas em cultura de tecidos. A glutamina (precussora dos demais aminoácidos), também tem sido utilizada com muito sucesso na complementação das fontes inorgânicas de nitrogênio, ou ainda como fonte única de nitrogênio, promovendo o crescimento de tecidos *in vitro* (CALDAS et al., 1990). É possível que a suplementação exógena de glutamina estimule a síntese de proteínas e a rápida divisão de células embriogênicas (STASOLLA et al., 2001). Garin et al. (2000) indicou que o aumento da concentração de glutamina aumentou ligeiramente a osmolaridade do meio, que por sua vez pode ter um efeito na resposta da maturação

dos embriões. Em embriões somáticos de dendezeiro, a utilização da glutamina sozinha ou em combinação com arginina foi benéfica na acumulação de proteínas (MORCILLO et al., 1999).

O potássio é absorvido pelas plantas na forma de K^+ e é usualmente o catiônico mais abundante nas células vegetais. Seu principal papel é o de ativador de numerosas enzimas. Entra na planta como íon acompanhante do nitrato, fosfato ou, em alguns casos, do cloreto e enxofre (CALDAS et al., 1998; FIGUEIREDO et al., 2008). Quando o cloro é o ânion acompanhante, na forma de KCl, eles são absorvidos em quantidades equivalentes ao potássio. Entretanto, quando se utiliza o enxofre como acompanhante, na forma de K_2SO_4 , tem-se maior ativação de enzimas proteolíticas e síntese de vitaminas. A deficiência de potássio no meio de cultura pode conduzir, segundo alguns autores, à hiperidricidade e ao decréscimo na taxa de absorção de fosfato (PASQUAL, 2001 a).

A água é um componente básico de maior quantidade de todos os meios de cultura e sua qualidade é essencial para a obtenção de resultados satisfatórios na cultura de tecidos. Para a purificação da água, basicamente são utilizados os métodos de destilação, que elimina os compostos orgânicos, e desmineralização, que consiste na passagem da água numa coluna de resina de troca catiônica e aniônica (CALDAS et al. 1998).

Ainda segundo Maheshwari et al. (1982) e Reynolds (1997), além da constituição nutricional, outros fatores podem influenciar significativamente o desenvolvimento dos tecidos *in vitro*, como as condições físicas do meio de cultura. Alguns tecidos expressam melhores respostas quando cultivados em meios sólidos, enquanto outros tecidos desenvolvem-se melhor em meios de consistência líquida. No geral, a escolha do meio é ditada pela finalidade, espécie ou a variedade a ser cultivada *in vitro* (PRAKASH et al, 2004).

Nos meios de cultura de consistência sólida, vários são os tipos e classes do ágar disponíveis comercialmente, que diferem nas quantidades de impurezas, capacidade geleificante e composição (PRAKASH et al., 2004). Os solidificantes fornecem sustentação apropriada para as plantas *in vitro*, embora a rigidez excessiva do gel deva ser evitada para permitir o contato adequado entre o meio de cultura e a planta (BERRIOS et al. 1999). A concentração e o tipo do agente geleificante usado na cultura de tecidos de plantas podem ter efeitos drásticos no crescimento e no desenvolvimento dos explantes (WILLIAMS, 1993). Os mais

utilizados são o Ágar, Agargel, Gelrite e o Phytigel. O Agar, produto natural extraído de algas marinhas, é composto por uma mistura complexa de polissacarídeos, principalmente por agarose e agarpectinas. O Phytigel e o Gelrite são heteropolissacarídeos produzidos por bactérias e complementados com moléculas de keto-glucuronato, ramnose e celobiose. O Agargel por sua vez, é composto por phytigel e ágar (GEORGE, 1993).

Já no meio de cultura líquido, o contato próximo do tecido com o meio pode estimular e facilitar a absorção dos nutrientes e dos reguladores de crescimento, melhorando o crescimento das gemas e raízes (PEREIRA; FORTES, 2003; MEHROTRA et al., 2007). Os meios líquidos também permitem melhor diluição de exsudatos oriundos do explante, evitando, desta forma, o acúmulo de compostos tóxicos (FERREIRA et al, 2001). Porém, algumas desvantagens são observadas nos meios de cultura de consistência líquida, como no caso da vitrificação, também conhecida como hiperidricidade, que designa as malformações hiperídricas que freqüentemente afetam plantas lenhosas e herbáceas durante sua propagação vegetativa *in vitro* (KEVERS et al., 2004).

2.4 REGULADORES DE CRESCIMENTO

Regulador 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.; ARSHAD, 1995). 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%) (JIMENEZ, 2005).

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).

Já no grupo das citocininas, nos protocolos que a utilizam em conjunto com as auxinas para a embriogênese somática, Raemakers et al. (1995) cita que o BAP é constantemente a mais empregada (57%), seguida pela cinetina (37%), zeatina (3%) e thidiazuron (3%). Ressalte-se que na grande maioria das vezes, a conjugação de auxinas com citocininas tem sido mais efetiva na indução da embriogênese do que somente as citocininas (MERKLE et al. 1995). As citocininas são freqüentemente utilizadas para estimular a multiplicação celular, diminuir a dominância apical, pois promovem a formação de brotos axilares e retardar o envelhecimento. Além disso, por serem substâncias antagônicas às auxinas, sua utilização inibe a formação de raízes (GOMEZ, 2002). Do grupo das citocininas, o thidiazuron (TDZ), uma citocinina pertencente às feniluréias, está surgindo como alternativa para alta frequência de regeneração direta de embriões somáticos (GAIRI; RASHID 2004 a,b; PANAIA et al. 2004; ZHANG et al. 2005). Em palmáceas, apesar de o TDZ ter sido empregado na regeneração de embriões somáticos de *Serenoa repens* (GALLO-MEAGHER; GREEN, 2002), e na regeneração de brotos combinado com BAP em *Areca catechu* (WANG et al, 2003), não existem relatos de sua utilização na indução da embriogênese somática.

A quase totalidade dos experimentos que obtiveram sucesso a propagação vegetativa *in vitro* do dendezeiro usaram a embriogênese somática, partindo-se de calos induzidos em meio de cultura com 2,4-D (JONES, 1974; RABECHULT; MARTIN, 1976; PARANJOTHY; OTHMAN, 1982; NWANKWO; KRIKORIAN, 1983; BLAKE, 1983; 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), e que 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).

Apesar dos reguladores de crescimento apresentarem um papel predominante na morfogênese *in vitro*, o processo também é significativamente influenciado por fatores ambientais, como a temperatura e a luminosidade (LERCARI et al. 1999). Geralmente, na indução e regeneração da embriogênese e embriões somáticos, os explantes são mantidos sob condições de obscuridade e luminosidade, respectivamente, e em temperatura em torno de 25 °C.

2.5 FONTE DE EXPLANTE

Uma planta íntegra é um sistema pluricelular altamente diversificado, originado de uma célula inicial única, o zigoto, com seu complemento genético característico (totipotência). Neste contexto, podemos conceituar explante como sendo 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).

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). Conforme Pierik (1990), 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; BIASI, 2004; THOMÉ et al. 2004). 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*. Mas 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).

Protocolos de embriogênese somática já foram descritos para algumas espécies de palmeiras utilizando como explantes embriões zigóticos (TEIXEIRA et al, 1993; HUONG et al, 1999; LEDO et al, 2002; WANG et al, 2003; GUEDES et al. 2006; PEREIRA et al., 2007; STEINMACHER et al, 2007 a) folhas e inflorescências imaturas (SCHWENDIMAN et al, 1988; VERDEIL et al, 1994; TEIXEIRA et al, 1994; KARUN et al, 2004; GUERRA; HANDRO, 1998; STEINMACHER et al, 2007 b) e ovários não fertilizados (PERERA et al, 2007).

Desde 1973, diversos trabalhos abordam a utilização de inflorescências imaturas de palmeiras *in vitro*. A utilização deste tipo de explante em protocolos de micropropagação faz dessa fonte de explantes uma das mais importantes fontes de explante na indução da embriogênese somática (TEIXEIRA et al. 1994; KARUN et al, 2004) contaminação microbiana exógena. Além disso, estão geralmente disponíveis em grandes quantidades, além dos estágios iniciais de desenvolvimento apresentarem competência celular por poder existir até 3.000 meristemas florais por inflorescência (EEUWENS; BLAKE, 1977; GUERRA; HANDRO, 1998; DESAI et al, 2004). Porém, altos níveis de auxinas são relatados como sendo necessários para a indução da morfogênese, dados estes confirmados quando se utilizaram inflorescências de tamareira (EEUWENS; BLAKE, 1977). De Mason e Tisserat (1980) postularam que a aplicação de auxinas no meio de cultura aumentou a frequência de indução de calos em inflorescências masculinas de tamareira. Porém, os resultados observados revelaram que as respostas dependeram do estágio fisiológico e origem do material utilizado como explante, tendo sido observados também altos níveis de oxidação e morte dos explantes, após poucas semanas de cultivo *in vitro* (TISSERAT, 1979), fato que demonstra a dificuldade de se trabalhar com este tipo de material. Em *Cocos nucifera*, raízes e embrióides foram iniciadas a partir de explantes florais, o que não aconteceu quando se utilizou explantes provenientes de tecidos foliares e meristemáticos (EEUWENS, 1978). Fki et al.

(2003), testaram um protocolo para regeneração de plantas a partir de culturas de suspensões embriogênicas de *Phoenix dactylifera* L. cv. Deglet Nour e concluíram que a capacidade das inflorescências em formar calos foi bem maior que os explantes foliares.

Folhas imaturas também são consideradas excelentes fontes de explantes no cultivo *in vitro* de palmeiras. Besse et al. (1992) utilizando como explante folhas imaturas de quatro clones de dendezeiro denominados C1, C2, C3 e C4, obtiveram dois tipos de calos subcultivados nos mesmos meios de cultura MS suplementado com 2,4-D: calos nodulares compactos e calos friáveis. De acordo com os dados, na morfologia e status fisiológicos dos calos estes eram diferentes, mas exibiam potencialidade similar para a indução da embriogênese. Estudos realizados por Koornneef et al. (1993) e Smith et al. (1995), indicaram que a competência e a determinação dos explantes resultam da ação diferencial de genes que regulam as diversas etapas do desenvolvimento. Em dendezeiro var. *tenera*, os resultados das pesquisas desenvolvidas por Morcillo et al. (2007) utilizando explantes foliares demonstraram a expressão do gene *EgAP2-1*, que codifica a proteína *AINTEGUMENTA-like (AIL)* em tecidos meristemáticos de embriões zigóticos. Estes estudos revelaram que a transcrição do gene *EgAP2-1* foi mais proeminente em embriões zigóticos. Porém, um teste padrão da expressão foi investigado mais detalhadamente pela hibridização *in situ* e revelou que tanto em embriões zigóticos quanto somáticos, a expressão do gene *EgAP2-1* está concentrada nos tecidos em proliferação, associados com o desenvolvimento dos primórdios foliares e no início da rizogênese.

O termo *thin cell layer* (da sigla em inglês TCL) é usada para descrever explantes minúsculos excisados longitudinalmente ou transversalmente dos tecidos das plantas, incluindo geralmente tecidos da epiderme, subepiderme e de finas lâminas foliares (KLERK, 2004). Desde que a regeneração de órgãos específicos pôde eficazmente ser manipulada com o uso da técnica *Thin Cell Layer* (TCL), o uso de explantes advindos desta técnica vem sendo utilizada efetivamente na micropropagação de leguminosas, plantas medicinais e ornamentais (SILVA; TANAKA, 2006; ZHAO et al. 2007; EBERHARD et al. 1989; NHUT et al. 2001; SILVA; FUKAI, 2003; ŠAULIENE; RAKLEVIČIENE, 2004; CANTRILL et al. 2005; GHNAYA et al. 2008; SILVA, 2003 a; FALASCA et al. 2004). Na embriogênese somática alguns poucos trabalhos foram desenvolvidos (SHU; LOH, 1991; FIORE et

al. 2002; LEGUILLON et al. 2003; LAKSHMANAN et al. 2006). Porém, não existem na literatura trabalhos que fazem o uso desta técnica visando a indução da embriogênese somática em palmeiras, especialmente dendê, com exceção do trabalho desenvolvido por Steinmacher et al. (2007 c) que utilizou TCL em explantes foliares de pupunheira na indução da embriogênese somática.

2.6 OXIDAÇÃO DOS EXPLANTES

A oxidação de explantes é considerada um dos aspectos mais sérios relacionados com a cultura de tecidos de palmeiras. O escurecimento é atribuído à liberação e oxidação de exsudatos que na verdade são compostos fenólicos como a melanina, suberina, lignina, cutina e calose em torno da superfície incisada, tornando-as escurecidas que prejudicam a absorção de metabólitos, chegando a modificar a composição do meio de cultivo (MÔNACO et al., 1977; ANDRADE et al. 2000; MELO et al, 2001). Geralmente, a oxidação fenólica é altamente dependente do genótipo e do tipo de explante utilizado, onde explantes jovens em geral oxidam menos que os mais velhos (TEIXEIRA, 2005). Portanto, normalmente é necessária a adição de substâncias que previnam ou diminuam a oxidação dos explantes. Dentre estas substâncias as mais utilizadas são o carvão ativado, o PVP, ácido ascórbico e ácido cítrico (GANESAN et al, 2007; XIAO et al, 2007; GUO et al, 2007; LIN et al, 2007; WANG et al, 2005; LIAO et al, 2004).

O carvão ativado age promovendo adsorção dos exsudatos liberados pelo explante, como os compostos fenólicos que provocam a oxidação. No entanto, também possui as propriedades de adsorver e reduzir a disponibilidade de nutrientes e reguladores de crescimento adicionados exogenamente no meio de cultura, um fator desfavorável ao seu uso (GEORGE, 1996). Em protocolos de cultura de tecidos de palmeiras, o carvão ativado é o que tem proporcionado os melhores resultados, passando a ser incluído normalmente como procedimento-padrão em concentrações de até 0,3% (TISSERAT, 1987, 1979; PARANJOTHY; OTHAMAN, 1982; ASHUBURNER et al., 1993). O uso do carvão ativado é mais indicado do que outros adsorventes, pois estes últimos são considerados tóxicos ou pouco efetivos no cultivo de tecidos de plantas. Ashuburner et al. (1993) controlaram a oxidação por fenóis na cultura *in vitro* de embriões de coco (*Cocos nucifera* L.), efetuando a

suplementação com carvão ativado a 0,2% no meio. Embriões zigóticos de *Elaeis guineensis*, variedade pisifera, se desenvolveram rapidamente em meio de cultura contendo carvão ativado (PARANJOTHY; OTHAMAN, 1982). Para De Guzman e Manuel (1975) a adição de carvão ativado no meio de cultura para o desenvolvimento de embriões zigóticos do coqueiro mutante "Makapuno" resultou em um maior desenvolvimento das raízes. A adição de carvão ativado nas concentrações de 0,25 e 0,5 g.L⁻¹ no meio de cultura proporcionou efeito benéfico na germinação dos embriões somáticos obtidos de meristemas apicais de tamareira. (ZOUINE, et al. 2005). Em *Phoenix canariensis*, a adição de carvão ativado acarretou a inibição completa da indução de calos embriogênicos em embriões zigóticos, mesmo quando a concentração de 2,4-D foi aumentada (HUONG, 1999).

2.7 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

A embriogênese somática (ES) é a mais clara expressão do fenômeno da totipotência celular enunciado por Haberland em 1902 (ETIENNE et al., 1999; SOLANO, 2001). ES 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). Segundo Ammirato (1983), a ES 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, pode 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 por outros quatro estágios básicos: globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar (TEIXEIRA et al. 2004; TITON et al. 2007).

De maneira geral, a taxa de ES 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). 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 ES. 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 ES *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 das culturas embriogênicas representarem um sistema bastante eficiente para a aplicação de técnicas de biotecnologia, como transformação genética, indução e seleção de mutações e regeneração de plantas haplóides. Mas a grande vantagem do uso de embriões somáticos para micropropagação em larga escala 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 b), a ES é preferida na rota regenerativa *in vitro* das palmeiras, pois esta via morfogênica pode aumentar o número de plantas regeneradas quando comparadas à organogênese. Karun et al., (2004) estabeleceram um protocolo para a embriogênese somática e regeneração de diferentes variedades de *Areca catechu* utilizando explantes de folhas e inflorescências imaturas. O meio de cultura utilizado para a indução de calos, embriogênese somática e regeneração de plantas foi o MS. Inicialmente, cinco tratamentos com as auxinas 2,4-D (68 μ M), Dicamba (25, 50 μ M) e Picloram (100, 200 μ M) foram testados para o desenvolvimento de calos. Após dezesseis semanas de cultivo, o Picloram (200 μ M) foi considerado a melhor auxina na indução da calogênese para ambos os tipos de explantes, bem como as variedades testadas. Transferências de meio de cultura contendo altas concentrações para baixas concentrações de auxinas foram realizadas e maximizaram o crescimento de calos e indução da ES.

Sogeke et al. (1996) induziram a ES em explantes de folhas imaturas de dendezeiro em meio de cultura Y3 modificado (Y3a) contendo 15 mg. L⁻¹ de ANA. Rápido crescimento dos calos foi alcançado quando se diminuiu a concentração de ANA para 5 mg.L⁻¹ (Y3(3a)). Após esta etapa, a ES foi induzida em meio Y3 básico (Y3(0)) suplementado com 0,5 mg.L⁻¹ de ANA, 2,0 mg. L⁻¹ de KIN (DM1). Subseqüentes passagens em meio de cultura (DM1) resultaram na formação de mais embriões verdes, primórdios foliares, com folhas e raízes bem desenvolvidas. A formação de raízes adventícias e plantas foi estimulada em meio MS modificado por Hyndman et al. (1982)². As plantas obtidas foram colocadas em campo onde cresceram satisfatoriamente.

Em trabalho desenvolvido por Teixeira et al. (1994), inflorescências imaturas de dendezeiro var. Pisifera foram inoculados no meio modificado do MS com 0,3% (w/v) de carvão ativado e 475 µM de 2,4-D. Após 2-3 meses da cultura, calos compactos de coloração amarela proliferaram. Após 26 semanas de cultivo, elevada incidência de oxidação fenólica (46%) requereu o uso de maiores níveis de carvão ativado (0,5%) e de 2,4-D (500 e 550 µM). O desenvolvimento de estruturas florais dos explantes de inflorescências foi observado freqüentemente durante o período da cultura. Após 81 semanas em meio de cultura, tecidos embriogênicos caracterizados pela consistência compacta e a cor branca foram observados nos tecidos derivados das inflorescências imaturas. Estes tecidos se diferenciaram em embriões somáticos normais quando transferidos para um meio de regeneração que continha ANA (15 µM) e ABA (2 µM). Plantas normais foram obtidas após 8 semanas no meio da regeneração. Todo o processo durou 89 semanas.

O protocolo desenvolvido por De Touchet et al. (1991) utilizou suspensão celular de calos embriogênicos obtidos a partir de segmentos de folhas imaturas de dendezeiro. O meio de cultura para indução da embriogênese somática foi o MS adicionado de 30 mg.L⁻¹ de BAP, 1,0 mg.L⁻¹ de carvão ativado e quatro concentrações de 2,4-D (80, 100, 150 e 150 mg.L⁻¹). As concentrações de 80 e 100 mg.L⁻¹ de 2,4-D foram consideradas as mais efetivas para produção de células embriogênicas com características pró-embrionárias. Para a proliferação, os meios de cultura continham 2,4-D nas concentrações de 25, 50 e 100 mg.L⁻¹, sendo que a

² HYNDMAN, S. E.; HASEGAWA, P. M. e BRESSAN, R. A. The role of sucrose and nitrogen in adventitious root formation on cultured rose shoots. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** . 1 (4): 229-238, 1982.

concentração de 100 mg.L^{-1} demonstrou manter o potencial embriogênico após 18 semanas de cultivo. O meio de cultura empregado na regeneração foi o MS sem reguladores de crescimento, dando origem a plantas que depois de enraizadas foram transferidas para casa de vegetação.

Kanchanapoom e Domyoas (1999) utilizaram embriões zigóticos de frutos maduros de dendê var. tenera cultivados em meio de cultura Y3 com 2 mg.L^{-1} de 2,4-D. A calogênese foi iniciada a partir da 8ª semana, sendo que para a diferenciação dos embriões e regeneração das plantas, dois meios sucessivos foram empregados. O primeiro meio foi o MS-CAP sem a presença de auxinas, mas com 0,05% de carvão ativado. O segundo meio foi MS-CAP que continha $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP e $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D. Os embriões somáticos foram examinados microscopicamente em tempos distintos, observando-se que a origem dos calos foi unicelular a partir da subepiderme dos explantes.

2.8 ETAPAS DE OBTENÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

2.8.1 Indução da embriogênese somática

A indução da embriogênese é geralmente iniciada a partir de explantes embrionários, juvenis ou maduros cultivados em meios semi-sólidos ou sólidos, contendo altos níveis das auxinas ANA, 2,4-D, e Picloram (GUERRA et al. 1998; HUONG et al. 1999; STEIMACHER et al. 2007 b,c) com ou sem conjugação das citocininas BAP, KIN e TDZ (CARVALHO et al. 2004; REY et al. 2006; STEIMACHER et al. 2007 a; JOGESWAR et al. 2007). Durante essa fase, células somáticas diferenciadas adquirem competência embriogênica e proliferam como células embriogênicas (NAMASIVAYAM, 2007). Em protocolos de indução da embriogênese pela via direta, a primeira expressão morfogênica é o surgimento de estruturas globulares brancas e translúcidas que correspondem a embriões somáticos globulares. Em modelos indiretos, inicialmente há a diferenciação de calo e o surgimento neste de setores friáveis, normalmente brancos e translúcidos, convencionalmente designados de massas ou complexos celulares pró-embriogênicos, os quais se dividem para formar pró-embriões somáticos (GUERRA et al., 1999). Além das características morfológicas, as massas calosas e pró-

embrionárias podem ser distinguidas por características citoquímicas, reagindo fortemente a diversos corantes (SANTOS et al. 2003; FLORES et al. 2006)

A frequência de indução nesta etapa não depende somente das condições de cultura, mas também do genótipo, tecidos e estágios de desenvolvimento do explante (CARMAN, 1990), bem como os níveis de hormônios endógenos presentes nos explantes (JIMENEZ, 2001).

2.8.2 Multiplicação de culturas embriogênicas

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-embrionárias ou embriões somáticos em estágios globulares iniciais de desenvolvimento (GUERRA et al. 1999). Suspensões celulares são mais adequadas, podendo ser cultivadas em biorreatores ou frascos Erlenmeyers sob agitação ou o emprego de agitador rotatório (FKI et al. 2003; SANÉ et al. 2006; ZOUINE, et al. 2007). 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 nesta fase 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.

2.8.3 Maturação dos embriões somáticos

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* (GUERRA et al., 1999).

Nesta fase, o aumento da osmolaridade do meio de cultura tem proporcionado melhoria nos resultados por estar relacionado com a transição do ciclo de divisão/diferenciação celular. Geralmente, o aumento da osmolaridade pode ser obtido pela adição de mio-inositol, sorbitol e manitol (LARA; MONTER, 2002; LEMOS et al., 2002). O ABA, a exemplo de seus efeitos na embriogênese zigótica, exerce efeito notável nesta fase por impedir processos de clivagem e gemação que compreendem os estágios iniciais da diferenciação (HUONG et al., 1999; SAHRAWAT; CHAND, 2001) .

2.8.4 Germinação dos embriões somáticos

Nos protocolos de embriogênese somática, a germinação dos embriões somáticos é usualmente realizada em meio de cultura livre de reguladores de crescimento (SWATI et al., 2001). 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 espécies de plantas (RAJU et al., 1989; ANITHA; SAJINI, 1996; ABERLENC-BERTOSSI et al., 1999).

Na embriogênese somática de coqueiro, a diminuição da concentração de 2,4-D no meio de cultura, seguido pela adição de BAP foi considerado essencial para a completa diferenciação bipolar dos embriões (VERDEIL et al., 1994). Para a regeneração dos brotos e desenvolvimento radicular de embriões somáticos de *Phoenix dactylifera*, 30 g.L⁻¹ de sacarose, 0,2 g.L⁻¹ de glutamina e 0,15% de carvão ativado foram adicionados no meio de cultura, com a suplementação de 0,05 a 0,1 mg.L⁻¹ de ANA e 1 mg.L⁻¹ de 2-iP (EKE et al., 2005). Em dendezeiro, a adição de BAP nas concentrações de 0, 1, 5 e 10 µM foi testada em quatro clones (87, 121, 123 e 221). O efeito da concentração de BAP sobre a percentagem de embriões que possuíam um único broto dependeu do clone avaliado, mas a regeneração aumentou de 60% para 73% na presença de 1 µM BAP (ABERLENC-BERTOSSI et al., 1999).

2.9 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DIRETA E INDIRETA

Segundo Sharp et al. (1980), a ES *in vitro* apresenta dois padrões básicos de desenvolvimento de embriões: Embriogênese somática direta (ESD), na qual os embriões somáticos originam-se diretamente de tecidos de matrizes sem a formação de estádios intermediários de calos, e embriogênese somática indireta (ESI), na qual os embriões somáticos se formam a partir de calos, que apresentam células em diferentes estádios de diferenciação. Em ambos os padrões, o embrião somático segue a mesma seqüência de desenvolvimento do zigótico, ou seja, a passagem pelos estádios globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar (GUERRA et al., 1999). Segundo Vieira e Kobayashi (2000), a diferença primordial entre estes dois padrões de desenvolvimento embriogênico é a resposta à ação de reguladores de crescimento. Enquanto a ESD caracteriza-se pelo cultivo dos explantes em um único meio de cultura, geralmente com a adição de apenas uma citocinina, a ESI requer alta relação auxina/citocinina para a formação de calos não diferenciados em um meio de cultura inicial e baixa relação para a indução de calos embriogênicos durante as culturas subseqüentes.

A ESI requer a determinação de células diferenciadas, a proliferação de calos e a indução de células embriogênicas, dependendo da ação de reguladores de crescimento, para a determinação do estado embriogênico (SONDAHL et al., 1985; WILLIAMS; MAHESWARAN, 1986). De acordo com Pannetier et al. (1981) na maioria dos casos envolvendo as monocotiledôneas, a embriogênese indireta através da formação de calos é necessária e o modelo mais rotineiramente seguido para a produção *in vitro* de plantas.

Na ESD normalmente ocorre a formação de agregados de células embriogênicas, os chamados complexos embrionários, a partir dos quais um ou vários embriões somáticos podem se desenvolver (GUERRA, 1989), mediante o uso de dois meios de cultivo: um de indução de calo embriogênico e outro para a regeneração dos embriões (SONDAHL et al., 1985; WILLIAMS; MAHESWARAN, 1986; DENCHEV et al., 1992; BERTHOULY; ETIENNE, 1999).

Segundo Merkle et al. (1995) um estímulo da divisão celular pode ser suficiente para a formação de um embrião somático no tecido do explante. Este processo é chamado comumente de embriogênese direta. Segundo Sharp et al, (1980) os explantes com este tipo de embriogênese possuem um princípio de

proliferação, antes de formarem os embriões somáticos, em que todas ou algumas das células estão pré-determinadas à embriogênese, geralmente por possuírem propriedades de células meristemáticas.

Pereira et al, (2007) postulou que a ação combinada entre cinetina, AG_3 e ANA estimulou a indução de embriões somáticos em *Coffea arabica* L. cv. Acaiá Cerrado pela via direta e que o maior comprimento de embriões foi observado quando se utilizou 8 mg L^{-1} de cinetina e $8,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA ou 17 mg L^{-1} de AG_3 e $8,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA isoladamente. Já para Maciel et al. (2003) a combinação entre 4 mg.L^{-1} de 2,4-D e 2 mg.L^{-1} de cinetina favoreceu a indução de calos primários mistos e o maior número de embriões por explante de *Coffea arabica* L. cv. Obatã pela via indireta. Martin e Madassery, (2005) trabalhando com uma espécie medicinal *Quassia amara* L. induziu tanto a ESD como a ESI em meio de cultura contendo concentrações de BAP entre 8,9 e $13,3 \mu\text{M}$.

2.9.1 Embriogênese somática secundária ou repetitiva

A embriogênese somática secundária (ESS) é um fenômeno pelo qual embriões somáticos novos são iniciados a partir de outros embriões somáticos já existentes. Num sistema experimental ele possui determinadas vantagens quando comparado à embriogênese somática primária, tal como uma taxa elevada de multiplicação, a independência de uma fonte de explante e a repetibilidade do processo (VASIC et al, 2001). Além disso, o potencial embriogênico pode ser mantido por longos períodos de tempo por ciclos repetidos do embriogênese secundária (RAEMAKERS et al. 1995). O surgimento da embriogênese somática secundária ou adventícia pode ser considerada em consequência da predisposição de alguns grupos de células em particular, que permitem que sua totipotência seja expressada (WILLIAMS; MAHESWARAN, 1986). Martin e Madassery, (2005) obtiveram embriões somáticos primários e secundários em *Quassia amara* L. quando cultivados em meio de MS com $8,9 \mu\text{M}$ de BAP e $11,7 \mu\text{M}$ de nitrato de prata.

2.9.2 Fatores que afetam a embriogênese somática

Na grande maioria dos protocolos de indução da embriogênese somática, os reguladores de crescimento têm reconhecida importância e, muitas vezes, são indispensáveis para a expressão deste fenômeno. Contudo, outros promotores ou fatores podem influenciar na indução da ES, como o nitrato de prata (MARTIN; MADASSERY, 2005; PULLMAN et al, 2005; GIRIDHAR et al, 2004), aminoácidos (MALABADI; VAN STADEN, 2005; BISWAS et al, 2007), poliaminas (SANTA-CATARINA et al, 2007; STEINER et al, 2007; LANGHANSOVÁ et al, 2004), tipos de açúcares (VILA et al, 2007; THOMAS et al, 2006; KARAMI et al, 2006) e luminosidade (IANTCHEVA et al, 2005). Cheong e Pooler (2004) usando meio MS suplementado com 10 μ M 2,4-D avaliaram o efeito da luz, regulador de crescimento, aminoácidos, fonte de carboidrato em explantes de *Prunus incisa*. O cultivo sob condições de luz ou escuro resultou em formação de embriões, mas a embriogênese foi inibida pela adição de BAP, TDZ, ou AG₃ no meio de cultura. Aminoácidos não foram efetivos na promoção da embriogênese. Sacarose e glicose efetivamente induziram a embriogênese, enquanto o sorbitol e manitol inibiram completamente este processo. Segundo Ikeda-Iwai et al. (2003) a condição de stress, bem como sua duração, foi o fator mais importante na indução de embriões somáticos. Osmolaridade, íons de metais pesados e stress por desidratação induziram a formação de embriões somáticos em *Arabidopsis*.

De modo geral, a compreensão dos estímulos e condições ideais à indução, no que se refere ao conhecimento sobre os mecanismos pelos quais os hormônios da planta são envolvidos na regulação e no controle deste processo ainda são limitados.

2.10 PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DO DENDEZEIRO

Apesar de nunca se ter definido e obtido um protocolo eficiente de multiplicação em larga escala, a biotecnologia foi introduzida nos estudos de propagação de dendezeiro há quase três décadas, inicialmente visando originar clones elite de dendezeiro em larga escala (ABDULLAH, 2005). Os trabalhos mais significativos foram os desenvolvidos por RABÉCHAULT; MARTIN, (1976); CORLEY

et al. (1977); PANNETIER et al. (1981); De TOUCHET et al. (1991). No entanto, dado à importância econômica do dendzeiro, atualmente a micropropagação desta cultura tropical vem sendo estudada com maior aprofundamento para que se possa multiplicar indivíduos com características agrônômicas desejáveis, capazes de aumentar a produção de óleo de dendê (DE TOUCHET et al., 1991). De acordo com Lubis et al. (1993), clones de dendzeiro podem promover um aumento de 20 a 30% no rendimento de óleo comparado às plantas propagadas por sementes.

O estabelecimento da regeneração de plantas de dendzeiro via embriogênese somática já foi relatado por diversos pesquisadores (AHEÉ et al., 1981; DUVAL et al., 1988; DE TOUCHET et al. 1991; TEIXEIRA et al. 1995). No entanto, o desenvolvimento de protocolos de indução da embriogênese somática e regeneração nunca foram validados para uso em larga comercial, pois além da dificuldade da definição de um protocolo eficiente, foi observado que dentro de uma faixa de 0% a 10% dos clones obtidos *in vitro* poderiam resultar em indivíduos com características fenotípicas diferentes das plantas convencionais quando as mesmas alcançavam o estágio adulto (RIVAL et al. 1997). De acordo com Paranjothy et al. (1995), este fenômeno denominado de variação somaclonal surge devido à adição de altas concentrações de auxinas no meio de cultura de indução. Esta variante somaclonal em dendzeiro pode exibir marcante heterogeneidade entre linhagens clonais, geralmente resultando na esterilidade parcial ou completa da flor, afetando diretamente a produção de óleo, dependendo da severidade da anormalidade (CORLEY et al, 1986; JALIGOT et al. 2000, 2002; ALWEE et al, 2006). As flores ditas “anormais” não são funcionais, pois as plantas que produzem órgãos masculinos são feminizadas e, por consequência, os frutos que são formados usualmente são abortados durante o desenvolvimento. No entanto, estudos têm mostrado que esta variação é do tipo epigenética e, portanto, reversível com o passar do tempo (EEUWENS et al., 2002; ALWEE et al, 2006). Segundo Uzelac et al. (2007), a ES de origem unicelular e, preferencialmente a ESD, pode reduzir a possibilidade do surgimento de variação somaclonal em plantas multiplicadas por este tipo de propagação.

2.11 ESTUDOS MORFOANATÔMICOS E HISTOLÓGICOS

A anatomia vegetal fornece importantes contribuições à elucidação de relações ecológicas, taxonômicas e filogenéticas das plantas vasculares, assim como para a fisiologia das mesmas (SILVA et al., 2005). Os processos de regeneração de plantas *in vitro* podem ser avaliados e caracterizados pela análise histológica e morfológica do material vegetal. Estudos histológicos podem ser realizados para a verificação e confirmação da via de regeneração, diferenciando a organogênese da embriogênese somática (VIEIRA; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, 2001).

Caracterizando-se a via de regeneração, pode-se melhorar as condições de cultivo, para o estabelecimento de protocolos eficientes na indução e conversão de plantas. Através das secções histológicas é possível a observação do desenvolvimento das gemas adventícias ou de embriões somáticos e a definição da origem direta ou indireta. Tais resultados permitem caracterizar as alterações celulares e definir as regiões do explante com potencial morfogênico (MONTEIRO, 2000).

As alterações histológicas associadas com a posição e a atividade das células competentes têm sido muito estudadas na embriogênese somática (CANGAHUALA-INOCENTE et al., 2004). Maheswaran e Williams (1985) constataram que a embriogênese somática de *Trifolium repens* L., obtida a partir de embriões zigóticos imaturos, originava-se de células da epiderme do hipocótilo, que proliferavam produzindo embriões somáticos sem uma fase de calo. A iniciação do desenvolvimento da embriogênese somática de *Carya illinoensis* (Wagenh) C. Koch induzida por diferentes auxinas revelou pela análise morfológica e anatômica que as auxinas ANA e 2,4-D induziram acentuada divisão celular na camada subepidérmica dos cotilédones de embriões imaturos (RODRIGUEZ; WETZSTEIN, 1998). Nas observações histológicas realizadas por Quiroz-Figueroa et al, (2002) em *Coffea arabica*, ambos os embriões somáticos de café formados diretos e indiretamente a partir de explantes de segmentos da folha e de calos, respectivamente, tiveram a mesma origem unicelular.

Análises histológicas de células embriogênicas, pró-embriões e embriões de *Cocos nucifera* obtidas pelo decréscimo dos níveis de 2,4-D e adição de BAP foram descritas por Chan et al. (1998). Os calos desenvolvidos nos centros meristemáticos,

indicaram o potencial embriogênico e a via multicelular para a formação do embrião somático. Neste sentido, o acompanhamento e a identificação das estruturas presentes nos calos embriogênicos e embriões somáticos, bem como os embriões zigóticos de dendezeiro, através dos estudos morfoanatômicos são necessárias para a maximização e recomendação de um protocolo eficiente de ES nos estudos relacionados à clonagem de dendezeiro.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos foram conduzidos no Laboratório de Morfogênese e Biologia Molecular (LABMOL) da Embrapa Acre, Rio Branco, AC. Os experimentos tiveram início em março de 2005 e término em novembro de 2007.

3.1 EFICIÊNCIA NA INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E REGENERAÇÃO DE PLANTAS EM DENDEZEIRO PELA TÉCNICA *THIN CELL LAYER* (TCL)

3.1.1 Fonte de explante e condições de cultivo

Para a obtenção dos explantes propriamente ditos, plantas jovens de dendezeiro (*Elaeis guineensis*, var. *dura*), com 8 a 10 cm de altura, provenientes do Campo Experimental da Embrapa Acre, tiveram as folhas mais externas e desenvolvidas, juntamente com as raízes, removidas, deixando-se somente o segmento caulinar, caracterizado por possuir folhas imaturas e aclorofiladas. Deste material, foram realizados seccionamentos transversais de aproximadamente 1 mm de espessura para a obtenção dos explantes, classificados como apicais, medianos e basais, em razão da posição no explante, conforme pode ser observado na Figura 5A. De cada posição foram retiradas 6 finas camadas de tecido foliar imaturo.

O processo de desinfestação do material consistiu da lavagem das plantas jovens em água corrente por 5 minutos, seguido da imersão destas por 15 segundos em álcool 70%, 10 minutos em hipoclorito de sódio (50% da solução comercial) e três lavagens em água destilada e autoclavada. Logo em seguida, as folhas mais externas foram removidas e os explantes excisados e colocados em frascos de vidro com capacidade de 250 mL, contendo 30 mL de meio de cultura e vedados com filme de PVC.

O meio de cultura utilizado para a indução da embriogênese somática foi composto pelos sais e vitaminas de MS, acrescido de 30,0 g.L⁻¹ de sacarose, 100 mg.L⁻¹ de inositol, 500 mg.L⁻¹ de L-glutamina e 300 mg.L⁻¹ de carvão ativado. Foram adicionados os reguladores de crescimento Picloram e 2,4-D nas concentrações de 0, 225 e 450 µM.

O meio de cultura teve o pH ajustado para $5,8 \pm 0,1$ antes da adição de $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ do solidificante Phytigel (Sigma®) e posteriormente foi autoclavado à 121°C por 15 minutos e 1,3 atm de pressão. Os explantes permaneceram nesse meio de cultura por 3 meses, tempo este necessário para que fosse observado a formação de calos primários e com características embriogênicas (FIGURA 5 C,D).

Para a maturação dos embriões somáticos diferenciados no meio de indução foi utilizado o mesmo meio de cultura da etapa de indução, sendo desta vez suplementado com $12,3 \text{ }\mu\text{M}$ de 2iP e $0,6 \text{ }\mu\text{M}$ de ANA. Os agregados embriogênicos permaneceram nesse meio de cultura por 30 dias, até que fosse observada a formação dos eixos bipolares (apical e basal) dos embriões somáticos (FIGURA 5 G), bem como o surgimento de embriões secundários formados sobre os já existentes (FIGURA 5 J).

Após esta etapa, os embriões somáticos maduros foram transferidos para um novo meio de cultura, desta vez de regeneração, formado pela metade da concentração dos sais de MS e sacarose, com a adição de 1 g.L^{-1} de carvão ativado. Nesse meio de cultura, os embriões somáticos permaneceram por até 3 meses, para completa germinação (conversão) dos embriões somáticos em plantas completas.

Na Tabela 1 pode ser observado a composição dos meios de cultura utilizados nas diferentes etapas da embriogênese somática do dendezeiro, var. dura, a partir da técnica TCL.

TABELA 1. Composição dos meios de cultura usados nas diferentes etapas da embriogênese somática em explantes TCL de dendezeiro. Embrapa, 2007.

Composição	Meio de indução	Meio de maturação	Meio de germinação
Meio basal	MS	MS	MS/2
2,4-D (μM)	225, 450	-	-
Picloram (μM)	225, 450	-	-
ANA (μM)	-	0,6	-
2-iP (μM)	-	12,3	-
Glutamina (mg.L^{-1})	500	-	-
Carvão ativado (mg.L^{-1})	300	-	1.000
Sacarose (g.L^{-1})	30	30	15
Phytigel (g.L^{-1})	2,5	2,5	2,5
Mio-inositol (mg.L^{-1})	100	100	50

3.1.2 Delineamento estatístico

O experimento seguiu um esquema fatorial 3 x 5, com três origens de explantes (basal, mediano e apical) e cinco tratamentos com auxinas (0, 225 µM e 450 µM de 2,4-D e 225 µM e 450 µM de Picloram). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado. Cada tratamento foi repetido seis vezes, sendo cada parcela formada por seis explantes.

Os dados obtidos foram analisados com o emprego do programa de análises estatísticas SANEST (ZONTA; MACHADO, 1984), com as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Dados expressos em porcentagem (x) foram transformados segundo arco seno $(x/100)^{0,5}$.

3.1.3 Estudos morfo-histológicos

Para fornecer maiores detalhes da morfologia de tecidos embriogênicos formados e comparar estruturas internas e externas de embriões somáticos e embriões zigóticos de dendezeiro, estudos morfoanatômicos foram realizados.

3.1.3.1 Obtenção do material para as análises

Os explantes da região basal que apresentaram as melhores respostas quanto à indução de calos embriogênicos e embriões somáticos foram selecionados e comparados com os embriões zigóticos extraídos de frutos maduros de dendezeiro, var. dura. Calos com estruturas embriogênicas e de coloração amarelada, aos 90 dias de cultivo *in vitro* foram analisados histologicamente. Da mesma forma, embriões somáticos no último estágio de desenvolvimento, com aproximadamente cento e trinta dias de cultivo formados em meio MS contendo Picloram foram utilizados para as análises histológicas. Todo o material foi fixados através da imersão por 2 horas em solução de glutaraldeído à 2,5% e, logo após, em tampão fosfato de sódio 0,1 M com pH 7,2. Em seguida, o material foi lavados por 3 vezes em tampão fosfato e desidratados lentamente em etanol à 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 70 °GL, em série de 30 minutos para cada concentração.

Para a montagem dos blocos de parafina, conforme metodologia adotada por Johansen (1940), os embriões e os calos conservados em etanol 70 °GL foram desidratados em série etílica com imersões de 30 minutos em etanol 80 °GL, 90 °GL e duas vezes em etanol 100 °GL. Na seqüência, o material foi lavado em xilol em 2 séries de 30 minutos e, logo após, transferidos para solução de xilol e parafina, na proporção de 1:1 onde permaneceram por aproximadamente 12 horas.

Posteriormente, os calos embriogênicos foram imersos em parafina em 2 séries de 3 horas cada e, após esse procedimento, montados em blocos de parafina. Após a infiltração em estufa (60 °C), foram montados blocos de parafina, como apoio das amostras, os quais foram seccionados, em série, em micrótomo de rotação Leica – RM 2125 RT[®], com 8 e 10 µm de espessura das secções. Foi utilizado o adesivo de Bissing (BISSING, 1974) para fixação das secções sobre a lâmina. As secções foram distendidas em lâminas de vidro sobre chapa aquecedora (40 °C) para que houvesse melhor fixação do corte e por consequência, melhor visualização das estruturas no microscópio. Após a secagem das lâminas realizou-se a coloração dos cortes com safranina/fast-green, e posteriormente, montagem entre lâmina-lamínula com bálsamo do Canadá sintético.

As descrições das lâminas que continham os tecidos dos embriões somáticos e zigóticos foram feitas utilizando-se microscópio óptico da marca Bheil[®], com câmera fotográfica digital acoplada, no Laboratório de Morfogênese e Biologia Molecular (LABMOL) da Embrapa Acre.

3.2 INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM DIFERENTES GENÓTIPOS DE DENDEZEIRO A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES IMATUROS

3.2.1 Fonte de explante e condições de cultivo

Como fonte de explante, utilizou-se segmentos foliares imaturos, obtidos de plantas jovens de dendezeiro var. dura com 3 meses de idade e, aproximadamente, 20 a 30 cm de altura. Para este ensaio, três genótipos de dendezeiro, denominados GES3, GES4 e GES6, provenientes do Campo Experimental da Embrapa foram utilizados. Após a coleta em campo, as plantas foram submetidas a uma prévia lavagem em água corrente com sabão líquido neutro, sendo as folhas mais externas

e raízes retiradas. Em seguida, foi feita a esterilização superficial deste material, a partir da imersão em álcool (70%) por 30 segundos, hipoclorito de sódio por 20 minutos (1,25%) e três lavagens consecutivas em água destilada e esterilizada. Uma vez desinfestado, a partir da região do meristema apical, as folhas imaturas aclorofiladas que compreendiam o segmento caulinar da planta, foram extraídas e excisadas em porções de aproximadamente 1 cm² (FIGURA 3 A).

Uma vez obtidos, os explantes foram submetidos a um pré-tratamento por sete dias em meio de cultura de MS, desprovido de reguladores de crescimento e solidificado com 2,2 g.L⁻¹ de Phytigel®. Após este período, os explantes não contaminados ou oxidados foram então transferidos para novo meio de cultura, desta vez com 225 µM de Picloram e 2,4-D.

Utilizaram-se frascos de vidro de 250 mL com 40 mL de meio de cultura, sendo lacrados com filme transparente de PVC. As culturas foram mantidas no escuro, em temperatura de 25 ± 2 °C. Após dois meses de cultivo, avaliaram-se as seguintes variáveis: percentual de explantes com embriões somáticos e oxidados.

3.2.2 Delineamento estatístico

O experimento seguiu um esquema fatorial 2 x 3, com dois tipos de auxinas (Picloram e 2,4-D) e três genótipos (GES3, GES4 e GES6). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com cinco repetições, sendo cada parcela formada por seis explantes. Os dados obtidos foram analisados utilizando-se o programa estatístico SANEST sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Dados expressos em percentagem (x) foram transformados segundo arco seno $(x/100)^{0,5}$

3.3 RESPOSTAS MORFOGÊNICAS *IN VITRO* DE INFLORESCÊNCIAS FEMININAS IMATURAS DE DENDEZEIRO QUANTO A REVERSÃO DO ESTADO FLORAL AO VEGETATIVO EMBRIOGÊNICO

3.3.1 Influência de tipos de meios de cultura e reguladores de crescimento na indução da embriogênese somática em inflorescências femininas imaturas de dendezeiro, var. dura.

3.3.1.1 Fonte de explante e condições de cultivo

Neste primeiro ensaio, o material vegetal utilizado consistiu de inflorescências femininas imaturas de plantas matrizes de dendezeiro *Elaeis guineensis* Jacq. var. dura, medindo aproximadamente 20 cm, sendo que cada ráquila media cerca de 10 cm de comprimento, coletadas no Campo Experimental da Embrapa Acre (FIGURA 1 A). Depois de coletadas, as inflorescências, ainda protegidas pelas espatas, foram submetidas a um processo de assepsia em álcool 70% por 5 min, hipoclorito de sódio 1% por 30 min. seguidas de três lavagens em água destilada e esterilizada. Após a assepsia, realizou-se a remoção das espatas e, em seguida, as inflorescências tiveram suas ráquulas separadas e cortadas transversalmente em seções de 1 a 2 mm de espessura, com o auxílio de pinça e bisturi (FIGURA 1 C). Os meios de cultura MS e Y3 testados neste experimento foram acrescidos de 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativado e solidificados com 2,2 g.L⁻¹ de Phytigel (Merck®), associado a 450 µM de 2,4-D e diferentes concentrações de BAP (0, 25 e 50 µM). O pH dos meios de cultura foram ajustados para 5,8±0,1, antes da adição do geleificante, sendo posteriormente autoclavado a 121 °C e 1,3 atm de pressão por 15 min. Os explantes foram inoculados em frascos de vidro de 250 mL com 40 mL de meio de cultura em câmara de fluxo laminar e acondicionados no escuro, em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C.

Após três meses de cultivo *in vitro*, foram avaliados as seguintes respostas: percentual de explantes com calos embriogênicos e embriões somáticos, massa fresca dos calos e número de embriões somáticos formados por explante. A determinação do percentual de calos embriogênicos foi obtida fazendo-se a contagem da quantidade de explantes com embriões somáticos dividido pela quantidade de explantes por frasco. Para os dados de massa fresca dos calos, expresso em gramas, esta foi obtida por meio de pesagem dos calos embriogênicos.

Para a variável número de embriões somáticos formados por explante, os valores foram obtidos por contagem.

3.3.1.2 Delineamento experimental

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 3, dois meios de cultura (MS e Y3) e três concentrações de BAP (0, 25 e 50 μM), totalizando 6 tratamentos com cinco repetições, sendo que cada parcela formada por seis explantes. Os dados obtidos foram analisados com o emprego do programa de análises estatísticas SANEST (ZONTA; MACHADO, 1984), com as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Dados expressos em porcentagem (x) foram transformados segundo arco seno $(x/100)^{0,5}$.

3.3.2 Influência da posição do explante e concentrações de 2,4-D na indução da embriogênese somática em inflorescências femininas imaturas de dendezeiro, var. dura.

3.3.2.1 Fonte de explante e condições de cultivo

Neste segundo ensaio, a fonte de explantes foi a mesma utilizada no primeiro ensaio. No entanto, diferentemente do anterior, neste ensaio os explantes foram obtidos da região apical e basal, visando avaliar a influência da posição do explante na ráquila na indução da embriogênese somática (FIGURA 1 B). As secções possuíam as mesmas características do ensaio 4.2.1. O meio de cultura utilizado foi o Y3, acrescido $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ de carvão ativado, sendo os mesmos solidificados com $2,2 \text{ g.L}^{-1}$ de Phytigel (Merck®) e, posteriormente autoclavados a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ e $1,3 \text{ atm}$ por 15 min. Utilizaram-se frascos de vidro de 250 mL, contendo 40 mL de meio de cultivo, com pH ajustado para $5,8 \pm 0,1$ antes da adição do geleificante. As culturas foram mantidas sob condição de escuro e temperatura de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ e, após três meses foi observada a indução e formação de calos embriogênicos nos explantes.

3.3.2.2 Delineamento estatístico

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, sendo cada tratamento formado por quatro repetições e seis explantes por parcela. Os dados obtidos foram analisados com o emprego do programa de análises estatísticas SANEST (ZONTA; MACHADO, 1984), com as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Dados expressos em percentagem (x) foram transformados segundo arco seno $(x/100)^{0,5}$.

3.3.3 Efeito de substâncias antioxidantes e 2,4-D na indução da embriogênese somática em inflorescências femininas imaturas de dendezeiro, var. dura.

3.3.3.1 Fonte de explante e condições de cultivo

Foram utilizados como explantes inflorescências imaturas femininas de dendezeiro retiradas das espatas ainda fechadas, com as mesmas características no experimento 4.1 (Figura 1 A). Posteriormente, as inflorescências foram submetidas à esterilização superficial em álcool 70% por 5 min. e hipoclorito de sódio 1,0% por 30 min. seguida de tríplice lavagem em água destilada e esterilizada. Já em fluxo laminar, as espatas foram removidas, sendo as ráquias cortadas transversalmente em finas camadas de 1 a 2 mm (FIGURA 1 B,C) e inoculadas em frascos com capacidade de 250 mL, contendo 40 mL de meio de cultura MS acrescido de 450 μ M de 2,4-D.

O pH do meio de cultura MS foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$ antes da adição de 2,5 g.L⁻¹ do solidificante Phytigel (Merck®), sendo posteriormente autoclavado à 121 °C e 1,3 atm de pressão por 15 min. As culturas foram mantidas no escuro, em temperatura de 25 ± 2 °C. Após 90 dias de cultivo, avaliou-se a quantidade de calos embriogênicos formados e o número de explantes mortos expressos em percentagem.

3.3.3.2 Delineamento estatístico

Os tratamentos consistiram de um fatorial 2 x 3, com 2 concentrações de PVP-40 (0 e 1,0 g.L⁻¹) e 3 concentrações de carvão ativado (0; 1,5 e 3,0 g.L⁻¹). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com cinco repetições e cinco explantes por parcela. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Dados expressos em percentagem (x) foram transformados segundo arco seno $(x/100)^{0,5}$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EFICIÊNCIA NA INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E REGENERAÇÃO DE PLANTAS EM DENDEZEIRO PELA TÉCNICA *THIN CELL LAYER* (TCL)

Após sete dias da inoculação dos explantes TCL em meio de cultura, verificou-se a formação de calo primário ao redor de todo o explante, de coloração amarelada e translúcida e por volta dos 65 dias de cultivo, a progressão do calo do estágio friável para o estágio embriogênico. No entanto, a primeira avaliação para formação de calos embriogênicos nos tipos de explantes testados foi feita somente aos 90 dias da inoculação *in vitro*. Verificou-se que quanto mais afastado do ápice meristemático da planta, menores foram as taxas de respostas embriogênicas obtidas e maiores foram as taxas de oxidação observada nos explantes cultivados, especificamente os medianos e apicais. Quando se avaliou o potencial de indução da embriogênese somática em dendezeiro a partir da técnica *thin cell layer* em diferentes concentrações de 2,4-D e Picloram, observou-se que, de maneira geral, explantes oriundos da região basal da planta apresentaram resultados significativamente superiores quanto à formação de calos embriogênicos em comparação aos demais tipos de explantes testados (mediano e apical) (FIGURA 2). Esses resultados podem ser explicados pela maior quantidade de tecidos menos e até não diferenciados (meristemático) presente neste tipo de explante, fato que pode aumentar consideravelmente a competência destes tecidos para a indução da ES.

Quando se avaliou a influência dos tratamentos com reguladores de crescimento na indução da ES, verificou-se que as melhores respostas foram obtidas nos meios que continham auxina, com exceção do tratamento constituído por 450 μM de 2,4-D, onde não se observou respostas dos explantes a esta concentração. O tratamento que proporcionou os melhores resultados foi aquele formado com Picloram na concentração de 450 μM , onde a taxa de indução de calos embriogênicos observada foi de 41,5% dos explantes colocados em cultivo, porcentagem significativamente superior aos demais tratamentos testados. Na concentração de 225 μM de Picloram, também foi observada formação de calos embriogênicos, mas esta atingiu 12,8% dos explantes, não diferindo estatisticamente dos 8,8% observados na concentração de 225 μM de 2,4-D. De maneira geral, os explantes da posição mediana e apical da planta não diferiram estatisticamente

entre si, independentemente da concentração de Picloram e 2,4-D utilizadas (FIGURA 2).

Neste trabalho, o desenvolvimento dos embriões somáticos se deu de forma assincronizada, onde em um mesmo *cluster* foi possível verificar nítida diferença nos estágios de desenvolvimento dos embriões somáticos formados, com a presença de embriões globulares junto com embriões somáticos maduros com características bipolares (FIGURA 3 G). Estas características também foram encontradas nos experimentos conduzidos por Steinmacher et al., (2007 a), quando calos embriogênicos foram transferidos para o meio de regeneração.

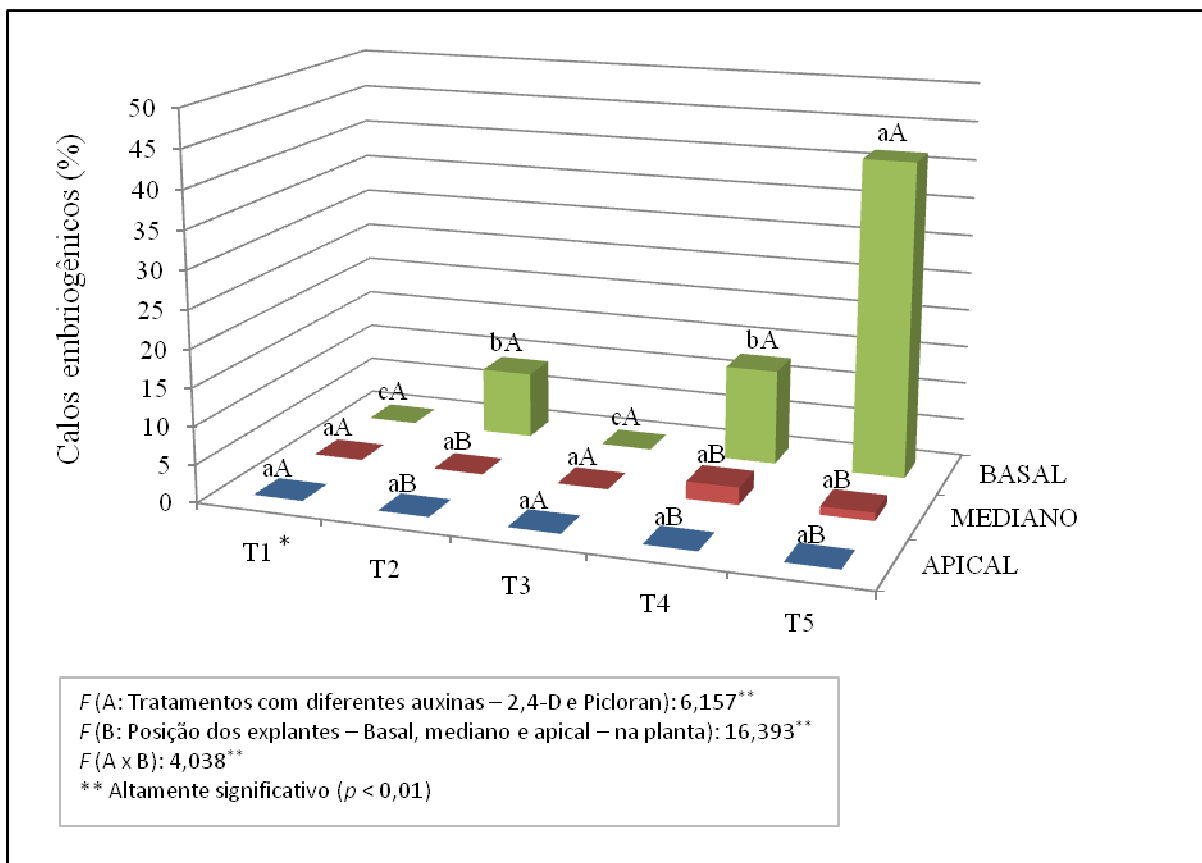


FIGURA 2. Influência da posição do explante (Basal, Mediano e Apical) na planta doadora e diferentes tratamentos com auxinas (2,4-D e Picloram) na indução de calos embriogênicos em dendezeiro. *T1: 0 μM (Testemunha); T2: 225 μM de 2,4-D; T3: 450 μM de 2,4-D; T4: 225 μM de Picloram; T5: 450 μM de Picloram. Embrapa, 2007

**Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na horizontal (dentro de cada posição do explantes e entre os tratamentos com auxinas) e maiúsculas na vertical (entre as posições dos explantes e dentro de cada tratamento com auxina), diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

A maturação dos embriões somáticos de dendezeiro foi conduzida em meio de cultura MS contendo 0,6 μM de ANA e 12,30 μM de 2-iP. Resultados semelhantes foram obtidos por Ledo et al. (2002) onde o meio de maturação dos embriões somáticos de *Euterpe oleracea* continha 0,537 μM de ANA e 12,30 μM de 2-iP, muito embora o modelo de ES expressado em seus experimentos tenha sido alcançado pela via direta.

De maneira geral, a germinação dos embriões somáticos em meio de cultura composto pela metade dos sais e vitaminas do meio de MS contendo 1 g.L^{-1} de carvão ativado, teve início, aproximadamente, aos 150 dias. Esse tempo para início da germinação é menor do que o citado por Ledo et al. (2002), que verificaram o início da germinação de ES de açazeiro em meio de cultura MS sem reguladores de crescimento aos 200 dias. No mesmo sentido, Guerra e Handro (1998) utilizaram 0,1 mg.L^{-1} de ANA e 2,5 mg.L^{-1} de 2-iP em meio de cultura MS sem carvão ativado, resultando no desenvolvimento de bipolaridade dos embriões somáticos de *Euterpe oleracea* aos 240 dias.

Com uma semana em meio de regeneração, foi observado que os embriões somáticos apresentavam características de embriogênese secundária, com formação de calos embriogênicos nodulares e novos embriões com coloração mais clara e de consistência compacta se desenvolvendo sobre os embriões somáticos já existentes (FIGURAS 3 I,J). Santa-Catarina et al., (2001), trabalhando com embriogênese somática em canela sassafrás obtiveram resultados semelhantes ao transferirem embriões somáticos para meio de cultura isento de reguladores de crescimento. Em algumas espécies como a *Mangifera indica* (LITZ et al. 1995) e *Juglans regia* (TULECKE et al. 1995), a capacidade embriogênica pôde manter-se por mais de 5 e 9 anos, respectivamente, via embriogênese secundária repetitiva.

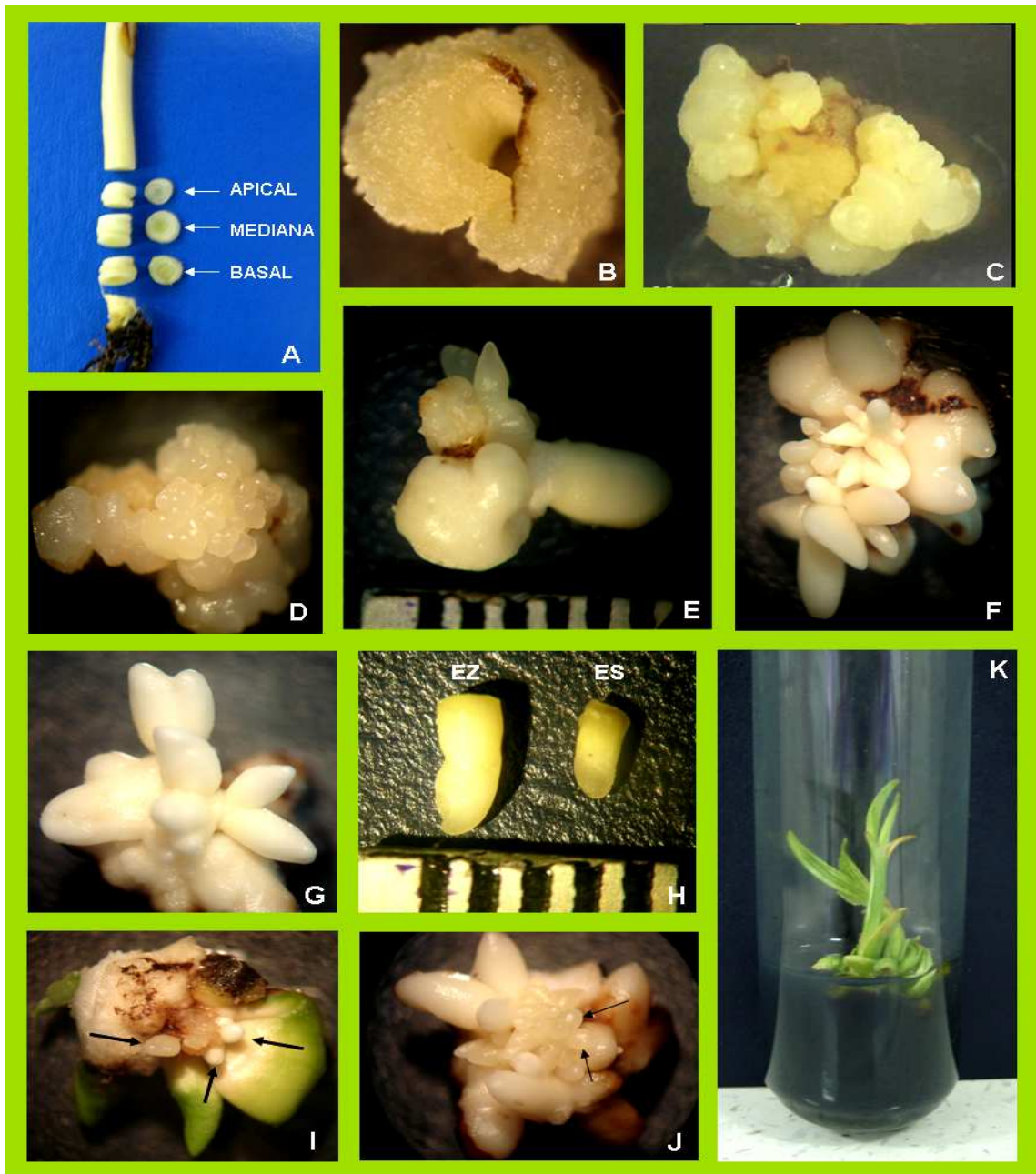


FIGURA 3- Embriogênese somática e regeneração de plantas de dendezeiro pela técnica *Thin Cell Layer* (TCL). (A) Ilustração esquemática dos cortes TCL das porções apical, mediana e basal de plantas de dendezeiro utilizadas no experimento de embriogênese somática (ES); (B) início da formação de calo primário, após 7 dias de cultivo em meio com Picloram; (C) Início da progressão do calo primário em calo embriogênico; (D) Calo embriogênico no início da etapa de diferenciação de embriões somáticos; (E) Início da formação de embriões somáticos a partir do calo embriogênico; (F) Aglomerado de embriões somáticos originados a partir dos calos embriogênicos; (G) embriões somáticos maduros; (H) Comparação entre um embrião zigótico (EZ) extraído de um fruto maduro de dendê e um embrião somático (ES) maduro produzido por TCL; (I) embriões somáticos no início da germinação e aspecto da assincronização do desenvolvimento (setas); (J) aspecto da formação de embriões secundários a partir dos embriões somáticos pré-existentes; (K) plantas de dendezeiro regeneradas em meio de cultura com carvão ativado. Embrapa 2007



FIGURA 4 - Plantas de dendezeiro após 3 meses de crescimento, após início da germinação dos embriões somáticos em meio de cultura sem carvão ativado para rápido crescimento. Embrapa, 2007

A capacidade de um protocolo TCL ser incorporado num programa de propagação de plantas depende de vários fatores, incluindo a percepção correta do sinal e a transdução no explante, a capacidade da maquinaria genética interna do explante em responder e reagir a este estímulo e no último caso pode depender do estado e da origem fisiológica do tecido ou do órgão envolvido (SILVA, 2003 a).

A técnica TCL já vem sendo bastante utilizada com eficiência em protocolos de micropropagação em algumas espécies de plantas, principalmente as leguminosas e ornamentais (ROUT et al., 2006; HUANG et al., 2007). Porém, na literatura, praticamente não se tem notícia da aplicação desta tecnologia na cultura de tecidos de palmeiras, com exceção de um recente artigo publicado com pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth) utilizando a técnica TCL, com resultados

semelhantes aos obtidos em nosso experimento, principalmente com os resultados mais significativos atribuídos à utilização do Picloram em altas concentrações e diferentes posições dos explantes. Neste trabalho, Steinmacher et al. (2007 c), observaram que a indução de calos primários foi abundante em explantes obtidos a partir da técnica TCL. A maior percentagem de indução de calos primários (ainda não embriogênicos) também foi alcançada nos explantes mais próximos ao ápice meristemático das plantas, utilizando meio de cultura de MS, suplementado com concentrações de 150–600 μM de Picloram (83–97% respectivamente). Nos explantes sub-apicais, a percentagem de indução de calos foi significativa para as concentrações de 300 e 600 μM , representando 74 e 71% respectivamente. Já nos explantes sob-apicais, a calogênese primária foi obtida com 600 μM de Picloram, variando de 10% a 50%. No entanto, diferentemente do nosso trabalho, a produção de calos embriogênicos foi avaliada somente após cinco meses de cultivo no mesmo meio de cultura utilizado na indução da calogênese, onde as análises estatísticas demonstraram interação entre as concentrações de Picloram e a posição dos explantes. A concentração de 300 μM juntamente com o explante da região do ápice meristemático apresentou 43% de calos embriogênicos, enquanto que nas concentrações de 150 e 600 μM , houve apenas 3 e 9% de formação de calos embriogênicos, respectivamente. Para a indução da embriogênese somática em dendezeiro, diferentemente do nosso trabalho, não foram encontrados trabalhos na literatura que abordassem o uso do Picloram, mesmo quando os experimentos utilizaram fontes alternativas de explantes como folhas e embriões zigóticos.

Fiore et al. (2002) induziram a calogênese, embriogênese somática e regeneração de plantas a partir de explantes de estigma e talo utilizando cortes transversais (TCL) de *Citrus limon* (L.) Burm. cv 'Femminello' e *Citrus sinensis* (L.) Osb. cv 'Washington Navel GS' utilizando 2,4-D. Os explantes foram cultivados em 16 meios de cultura diferentes, baseados nos nutrientes e vitaminas de Murashige e Tucker (MT), suplementado com diferentes combinações de 2,4-D e 4-CPPU. Em *Citrus limon*, explantes TCL começaram a produzir embriões 3 meses após a inoculação no meio de cultura, enquanto que em *Citrus sinensis* após 2 meses de cultivo. A resposta embriogênica do estigma foi maior do que o talo, ambos no corte TCL. O melhor resultado em termos de potencial embriogênico foi observado nos estigmas de *Citrus limon* em meio suplementado com 4,0 μM de 4-CPPU (76,6%) enquanto que nas mesmas condições, o *Citrus sinensis* apresentou 40%. Neste

trabalho, altas percentagens de embriões somáticos desenvolveram-se em plantas completas, sendo que para os embriões somáticos derivados de estigma e talo os resultados observados foram de 68% e 75% para *Citrus limon* e 61% e 53% em *Citrus sinensis*, respectivamente.

Bui et al., (1997), também utilizou a técnica TCL combinada com 2,4-D para a indução da ES em *Digitaria sanguinalis* L.. Neste experimento, cinco tipos de explantes de mudas de 4 semanas foram testados: a zona acima do ápice terminal da planta (AAz), que consistia somente de anéis de folhas, as zonas sub-apicais da planta (Az) incluindo anéis e primórdios das folhas que cercavam o ápice, o primeiro e segundo nó (N1 e N2), o primeiro e segundo entrenó (I1 e I2) e a zona apical da raiz (r). Os autores verificaram que na presença de 10 μM de 2,4-D embriões somáticos e calos friáveis diferenciaram do sétimo ao décimo dia, sendo que 45% para o TCL dos explantes AAz e Az, 13% para N2 e 3% para N1.

Em meio de cultura MS contendo concentrações de 1,0 a 10,0 mg.L^{-1} de ANA e 0,1 a 10,0 mg.L^{-1} de 2,4-D, a freqüência de explantes TCL de *Brassica napus* ssp. *oleifera* apresentando embriogênese secundária foi significativamente inibida, com diminuição dos embrióides, com o aumento das concentrações de ANA ou 2,4-D no meio de cultura (SHU ; LOH, 1991).

A maioria dos pesquisadores que obtiveram sucesso com a propagação vegetativa *in vitro* do dendezeiro utilizou o processo da ES a partir da formação de calos em meio de cultura contendo 2,4-D (JONES, 1974; RABECHULT; MARTIN, 1976; PARANJOTHY; OTHMAN, 1982; NWANKWO; KRIKORIAN, 1983; BLAKE, 1983; DUVAL et al. 1988; PARANJOTHY, 1989; AHÉE et al., 1981; DE TOUCHET et al., 1991; TEIXEIRA et al. 1994; KANCHANAPOOM; DOMYOAS, 1999; RAJESH et al., 2003). De acordo com Vasil (1982), a competência embriogênica estimulada pelo 2,4-D é adquirida durante os primeiros estágios de cultivo em meio de cultura. Cerca de 60% dos trabalhos que relataram sucesso na ES em dicotiledôneas estão associados à presença do 2,4-D no meio de cultura (GUERRA; HANDRO, 1998). Nas monocotiledôneas, este número é considerado bem maior, com a utilização de altas concentrações desta auxina na indução da ES (TEIXEIRA et al., 1994; ABERLENC-BERTOSSI et al., 1999; ABDULLAH et al., 2005; EKE et al. 2005; ESHRAGHI et al., 2005).

Huong et al., (1999) postularam efeitos significativos de 10,8 μM de 2,4-D na formação de embriões somáticos em embriões zigóticos e ápices caulinares de

Phoenix dactylifera L., sendo ainda considerado essencial na proliferação e manutenção dos embriões formados. Da mesma forma, altas concentrações de 2,4-D para a indução de embriões somáticos em outras palmeiras também já foram relatados, como nos trabalhos desenvolvidos por Ledo et al. (2002) onde verificaram que a concentração de 339,36 μM de 2,4-D em meio de cultura MS proporcionou as melhores respostas morfogênicas em embriões zigóticos de *Euterpe oleracea* Mart. Guerra e Handro (1998) utilizaram embriões zigóticos de *Euterpe edulis* Mart. em meio de cultura MS contendo 226,24 e 454,48 μM de 2,4-D e observaram a indução da ES. Entretanto, baixas concentrações de 2,4-D (1 mg.L^{-1}) foram suficientes para induzirem calos embriogênicos na cultivar de tamareira Deglet Nour (FALCONE; MARCHESCHI, 1988).

Teixeira (1989) publicou sua tese de doutoramento como sendo o primeiro trabalho que utilizou o Picloram como substituto do 2,4-D no protocolo de indução da ES em dendezeiro a partir de explantes advindos de inflorescências imaturas. Estes resultados, se comparados aos alcançados em nossos experimentos, juntamente com os obtidos em outras espécies de palmeiras por Valverde et al., (1987), Karun et al., (2004), Guedes et al., (2006), Fermino Jr. et al., (2007) e Steinmacher et al., (2007a,b e c), contrastam com os resultados que relatam que o 2,4-D é a auxina mais importante utilizada na cultura de tecidos de palmeiras e provam que o Picloram, em altas concentrações, possui igual ou maior potencial e eficiência para a expressão de um modelo embriogênico. Nossos resultados sugerem que pode haver maior eficácia na absorção e mobilização do Picloram, juntamente com a metabolização mais rápida nas “células alvo”, ou seja, grupos de células que possuem centros ativos de divisão celular (competentes), presentes nos explantes de dendezeiro utilizados nesse experimento. Teixeira et al. (1995) também atribuíram ao Picloram na concentração de 250 μM a indução da ES em explantes de embriões zigóticos imaturos de dendezeiro var. tenera em meio de cultura Y3 líquido, após cinco meses de cultivo *in vitro*.

Steinmacher et al., (2007 a) utilizando embriões zigóticos de *Bactris gasipaes* no estágio maduro observaram 78% de calos primários na presença de 20 μM de Picloram e de 75% quando a concentração do Picloram passou para 40 μM . A superioridade do Picloram sobre o 2,4-D e Dicamba também foi relatada por Steinmacher et al., (2007 b) em inflorescências de *Bactris gasipaes*. Estas auxinas empregadas nas concentrações de 150, 300 e 600 μM foram avaliadas em

explantes do tipo inflorescências, classificadas de acordo com o estágio de desenvolvimento (infl1 = 5-8 cm; infl2 = 8–12 cm e infl3 = 12–16 cm). Os autores verificaram que as inflorescências mais jovens foram mais competentes na resposta à indução da ES que as mais desenvolvidas, sendo que o Picloram aumentou as taxas de indução da ES mais que o 2,4-D e Dicamba, e dentre as concentrações avaliadas, a de 300 µM foi a que proporcionou os melhores resultados.

Em outras espécies de plantas, o Picloram também se mostrou mais efetivo na indução da ES em comparação ao 2,4-D (PEREIRA et al., 2007). Explantes de hastes florais de *Tulipa gesneriana* L. foram cultivados em meio de cultura MS contendo 10, 25, 50 e 100 µM de 2,4-D, ANA e Picloram. Neste trabalho também se verificou que o Picloram, na concentração de 25 µM, foi a auxina mais eficiente na indução e formação de calos embrionários do que o 2,4-D e ANA (PTAK; BACH, 2007).

4.1.2 Estudos morfo-histológicos

Segundo Rodriguez e Wetzstein (1994) as características morfológicas dos embriões somáticos podem afetar a germinação e, conseqüentemente, a conversão dos embriões somáticos em plantas. Assim, o acompanhamento histológico das estruturas formadas permite uma melhor caracterização dos processos embriogênicos, identificando as possíveis falhas na formação do embrião somático.

As observações histológicas obtidas de secção transversal de calos primários embriogênicos revelaram proliferação de uma zona meristemática, com núcleos proeminentes e citoplasma denso, e tecido parenquimático (FIGURA 5 B), além de tecido vascular de conexão com o explante e as células de revestimento do calo (FIGURA 5 C). Estes resultados corroboram àqueles obtidos por Steinmacher et al. (2007c), que cultivando na presença de Picloram tecidos do tipo *thin cell layer* de *Bactris gasipae*, obtidos a partir de bainhas foliares internas, observaram que estes apresentam desenvolvimento de calos primários de aspecto compacto e coloração amarela escura e formação de uma zona meristemática.

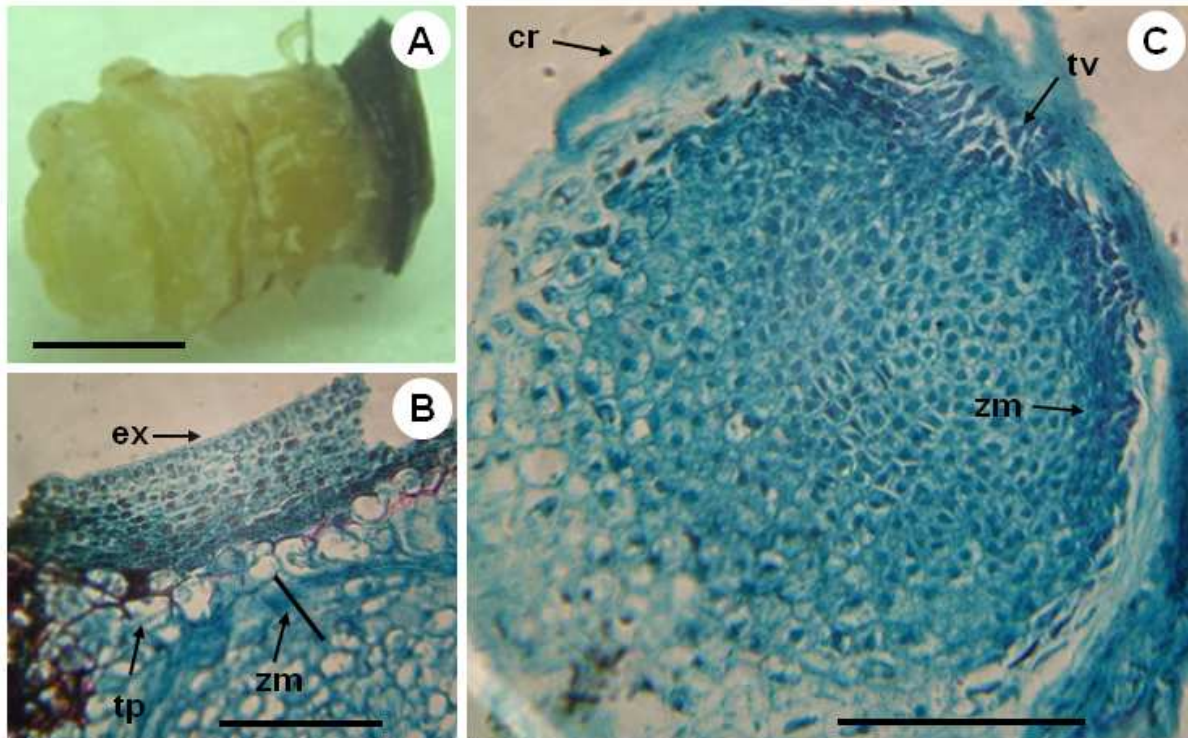


FIGURA 5 - Aspecto morfo-histológico de calos primários embriogênicos de dendezeiro, var. dura, a partir de explantes do tipo *thin cell layer* (TCL). Morfologia do calo utilizado nos estudos morfo-histológicos (Barra= 1 cm) (A); explante (ex) em secção transversal do calo mostrando a proliferação da zona meristemática (zm) e tecido parenquimático (Barra= 30 µm)(tp). (B); Secção transversal do calo com visualização de tecido vascular (tv) na conexão com o explante, zona meristemática (zm) e células de revestimento do calo (cr) (Barra= 50 µm) (C). Embrapa, 2007. Abreviações: ex, explante; zm, zona meristemática; tp, tecido parenquimático; TV, tecido vascular, Cr, células de revestimento do calo. Escala das barras: A = 1 cm; B = 30 µm; C = 50 µm.

Em seqüência ao desenvolvimento das culturas, *clusters* formados por embriões somáticos puderam ser observados nos tecidos *thin cell layer*, especialmente em presença de Picloram, os quais apresentavam certo grau de assincronia no desenvolvimento dos embriões somáticos (FIGURA 6 A). Já em secção longitudinal do embrião somático, foi observado como principais características a presença do meristema apical, cordão procambial e protoderme (FIGURA 6 B), além de células com citoplasma denso e núcleos proeminentes no tecido do cordão procambial (FIGURA 6 C). De acordo com Sané et al. (2006) análises histológicas de calos primários compactos de *Phoenix dactylifera* (Arecaceae) mostraram que eles foram formados por pequenas células

meristemáticas com citoplasma denso e ricas em proteínas solúveis. Além disso, as células pequenas em divisão tinham uma aparência embriogênica, com um citoplasma rico em proteína, vacúolos pequenos e um largo núcleo.

Em relação ao embrião zigótico, as análises morfo-histológicas evidenciaram a presença de meristema apical e primórdios foliares (FIGURA 6 E), caracterizando assim a existência de semelhanças quando comparado às análises morfo-histológicas dos embriões somáticos. Estas observações são semelhantes àquelas obtidas por Kanchanapoom e Domyoas (1999), segundo os quais embriões zigóticos maduros de *Elaeis guineensis* Jacq var. *tenera*, apresentam como características coloração branca, forma ovalada, meristema apical circundado por um cotilédone simples, cavidade interna contendo uma zona característica de gema apical, composta de um meristema apical e dois ou três primórdios foliares. Além disso, segundo os autores, o cotilédone é composto por três tipos de células denominadas parênquimáticas, procambiais e protodérmicas. De acordo com Sané et al. (2006), a diferença fundamental entre o desenvolvimento de embriões somáticos e zigóticos é o baixo acúmulo de reservas durante o desenvolvimento inicial. Nesse mesmo sentido, Schewendiman et al. (1988) afirmam que acumulação precoce de reservas de lipídeos em dendezeiro pode ser um bom indicador da aquisição do potencial embriogênico dos tecidos.

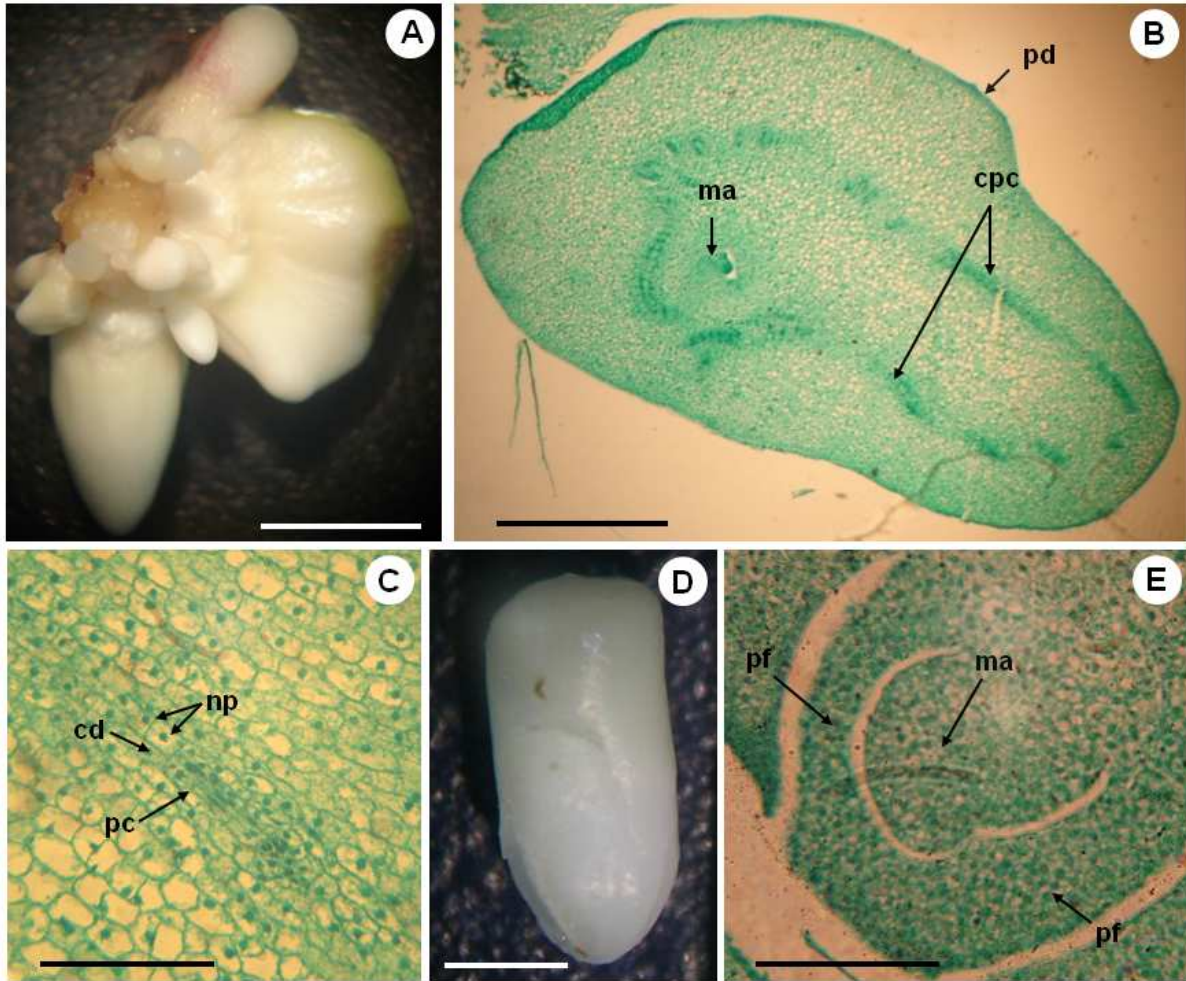


FIGURA 6 - Aspectos morfológicos e histológicos dos embriões somáticos e zigótico de dendezeiro var. Dura. Morfologia externa do cluster oriundo de *thin cell layer*, mostrando embriões somáticos em desenvolvimento assincrônico (A); Secção longitudinal de um embrião somático evidenciando o meristema apical, cordão procambial e protoderme (B); Detalhe do cordão procambial destacando células com citoplasma denso e núcleos proeminentes (C); Morfologia externa de embrião zigótico (D); Secção longitudinal de embrião zigótico evidenciando o meristema apical e primórdios foliares (E). Embrapa, 2007.

Abreviações: *ma*, meristema apical; *cpc*, cordão procambial; *pd*, protoderme; *cd*, citoplasma denso; *np*, núcleos proeminentes; *pf*, primórdios foliares. Escala das barras: A = 5 mm; B = 50 μ m; C = 10 μ m; D = 1 mm; E = 30 μ m.

4.2 INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM DIFERENTES GENÓTIPOS DE DÊNDEZEIRO A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES IMATUROS

As respostas de explantes em um sistema de cultura de tecidos muitas vezes depende do genótipo colocado em meio de cultura. Segundo Guerra et al., (2001), o genótipo da planta mãe doadora dos explantes juntamente com o tipo de auxina exercem papel fundamental na competência embriogênica. Quando se avaliou a influência de diferentes genótipos na indução da E.S. em explantes foliares imaturos de dendezeiro, verificou-se que os genótipos testados apresentaram diferenças estatísticas significativas em relação às variáveis percentagem de explantes com embriões somáticos e número de embriões somáticos formados por explante (TABELA 4). O genótipo GS4 proporcionou resultados significativamente superiores aos demais, sugerindo que para o do dendezeiro, diferentes genótipos podem apresentar respostas diferenciadas *in vitro*, mesmo quando cultivados sob condições semelhantes.

Corroborando com os nossos resultados, Steinmacher et al., (2007 b), observaram diferenças significativas quando na comparação de dois genótipos (I e II) de pupunheira para as variáveis analisadas quando testaram a influência do 2,4-D, Dicamba e Picloram (150, 300 e 600 μM) na indução da ES a partir de inflorescências de pupunheira em diferentes estágios de desenvolvimento (Inf1=5-8 cm; Inf2= 8-12 cm e Inf3=12-16 cm). O genótipo II apresentou as melhores respostas para indução da ES. Houve interação do genótipo com o estágio de desenvolvimento das inflorescências, sugerindo que as inflorescências mais jovens são mais responsivas à ES do que as mais desenvolvidas. Interação significativa também foi observada entre os genótipos quanto foi feito um pré-tratamento dos explantes com 200 μM de 2,4-D. O Picloram na concentração de 300 μM induziu a ES em ambos os genótipos, com diferenças estatísticas entre os mesmos. A influência dos genótipos na indução da ES em pupunheira também foi observada em explantes foliares (STEIN; STEPHENS 1991).

Konan et al., (2007), testaram o enraizamento em três diferentes tamanho de ápices caulinares (L: > 9 cm) (M: 7–9 cm) e (S: 5–7 cm) de três clones de dendezeiro (LCM 022, LCM 051 e LCM 079) obtidos de embriões somáticos. O desempenho dos propágulos no enraizamento foi dependente da origem genética e do tamanho inicial das partes aéreas. Quando os grupos de três ápices da mesma

linha clonal foram enraizados juntos, no mesmo tubo da cultura, a combinação do tamanho da planta dentro do grupo impactou na qualidade total de enraizamento. O desempenho do enraizamento foi significativamente melhor nos ápices da linha clonal LMC 051 e para os ápices maiores ($L > 9$ cm). A linha clonal LMC 051 mostrou uma taxa de enraizando mais elevada (81%), quando comparada às duas outras linhagens (41% para LMC 079 e 25% para LMC 022).

No experimento desenvolvido por Al-Khayri e Al-Bahrany (2004), foram utilizados cinco genótipos de tamareira (Barhee, Hillali, Naboot Saif, Ruzaiz e Khusab) para avaliar o potencial de indução da ES em meio de cultura MS na presença de ANA (53,7 μM), 2iP (7,4 μM), AgNO_3 (0; 12,5; 25, 37,5; 50; 62,5; 75; 87,5 e 100 μM) e carvão ativado (1,5 g.L^{-1}). O crescimento de calos das cvs. Barhee, Naboot Saif, Ruzaiz e Hillali foi significativo em resposta a adição de 37,5 μM de AgNO_3 . Entretanto, a cv. Hillali foi considerada a que melhor na indução da ES na concentração de 62,5 μM de AgNO_3 , enquanto que para as cvs. Barhee, Hillali e Ruzaiz, a concentração ótima de foi de 62,5; 50 e 37,5 μM , respectivamente.

Resultados contrastantes do efeito do genótipo foram revelados por He e Lazzeri (2001) quando não encontraram diferenças significativas sobre a embriogênese e regeneração de plantas no cultivo de inflorescências de quatro genótipos de trigo (L35, Svevo, Latino e Ofanto) em meios com 2 e 4 mg.L^{-1} de Picloram e 1 e 2 mg.L^{-1} de 2,4-D. Por outro lado, Hankoua et al., (2005), encontraram diferenças significativas na habilidade de 17 genótipos de mandioca (TME 1, TME 2, TME 5, TME 8, TME 12, TME 13, TME 127, TME 203, TMS 282, TMS 70775, TMS 30572, TMS 92/0057, TMS 30001, TMS 4(2)1425, TMS 93/0665, TMS 91/02327 e TMS 92/02324) em induzir embriões somáticos a partir de folhas imaturas e meristemas apicais em meio de cultura contendo 12,0 mg.L^{-1} de Picloram (meio P-CIM). Uma vez obtidos, embriões somáticos nos estágios globular, torpedo e cordiforme, estes foram transferidos para meio de cultura de maturação, contendo 0,1 mg.L^{-1} de BAP e para regeneração foi usado o meio de cultura MS contendo 0,4 mg.L^{-1} de BAP e 2 μM de CuSO_4 . De maneira geral, os autores verificaram que os genótipos, TME 1, TME 203, TME 12, TMS 92/02324 e TME 5 tiveram maior formação de estruturas embriogênicas primárias do que TME 127, TMS 91/02327, TMS 30001, TMS 70775 e TMS 93/0665 quando o meristema apical foi cultivado em meio P-CIM. Os genótipos apresentando a maior taxa de maturação (100%) foram TME 1, TME 12, e TMS 91/02324 e TME 203 o mais baixo. Os genótipos TME 8 e

TMS 91/02327 tiveram o melhor potencial de regeneração entre os genótipos testados.

Resultados semelhantes aos observados neste trabalho demonstrando a influência do genótipo para a indução e regeneração de plantas por ES, também foram observados por Guerra et al., (2001), quando avaliaram as respostas de cinco acessos de *Feijoa sellowiana* Berg, quanto ao potencial embriogênico com choques auxínicos de 2,4-D (20 μ M) em períodos de 1, 2, 4, 8 e 16 semanas. A maior porcentagem de indução da embriogênese somática e o maior número de embriões ocorreram nos acessos 101 e 50-4, sendo observado que o genótipo 53B-7 revelou as menores taxas de indução e produção de embriões somáticos.

Šerhantová et al., (2004), estudaram a indução da embriogênese somática utilizando três auxinas (2,4-D, Picloram e Dicamba) em embriões zigóticos de 12 cultivares de cevada e observaram que a frequência de formação de calos e número de regenerantes foi influenciada significativamente pelo genótipo e auxina utilizada, sendo que os maiores valores para número de regenerantes foi obtida pela cultivar Golden Promise. Nesse contexto, Satyavathi et al., (2004), avaliaram quatro cultivares de trigo de importância agrônômica quanto ao potencial de regeneração na presença de diferentes concentrações de 2,4-D, Dicamba e Picloram. Foi constatado que houve interação entre as auxinas e suas respectivas concentrações, juntamente com as quatro cultivares na habilidade de produzir calos e regeneração de plantas. Nos estudos desenvolvidos por González et al., (2001), todos os genótipos de *Triticum* analisados apresentaram boas respostas de indução de calos em meio contendo 9,05 μ M de 2,4-D. Porém, diferenças foram observadas entre genótipos e meio de cultura quanto a porcentagem de calos formados e sua morfologia. Enquanto a cultivar 'Vitrón' mostrou a mais baixa frequência na indução de calos, variando de 54% em meio MS para 88,33% em meio MSm, a cultivar 'Fabio', entretanto, apresentou frequência de indução de 100% em todos os meios de cultura analisados.

Na media geral das auxinas testadas, o Picloram foi estatisticamente superior ao 2,4-D na variável número de embriões somáticos formados, principalmente no estágio globular, por explante (TABELA 2). Analisando os aspectos dos calos formados tanto na presença de Picloram quanto em 2,4-D, percebe-se que algumas características morfológicas como coloração e consistência não diferiram, apesar das respostas embriogênicas terem sido diferentes de acordo com as análises

estatísticas (FIGURA 7). Corroborando com os resultados alcançados neste experimento, Karun et al., (2004), chegaram a conclusão que o Picloram na concentração de 5 μM foi superior ao 2,4-D e Dicamba na formação de embriões somáticos globulares a partir de explantes foliares de *Areca catechu* L. Resultados semelhantes foram obtidos por Teixeira et al., (1995), quando testaram a eficiência do cultivo de células em suspensão de seis genótipos de dendezeiro (D-1967, D-1986, D-2107, D-1974, D-2036, D-2289) em meio MS e Y3 suplementados com 475-500 μM de 2,4-D ou 250 μM de Picloram e 0,3% (p/v) de carvão ativado. Os resultados apontaram para os genótipos D-2036 e D-2289 como sendo os que mais produziram tecidos embriogênicos friáveis (FET), após 26 semanas de cultivo *in vitro*.

Da mesma forma que neste experimento, Teixeira et al., (1995), concluíram que a concentração de 250 μM de Picloram foi eficaz na indução da embriogênese de dendezeiro, cultivar pisifera. Resultados semelhantes também foram demonstrados quando o Picloram foi mais efetivo que o 2,4-D no experimento de desenvolvido por Valverde et al. (1987) para a indução da embriogênese somática em mudas de pupunheira. Steinmacher et al. (2007a) relataram que o Picloram na concentração de 10 μM foi efetivo na indução de calos embriogênicos em 9,8% dos explantes oriundos de embriões zigóticos de pupunheira, porém, níveis mais elevados desta auxina tiveram efeitos prejudiciais. Em outra monocotiledônea, *Tulipa gesneriana* L., Ptak e Bach (2007) concluíram que o Picloram foi mais eficiente na indução e formação de calos nodulares embriogênicos do que o 2,4-D, com maior número de embriões somáticos produzidos em meio com 25 μM de Picloram e 0,5 μM de BAP.

Sogeke (1998) utilizou folhas imaturas de dendezeiro em meio de cultura Y3 contendo 15 mg.L^{-1} de ANA, observando a formação de calos 58 dias após a inoculação *in vitro*. A estimulação da ES foi percebida após 2 meses também em meio Y3, contudo numa concentração mais baixa de ANA (0,5 mg.L^{-1}) conjugado com 2 mg.L^{-1} de cinetina. Já Touchet et al., (1991), utilizando folhas imaturas de dendezeiro verificaram que as respostas na obtenção de calos embriogênicos são obtidas quando se utiliza meio de MS na presença de 1 g.L^{-1} de carvão ativado, adicionado de concentrações entre 80 e 100 mg.L^{-1} de 2,4-D.

Efeitos benéficos do Picloram na indução da embriogênese somática também foram observados por Groll et al., (2001), em explantes foliares de mandioca

(genótipo MCol 22). O meio SH6, com elevada concentração de Picloram (12 mg.L^{-1}), foi capaz de produzir a maioria dos tecidos embriogênicos induzidos.

Titon et al. (2007) observaram que calos formados em cotilédones de *Eucalyptus grandis* nas concentrações de 5,0 e $10,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de Picloram, quando subcultivados em meio MS e mantidos na luminosidade, apresentaram estruturas semelhantes a embriões somáticos em estágio de torpedo e cotiledonar. Nugent et al., (2001), obtiveram embriões somáticos a partir de calos embriogênicos formados em fragmentos cotiledonares e de hipocótilos de embriões zigóticos maduros de *Eucalyptus globulus* em tratamentos com $12,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de Picloram.

Quando se avaliou a oxidação dos explantes, nenhuma diferença estatística foi observada entre os tratamentos, muito embora para todos os genótipos avaliados, os valores percentuais de oxidação tenham sido maiores quando os mesmos foram cultivados com 2,4-D (TABELA 2). Possivelmente, a alta taxa de oxidação observada esteja relacionada à não utilização de compostos antioxidantes como o carvão ativado, comumente usado na cultura de tecidos do dendezeiro (TEIXEIRA et al. 1994; DE TOUCHET et al. 1991; STEINMACHER, et al. 2007 a; MOTOIKE et al. 2007). Esses resultados se assemelham com os postulados por Silva et al. (2003), onde altas concentrações de 2,4-D, independentemente das concentrações de cinetina e sacarose, promoveram a oxidação e redução do peso de calos de cotilédones e hipocótilos de soja. Figueira et al. (2003) analisando a indução de embriões em anteras de café Mundo Novo, Catuaí Vermelho 44 e 99, observaram que o aumento das concentrações de 2,4-D no meio de cultura promoveu um aumento nas taxas de oxidação das anteras.

Por outro lado, Sato et al. (2004) observaram que o 2,4-D promoveu a diminuição da oxidação nas concentrações de 2 a 4 mg.L^{-1} em explantes de caule e folha de Pau D'álho. Já resultados observados por Karun et al. (2004), testando as auxinas 2,4-D, Dicamba e Picloram na indução da embriogênese somática e regeneração de plantas, demonstraram que o Picloram promoveu as maiores taxas de oxidação dentre as auxinas testadas, sendo que a concentração que mais oxidou os explantes foi a de $200 \mu\text{M}$.

TABELA 2 - Influência do Picloram (Pi) e 2,4-D nas concentração de 225 µM em meio de MS na formação de embriões somáticos em diferentes genótipos de dendezeiro, aos dois meses de cultivo. Embrapa, 2007

Genótipo	Explantos com embriões somáticos (%)			Nº de embriões/explante			Oxidação de explantes (%)		
	Auxina		Média (Genótipo)	Auxina		Média (Genótipo)	Auxina		Média (Genótipo)
	Pi	2,4-D		Pi	2,4-D		Pi	2,4-D	
GES3	0,6	0,0	0,2 b	3,0 bA	0,0 bB	1,5 c	86,3	88,5	86,3 a
GES4	13,0	22,4	17,5 a	7,8 aA	6,5 aA	7,1 a	78,1	80,8	79,5 a
GES6	13,7	2,4	7,0 b	3,1 bA	2,4 bA	2,7 b	49,3	71,1	60,5 a
Média (auxina)	9,1A	8,3A		4,6 A	3,0 B		71,2A	80,1A	
<i>F</i> (A: Auxinas): 0,305 ^{ns}				11,228**			0,489 ^{ns}		
<i>F</i> (B: Genótipos): 4,513*				29,915**			1,791 ^{ns}		
<i>F</i> (A x B): 0,893 ^{ns}				3,982**			0,210 ^{ns}		

Médias seguidas por letras distintas dentro de cada item avaliado, minúsculas na vertical (entre os genótipos testados) e maiúsculas na horizontal (entre os tratamentos de auxinas), diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. ^{ns} não significativo; * Significativo ($p < 0,05$); ** Significativo ($p < 0,01$).

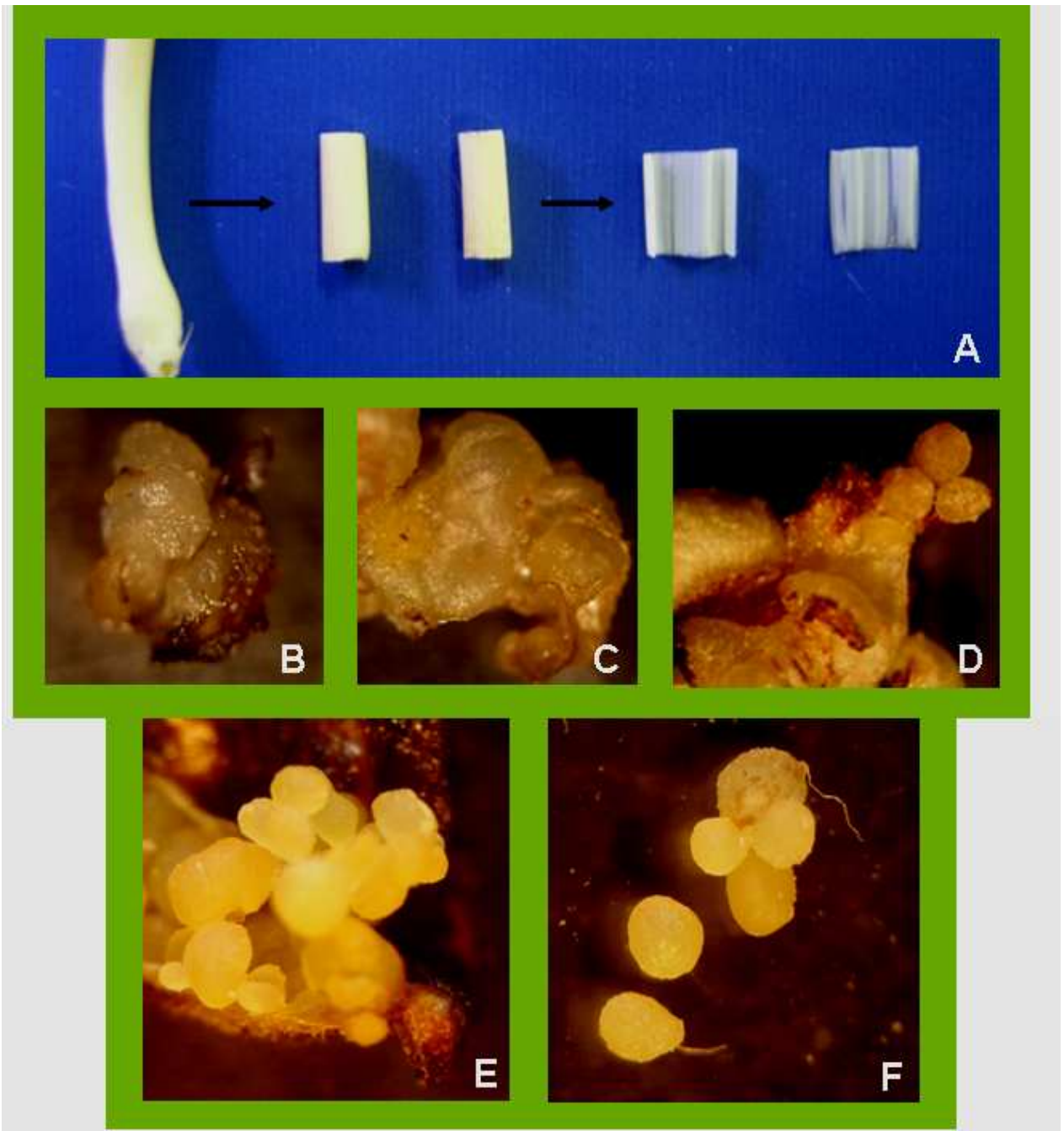


FIGURA 7 - Indução da embriogênese somática em dendezeiro a partir de folhas imaturas: (A) Sequência ilustrativa mostrando o segmento caulinar de mudas de dendezeiro, o seccionamento do segmento caulinar logo acima do meristema em pequenas partes e os explantes de folhas imaturas aclorofiladas medindo cerca de 1 cm² obtidos; (B) calos multi-granulares obtidos com Picloram; (C) calos granulares obtidos com 2,4-D; (D) início da formação de embriões somáticos em estágio globular induzidos em 225 µM de 2,4-D e; (E,F) embriões somáticos obtidos dos genótipos GES4 e GES6 de dendezeiro cultivados meio de MS com 225 µM de Picloram. Embrapa, 2007

4.3 - RESPOSTAS MORFOGÊNICAS *IN VITRO* DE INFLORESCÊNCIAS FEMININAS IMATURAS DE DENDEZEIRO QUANTO A REVERSÃO DO ESTADO FLORAL AO VEGETATIVO EMBRIOGÊNICO

4.3.1 Influência de tipos de meios de cultura e reguladores de crescimento na indução da embriogênese somática em inflorescências femininas imaturas de dendezeiro, var. dura.

Os resultados encontrados em nossos experimentos demonstram que o padrão embriogênico observado quando se utilizou como fonte de explante inflorescências imaturas femininas de dendezeiro foi pela via direta, ou seja, na qual os embriões somáticos originaram-se diretamente de tecidos matrizes sem a formação de estádios intermediários de calos.

De modo geral, quando se avaliou tipos de meio de cultura e concentrações de BAP na indução da embriogênese somática em inflorescências femininas imaturas de dendezeiro, verificaram-se efeitos significativos para explantes com respostas embriogênicas apenas para o fator meio de cultura, sendo os melhores resultados obtidos na formulação do meio de MS do que a do Y3, com 54,8% e 13,5% de explantes com embriões somáticos formados, respectivamente, independente das concentrações de BAP estudadas, as quais não apresentaram nenhuma diferença significativa (TABELA 3). No entanto, para as variáveis massa fresca e número de embriões somáticos formados por explante, verificou-se uma tendência de melhoria nas respostas para estas variáveis com o aumento das concentrações de BAP, especialmente em meio de MS.

TABELA 3 - Influência de diferentes meios de cultura primários e concentrações de BAP associados à presença de 2,4-D (450 μM) na indução da embriogênese somática em inflorescências femininas imaturas de dendezeiro, após 90 dias de cultivo. Embrapa, 2007

Explantes com ES [†] (%)					Massa fresca explante (g)			N° de ES/explante			
2,4-D (450 μM)											
Meio	BAP (μM)				Média	BAP (μM)			BAP (μM)		
	(0)	(25)	(50)			(0)	(25)	(50)	(0)	(25)	(50)
MS	40,4	68,5	55,6	54,8a	0,79	0,81	1,1	29	45	72	
Y3	22,7	6,1	11,6	13,5b	1,1	0,84	1,1	15	25	ND ^{††}	
<i>F</i> (A: Meio): 14,756 ^{**}						ND			ND		
<i>F</i> (B: BAP): 0,011 ^{ns}						ND			ND		
<i>F</i> (A x B): 1,588 ^{ns}						ND			ND		

[†]ES: Embriões somáticos; ^{††}ND: não determinado; Médias seguidas por letras distintas, minúscula na vertical, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ^{ns} não significativo; ^{**} Significativo ($p < 0,01$).

Não foram encontrados na literatura trabalhos acerca da influência do BAP na indução da embriogênese somática em inflorescências imaturas de dendezeiro. No entanto, a indução de calos embriogênicos tem sido bastante relatada na literatura pela combinação de tratamentos com auxinas e citocininas (BHANSALI et al. 1990; ALY et al. 2002; MA e XU 2002; HERNANDEZ et al. 2003; NATH; BURAGOHAİN 2005). Segundo Haensch et al. (2007) a indução de calos em explantes foliares imaturos de *Pelargonium x domesticum* cv. Madame Loyal somente foi possível com combinações de 2,4-D e BAP. Entretanto, a propagação das células, bem como a diferenciação dos embriões, foi inibida por uma aplicação contínua da combinação destes reguladores de crescimento. Inflorescências imaturas de *Setaria italica* em meio de cultura MS com 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D associado com 0,2–0,5 mg.L⁻¹ de BAP mostraram alta capacidade de indução de calos embriogênicos (XU et al. 1984).

Tuominen e Musgrave (2006), além de atribuir dois tipos de resposta ao BAP (aumento na proliferação de calos e rápida indução), testaram uma concentração ótima desta citocinina para a estimulação da proliferação de calos em soja, 4,4 x 10⁻⁷ M de BAP, resultando em ganho de peso dos calos. O ganho de massa dos calos foi tipificado pelo peso fresco e seco, confirmando que o ganho de peso dos calos foi atribuído mais à proliferação das células do tecido do calo. Jain et al, (2005) utilizaram inflorescências de híbridos de *Cynodon* sp. para induzir calos embriogênicos com competência morfogênica em meio MS adicionado de 4,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 0,01 à 1,5 mg.L⁻¹ de BAP, obtendo nítido ganho de massa fresca dos calos com o aumento da concentração de BAP no meio. Berthouly e Michaux-Fierrere (1996), estudando genótipos de *Coffea canephora*, observaram que a adição de BAP em concentrações acima de 1,5 µM favoreceu a diferenciação de células embriogênicas do que a multiplicação e, segundo o autor, isso ocorreu provavelmente por haver alteração na polaridade e no plano de divisão da célula (WILLIAMS; MAHESWARAN, 1986).

Na literatura revisada, apenas no trabalho desenvolvido por Teixeira et al. (1994), que utilizou inflorescências como fonte de explante, foi testada a eficiência dos meios de cultura MS e Y3, em uma das etapas do protocolo de indução da ES em dendezeiro. Em seu experimento, foi observado que o meio MS suplementado com 3 g.L⁻¹ de carvão ativado e 475 µM de 2,4-D resultou em formação de calos quando transferidos num intervalo de 3 a 4 semanas. Após 26 semanas de cultura,

os explantes foram transferidos para o meio de MS contendo 5 g.L⁻¹ de carvão ativado devido a alta oxidação, juntamente com 475, 500 e 550 µM de 2,4-D. Após 52 semanas, os explantes foram transferidos para um novo meio M ou Y3 contendo 400, 450, 500 e 550 µM de 2,4-D. O isolamento de culturas embriogênicas só foi possível em meio de cultura Y3 com 500 µM de 2,4-D. A maturação dos embriões somáticos foi induzida em meio Y3 com 15 µM de ANA e 2 µM de ABA. Após esta etapa, os embriões foram postos para germinarem em meio de MS com metade dos sais e vitaminas do meio MS. Percebeu-se que nos meio de cultura livre de 2,4-D, houve intensa oxidação.

Contudo, resultados contrários foram observados por Mkumbo et al., (1998), que utilizaram os meios de cultura líquidos MS e Y3 para verificar a germinação de embriões zigóticos maduros de *Cocos nucifera*. Foi constatado que o meio Y3 contendo 2.5 g.L⁻¹ de carvão ativado e 45 g.L⁻¹ de sacarose provou ser o mais indicado para a germinação e crescimento dos embriões. Silva (2002) avaliou as taxas de germinação aos 15, 30, 60, 90 e 120 dias e verificou que o meio de cultura Y3 mostrou-se superior ao meio de cultura MS para a germinação de embriões zigóticos de *Cocos nucifera* aos 60, 90 e 120 dias.

Steinmacher (2005), trabalhando com germinação de embriões zigóticos em pupunha, testando o efeito da composição salina utilizada em interação com a presença ou ausência de carvão ativado, não observaram diferenças significativas entre os meios de cultura MS e Y3, mas verificou que o efeito do carvão ativado influenciou na porcentagem de embriões zigóticos de pupunha.

4.3.2. Influência da posição do explante e concentrações de 2,4-D na indução da embriogênese somática em inflorescências femininas imaturas de dendezeiro, var. dura.

Quando se avaliou o efeito da posição do explante em combinação com diferentes concentrações de 2,4-D, em meio de cultura Y3, verificou-se que na média, os melhores resultados para percentual de explantes embriogênicos foram obtidos em meio de cultura com 225 µM de 2,4-D, independentemente da posição do explante na ráquila, após 3 meses de cultivo (TABELA 4). Por outro lado, concentrações superiores a 225 µM de 2,4-D influenciaram negativamente a indução

de explantes com características embriogênicas, possivelmente em virtude de um efeito fitotóxico prejudicial destas concentrações aos explantes.

Teixeira et al. (1994) verificaram que após 5 meses de cultura, a indução de embriões somáticos em inflorescências imaturas de dendezeiro variedade pisifera, ocorreu na concentração de 500 μM de 2,4-D. Trabalhando com pupunha (*Bactris gasipaes*), Steinmacher (2005) observou que a resposta de estruturas florais foi estimulada por auxinas ou pela adição de elevadas concentrações de 2,4-D no meio de cultura.

TABELA 4 - Influência da posição do explante na ráquila (basal e apical) e diferentes concentrações de 2,4-D, em meio de cultura Y3, na indução da embriogênese somática em inflorescências imaturas femininas de dendezeiro, após 90 dias de cultivo. Embrapa 2007

Explantes com características embriogênicas (%)				
Posição do explante na inflorescência	2,4-D (μM)			
	0	225	450	675
Apical	1,1	43,8	35,0	0,0
Basal	0,0	54,3	4,1	0,0
Média (2,4-D)	0,5C	49,0A	19,5B	0,0C

F (A: Posição do explante): 1,708^{ns}

F (B: Concentrações de 2,4-D): 19,341**

F (A x B): 0,142^{ns}

Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

^{ns} não significativo; ** Significativo ($p < 0,01$).

Em dendezeiro, não há trabalhos na literatura que tratam da indução da embriogênese somática utilizando como metodologia diferentes partes e posições dos explantes de inflorescências em meio de cultura associados à diferentes concentrações de auxinas. As inflorescências de palmeiras são bastante utilizadas como explantes na cultura de tecidos devido a grande quantidade de células meristemáticas, elevado grau de determinação e por não representarem dano à planta mãe quando coletadas (TEIXEIRA et al. 1994; VERDEIL et al. 1994).

De acordo com Vasil (1987), em cultura de tecidos de monocotiledôneas é imprescindível que a fonte de explante a ser empregada seja composta de células meristemáticas e o explante que melhor atende à essa premissa parecem ser as inflorescências.

Em seu experimento, Steinmacher (2007b) utilizou três tama (Inf2=8-12 cm e Inf3=12-16 cm), de acordo com o seu grau de desenvolvimento para indução da ES, juntamente com um pré-tratamento com choques auxínicos de 200 μM de 2,4-D que interferiram significativamente no padrão das respostas obtidas. Após o pré-tratamento, os explantes foram colocados em meio de MS contendo 2,4-D, Dicamba e Picloram nas concentrações de 0, 150, 300 e 600 μM . O pré-tratamento aumentou consideravelmente a aquisição de competência embriogênica, sendo que a *Inf1* na concentração de 300 μM de Picloram apresentou a maior média para formação de calos embriogênicos.

Segundo Huo et al., (2006), inflorescências imaturas de híbridos de trigo (*Agropyron cristatum* x *A. desertorum* cv. Hycrest-Mengnong) foram utilizadas como explantes e resultaram na regeneração de plantas a partir de calos quando cultivados em meio MS contendo 2,0 a 3,0 mg.L^{-1} de 2,4-D e posteriormente em meio MS na metade da concentração (MS $\frac{1}{2}$) para diferenciação e enraizamento.

Barro et al. (1999) utilizaram inflorescências e escutelo imaturos de trigo, cevada e triticale na indução da embriogênese somática e regeneração de plantas. Para inflorescências de trigo e triticale, na regeneração dos calos embriogênicos induzidos em meio com 2 mg.L^{-1} de 2,4-D e Picloram, verificou-se que o Picloram foi duas vezes mais eficiente que o 2,4-D. Para o escutelo, as freqüências mais elevadas de embriogênese (85%) e regeneração (50%) foram obtidas em meio contendo 2 mg.L^{-1} de 2,4-D na metade da concentração dos aminoácidos. A capacidade morfogênica de 19 cultivares diferentes do trigo, cevada e triticale foram comparadas, com diferenças entre explantes e genótipos. No trigo, a capacidade embriogênica das inflorescências (média de 92%) foi mais elevada do que o escutelo (média de 62%). Entretanto, a regeneração do escutelo foi mais elevada que as inflorescências (médias de 63% e de 18%, respectivamente).

Desai et al., (2004) utilizou um protocolo de embriogênese somática direta em cana-de-açúcar variedade CoC-671, utilizando segmentos de inflorescências imaturas de 3 – 6 mm. O meio de cultura MS (S1) suplementado com 0,5 mg.L^{-1} de ANA, 2,5 mg.L^{-1} de cinetina e glutamina proporcionou alta freqüência de desenvolvimento dos embriões somáticos, enquanto que o meio MS (S4), adicionado apenas com 1 mg.L^{-1} de TDZ não exibiu respostas embriogênicas. Segundo este autor, as inflorescências possuem a vantagem de não necessitar de

esterilização superficial, além de não liberar compostos fenólicos no início do cultivo *in vitro*.

Vikrant e Rashid, (2001) induziram direta e indiretamente embriões somáticos em inflorescências imaturas de *Paspalum scrobiculatum* L. cv. PSC 1 em meio MS ou N6 suplementados com 2,4-D (4,5; 9,0; 18,0 e 22,5 μM). Não houve diferenças significativas entre os meios de culturas testados, mas a mais alta concentração de 2,4-D (22,5 μM) inibiu a embriogênese direta em meio MS e possibilitou baixas freqüências desta (9%) em meio N6. A freqüência mais elevada de embriogênese direta (34% e 30%, respectivamente) foi possível no meio N6 com 4,5 μM de 2,4-D e no meio MS com 9,0 μM de 2,4-D. Indiretamente, observou-se alta freqüência de embriogênese (75%) com 18,0 μM de 2,4-D em meio de MS e em 73% dos explantes na concentração de 9,0 μM de 2,4-D no meio N6. Este experimento demonstrou que partes diferentes do explante de inflorescência potencializaram a formação de embriões somáticos, especialmente pendúnculo e primórdios florais.

No experimento conduzido por Gomes et al., (2004), eixos embrionários de embriões zigóticos maduros de coqueiro foram seccionados em cinco segmentos (A, B, C, D e E), e cultivados em meio de cultura Y3, suplementado com quatro concentrações de 2,4-D (10^{-4} ; $1,36 \times 10^{-4}$; $3,62 \times 10^{-4}$ e $4,52 \times 10^{-4}$ M) na tentativa de induzir calogênese. As concentrações de 2,4-D que melhor induziram a calogênese foram as de 10^{-4} e $1,36 \times 10^{-4}$ M e os segmentos A (corte na região apical), B (corte logo após o primeiro na região apical) e E (corte região basal) apresentaram maior competência para calogênese.

Verdeil et al. (1994) utilizaram quatro inflorescências imaturas (If1, If2 mais novas) e (If3, If4 mais velhas) de cada um dos híbridos elite de coqueiro testados (PB 111, PB 121 e PB 131), cultivados em meio sólido suplementado com carvão ativado (2%) e 2,4-D nas concentrações de 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 e $3,5 \times 10^{-4}$ M). Após oito meses de cultivos os calos formados foram destacados e novamente colocados em meio de cultura com 2 g.L^{-1} de carvão ativado com baixos níveis de 2,4-D (1,5 ou 2×10^{-4} M), níveis intermediários (3 ou 4×10^{-4} M) e altos níveis (4,5 ou $5,5 \times 10^{-4}$ M). As respostas na formação de calos diferiram entre os genótipos PB 111 e PB 121, bem como as inflorescências If2 e If3 foram mais responsivas que as mais maduras If4 e If5. A aquisição competência embriogênica foi observada quando os calos foram cultivados em altas concentrações de 2,4-D (4,5 ou $5,5 \times 10^{-4}$ M). Após seis meses, os calos embriogênicos foram colocados em novo meio de cultura para

maturação, reduzindo-se a concentração de BAP a cada transferência de meio ($4,5 \times 10^{-4}$ M para 10^{-5}), sendo que para a regeneração foi usado meio sem auxinas e carvão ativado.

Em tamareira, Fki et al, (2003) concluíram que a capacidade de explantes de inflorescências imaturas para formar calos foi bem maior que as folhas imaturas, quando se utilizou 2,4-D no meio de cultura. A frequência da indução de calos em folhas imaturas no meio de cultura MS M2 (10 mg.L^{-1} de 2,4-D) foi de 20% na média, contra 50% para as inflorescências imaturas cultivados no meio MS M1 ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D).

Jogeswar et al., (2007) observaram alta frequência na indução da embriogênese somática em inflorescências imaturas de três genótipos de *Sorghum bicolor* em meio MS suplementado com 2 mg L^{-1} de 2,4-D, adicionado de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de cinetina. Trabalhando com inflorescências imaturas de trigo, Benkirane et al., (2000) obtiveram, após seis semanas de cultivo, 78% de formação de calos embriogênicos induzidos em 2,4-D na concentração de $6,8 \text{ } \mu\text{M}$. Resultados semelhantes foram alcançados por Xiu-Wen et al, (2006) que induziram diretamente calos embriogênicos em inflorescências imaturas de híbridos de trigo em meio de cultura MS contendo 2,0 a $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D.

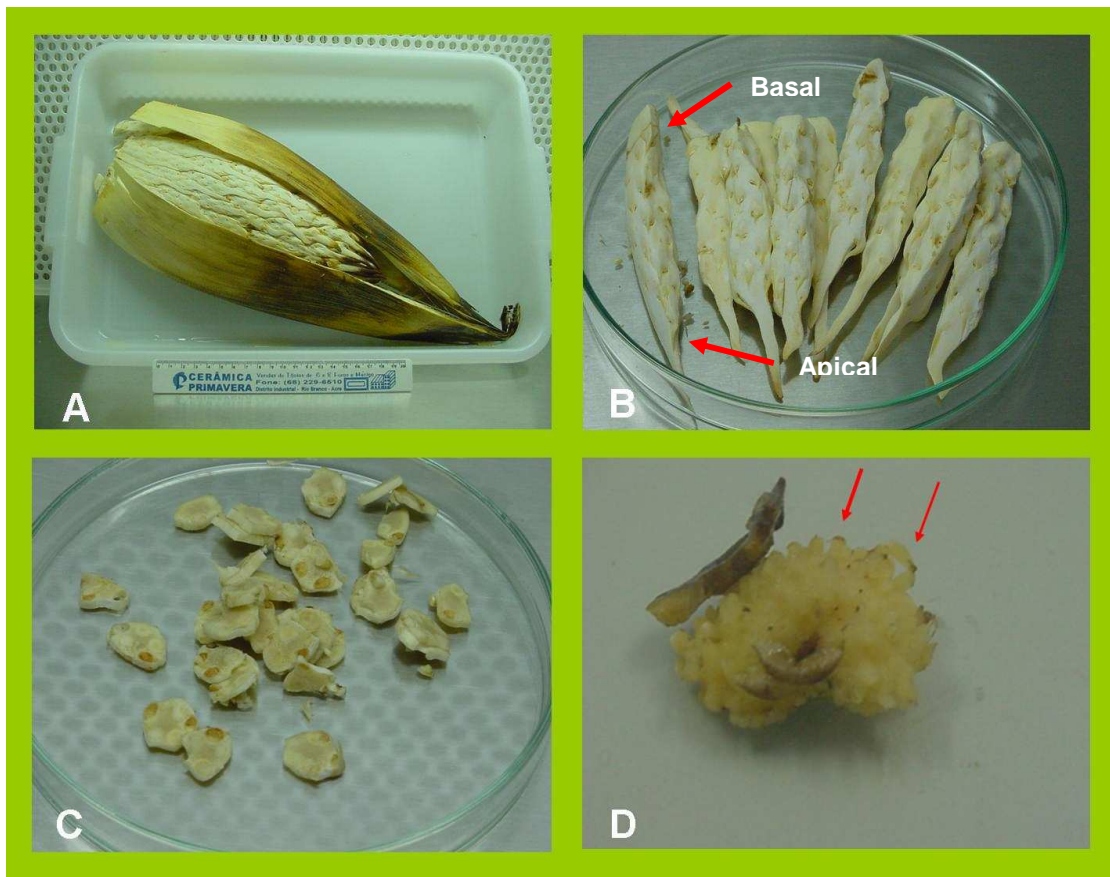


FIGURA 8 - Aspecto geral da inflorescência utilizada como fonte de explantes. (A) inflorescência de dendezeiro dentro da espata; (B) detalhamento dos cortes apical e basal na ráquila de dendezeiro; (C) Segmentos transversais de inflorescências; (D) *cluster* com vários embriões somáticos no estágio torpedão, após 3 meses de cultivo em meio com 2,4-D. Embrapa, 2007

4.3.3 Efeito de substâncias antioxidantes e 2,4-D na indução da embriogênese somática em inflorescências femininas imaturas de dendezeiro, var. dura.

A avaliação da influência dos antioxidantes carvão ativado e PVP-40 no potencial embriogênico dos explantes de inflorescências imaturas de dendezeiro, revelou que em média, 43,7% dos explantes apresentaram reversão do estado floral para o estado vegetativo embriogênico, após 90 dias de cultivo (TABELA 5). Este resultado só foi observado em meio de cultura suplementado com $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ de carvão ativado, independentemente da suplementação ou não do meio com PVP-40. O carvão ativado é um componente que, apesar de freqüentemente ser adicionado aos meios de cultura para adsorver os compostos fenólicos tóxicos aos explantes

(VAN WINKLE et al., 2003), pode promover a adsorção de outros componentes do meio de cultura, como os reguladores de crescimento vegetal (auxinas, citocininas), interferindo no padrão de desenvolvimento dos cultivos (COSTA et al., 2006). Neste sentido, é possível que as respostas dos explantes na mais alta concentração de carvão ativado tenha sido devido à adsorção mais pronunciada do 2,4-D por este antioxidante, reduzindo ou eliminando seus efeitos fitotóxicos, assim como observado nos demais tratamentos, onde a taxa de conversão das inflorescências para o estado vegetativo foi nula, com 100% de morte dos explantes.

Já no caso do PVP, também considerada como antioxidante, a adição desta substância ao meio não promoveu diferenças nas repostas dos explantes florais imaturos de dendezeiro, apesar de Pasqual et al., (2002) terem verificado efeitos benéficos do PVP quando suplementado ao meio de cultura na formação de calos em cafeeiro (*Coffea arabica* L.). Resultados semelhantes ao obtidos em nosso trabalho foram observados por Sáenz et al., (2005), em coqueiro que, testando um protocolo capaz de formar calos em explantes de plúmula na presença de 2,4-D e PVP, verificaram que aproximadamente 43% dos explantes cultivados com 1 μM de 2,4-D formaram calos embriogênicos depois de 4 meses, independentemente da presença de PVP no meio de cultura.

A adsorção de 2,4-D 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 chegam a afirmar que fica indefinida a concentração disponível de 2,4-D 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 mg.L^{-1} 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 500 μM para o pleno e satisfatório desenvolvimento das culturas embriogênicas. Já quando trabalhou com inflorescências imaturas de dendezeiro, Teixeira et al., (1994), verificaram que na concentração de 3,0 g.L^{-1} de carvão ativado em meio de cultura contendo 475 μM de 2,4-D, altas taxas de oxidação dos explantes foram observadas, sendo a concentração de carvão ativado aumentada para 5,0 g.L^{-1} . Posteriormente, perceberam que além do aumento da concentração de carvão ativado conduzir a uma redução na concentração da 2,4-D disponível, o subcultivo

dos explantes em meio sem reguladores de crescimento foi seguido sempre pelo aumento da oxidação, e subcultivos em meios de cultura com concentrações mais elevadas da 2,4-D (500 e 550 μM) conduziram a uma redução substancial no nível de oxidação na ordem de 28% e 37%, respectivamente.

TABELA 5 - Influência do carvão ativado e PVP-40 na resposta de explantes de dendezeiro à indução de características embriogênicas, cultivados com 450 μM de 2,4-D, aos 90 dias de cultivo. Embrapa, 2007

Carvão (g.L^{-1})	Explantes com características embriogênicas (%)			Explantes mortos (%)		
	Com PVP	Sem PVP	Média	Com PVP	Sem PVP	Média
0,0	0,0	0,0	0,0b	100,0	100,0	100,0b
1,5	0,0	0,0	0,0b	100,0	96,2	98,1b
3,0	56,5	30,9	43,7a	0,0	0,0	0,0a
<i>F</i> (A: Com e Sem PVP): 1,043 ^{ns}				1,000 ^{ns}		
<i>F</i> (B: Carvão ativado): 31,565**				240,999**		
<i>F</i> (A x B): 1,043 ^{ns}				1,000 ^{ns}		

Médias seguidas por letras distintas dentro de cada item avaliado, diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. ^{ns} não significativo; ** Significativo ($p < 0,01$).

Alguns autores sugerem que o efeito benéfico do carvão ativado pode ser atribuído a sua capacidade de remoção de inibidores e do excesso de reguladores de crescimento no meio de cultura (FRIDBORG et al., 1978; WEATHERHEAD et al., 1978; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; COSTA et al., 2006; LEDO et al., 2007 b).

Kanchanapoom e Domyoas (1999), notaram diferenciação dos embriões de dendezeiro quando os mesmos foram transferidos para meio de cultura MS livre de reguladores de crescimento e com 0,5 g.L^{-1} de carvão ativado por 5 semanas. Fki et al, (2003) observaram que no subcultivo de células em suspensão de tamareira em meio líquido enriquecido com baixas quantidades de reguladores de crescimento 1 mg.L^{-1} 2,4-D e 300 mg.L^{-1} de carvão ativado, resultaram na diferenciação de grande quantidade de embriões somáticos. Em pupunheira, quando Steinmacher et al. (2007) transferiram calos embriogênicos para um meio de regeneração que continha 2,4-D e carvão ativado, respostas morfológicas distintas foram observadas, incluindo o desenvolvimento assincronizado dos embriões somáticos, além de enraizamento e em alguns casos (20%), da conversão de embriões somáticos em plantas.

Perera et al. (2007) utilizaram ovários de inflorescências imaturas de coqueiro como fonte de explante para a indução da ES. Três diferentes concentrações de 2,4-D (50, 100 e 200 μM) em combinação com três níveis de carvão ativado (0,1; 0,25 e 0,3%) foram testados. Os resultados indicaram claramente que houve diferenças nas respostas quando os explantes foram cultivados em diferentes combinações de 2,4-D e carvão ativado. Percebeu-se que a porcentagem de produção de calos embriogênicos com 100 μM de 2,4-D e 0,1 g.L^{-1} de carvão ativado foi significativamente mais elevada (30%) do que os tratamentos restantes.

Duval et al, (1994) quando transferiram tecidos embriogênicos para meio líquido contendo 2,4-D e carvão ativado, notaram que houve parada da atividade das células embriogênicas nos clusters. Guerra e Handro (1998) concluíram que o estabelecimento de culturas viáveis e seu gradual desenvolvimento advindo de explantes foliares, embriões zigóticos e de inflorescências de *Euterpe* ocorreram somente em meio sólido que continham carvão ativado.

Siqueira e Inoue (1991), trabalhando com explantes provenientes de folhas adultas de *Cocos nucifera* L. em meio de cultura Y3 sólido, observaram que a intensa oxidação dos explantes não foi diminuída com a adição de 0,1% de PVP no meio e que a diminuição da intensidade só foi conseguida quando os explantes foram cultivados em meio líquido, independente da presença ou não de PVP.

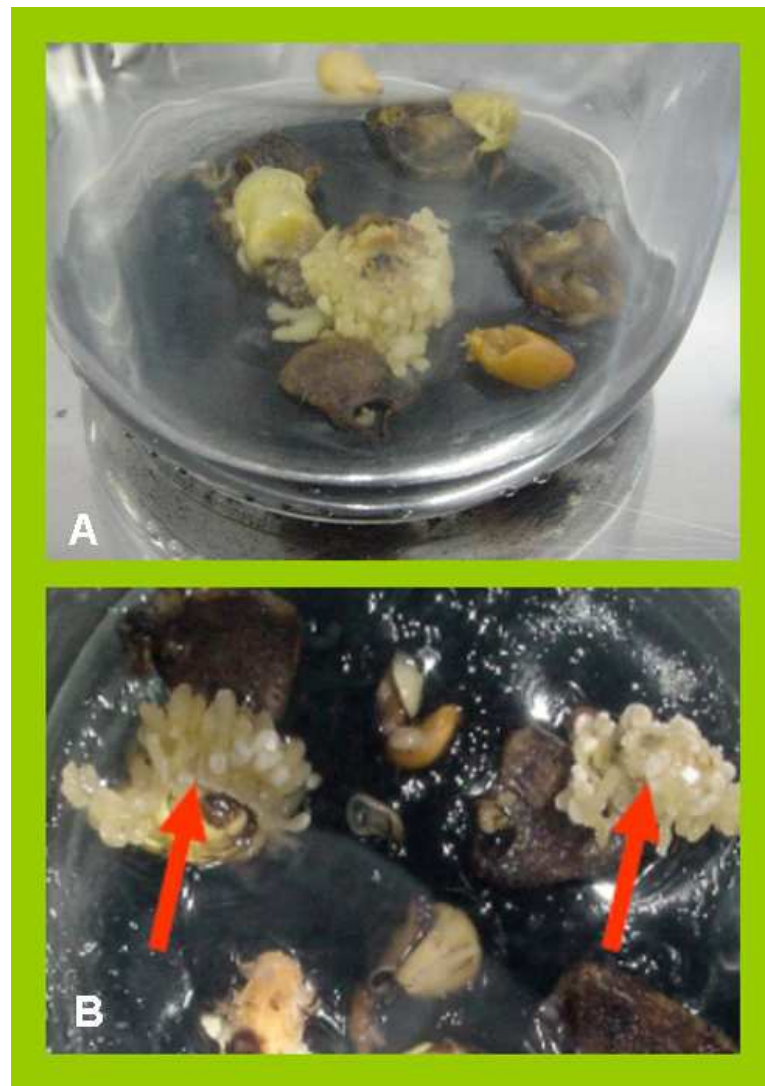


FIGURA 9 - Início da formação de embriões somáticos aos 40 dias de cultivo em meio MS com carvão ativado (A) embriões somáticos após 90 dias (B). Embrapa, 2007

5 CONCLUSÃO

- ✓ A técnica *thin cell layer* (TCL) é uma técnica que permite induzir eficazmente a embriogênese somática e a regeneração de plantas completas em dendezeiro;
- ✓ Explantes localizados na parte basal (a mais próxima do ápice meristemático) de jovens plantas são os que proporcionam as maiores taxas de embriogênese somática e regeneração de plantas em dendezeiro;
- ✓ Folhas imaturas no estado aclorofilado podem ser indicadas como explantes responsivos à embriogênese somática em dendezeiro, desde que altas concentrações de auxinas sejam providas ao meio de cultura de indução da embriogênese somática;
- ✓ Diferentes genótipos de dendezeiro respondem diferentemente à indução da embriogênese somática, mesmo sob condições idênticas de cultivo *in vitro*;
- ✓ Inflorescências femininas imaturas de dendezeiro são facilmente induzidas ao estado vegetativo embriogênico e constituem-se como excelentes fontes alternativas de explantes para a indução da embriogênese somática em dendezeiro;
- ✓ O Picloram é mais eficiente do que o 2,4-D e a auxina mais responsiva e indicada para a indução da embriogênese somática em dendezeiro, independentemente do tipo de explante a ser utilizado;
- ✓ De modo geral, altas concentrações de auxinas são necessárias para induzir a embriogênese somática do dendezeiro, independentemente do tipo de explante utilizado para isso;
- ✓ A composição formada pelos sais e vitaminas do meio de MS proporciona resultados superiores ao meio Y3 na indução da Embriogênese somática em dendezeiro;
- ✓ O Carvão ativado é a o antioxidante mais indicado para impedir a oxidação de diferentes tipos de explantes de dendezeiro e sua presença em todas as etapas do processo é considerado fundamental para o normal desenvolvimento e regeneração de embriões somáticos formados.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As palmeiras de modo geral são consideradas a família de plantas mais difíceis para trabalhos na cultura de tecidos de plantas *in vitro*. Devido a isso, este trabalho relatou alguns protocolos de indução da embriogênese somática onde a fonte e a idade do explante, o tipo de auxina, o genótipo utilizado e o meio de cultura dentre outros fatores podem maximizar as respostas embriogênicas. Neste sentido, novos trabalhos devem ser realizados com o intuito de avaliar outras características, também não menos importantes no estabelecimento de um protocolo de embriogênese somática eficiente para o dendezeiro. Dentre estas características, o tempo de exposição dos explantes em diretos meios de cultura, incluindo meio de consistência líquida, já que em alguns protocolos há relatos que apenas a exposição dos explantes a choques auxínicos por poucos períodos de tempo (12 horas, 1 e 2 dias) já são suficientes para induzir a ES, diminuindo, assim, o tempo de obtenção de novas plantas e a maior ocorrência de variação somaclonal. A utilização de marcadores moleculares visando avaliar a fidelidade genética, possíveis níveis de variação somaclonal, bem como a identificação de genes (genômica) e proteínas (proteômica) chave envolvidos nas diferentes etapas do processo podem ser de fundamental importância para um melhor entendimento da ES e para que os protocolos sejam otimizados. Esta prática é indicativa e específica para os estágios do desenvolvimento dos embriões, podendo fornecer meios mais confiáveis e consistentes da avaliação da qualidade do embrião, do que as descrições morfológicas, sendo capazes de conduzir a uma melhor compreensão do processo global da ES e EZ, como citado anteriormente. Por fim, a otimização dos protocolos de ES e sua eficiência devem ser testados para a produção de mudas em larga escala pelo uso de biorreatores.

Contudo, depois de obtido sucesso com a obtenção de clones por meio de ES direta ou indireta, a aclimatização das plantas é considerada uma das etapas mais críticas, pois a planta é submetida repentinamente ao estado autotrófico para a retomada normal do crescimento. Para tanto, a inoculação de fungos micorrízicos, bem como a formulação de novos substratos para o pleno estabelecimento destas plantas devem ser testados e desenvolvidos, além da evidência necessidade de acompanhamento fitotécnico destas plantas em campo.

REFERÊNCIAS

ABDULLAH, R. A Decade of Oil Palm Gene Manipulation. Where are we now?". 9th International Conference on Agricultural Biotechnology: Ten Years After. **International Consortium on Agricultural Biotechnology Research (ICABR)**, Bangi, Malaysia, 2005.

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

AGROANALYSIS. Biodiesel II. No Brasil, falta execução. Edição número 08. Volume 27, Agosto 2007.

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. e ZUCKERMAN, L. La multiplication végétative *in vitro* du palmier à huile par embryogénese somatique. **Oleagineux**. 36: 113-115, 1981.

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

ALWEE, S. S.; VAN DER LINDEN, C. G.; VAN DER SCHOOT, J.; FOLTER, S. De; ANGENENT, G. C.; CHEAH, S. C. e SMULDER, M. J. M. Characterization of oil palm MADS box genes in relation to the mantled flower abnormality S. s2. **Plant Cell, and Tissue Organ Culture** 85: 331–344, 2006.

ALY, M. A. M.; RATHINASABAPATHI, B. e KELLEY, K.: Somatic embryogenesis in perennial statice *Limonium bellidifolium*, *Plumbaginaceae*. - **Plant Cell, and Tissue Organ Culture** 68: 127-135, 2002.

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

AMARAL, L. **Conservação e propagação *in vitro* de três cultivares híbridas de amarílis**. Dissertação apresentada ao Instituto Agrônômico (IAC), na área de Melhoramento Genético Vegetal, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre. Campinas, 2005.

AMBLARD, P.; NOIRET, J. M.; KOUAMÉ, B.; POTIER, F. e ADON, B. Performances comparées des hybrides interspécifiques et du matériel commercial *E. guineensis*. **Oléagineux, Corps Gras et Lipides**, Montpellier, v. 2, p. 335-340, 1995.

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

ANDRADE, M. W.; LUZ, J. M. Q.; LACERDA, A. S. et al. Micropropagação de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. Allemao). **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n.1, p.174-180, 2000.

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

ASHUBURNER, G. R.; THOMPSON, W. K. e BURCH, J. M. Effect of a-naphthaleneacetic acid and sucrose levels on the development of cultured embryos of coconut. **Plant Cell, and Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v.35, n.2, p.157-163, Sept. 1993.

BARCELOS, E.; AMBLARD, P.; BERTHAUD, J. e SEGUIN, M. Genetic diversity and relationship in American and African oil palm as revealed by RFLP and AFLP molecular markers. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira** 37(8):1105-1114, 2002.

BARRO, F.; MARTIN, A.; LAZZERI, P. A. e BARCELÓ, P. Medium optimization for efficient somatic embryogenesis and plant regeneration from immature inflorescences and immature scutella of elite cultivars of wheat, barley and tritordeum. **Euphytica** 108: 161–167, 1999.

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

BELTRÃO, N. E. M.; **O Agronegócio do Algodão no Brasil**, 1a edição, EMBRAPA, Campina Grande –PB, 1999, V. 1.

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

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L.; LARANJEIRA, F. F.; BERGER, R. D. e HAU, B. Análise temporal do amarelecimento fatal do dendezeiro como ferramenta para elucidar sua etiologia. *Fitopatologia Brasileira* 23: 391–396, 1998.

BERGERT, D. L. **Management strategies of *Elaeis guineensis* (oil palm) in response to localized markets in south eastern Ghana, west Africa.** Master of science in forestry michigan technological university. 2000.

BERRIOS, E. F.; GENTZBITTEL, L.; SERIEYS, H.; ALIBERT, G.; SARRAFI, A. Influence of genotype and gelling agents on in vitro regeneration by organogenesis in sunflower. **Plant Cell, and Tissue Organ Culture.** 59:65–69; 1999.

BERTHOULY, M. e MICHAUX-FERRIERE, N. M. High frequency somatic embryogenesis from *Coffea ca nephora*. **Plant Cell, and Tissue Organ Culture** , Netherlands, v. 44, p. 169-176, 1996.

BERTHOULY, M. e ETIENNE, H. Somatic embryogenesis of Coffee. In: JAIN, S. M.; GUPTA, P. K. e NEWTON, R. J., eds. Somatic embryogenesis in woody plants, vol 5. London: **Kluwer Academic Publishers**; 1999:259–288.

BESSE, I.; VERDEILI, J. L.; DUVAL, Y.; SOTTA, B.; MALDINEY, R. e MIGINIAC, E. Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) Clonal Fidelity: Endogenous Cytokinins and Indoleacetic Acid in Embryogenic Callus Cultures. **Journal of Experimental Botany**, Vol. 43, No. 252, pp. 983-989, July 1992.

BHANSALI, R. R.; DRIVER, J. A. e DURZAN, D. J.: Rapid multiplication of adventitious somatic embryos in peach and nectarine by secondary embryogenesis. - **Plant Cell Reports.** 9: 280-284,1990.

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

BISSING, D. R. Haupt's gelatin adhesive mixed with formalin for affixing paraffin sections to slides. **Stain Techn.**, 49: 116-117, 1974.

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

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

BODDEY, R. M. Green energy from sugar cane. **Chemistry and Industry**, v.12, p.355-358, 1993.

BUI, V. L.; THAO, D. M. N.; GENDY, C.; VIDAL, J. e TRAN THANH VAN, K. Somatic embryogenesis on Thin Cell Layers of a C4 species, *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** **49**: 201–208, 1997.

CALAMAR, A.; KLERK, G. J. de. Effect of sucrose on adventitious root regeneration in apple. **Plant Cell, and Tissue Organ Culture**. v.70, p.207-212, 2002.

CALDAS, L. S.; HARIDASON, P. e FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (Ed.) **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPACNPH, 1990. 443p.

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

CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; STEINER, N.; SANTOS, M. e GUERRA, M. P. Morphohistological analysis and histochemistry of *Feijoa sellowiana* somatic embryogenesis. **Protoplasma**. 224: 33–40. 2004.

CANTRILL, L. C.; OVERALL, R. L. e GOODWIN, P. B. Changes in macromolecular movement accompany organogenesis in thin cell layers of *Torenia fournieri*. **Planta** 222: 933–946. 2005.

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” Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Recursos Florestais com opção em Silvicultura e Manejo Florestal. PIRACICABA. 2006.

CARMAN, J. G. Embryogenic cells in plant tissue cultures: occurrence and behaviour. **In Vitro Cellular Developmental Biology - Plant** 26: 746–753, 1990.

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

CARVALHO, D. C. de. e BIASI, L. A. Organogênese do caquizeiro a partir de segmentos radiculares. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.5, p.1401-1406, set-out, 2004.

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**, Brasília, v.41, n.2, p.293-300, fev. 2006.

CARVALHO, J. M. F. C.; LIMA, M. M. de A.; AIRES, P. S. R.; VIDAL, M. S. e PIMENTEL, N. W. Embriogênese Somática. Campina Grande, PB. MAPA. **Documentos 152**. 2006.

CHAN, J. L.; SAÉNZ, L.; TALAVERA, C.; HORNING, R.; ROBERT, M. e OROPEZA, C. Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports** 17: 515–521, 1998.

CHEONG, E. J. e POOLER, M. R. Factors affecting somatic embryogenesis in *Prunus incisa* cv. February Pink. **Plant Cell Reports**. 22:810–815, 2004.

CID, L. P. B. A propagação *in vitro* de plantas. O que é isso? **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n.19, p.16-21, 2001.

COOKE, T. J.; RACUSEN, R. H. e COHEN, J. D. The role of auxin in plant embryogenesis. **Plant Cell** 5: 1494–1495. 1993.

CORLEY, R. H. V.; BARRETT, J. N. e JONES, L. H. Vegetative propagation of oil palm via tissue culture. **Oil Palm News** 222-7, 1977.

CORLEY, R. H. V.; LEE, C. H.; LAW, L. H.; WONG, C. Y. Abnormal flower development in oil palm clones. **Planter**, vol. 62, p. 233-240. 1986.

CORREIA, D.; GONÇALVES, A. N.; COUTO, H. T. Z.; RIBEIRO, M. C. Efeito do meio de cultura líquido e sólido no crescimento e desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* na multiplicação *in vitro*. **IPEF**, Piracicaba, v. 48/49, p. 107-116, 1995.

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

COSTA, N. M. de S. e ALOUFA, M. A. I. Organogênese direta de *Phoenix dactylifera* L. via pecíolo cotiledonar. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, 36 (3): 195-198, 2006.

CYSNE, J. R. B. **Propagação *in vitro* de *moringa oleifera*** L. Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Agronomia. Fortaleza, 2006.

DE GUZMAN, E. V. e MANUEL, G. C. **Improved root growth in embryo and seedlings cultures of coconut “makapuno” by the incorporation of charcoal in the growth medium.** Rome: FAO, 1975. 6p.

DE MASON, D. A., e B. TISSERAT. 1980. The occurrence and structure of apparently bisexual flowers in the date palm *Phoenix dactylifera* L. (Arecaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society** 81: 283–292.

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

DENCHEV, P.; KUKLIN, A. e SCRAGG. A. Somatic embryo production in bioreactor. **Journal of Biotechnology** 26: 99-109. 1992.

DESAI, N. S.; SUPRASANNA, P. e BAPAT, V. A. Simple and reproducible protocol for direct somatic embryogenesis from cultured immature inflorescence segments of sugarcane (*Saccharum* spp.). **Current Science**, VOL. 87, NO. 6, 25 SEPTEMBER 2004.

DODEMAN, V. L.; DUCREUX, G. e KREIS, M. 1997. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. **Journal of Experimental Botany**. 48 (313): 1493-1509.

DONATO, V. M. T.; ANDRADE, S. A. G. de; CÂMARA, T. R. Variedades de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* com diferentes fontes de nitrogênio **Scientia Agrícola**. Suplemento. v.56, n.4, p.1289-1292, out./dez. 1999.

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**. Turrialba, p.612-642, 1991.

DUDITS, D.; GYORGYEY, J.; BOGRE, L. e BAKO, L. **Molecular biology of somatic embryogenesis**. In: THORPE T. A. (ed.), *In Vitro Embryogenesis in Plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 276–308. 1995.

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

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

EBERHARD, S.; DOUBRAVA, N.; MARFA, V.; MOHNEN, D.; SOUTHWICK, A.; DARVILL, A. e ALBERSHEIM, P. Pectic Cell Wall Fragments Regulate Tobacco Thin-Cell-Layer Explant Morphogenesis. **The Plant Cell**, Vol. 1, 747-755, August 1989.

EBERT, A e TAYLOR, H. F. Assessment of the changes of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentrations in plant tissue culture media in the presence of activated charcoal. **Plant Cell, and Tissue Organ Culture** 20:165–172, 1990.

EEUWENS, C.J. e BLAKE, J. **Acta Horticulturae**. 78, 277-286,1977.

EEUWENS, C. J. Effects of organic nutrients and hormones on growth and development of tissue explants from coconut (*Cocos nucifera* L.) and date (*Phoenix dactylifera*) palms cultured in vitro. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 42, p. 73-78, 1978.

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

EKE, R.; AKOMEAH, P e ASEMOTA, O. Somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) from apical meristem tissues from ‘zebia’ and ‘loko’ landraces Chukwuemeka. **African Journal of Biotechnology** Vol. 4 (3), pp. 244-246, March 2005.

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

ENGELMANN, F. e BATUGAL, P. A. Background on the development and implementation of the coconut embryo in vitro culture project. In: ENGELMANN, F.;

BATUGAL, P.A.; OLIVER, J. (Ed.). **Coconut embryo in vitro culture**. Malaysia: IPGRI-APO, 2002. v.2. p.1-4.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. **Mineral nutrition of plants: principles and perspectives**. Sinauer Associates; 2nd edition, Sunderland, MA. 2005.

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

ETIENNE, H.; BARRY-ETIENNE, D.; VASQUÉZ, N. e BERTHOULY, M. Aportes de la biotecnología al mejoramiento genético del café. EN: **Desafíos de la cafcultura en Centroamérica**. BERTRAND, B. and RAPIDEL, B. eds. IICA.. San José, Costa Rica. pp 457-495. 1999.

FALASCA, G.; ZAGHI, D.; POSSENTI, M. e ALTAMURA, M. M. Adventitious root formation in *Arabidopsis thaliana* thin cell layers. **Plant Cell Reports** 23:17–25, 2004.

FALCONE, A. M. e MARCHESCHI, G. L. Embriogenini somatica “in vitro”da tessuti de palma de datters (*Phoenix dactylifera* L.) resultati peliminari. **Revista de Agricultura Subtropical e Tropicale**. Florence, v.82. n. 1-2. p. 379-389, 1988.

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

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

FERRARI, R. A.; OLIVEIRA, V. S.; SCABIO, A. Biodiesel de soja – Taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia. **Química Nova**, V. 28, 2005.

FERREIRA, M. das G. R.; CÁRDENAS, F. E. N.; CARVALHO, C. H. S. de.; CARNEIRO, A. A. e DAMIÃO FILHO, C. F. Desenvolvimento de calos em explantes de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Schum.) em função da concentração de auxinas e do meio líquido. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 23, n. 3, p. 473-476, dezembro 2001.

FIGUEIRA, E. R.; LUZ, J. M. Q.; SILVA, A. S.; LONDE, L. N. SANTANA, D. G. e PASQUAL, M. Efeito de pré-tratamentos em botões florais e influência do 2,4-D no cultivo *in vitro* de anteras de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Biosci, J.** Uberlândia, V.19, n.2, p-49-55. 2003.

FIGUEIREDO, M. A. de PASQUAL, M.; ARAUJO, A. G. de; JUNQUEIRA, K. P.; SANTOS, F. C. e RODRIGUES, V. A. Fontes de potássio no crescimento *in vitro* de plantas de orquídea *Cattleya loddigesii*. **Ciencia Rural.** vol.38 no.1 Santa Maria Jan./Feb. 2008.

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.** 34:125–132, 1993.

FIORE, S.; PASQUALE, F. de; CARIMI, F. e SAJEVA, M. Effect of 2,4-D and 4-CPPU on somatic embryogenesis from stigma and style transverse thin cell layers of *Citrus*. **Plant Cell, and Tissue Organ Culture** 68: 57–63, 2002.

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

FLORES, R.; NICOLOSO, F. T. e VASCONCELLOS, N. J. S. Indução de calos e aspectos morfogênicos de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken **Revista Brasileira Plantas Medicinai.** Botucatu, v.8, n.3, p.89-95, 2006.

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

FRIDBORG, G. et al. The effect of activated charcoal on tissue cultures: adsorption of metabolites inhibiting morphogenesis. **Physiologia Plantarum,** Copenhagen, v.43, n.2, p. 104-106, Fevereiro, 1978.

FUENTES, G.; TALAVERA, C.; OROPEZA, C.; DESJARDINS, Y. e SANTAMARIA, J. M. Exogenous sucrose can decrease *in vitro* photosynthesis but improve field survival and growth of coconut (*cocos nucifera* L.) *in vitro* plantlets. **In Vitro Cellular Developmental Biology—Plant** 41:69–76, January–February 2005.

GAIRI A. e RASHID A. Direct differentiation of somatic embryos on different regions of intact seedlings of *Azadirachta* in response to thidiazuron. **Journal Plant Physiology.** 161:1073–1077. 2004a.

GAIRI A. e RASHID A. TDZ-induced somatic embryogenesis in non-responsive caryopses of rice using a short treatment with 2,4-D. **Plant Cell, and Tissue Organ Culture**. 76: 29–33. 2004b.

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

GALLO-MEAGHER, M. e GREEN, J. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of saw palmetto, an important landscape and medicinal plant. **Plant Cell, and Tissue Organ Culture**. 68: 253-256. 2002.

GANESAN, M.; CHANDRASEKAR, R.; KUMARI RANJITHA, B. D.; e N. JAYABALAN. Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Abelmoschus esculentus* through suspension culture **Biologia Plantarum** 51 (3): 414-420, 2007.

GARIN, E., BERNIER-CARDOU, M., ISABEL, N., KLIMASZEWSKA, K. e PLOURDRE, A., Effect of sugars, amino acids, and culture technique on maturation of somatic embryos of *Pinus strobus* on medium with two gellan gum concentration. **Plant Cell, and Tissue Organ Culture** 62, 27–37, 2000.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. Part 1: The technology. Second edition. Exegetics Ltd. England. 570 p. 1993.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. Part 2: In Practice. Second edition. Edington: Exegetics Limited, 1361p. 1996.

GIRIDHAR, P.; INDU, E. P.; VINOD, K.; CHANDRASHEKAR, A. and RAVISHANKAR, G. A. Direct somatic embryogenesis from *Coffea arabica* L. and *Coffea canephora* P ex Fr. under the influence of ethylene action inhibitor-silver nitrate. **Acta Physiologiae Plantarum** Vol. 26. No. 3. 2004: 299-305.

GHNAYA, A. B.; CHARLES, G. e BRANCHARD, M. Rapid shoot regeneration from thin cell layer explants excised from petioles and hypocotyls in four cultivars of *Brassica napus* L. **Plant Cell, and Tissue Organ Culture** 92:25–30, 2008.

GÓMEZ, M. A. Biotecnología aplicada a mejora de pelargonium. TESIS DOCTORAL, Madrid, 2002. **UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**.

GOMES, K. K. P.; OLIVEIRA, V. C. de; LEDO, A. da S.; ÂNGELO, P. C. da S. e COSTA, J. L. da S. Indução de calo a partir de eixo embrionário de coqueiro (*Cocos nucifera* L.). **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 26, n. 1, p. 124-126, Abril 2004.

GONZÁLES, J. M.; FRIERO, E. e JOUVE, N. Influence of genotype and culture medium on callus formation and plant regeneration from immature embryos of *Triticum turgidum* Desf. Cultivars. **Plant Breeding** 120, 513-517 (2001).

GRATTAPAGLIA, D. e MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: Ministério da Agricultura, p.99-170, 1998.

GROLL, J.; MYCOCK, D. J.; GRAY, V. M. e LAMINSKI, S. Secondary somatic embryogenesis of cassava on picloram supplemented media. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 65: 201–210, 2001.

GUEDES, R. S.; MACIEL, S. A. e PEREIRA, J. E. S. 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. e 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, 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: Brasília, v. 2, p. 533-568, 1999.

GUERRA, M. P.; DAL VESCO, L. L. DUCROQUET, J. P. H. J. NODARI, R. O. e REIS, M. S. Somatic embryogenesis in goiabeira serrana: genotype response, auxinic shock and synthetic seeds. **Revista Brasileira Fisiologia Vegetal**. 13(2):117-128, 2001.

GUO, Y.; BAI, J. e ZHANG, Z. Plant regeneration from embryogenic suspension-derived protoplasts of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). **Plant Cell, and Tissue Organ Culture** 89:151–157, 2007.

GUPTA, P. K.; TIMMIS, R. e CARLSON, W. C. Somatic embryogenesis: a possible tool for large-scale propagation of forestry species. In: SOH, W. Y.; LIU, J. R. e 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**. 28: 74-81, 1978.

HAENSCH, K. T. Influence of 2,4-D and BAP on callus growth and the subsequent regeneration of somatic embryos in long-term cultures of *Pelargonium x domesticum* cv. Madame Loyal. **Electronic Journal of Biotechnology** ISSN: 0717-3458. Vol.10 No.1, Issue of January 15, 2007.

HANKOUA, B. B.; NG, S.Y.C.; FAWOLE, I.; PUONTI-KAERLAS, J.; PILLAY, M. e DIXON, A.G.O. Regeneration of a wide range of African cassava genotypes via shoot organogenesis from cotyledons of maturing somatic embryos and conformity of the field-established regenerants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** (2005) 82: 221–231

HABERLANDT, G. Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. Sitzungsber. Acad. Wiss. Wien. **Math. Naturwiss. Kl., Abt. 1**. 111, 69–92, 1902.

HARDON, J. J. e TAN, G. Y. Interspecific hybrids in the *Elaeis*. I. Crossability, cytogenetics and fertility of F1 hybrids of *E. guineensis* x *E. oleifera*. **Euphytica**, Dordrecht, v. 18, p. 372-379, 1969.

HARDON, J. J.; RAO, V. e RAJANAIDU, N. A review of oil palm breeding. In: Russel GE (ed) **Progress in plant breeding**. Butterworths, London, pp 139–163, 1985.

HE, G. Y. e LAZZERI, P.A. Improvement of somatic embryogenesis and plant regeneration from durum wheat (*Triticum turgidum* var. *durum* Desf.) scutellum and inflorescence cultures. **Euphytica** 119: 369–376, 2001.

HERNANDEZ, L.; CELESTINO, C. e TORIBIO, M. Vegetative propagation of *Quercus suber* L. by somatic embryogenesis. - **Plant Cell Reports**. 21: 759-764, 2003.

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

HU, C. Y. e 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.

HUANG, X.; NABIPOUR, A.; GENTZBITTEL, L. e SARRAFI, A. Somatic embryogenesis from thin epidermal layers in sunflower and chromosomal regions controlling the response. **Plant Science** 173. 247–252, 2007.

HUO, X-W.; WE, J-H.; XU, C-B.; MI, F-G. e YUN, J-F. Plant Regeneration from Immature Inflorescence Culture and Genetic Transformation of Wheatgrass (*Agropyron cristatum* x *A. desertorum* cv. Hycrest-Mengnong) **Agricultural Sciences in China**. 5(9): 648-654, 2006.

HUONG, L. T. L.; BAIOTTO, M.; HUY, B. P.; MEZZETTI, B.; SANTILLOCCHI, R., e ROSATI, P. Somatic embryogenesis in canary Island date palm. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 56, 1–7. 1999.

HYNDMAN, S. E.; HASEGAWA, P. M. e BRESSAN, R. A. The role of sucrose and nitrogen in adventitious root formation on cultured rose shoots. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 1 (4): 229-238, 1982.

IANTCHEVA, A.; VLAHOVA, M.; ATANASSOVA, B. and ATANASSOV, A. Plant regeneration via direct organogenesis and somatic embryogenesis of two new bulgarian spray carnation cultivars. **Biotechnol. & Biotechnol.** 2005.

IKEDA-IWAI, M.; UMEHARA, M.; SATOH, S. e KAMADA, H. Stress-induced somatic embryogenesis in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**. 34, 107-114, 2003.

JAIN, M.; CHENGALRAYAN, K.; GALLO-MEAGHER, M. and MISLEVY, P. Embryogenic callus induction and regeneration in a pentaploid hybrid bermudagrass cv. tifton 85. **Crop Science**, VOL. 45, MAY–JUNE 2005.

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

JALIGOT, E.; BEULÉ, T. e RIVAL, A. Methylation-sensitive RFLPs: characterisation of two oil palm markers showing somaclonal variation-associated polymorphism. **Theoretical and Applied Genetics** 104:1263–1269. 2002.

JIMÉNEZ, V. M. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on to the role of endogenous hormones. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. 13:196–223, 2001.

JIMÉNEZ V. M., GUEVARA E., HERRERA J. e BANGERTH F. Evolution of endogenous hormone concentration in embryogenic cultures of carrot during early expression of somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**. 23: 567–572. 2005.

JOGESWAR, G.; RANADHEER, D.; ANJALIAH, V.; e KISHOR, P. B. K. High frequency somatic embryogenesis and regeneration in different genotypes of *Sorghum bicolor* (L.) Moench from immature inflorescence explants. **In Vitro Cellular Developmental Biology—Plant** 43:159–166, 2007.

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

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

KALTNER, F. A Expansão da Agro-Energia e seus Impactos sobre os Ecossistemas Brasileiros. **O BIODIESEL NO BRASIL**. Rio de Janeiro, 26-27 de março de 2007.

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

KARAMI, O.; ALI DELJOU, A.; ESNA-ASHARI, M.; B, OSTAD-AHMADI, P. Effect of sucrose concentrations on somatic embryogenesis in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) **Scientia Horticulturae** 110. 340–344. 2006.

KARUN, A.; SIRIL, E. A.; RADHA, E. e PARTHASARATHY, V. A. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from leaf and inflorescence explants of arecanut (*Areca catechu* L.). **Current Science**, VOL. 86, NO. 12, 25 JUNE 2004.

KERBAUY, G. B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. E. e BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, SPI; EMBRAPA, CNPH, 1999. v.2. p. 519-531.

KEVERS, C.; FRANCK, T.; STRASSER, R.J.; DOMMES, J. e GASPER, T. Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress induced change of physiological state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 77: 181- 191, 2004.

KONAN, E. K.; KOUADIO, J. Y.; FLORI, A.; DURAND-GASSELIN, T. e RIVAL A. Evidence for an interaction effect during in vitro rooting of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryo-derived plantlets. **In Vitro Cellular Developmental Biology—Plant** 43:456–466, 2007.

KOORNNEEF, M.; BADE, J.; HANHART, C.; HORSMAN, K.; SCHEL, J.; SOPPE, W.; VEKERK, R. e ZABEL, P. Characterization and mapping of a gene controlling shoot regeneration in tomato. **Plant Journal**, 3: 131-141, 1993.

KRIKORIAN, A. D. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. In: ROCA, W. M. e MROGINSKY, L. A. (Eds.). **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali: CIAT, p. 41-77. 1991.

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

LAKSHMANAN, P.; GEIJSKES, R. J.; WANG, L.; ELLIOTT, A.; GROF, C. P. L.; BERDING, N. e SMITH, G. R. Developmental and hormonal regulation of direct shoot organogenesis and somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum* spp. interspecific hybrids) leaf culture. **Plant Cell Reports**. 25: 1007–1015, 2006.

LANGHANSOVÁ, L.; KONRÁDOVÁ, H. e VANEČK, T. Polyethylene glycol and abscisic acid improve maturation and regeneration of *Panax ginseng* somatic embryos. **Plant Cell Reports**. 22:725–730, 2004.

LARA, M. A. C. e MONTER, A. V. Potencial osmótico del medio de cultivo com diferentes componentes para la propagación in vitro. **Revista Fitotecnia Mexicana**. Abril-junio. Vol. 25, número 002, Chapingo, México. P 213-217, 2002.

LE GUEN, V.; AMBLARD, P.; OMORE, A.; KOUTOU, A. e MEUNIER, J. Le programme hybride interspécifique *Elaeis oleifera* x *Elaeis guineensis* de l'IRHO. **Oléagineux** 46: 479–487, 1991.

LEDO, A. S.; LAMEIRA, O. A. e MENEZES, I. C. Embriogênese somática e regeneração de plantas em açaizeiro. Rio Branco: Embrapa Acre, 22p (**Boletim de Pesquisa**, 34). 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** vol.24 nº.3 Jaboticabal Dec. 2002b.

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

LEDO, A. da S.; TUPINAMBÁ, E. A. e 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**, ISSN 1678-1961, 2007.

LEDO, A. da S.; SECA, G. S. V.; BARBOZA, S. B. S. C. e JUNIOR, J. F. da S. Initial growth of mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) in different culture medium of *in vitro* germination. **Ciência agrotecnologia**. Lavras, v. 31, n. 4, p. xx -xx, jul./ago., 2007.

LEGUILLON, S.; CHARLES, G. e BRANCHARD, M. Plant regeneration from thin cell layers in *Spinacia oleracea*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** **74**: 257–265, 2003.

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

LEMO, E. E. P. de; FERREIRA, M. de S.; ALENCAR, L. M. C. de; NETO, C. E. R. e ALBUQUERQUE, M. M. de. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 10, p. 1359-1364, out. 2002

LERCARI B.; MOSCATELLI, H. A.; GHIRARDI, E; NICEFORO, R. e BERTRAM, L. Photomorphogenic control of shoot regeneration from etiolated and lightgrown hypocotyls of tomato. **Plant Science**. 140:53-64, 1999.

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

LIAO, Z.; CHEN, M.; TAN, F.; SUN, X. e TANG, K. Micropropagation of endangered Chinese aloe. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** **76**: 83–86, 2004.

LIN, C.S.; LIANG, C. J.; HSAIO, H. W.; LIN, M. J. e CHANG, W. C. In vitro flowering of green and albino *Dendrocalamus latiflorus*. **New Forests** 34:177–186, 2007.

LITZ, R. E. Organogenesis and somatic embryogenesis. **Acta Horticulturae** 336: 199-205. 1993.

LITZ, R. E.; MOON, P. A.; MATHEWS, H.; JAYASANKAR, S.; MONSALUD, M. J. e PLIEGO-ALFARO, F. **Somatic embryogenesis in mango (*Mangifera indica* L.)**. In Somatic embryogenesis in woody plants, Angiosperms, (S.M. Jain, P.K. Gupta & R.J. Newton, eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, v.2, p.341-357. 1995.

LUBIS. A.; GINTING, U. e FATMAWATI, G. Yield and vegetative characteristics of oil palm clone planting material. Reprint A9; 1993 **PIPOC PORIM** Int. Palm Oil Congress update and vision, 20-25 September 1993; Kuala Lumpur.

MA, G. e XU, Q.: Induction of somatic embryogenesis and adventitious shoots from immature leaves of cassava. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 70: 281-288, 2002.

MACIEL, A. L. de R.; PASQUAL, M.; PEREIRA, A. R.; REZENDE, J. C. de; SILVA, A. B. e DUTRA, L. F. Embriogênese somática indireta em explantes foliares de *Coffea arabica* L. Cv. Obatã. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 1, p. 107-116, 2003.

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

MAHESHWARI, S. C.; RASHID, A. e TYAGI, A. K. Haploids from pollen grain - Retrospect and Prospect. **America Journal of Botany**. 69 (5): 865-879, 1982.

MAHESWARAN, G. e WILLIAMS, E.G. Origin and development of embryoids formed directly on immature embryo of *Trifolium repens* *in vitro*. **Annals of Botany**. v. 56, p-619-630, 1985.

MALABADI, R. B. e VAN STADEN, J. Role of antioxidants and amino acids on somatic embryogenesis of *Pinus patula*. **In Vitro Cellular Developmental Biology—Plant** 41: 181–186, March–April 2005.

MALDANER, J.; NICOLOSO, F. T.; SANTOS, E. S. dos; FLORES, R.; SKREBSKY, E. C. Sacarose e nitrogênio na multiplicação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 4, p.1201-1206, jul./ago. 2006.

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**. 344p, 1994.

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

MARTIN, K. P. e MADASSERY, J. Direct and indirect somatic embryogenesis on cotyledon explants of *Quassia amara* L., an antileukaemic drug plant. **In Vitro Cellular Developmental Biology—Plant** 41:54–57, January–February 2005.

MARUYAMA, E.; HOSOI, Y. e 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**. Volume 43, Issue 1, February 2007.

MEHROTRA, S.; GOEL, M. K.; KUKREJA, A. K. e NATH, B. Efficiency of liquid culture systems over conventional micropropagation: A progress towards commercialization MISHRA. **African Journal of Biotechnology** Vol. 6 (13), pp. 1484-1492, 4 July, 2007.

MELO, B. de; PINTO, J. E. B. P.; LUZ, J. M. Q.; PEIXOTO, J. R. e JULIATTI, F. C. Diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e desenvolvimento das plântulas na cultura *in vitro* de embriões da guarirobeira [*Syagrus oleracea* (mart.) becc.]. **Ciência Agrotecnologia**. Lavras, v.25, n.6, p.1301-1306, nov./dez., 2001.

MENGEL, K.; KIRKBY, E. A. **Principles of plant nutrition**. 2.ed. Bern, International Potash Institute, 593p, 1979.

MERKLE, S. A. Strategies for dealing with limitations of somatic embryogenesis in hardwood trees. **Plant Tissue Culture Biotechnology** 1: 112-121, 1995.

MIRAGAYA, J. C. G. Biodiesel: tendências no mundo e no Brasil. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte: EPAMIG, v. 26, n. 229, p. 7-13, 2005.

MKUMBO, K. E.; HOMNUNG, R. K. W.; TOPPER, C. P.; CALIGARI, P. D. S.; KULLAYA - AK; SHOMARI, S. H.; KASUGA, L. J.; MASAWA, P. A. L. e MPUNAMI, A. A. Status of research on coconut embryo culture and acclimatization techniques in Tanzania. In: INTERNATIONAL CASHEW AND COCONUT CONFERENCE: trees for life - the key to development, Dar es Salaam, 1998. **Proceedings**. Tanzania: BioHybrids International, 1998. p. 358-361.

MONACO, L. C.; SÖNDAHL, M. R.; CARVALHO, A. et al. Applications of tissue culture in the improvement of coffee. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y.P.S. **Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture**. Berlin: Springer-Verlag, 1977. p.109-126.

MONTEIRO, A. C. B. Cultivo *in vitro* de três espécies do gênero *Passiflora*. Piracicaba, 2000. 82 p. **Dissertação** (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

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

MORCILLO, F.; ABERLENC-BERTOSSI, F.; NOIROT, M.; HAMON, S. e DUVAL, Y. Differential effects of glutamine and arginine on 7S globulin accumulation during the maturation of oil palm somatic embryos. **Plant Cell Reports**. 18: 868–872, 1999.

MORCILLO, F.; GALLARD, A.; PILLOT, M.; JOUANNIC, S.; ABERLENC-BERTOSSI, F.; COLLIN, M.; VERDEIL, J. L. e TREGGAR, J. W. *EgAP2-1*, an *AINTEGUMENTA-like (AIL)* gene expressed in meristematic and proliferating tissues of embryos in oil palm. **Planta** 226:1353–1362 , 2007.

MORETZSOHN, M. C.; NUNES, C. D. M.; FERREIRA, M. E. e GRATTAPAGLIA, D. RAPD linkage mapping of the shell thickness locus in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Theor Appl Genet** 100:63–70, 2000.

MORETZSOHN, M. C.; FERREIRA, M. A.; AMARAL, Z. P. S.; COELHO, P. J. A.; GRATTAPAGLIA, D.; FERREIRA, M. E. Genetic diversity of Brazilian oil palm (*Elaeis oleifera* H.B.K.) germplasm collected in the Amazon Forest. **Euphytica**, Wageningen, v. 124, n. 1, p. 35-45, 2002.

MOTOIKE, S. Y.; SARAIVA, E. S.; VENTRELLA, M. C.; SILVA, C. V. e SALOMAO, L. C. C. Somatic embryogenesis of *Myrciaria aureana* (Brazilian grape tree). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 89:75–81, 2007.

MOURA, E. F. **Embriogênese somática em macaúba: indução, regeneração e caracterização anatômica**. TESE apresentada à Universidade Federal de Viçosa, Minas gerais. 2007.

MPOBS (Malaysian Palm Oil Board Statistics). **Export of palm oil by destination 2006**. Disponível em <http://www.e-kilangmpob.com.my/stat/web_report1.php?val=200635> Acesso em: 02 de janeiro de 2008, 10:40.

MPOBS (Malaysian Palm Oil Board Statistics) Disponível em: <<http://econ.mpob.gov.my/economy/overview07.htm>> Acesso em: 28 de janeiro de 2008, 09:22.

MURASHIGE, T. e SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plant**. 15: 473–497; 1962.

MURASHIGE, T. e SKOOG, F. Plant propagation through tissue cultures. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.25, p.153-166, 1974.

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

NATH, S. e BURAGOHAİN, A. K. Establishment of callus and cell suspension cultures of *Centella asiatica*. - **Biology Plant**. 49: 411-413, 2005.

NEGRÃO, M. O. **Estrutura genética de populações naturais de *Syagrus romanzoffiana* (Arecaceae) do continente (Serra do Mar, S.P) e da Ilha dos Alcatrazes**. 1999. 78 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.

NHUT, D. T.; LE, B. V. e VAN, K. T. T. Manipulation of the morphogenetic pathways of *Lilium longiflorum* transverse thin cell layer explants by auxin and cytokinin. **In Vitro Cellular Developmental Biology - Plant** 37:44-49; 2001.

NICOLOSO, F. T. et al. Efeito de concentrações e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen) cultivadas *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.27, n.1, p.84-90, 2003.

NUGENT, G. et al. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus globules*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v.67, p. 83-88, 2001.

NUNES, R. F. M. **Propagação gâmica in vitro e embriogênese somática em tamareira (*Phoenix dactilifera* L.)**. 1998. 93f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1998.

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

PANAIA, M.; SENARATNA, T.; DIXON, K. W. e SIVASITHAMPARAM, K. The role of cytokinins and thidiazuron in the stimulation of somatic embryogenesis in key members of the Restionaceae. **Australian Journal Botany**. 52: 257–267. 2004.

PANNETIER, C. ARTHUIS, P. e LIEVOUX D. Néof ormation de jeunes plantes d'*Elaeis guineensis* à partir de cals primaires obtenus sur fragments foliaires cultivés in vitro. **Oléagineux** 36:119–122. 1981.

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

PARANJOTHY, K. Research strategies and advances in oil palm cell and tissue culture. **Elaeis**. 1 (2): 119-125, 1989.

PARANJOTHY, K.; ROHANI, O.; TARMIZI, A. H.; TAN, C. S. e TAN, C. C. Current status and strategies of oil palm research. In Proceedings of the 1989 Palm Oil Development Conference, 5-9 September 1989. **Palm Oil Research Institute of Malaysia, Bangi**. p. 109-125. 1989.

PARANJOTHY, K.; OTHMAN, R.; TAN, C. C.; WONG, G. e SOH, A. C. **Incidence of abnormalities in relation to in vitro protocols**. In: RAO, V.; HENSON, I. E. e RAJANAIDU, N. (eds) Recent developments in oil palm tissue culture and biotechnology. Palm Oil Research Institute of Malaysia (PORIM), Kuala Lumpur, pp 70–85. (Proceedings of the 1993 ISOPB International Symposium on Recent Developments in Oil Palm Tissue Culture and Biotechnology, Kuala Lumpur, 24–25 September 1993), 1995.

PASQUAL, M. **Textos acadêmicos**: Meios de cultura. Lavras: FAEPE/UFLA, 127 p. 2001a.

PASQUAL, M.; MACIEL, A. L. R.; CAMPOS, K. P.; SANTOS, E. C. e CAMPOS, R. J. C. Indução de calos em anteras de café (*Coffea arabica* L.) cultivadas *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.26, n.1, p.71-76, jan./fev., 2002.

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

PEREIRA, A. R.; CARVALHO, S. P. de; PASQUAL, M. e SANTOS, F. C. Embriogênese somática direta em explantes foliares de *coffea arabica* l. cv. acaia cerrado: efeito de cinetina e ácido giberélico. **Ciência Agrotecnologia**. Lavras, v. 31, n. 2, p. 332-336, mar./abr., 2007.

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**. Pelotas, 1999. 93p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Agronomia "Eliseu Maciel", Universidade Federal de Pelotas.

PEREIRA, J. E. S. e 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.

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, jan.-mar. 2005.

PEREIRA, J. E. S.; MACIEL, S. de A. e 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**, 2007. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*. v. 1, p. 849-852.

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

PRAKASH, S.; HOQUE T, M. e BRINKS, I. **Culture media and containers**. In: FAO/IAEA. Low cost options for tissue culture technology in developing countries. **Plant Breeding and Genetics Section International Atomic Energy Agency**. 2004.

PTAK, A. e BACH, A. Somatic embryogenesis in tulip (*Tulipa gesneriana* L.) flower stem cultures. **In Vitro Cellular Developmental Biology—Plant** 43:35–39, 2007.

PULLMAN, G. S.; JOHNSON, S.; VAN TASSEL, S. e ZHANG, Y. Somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda*) and Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*): improving culture initiation and growth with MES pH buffer, biotin, and folic acid. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 80: 91–103, 2005.

QUIROZ-FIGUEROA, F. R.; FUENTES-CERDA, C. F. J.; ROJAS-HERRERA, R. e LOYOLA-VARGAS, V. M. Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea Arabica*. **Plant Cell Reports** 20:1141–1149. 2002.

RABÉCHAULT, H. e MARTIN, J. P. Multiplication végétative du palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) l'áide de cultures de tissus foliaires. **Comptes Rendus des Sceances de l'Academie des Sciences. Série D: Sciences Naturelles**. Paris, France, v.283, p. 1735-1737, 1976.

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

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

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

RAMAGE, C. M. e WILLIAMS, R. R. Mineral nutrition and plant morphogenesis. **In Vitro Cellular Developmental Biology — Plant** 38: 116–124, March–April 2002.

RENARD, J. L.; NOIRET, J. M. e MEUNIER, J. Sources and ranges of resistance to *Fusarium* wilt in the oil palms *Elaeis guineensis* and *Elaeis melanococca*. **Oléagineux** 35: 387–392. 1980.

RENYING, Z.; GUIRONG, Q. e ZONGXIU, S. Transgene expression in Chinese sweetgum driven by the salt induced expressed promoter. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 88:101–107. 2007.

REY, L.; GÓMEZ, P.L.; AYALA, I.; DELGADO, W. e ROCHA, P. Colecciones genéticas de palma de aceite *Elaeis guineensis* (Jacq.) y *Elaeis oleifera* (H.B.K.) de Cenipalma: Características de importancia en el sector palmicultor. **Palmas** 25 (2): 39-48, 2004.

REY, H. Y. e MROGINSKI, L. A. Somatic embryogenesis and plant regeneration in diploid and triploid *Arachis pintoi*. **Biologia Plantarum** 50 (1): 152-155, 2006.

REYNOLDS, T. L. Pollen embryogenesis. **Plant Molecular Biology** 33: 1-10. 1997.

RIVAL, A.; ABERLENC, F.; MORCILLO, F.; TREGGAR, J.; VERDEIL, J-L. e DUVAL, Y. Scaling-up in vitro clonal propagation through somatic embryogenesis: the case of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Plant Tissue Culture Biotechnology** 3: 74±83, 1997.

RIVAL, A.; BERTRAND, L.; BEULÉ, T.; TROUSLOT, P. e LASHERMES, P. Suitability of RAPD analysis for the detection of somaclonal variants in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Plant Breeding**, 1998, vol. 117, no. 1, p. 73-76.

RODRIGUES, J. A. A. Produção de embriões em dendê a partir da cultura de embriões imaturos. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** (1): 119-120, 1989.

RODRIGUES, L. R.; OLIVEIRA, J. M. S. de.; e 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 / Jul-Dez. 2004.

RODRIGUEZ, A. P. M. e WETZSTEIN, H. Y. The effect of auxin type and concentration on pecan (*Carya illinoensis*) somatic embryo morphology and subsequent conversion into plants. **Plant Cell Reports**, v.13, p.607-611, 1994.

RODRIGUEZ, A. P. M. e WETZSTEIN, H. Y. A morphological and histological comparison of the initiation and development of pecan (*Carya illinoensis*) somatic embryogenesis cultures induced with naphthaleneacetic acid or 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **Protoplasma**, v.204, p.71-83, 1998.

ROUT, G. R.; MOHAPATRA, A. e JAIN, S. M. Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. **Biotechnology Advances** 24 531-560, 2006.

SÁENZ, L.; SOUZA, R.; AZPEITIA, A.; CHAN, J. L. e OROPEZA, C. 14C 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid uptake and formation of embryogenesis calli in coconut plumular explant cultured on activated charcoal – free media. **Revista Fitotecnia Mexicana**. Vol. 28, número 002. pp. 151-159. 2005.

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

SAHRAWAT, K. e CHAND, S. Continuous somatic embryogenesis and plant regeneration from hypocotyl segments of *Psoralea corylifolia* Linn., an endangered and medicinally important Fabaceae plant Ashok. **CURRENT SCIENCE**, VOL. 81, NO. 10, 25 NOVEMBER 2001.

SANÉ, D.; ABERLENC-BERTOSSI, F.; GASSAMA-DIA, Y. K.; SAGNA, M. TROUSLOT, M. F.; DUVAL, Y. e BORGEL, A. Histocytological Analysis of Callogenesis and Somatic Embryogenesis from Cell Suspensions of Date Palm (*Phoenix dactylifera*). **Annals of Botany** 98: 301–308, 2006.

SANTA-CATARINA, C.; MACIEL, S. C. e PEDROTTI, E. L. Germinação *in vitro* e embriogênese somática a partir de embriões imaturos de canela de sassafrás (*Ocotea odorífera* Mez.). **Revista Brasileira de Botânica**. V. 24, número 4, p. 501-510. 2001.

SANTOS, M. M. **Polimorfismo isoenzimático de população subespontânea de dendê (*E. guineensis* Jacq.) do estado da Bahia e sua relação genética com seis procedências africanas**. PhD thesis, USP, São Paulo, Brazil. 1991.

SANTOS, C. G. dos; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. de O. e PAIVA, E. Indução e análise bioquímica de calos obtidos de segmentos foliares de *Coffea arabica* L., cultivar rubi. **Ciência Agrotecnologia**. Lavras. V.27, n.3, p.571-577, maio/jun., 2003.

SATO, A. Y.; DIAS, H. C. T.; ANDRADE, L. A. de; SOUZA, V. C. de; DORNELAS, G. V. Controle de contaminação e oxidação na micropropagação do pau d'alho (*Gallesia gorazema* moq.) **Agropecuária Técnica**, v. 25, n.2, 2004.

SATYAVATHI, V. V.; JAUHAR, P. P.; ELIAS, E. M.; e RAO, M. B. Effects of Growth Regulators on In Vitro Plant Regeneration in Durum Wheat. **Crop Science**, vol. 44, september–october 2004.

ŠAULIENE, I. e RAKLEVIČIENE, D. The effect of photoperiod and growth regulators on organogenesis in thin-layer tissues. **Acta Universitatis Latviensis, Biology**, Vol. 676, pp. 219–222. 2004.

SCHWENDIMAN, J.; PANNETIER, C. e N. MICHAUX-FERRIERE Histology of Somatic Embryogenesis from Leaf Explants of the Oil Palm *Elaeis guineensis*. **Annals of Botany** 62: 43-52, 1988.

SEGURA, J. Morfogénesis *in vitro*. In: BIETO, J. A; TALON, M. (Ed.) **Fisiología y bioquímica vegetal**. Madrid: Ed. Interamericana, 625p, 1993.

ŠERHANTOVÁ, V.; EHRENBERGEROVÁ, J. e OHNOUTKOVÁ, L. Callus induction and regeneration efficiency of spring barley cultivars registered in the Czech Republic. **PLANT SOIL ENVIRONMENT**. 50, (10): 456–462. 2004.

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

SHU, W. e LOH, C. S. Secondary embryogenesis from thin cell layers of *Brassica napus* ssp. *Oleifera*. **New Phytologist**. (1991), 119, 427-432.

SILVA, J. A. T. da. Thin Cell Layer technology in ornamental plant micropropagation and biotechnology. **African Journal of Biotechnology** Vol. 2 (12), pp. 683-691, December 2003a.

SILVA, J. A. T. da. Thin cell layer technology for induced response and control of rhizogenesis in chrysanthemum. **Plant Growth Regulation** 39: 67–76, 2003b.

SILVA, A. L. C. da; CARUSO, C. S.; MOREIRA, R. de A. e HORTA, A. C. G. *In vitro* induction of callus from cotyledon and hypocotyl explants of *Glycine wightii* (wight & arn.) verdc. **Ciência Agrotecnologia**., Lavras. V.27, n.6, p.1277-1284, nov./dez., 2003.

SILVA, J. A. T. da e FUKAI, S. Chrysanthemum organogenesis through thin cell layer technology and plant growth regulator Control. **Asian Journal of Plant Sciences** 2 (6): 505-514, 2003.

SILVA, J. A. T. da., e TANAKA, M. Multiple Regeneration Pathways via Thin Cell Layers in Hybrid Cymbidium (Orchidaceae). **Journal Plant Growth Regulator** 25:203–210, 2006.

SILVA, L. M.; ALQUINI, Y. e CAVALLET, V. J. Inter-relações entre a anatomia vegetal e a produção vegetal **Acta Botânica Brasileira** 19(1): 183-194. 2005.

SIQUEIRA, E. R. e INOUE, M. T. Controle de oxidação na cultura de tecidos do coqueiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 26(7): 949-953. 1991.

SMITH, L. G.; JACKSON, D. e HAKE, S. Expression of knotted1 marks shoot meristema formation during maize embryogenesis. **Developmental Genetics**. 16: 344-348, 1995.

SOGEKE, A. K. Rapid callus proliferation somatic embryogenesis and organogenesis of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Elaeis**. Vol. 8, número 2. pag. 92-103. December 1996.

SOGEKE, A. K. Stages in the Vegetative Propagation of Oil Palm, *Elaeis guineensis* Jacq. Through tissue culture. **Journal of Oil Palm Researches**. Vol. 10 N° 2, pp.1-9. 1998.

SOLANO, W. Efecto de las Características de Cultivo en Suspensión Celular y en Biorreactor con Inmersión Temporal sobre la Propagación masiva de *Coffea arabica* por Embriogénesis Somática. **Tesis Licenciatura en**. Ingeniería en. Agronomía con énfasis en Fitotecnia. Turrialba, Costa Rica., Universidad de Costa Rica. 87 p. 2001.

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

SONDAHL, M. R.; NAKAMURA, T. e SHARP, W. R. Propagation of coffee. In: HENKE, R. R.; HUGHES, K. W.; CONSTANTIN, M. P. e HOLLAENDER, A. (Ed.). **Tissue Culture in Forestry and Agriculture**. New York: Plenum, 1985. p. 215 -232.

STASOLLA, C.; LOUKANINA, N.; ASHIHARA, H.; YEUNG, E. C. e THORPE, T. A. Ascorbic acid changes the pattern of purine metabolism during germination of white spruce somatic embryos. **Journal Tree Physiology**. 21, 359–367, 2001.

STEIN, M. e STEPHENS, C. Effect of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid and Activated-Charcoal on Somatic Embryogenesis of *Bactris-Gasipaes* Hbk. *Turrialba* 41(2):196–201. 1991.

STEINER, N.; SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V.; FLOH, E. I. S.; GUERRA, M. P. Polyamine effects on growth and endogenous hormones levels in *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 89:55–62, 2007.

STEINMACHER, D. A. **Germinação *in vitro*, criopreservação e embriogênese somática em pupunha**. (Dissertação de mestrado). Florianópolis. 124 p. 2005.

STEINMACHER, D. A.; CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; CLEMENT, C. R. e GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis from peach palm zygotic embryos. **In Vitro Cellular Development Biology-Plant** DOI 10.1007/s11627-007-9032-y. 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**. 89:15–22, 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**. 1-11. 2007 c.

SUFRAMA. Instituto Superior de Administração e Economia ISAE/Fundação Getúlio Vargas (FGV). Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior Superintendência da Zona Franca de Manaus. **Potencialidades Regionais Estudos de Viabilidade Econômica - Sumários Executivos**. Vol. 5 – Dendê. Manaus. Amazonas. 2003.

SUMIANAH, G. H. M.; MAKKI, Y. M. e T. G. RUMNEY. Changes of three cultivars of date palm seed during germination. **Date Palm Journal**, 3 (21): 395-397, 1984.

SWATI, J.; ALOK, V.; KOTHARY, S. L. JAIN, S. e VARSHNEY, A. **Cereal Res. Commun.**, 19: 230-231. 2001.

TAKEDA, T.; MIZUKAMIB, M. e MATSUOKA, H. Characterization of two-step direct somatic embryogenesis in carrot. **Biochemical Engineering Journal**. Article in Press. 2007.

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. e KIRB, E. G. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of oil palm. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** **34**: 227-233, 1993.

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

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**. 40, 105–111. 1995.

TEIXEIRA, J. B. Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas. Brasília: Embrapa – **Recursos Genéticos e Biotecnologia**. Brasília, 2005.

THOMAS, T. D. Effect of Sugars, Gibberellic Acid and Abscisic Acid on Somatic Embryogenesis in *Tylophora indica* (Burm. f.) Merrill. **CHINESE JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY** Volume 22, Issue 3, May 2006.

TISSERAT, B. Propagation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) *in vitro*. **Journal Experimental Botany** 30:1275–1283, 1979.

TISSERAT, B. Palms. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D.J. **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nighoff, p.339-356. 1987.

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, numero 3. p.417-426. 2007.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. e BUSO, J. A. Cultura de tecido e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa, 1998.

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

TULECKE, W.; McGRANAHAN, G. H. e LESLIE, C. A. **Somatic embryogenesis in walnut (*Juglan species*)**. In: Biotechnology in agriculture and forestry, somatic embryogenesis and synthetic seed I (Y.P.S. Bajaj, ed.). Springer-Verlag, Berlin, v.30, p.370-377. 1995.

TUOMINEN, L. K. e MUSGRAVE, M. E. Tissue culture in synthetic atmospheres: diffusion rate effects on cytokinin-induced callus growth and isoflavonoid production in soybean [*Glycine max* (L.) Merr. cv. Acme]. **Plant Growth Regulators** 49:167–175, 2006.

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

UZELAC, B.; NINKOVIĆ, S; SMIGOCKI, A. e S. BUDIMIR. Origin and development of secondary somatic embryos in transformed embryogenic cultures of *Medicago sativa*. **BIOLOGIA PLANTARUM** 51 (1): 1-6, 2007.

VALVERDE, R.; ARIAS, O. e THORPE, T. A. Picloram induced somatic embryogenesis in pejobaye palm (*Bactris gasipaes* H.B.K) **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 10: 149-156, 1987.

VAN WINKLE, S.; JOHNSON, S. e PULLMAN, G. S. The impact of gelrite and activated carbon on the elemental composition of plant tissue culture media. **Plant Cell Reports**, New York, v.21, p.1175-1182, 2003.

VASIC, D.; ALIBERT, G. e SKORIC, D. Protocols for efficient repetitive and secondary somatic embryogenesis in *Helianthus maximiliani* (Schrader). **Plant Cell Reports** 20:121–125, 2001.

VASIL, I. K. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cereals and grasses. In: FUJIWARA, A. **Plant Tissue Culture**. Tokyo, Maruzen. p.101-103, 1982.

VASIL, I. K. Developing cell and tissue culture systems for the improvement of cereal and grape crops. **Journal of Plant Physiology**. Stuttgart, v. 128, p. 193-218, 1987.

VERDEIL, J. L.; HUET, C.; GROSDEMANGE, F. e BUFFARD-MOREL, J. Plant regeneration from cultured immature inflorescences of coconut (*Cocos nucifera* L.): evidence for somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**. Volume 13, Numbers 3-4 / January, 1994.

VERDEIL, J. L. e BUFFARD-MOREL, J. Somatic embryogenesis in coconut (*Cocos nucifera* L.). In: Bajaj YPS (ed) Somatic embryogenesis and synthetic seed I. Biotechnology in agriculture and forestry, vol 30. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 299–317, 1995.

VIEGAS, I. de J. M. e MULLER, A. A. **A cultura do dendezeiro na Amazônia brasileira**. Belém: Embrapa-Cpatu; Manaus: Embrapa-CPAA, 2000. 374p.

VIEIRA, L. G. E. e KOBAYASHI, A. K. Micropropagação do cafeeiro. In: SIMPÓSIO DE PESQUISAS DOS CAFÉS DO BRASIL, 1. 2000, Poços de Caldas. **Palestras...** Poços de Caldas: [s.n.], 2000. p. 147-167.

VIEIRA, M. L. C. e APEZZATO-DA-GLÓRIA, B. **Fundamentos e aplicações da cultura de tecidos no melhoramento**. In.: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I.S. e VALADARES-INGLIS, M.C. Recursos genéticos e melhoramento: plantas. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 911-938

VIKRANT e RASHID, A. Direct as well as indirect somatic embryogenesis from immature (unemerged) inflorescence of a minor millet *Paspalum scrobiculatum* L. **Euphytica** **120**: 167–172, 2001.

VILA, S. K.; REY, H. Y. e MROGINSKI, L. A. Factors Affecting Somatic Embryogenesis Induction and Conversion in “Paradise Tree” (*Melia azedarach* L.) **Journal Plant Growth Regulator**. 26:268–277. 2007.

VON ARNOLD, S.; SABALA, I.; BOZHKOV, P.; KYACHOK, J. e FILONOVA, L. Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** **69**: 233–249. 2002.

WANG, H.- C.; CHEN, J.-T.; WU, S.- P.; LIN, M.- C. e CHANG, W.- C. Plant regeneration through somatic embryogenesis from zygotic embryo-derived callus of *areca catechu* L. (Arecaceae). **In Vitro Cellular and Developmental Biology—Plant**. 39:34–36, 2003.

WANG, Q.; LAAMANEN, J.; UOSUKAINEN, M. e VALKONEN, J. P. T. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of raspberry (*Rubus idaeus* L.) by encapsulation–vitrification and encapsulation–dehydration. **Plant Cell Reports** **24**: 280–288, 2005.

WEATHERHEAD, M. A.; BURDON, J. e HENSHAW, G. G. Some effects of activated charcoal as an additive plant tissue culture media. **Zeitschrift fuer Pflanzenphysiologie**, v.89, p. 141-147, 1978.

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

WILLIAMS, R. R. Mineral nutrition *in vitro* - a mechanistic approach. **Australian Journal of Botany**, v.41, p.237-251, 1993.

WU, H. C.; DU TOIT, E. S. e REINHARDT C. F. A protocol for direct somatic embryogenesis of *Protea cynaroides* L. using zygotic embryos and cotyledon tissues. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 89:217–224. 2007.

YOU, X, L.; HAN, J. Y. e CHOI, Y. E. Plant regeneration via direct somatic embryogenesis in *Panax japonicus*. **Plant Biotechnology Reports** 1:5–9. 2007.

XIAO, W.; HUANG, X.-L.; HUANG, X.; CHEN, YA-PING.; DAI, XUE-MEI. e ZHAO, JIE-TANG Plant regeneration from protoplasts of *Musa acuminata* cv. Mas (AA) via somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 90:191–200, 2007.

XIU-WEN, H.; JIM-HUA, W.; CHUN-BO, X. FU-GUI, M. e JIN-FENG, Y. Plant Regeneration from Immature Inflorescence Culture and Genetic Transformation of Wheatgrass (*Agropyron cristatum* x *A. desertorum* cv. Hycrest-Mengnong). **Agricultural Sciences in China**. 5(9): 648-654, 2006.

XU, Z.-H.; WANG, D.-Y.; YANG, L. J. e WEI, Z.-M. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cultured immature inflorescences of *Setaria italica*. **Plant Cell Reports**. Volume 3, número 4, 1984.

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

ZHANG, C. G.; LI, W.; MAO, Y. F.; ZHAO, D. L.; DONG, W. e GUO, G. Q. Endogenous hormonal levels in *Scutellaria baicalensis* calli induced by thidiazuron. **Russian Journal Plant Physiology**. 52: 345–351, 2005.

ZHAO, P.; WANG, W.; FENG, FO-SHENG.; WU, F. YANG, Z.-QI e WANG, WAN-JUN. High-frequency shoot regeneration through transverse thin cell layer culture in

Dendrobium Candidum Wall Ex Lindl. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 90:131–139, 2007.

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

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

ZOUINE, J.; EL BELLAJ, M.; MEDDICH, A.; VERDEIL, J-L. e EL HADRAMI, I. Proliferation and germination of somatic embryos from embryogenic suspension cultures in *Phoenix dactylifera*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 82: 83–92. 2005.

ZOUINE, J. e EL HADRAMI, I. Effect of 2,4-D, glutamine and BAP on embryogenic suspension culture of date palm (*Phoenix dactylifera* L.), **Science Horticulturae**, 2007.