

CULTURA *IN VITRO* COMO FERRAMENTA NO MELHORAMENTO GENÉTICO E NA PROPAGAÇÃO DO DENDEZEIRO

Araújo, P.da S.G.¹; Paula, D.M.T. de²; Colares, L.M.L.²; Araújo, J.M.F. de³; Quoirin, M.⁴; Quisen, R.⁵

¹Eng. Florestal, M.Sc., Bolsista DTI, CNPq - Embrapa Amazônia Ocidental; ²Bióloga, Bolsista DTI, CNPq - Embrapa Amazônia Ocidental; ³Agrônoma, Bolsista DTI, CNPq - Embrapa Amazônia Ocidental; ⁴Agrônoma, D.Sc., Universidade Federal do Paraná; ⁵Engenheira Florestal, D.Sc., Embrapa Amazônia Ocidental, regina.quisen@cpaa.embrapa.br

Resumo

Apesar de algumas pesquisas mundiais apontarem avanços no sentido de melhorar os protocolos de propagação *in vitro* do dendezeiro, o desenvolvimento da micropropagação a partir de culturas embriogênicas não tem alcançado eficiência a nível comercial. A clonagem de materiais elite assegura um grande avanço no programa de melhoramento genético desta cultura e a disponibilidade de variedades mais produtivas e tolerantes, que implica em maior rentabilidade para o agronegócio do dendê e maior segurança aos elevados investimentos requeridos pela atividade. Neste sentido, buscando subsídios para a definição de protocolos para a produção massal de genótipos do híbrido interespecífico dendê africano (*Elaeis guineensis*) x caiaué (*Elaeis oleifera*), este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de calogênese de embriões zigóticos em diferentes condições de cultura *in vitro*. Embriões maduros e imaturos foram inoculados em meios de cultura com diferentes concentrações de auxinas (2,4-D, Picloram e Dicamba), onde verificou-se elevada porcentagem de embriões maduros germinados em altas concentrações de 2,4-D, assim como perdas de calos embriogênicos em meio de cultura Y3 e N6 a partir de embriões imaturos. O Picloram mostrou-se bastante eficiente na indução de calos com aspecto friável.

Abstract

In vitro culture as a tool in breeding and propagation of oil palm

Although some studies suggest advances in improving the protocols for *in vitro* culture of oil palm, the development of mass propagation from embryogenic culture has failed to achieve high efficiency. The cloning of elite genotypes ensures advances in the breeding program of this culture and the availability of productive and tolerant varieties, which results in higher progress for the oil palm agribusiness. So, to ensure the development of protocols for the mass production of interspecific hybrid genotypes of African oil palm (*Elaeis guineensis*) x Caiaué (*Elaeis oleifera*), this study aimed to evaluate the potential of *in vitro* calogenesis of zygotic embryos in different culture medium and plant growth regulators. Mature and immature embryos were cultivated in different concentrations of auxins (2,4-D, Picloram and Dicamba), where there was high percentage of mature embryos germinated on high concentrations of 2,4-D, as well as losses embryogenic callus in Y3 and N6 medium from immature embryos. The Picloram proved very effective in inducing callus with friable aspect.

INTRODUÇÃO

Uma das grandes limitações enfrentadas pelo Programa Brasileiro de Biodiesel está na oferta insignificante de óleos vegetais em quantidade, com custos e características desejáveis capazes descentralizar e incorporar a produção deste combustível alternativo ao petróleo à matriz energética do País. Dentro deste panorama, e considerando a crescente demanda na produção de biocombustível, é necessário um grande esforço de organização do setor produtivo, assim como fortes investimentos em P&D&I para a inserção na matriz nacional de oleaginosas alternativas, com elevada produtividade por área. Dentre estas culturas, a dendeicultura apresenta características vantajosas para atendimento do crescente mercado de biodiesel, tendo grande produtividade por área e possibilidades de expansão sem interferências de outros subprodutos que não o óleo.

O dendezeiro apresenta produtividade que pode atingir de 8 a 10 t de óleo/ha/ano em condições favoráveis, sendo que no Brasil, dos 60.000 hectares de dendezeais cultivados, 85% estão concentrados no Estado do Pará, atingindo 6 ton de óleo/ha/ano nos melhores plantios. A produção brasileira de óleo de dendê, produto este de amplo uso na indústria de alimentos, farmacêutica e química, e considerado um dos melhores óleos para produção de biodiesel, representa aproximadamente 0,4% da produção mundial (OIL WORD, 2005) e não atende a demanda nacional destinada principalmente para a indústria alimentícia.

Contudo, a expansão segura, competitiva e sustentável da dendeicultura depende da solução de problemas limitantes à cultura no Brasil e no continente americano, como pragas e doenças, uso inadequado de

Cultura in vitro como ...
2010 SP-PP-S8739



CPAA-23008-1

Embrapa Amazônia Ocidental
SIN - BIBLIOTECA

S
8739

fertilizantes, restrita base genética das cultivares e necessidade do desenvolvimento e avaliação de cultivares com adaptabilidade aos ecossistemas de expansão da cultura no país. Neste sentido, a Embrapa Amazônia Ocidental, a mais de 25 anos mantém um programa de pesquisa com esta cultura, sendo considerada uma referência nacional nas áreas de melhoramento genético, nutrição mineral e manejo do dendê (BARCELOS et al., 2001).

O programa de melhoramento genético do dendezeiro, que até recentemente era focado principalmente no melhoramento do híbrido intraespecífico do dendê africano (*Elaeis guineensis*), do tipo tenera, foi redirecionado e a prioridade passou a ser o melhoramento do híbrido interespecífico dendê africano x caiaué (*Elaeis oleifera*) ou dendê americano (HARDON e TAN, 1969; HARTLEY, 1988). Este híbrido é atualmente a única opção existente no mundo para a anomalia de etiologia desconhecida denominada de Amarelecimento Fatal (AF), e que já levou a falência várias empresas no continente americano trazendo insegurança ao futuro da dendeicultura no continente. Ademais, o caiaué também apresenta resistência a outras pragas e doenças, e características de interesse para o melhoramento como reduzida taxa de crescimento do tronco e alta taxa de ácidos graxos insaturados (MEUNIER, 1975; BARCELOS et al., 2001).

Os resultados obtidos até então desse programa são de grande contribuição ao avanço da cultura na região, que somam sete cultivares de dendezeiro do *Elaeis guineensis* tipo tenera (registradas no RNC/MAPA em 2006) que totalizam mais de 8 milhões de sementes germinadas comercializadas desde 1992, ocupando aproximadamente metade da área cultivada com dendezeiro no país; a produção do primeiro híbrido interespecífico entre o caiaué e o dendê africano, denominado BRS Manicoré (registro no RNC/MAPA em 2009). Os resultados dos primeiros experimentos demonstraram a tolerância dos híbridos interespecíficos F1 ao AF e a possibilidade de obter plantas com produtividade semelhante as das variedades comerciais de dendezeiro (BARCELOS et al., 2003, CUNHA et al. 2005)

Uma das grandes metas do programa de melhoramento genético é a disponibilidade de variedades mais produtivas e tolerantes, que implica em maior rentabilidade para o agronegócio do dendê e maior segurança aos elevados investimentos requeridos pela atividade, além de expressivo benefício ao meio ambiente, pelo menor uso de defensivos requerido no controle das pragas e doenças. Também a manutenção do banco de germoplasma da Embrapa Amazônia Ocidental, de coleções e do programa de melhoramento permite disponibilizar rapidamente aos produtores sementes de comprovada qualidade genética, sendo hoje a única empresa da América do Sul a comercializar sementes de dendê com origem controlada e genitores testados. Neste contexto é que se vislumbra o quanto a biotecnologia, por meio da clonagem *in vitro* pode incorporar este ganho em produtividade através da multiplicação vegetativa ao melhoramento genético do dendezeiro.

Entretanto, o problema a ser contornado após a seleção de híbridos é a multiplicação do material em escala comercial. Além da produção limitada de sementes que podem ser obtidas a partir dos cruzamentos superiores, os híbridos têm como inconveniente a baixa taxa de germinação (média 15%) e a segregação genética, pois em se tratando de plantas alógamas, apresentam alta heterozigose, principalmente o caiaué, espécie que ainda não foi submetida ao processo de seleção. Resultados de pesquisas demonstraram que a clonagem de plantas 'tenera' de alta produtividade pode contribuir com aumentos de até 30% em produção de óleo (Meunier, 1989). Jacquemard e Durand-Gasselín (1992) observaram que em média, o rendimento do dendezeiro multiplicado por semente aumenta cerca de 1% ao ano, enquanto utilizando clones aumenta-se a produção de óleo em 19%.

Apesar de que as bases fisiológicas da multiplicação vegetativa são as mesmas para a maioria das espécies e, portanto, amplamente publicadas, os detalhes específicos, os quais tornam o processo mais eficaz, normalmente são próprios de cada laboratório ou equipe e dificilmente disponíveis em bibliografia, sem, contudo, se constituir em barreiras intransponíveis para a obtenção dos resultados correntemente alcançados nos diversos laboratórios trabalhando com a planta.

Estes esforços já vêm demonstrando bons resultados, como no resgate de embriões, onde bons índices de germinação (acima de 70%) foram obtidos em pesquisas desenvolvidas na Embrapa (ÂNGELO et al., 2005). Quanto à clonagem, novos projetos de pesquisa tiveram início nos últimos anos com o objetivo de desenvolver metodologias de micropropagação de clones obtidos no programa de melhoramento genético da Embrapa, e que poderiam contribuir sobremaneira para os experimentos que empregam híbridos interespecíficos de dendezeiro x caiaué e para as plantas oriundas de retrocruzamentos, sendo considerada esta biotecnologia a única maneira de acelerar a obtenção de plantas selecionadas. Estas ações exigem mais tempo de pesquisa, considerando que além das fases *in vitro* são necessárias avaliações a campo das plantas obtidas via cultura *in vitro* para verificar a ocorrência de variações somaclonais relatadas na literatura, que provocam anomalias nas inflorescências e resultaram em plantas improdutivas ou pouco produtivas (JALIGOT et al., 2000; RIVAL e PARVEEZ., 2004).

Protocolos de embriogênese somática já foram descritos para algumas espécies de palmeiras (HUONG et al., 1999; GUERRA e HANDRO, 1998; LEDO et al., 2002). Para o dendezeiro, a clonagem é obtida através da embriogênese somática, a partir de calos obtidos com sucesso para a regeneração a partir de diferentes partes

da planta, incluindo embriões maduros e imaturos, meristemas apicais, culturas de suspensão de células embriogênicas, tecidos embriogênicos friáveis e calos derivados de plântulas, raízes, inflorescências e flores jovens (TEIXEIRA et al., 1993, 1994; SCHWENDIMAN et al., 1988). No entanto, apesar de quase três décadas de estudos, nenhum protocolo foi definido para a multiplicação em larga escala para esta cultura, com uma frequência de regeneração de plantas completas insuficiente para alguns explantes na maioria dos trabalhos relatados, o que tem inviabilizado a implementação de processos de produção massal de mudas de dendê (GORRET et al., 2004; TOUCHET et al., 1991; TEIXEIRA et al. 1995).

Atualmente, tanto os modelos de cultivo sob imersão temporária ou permanente, onde é proporcionado o maior contato das plantas com o meio de cultura, e conseqüentemente maior absorção dos nutrientes, se tem observado o aumento da taxa de multiplicação, diminuição do custo de produção de mudas, não sendo necessária a transferência dos explantes como no sistema tradicional de micropropagação em meio semi-sólido. A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia desenvolveu e submeteu ao INPI, para fins de patenteamento um sistema de biorreator de imersão permanente tomando como base o modelo desenvolvido por Alvard et al. (1993) e Lorenzo et al. (1998), que permite uma grande versatilidade de uso, mais adaptados às condições de cultivo *in vitro* para espécies tropicais. Entretanto, este modelo ainda não foi testado para culturas perenes, como no caso do dendezeiro.

Portanto, é fundamental que estas alternativas biotecnológicas promissoras e seguras para a produção massal de plantas elite de *Elaeis* sp. sejam testadas e estabelecidas metodologias de rotina para as diferentes fases do processo de embriogênese somática, nas diversas condições de cultura (semi-sólido ou líquido), proporcionando a clonagem de materiais e aumentando a taxa de multiplicação, mantendo a fidelidade genética do material produzido.

Neste sentido, este trabalho teve como objetivo avaliar o comportamento de embriões zigóticos e de diferentes condições de cultura *in vitro* do híbrido interespecífico dendê x caiaué na fase de indução de calos embriogênicos, visando subsidiar a pesquisa de desenvolvimento de protocolo de embriogênese somática e regeneração de plantas do híbrido interespecífico.

MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos estão sendo conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Amazônia Ocidental, em Manaus, Amazonas. Os experimentos apresentados a seguir fazem parte do projeto "Biofábricas Integradas à Agricultura Familiar", e tiveram início em novembro de 2009 e seguem andamento até a presente data. Portanto, os resultados apresentados são preliminares,

Para os quatro experimentos descritos a seguir foram utilizados como explantes embriões zigóticos (maduros e imaturos) do híbrido interespecífico dendê x caiaué.

A assepsia das sementes consistiu em sua imersão em solução contendo 50% de hipoclorito de sódio (produto comercial com 2,5% de cloro ativo) por 10 minutos, seguido de lavagem em água corrente, quebra do tegumento e extração dos embriões zigóticos com o auxílio de bisturi. Em câmara de fluxo laminar, os embriões foram imersos em 100 mL de solução de álcool etílico 70% + Tween-20 (2 gotas/100 mL) por 60 segundos, sendo posteriormente lavados quatro vezes em água destilada e autoclavada. Por último, os embriões foram imersos em uma solução contendo 5% de PPM® e 3% de hipoclorito de sódio com 0,125% de cloro ativo por 5 minutos e, lavados por três vezes em água destilada e autoclavada.

Os meios de cultura foram ajustados para pH 5,8, antes da adição do agente geleificante, e autoclavados a 121°C w 1,3 atm de pressão por 15 minutos. Os explantes foram inoculados em placas de petri de 10,0 cm de diâmetro e 2,0 cm de altura contendo aproximadamente 30 mL de meio de cultura e mantidos em ambiente escuro de câmaras de B.O.D. com temperatura de 26±1°C por 30 a 120 dias.

Os experimentos foram observados e avaliados seguindo critérios, tais como: formação de calos compactos e friáveis, germinação de embriões zigóticos, oxidação dos explantes e vigor do explante (com ou sem atividade morfogênica).

Experimento 1 – Comportamento inicial de embriões zigóticos maduros de híbrido interespecífico dendê x caiaué em meio de indução à calogênese.

Após assepsia, embriões maduros (150 dias) foram inoculados em meio de cultura de indução e estabelecimento de calos composto pelos sais de Y3 (Eeuwens, 1976) acrescido de glicina (2 mg.L⁻¹), ácido nicotínico (0,9 mg.L⁻¹), piridoxina (1,5 mg.L⁻¹), inositol (100,0 mg.L⁻¹), biotina (0,25 mg.L⁻¹), ácido pantotênico (0,25 mg.L⁻¹), carvão ativado (0,3%), sacarose (3%), ágar (0,7%) e 2,4-D nas concentrações 226,5; 679,5 µM e controle (sem 2,4-D).

O experimento seguiu o delineamento estatístico inteiramente casualizado com três tratamentos (concentrações de 2,4-D) com sete repetições (placa) com quatro embriões por placa. Os explantes permaneceram nesse meio de cultura por 30 dias, para que fosse observado o comportamento inicial da formação de calos primários.

Experimento 2 - Indução de calogênese em embriões zigóticos imaturos de híbrido interespecífico dendê x caiaué.

Após assepsia, embriões imaturos (90 dias) foram inoculados em meio de cultura de indução e estabelecimento de calos composto pelos sais de Y3 acrescido de glicina (2 mg.L⁻¹), ácido nicotínico (1 mg.L⁻¹), piridoxina (1 mg.L⁻¹), tiamina (0,5 mg.L⁻¹), inositol (200 mg.L⁻¹), L-glutamina (100 mg.L⁻¹), ácido aspártico (100 mg.L⁻¹), L-arginina (100 mg.L⁻¹), cisteína (250 mg.L⁻¹), carvão ativado (0,3%), PVP (500 mg.L⁻¹), sacarose (3%), fitagel (0,2%) com 2,4-D nas concentrações 453 e 679,5 µM.

O experimento seguiu o delineamento estatístico inteiramente casualizado com dois tratamentos (concentrações de 2,4-D) com dez repetições (placa) cada e cinco embriões por placa. Os explantes permaneceram nesse meio de cultura por 30 dias, para que fosse observado o comportamento inicial da formação de calos primários.

Experimento 3 – Efeito de diferentes meios de cultura na indução da embriogênese somática a partir de embriões zigóticos imaturos de híbrido interespecífico dendê x caiaué.

Após assepsia, embriões imaturos (90 dias) foram inoculados em meio de cultura de indução e estabelecimento de calos composto pelos sais e vitaminas de Y3 ou N₆ (CHU et al. 1975) acrescido de ácido ascórbico (250 mg.L⁻¹), inositol (200 mg.L⁻¹), L-glutamina (100 mg.L⁻¹), ácido aspártico (100 mg.L⁻¹), L-arginina (100 mg.L⁻¹), cisteína (500 mg.L⁻¹), carvão ativado (0,3%), PVP (500 mg.L⁻¹), sacarose (3%), fitagel (0,2%) com 679,5 µM de 2,4-D.

O experimento seguiu o delineamento estatístico inteiramente casualizado com dois tratamentos (meio de cultura) com dez repetições (placa) cada e quatro embriões por placa. Os explantes permaneceram nesse meio de cultura por 90 dias.

Experimento 4 – Efeito de diferentes reguladores de crescimento na indução da embriogênese somática em embriões zigóticos imaturos de híbrido interespecífico dendê x caiaué.

Após assepsia, embriões imaturos (90 dias) foram inoculados em meio de cultura de indução e estabelecimento de calos composto pelos sais e vitaminas de Y3 acrescido de ácido ascórbico (250 mg.L⁻¹), inositol (200 mg.L⁻¹), L-glutamina (500 mg.L⁻¹), ácido aspártico (100 mg.L⁻¹), L-arginina (100 mg.L⁻¹), cisteína (500 mg.L⁻¹), carvão ativado (0,3%), sacarose (3%), fitagel (0,2%) com 2,4-D (498,3 µM), picloram (596,2 µM) ou dicamba (498 µM).

O experimento seguiu o delineamento estatístico inteiramente casualizado com três tratamentos (regulador de crescimento) com 50 repetições (tubo de ensaio) cada e um embrião por tubo. Os explantes permaneceram nesse meio de cultura por 90 dias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados a seguir são preliminares, onde somente estão relacionados os critérios avaliados nas fases iniciais do processo de embriogênese somática a partir de explantes de híbrido interespecífico dendê x caiaué. Os experimentos ainda estão em andamento e, portanto farão parte de um novo relatório onde constarão as análises estatísticas e conclusões das fases seguintes até a regeneração de materiais elite.

Experimento 1- Resultados preliminares do comportamento inicial de embriões zigóticos maduros de híbrido interespecífico dendê x caiaué em meio de indução à calogênese.

Após 7-10 dias de inoculação observou-se um acentuado intumescimento dos embriões zigóticos, e após 15 dias e em seguida o início da curvatura e germinação dos embriões zigóticos (Figura 1). Ao final de 30 dias, avaliou-se a influência dos tratamentos na formação inicial de calos primários nos explantes. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 1, verificou-se em todas as concentrações de 2,4-D houve o início da germinação dos embriões zigóticos, não sendo observada a formação de calos primários. A germinação foi elevada (85,7%), demonstrando a viabilidade das sementes e que o meio utilizado se mostrou satisfatório para a germinação *in vitro*, apesar de não ser este o objetivo deste ensaio. Hu e Ferreira (1998) relatam que embriões excisados no estágio maduro ou próximo podem germinar e crescer num meio inorgânico, e os reguladores de crescimento tornam-se dispensáveis.

Nos demais tratamentos, apesar da presença de 2,4-D a inibição da germinação foi parcial, favorecido pelo efeito adsorvente do carvão ativado, que imobiliza parte dos elementos que compõem o meio, inclusive o regulador de crescimento. Este comportamento também foi observado em outros trabalhos, sendo considerada tanto a formação de calos quanto a germinação altamente influenciada pelo meio de cultura e principalmente pelo cruzamento ou genótipo utilizado (CHEHMALEE e TE CHATO, 2007; STEINMACHER et al., 2007). Teixeira (1989) avaliando este tipo de resposta em embriões zigóticos com diferentes estádios de desenvolvimento, observou a formação de calos em todos, entretanto, nos embriões mais jovens a produção de calos primários foi menor comparado aos demais, que por sua vez, foram mais propensos à germinação, mesmo em concentrações elevadas de 2,4-D.

Tabela 1 – Resposta de embriões zigóticos maduros de híbrido interespecífico dendê x caiaué, após 30 dias de cultura em meio de indução de calos. Embrapa Amazônia Ocidental, 2010.

2,4-D (em μM)	% explante com início de calogênese	% germinação	% germinação incompleta ou anormal	% embrião entumescido	% embrião inerte
679,5	0	10,7	57,1	17,9	14,3
226,5	0	46,4	42,9	10,7	0,0
0 (controle)	0	85,7	3,6	7,1	3,6

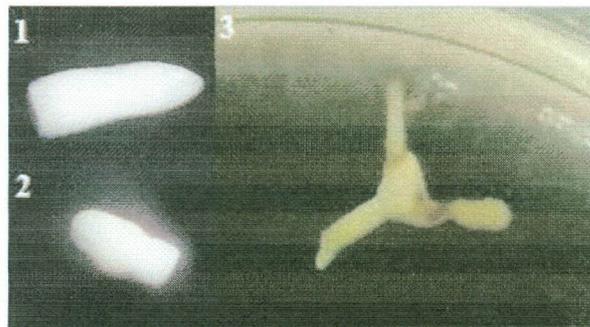


Figura 1 – Aspecto dos explantes maduros após 30 dias *in vitro*. 1. Embrião zigótico inerte; 2. Embrião zigótico intumescido; 3. Germinação do embrião zigótico. Embrapa Amazônia Ocidental, 2010.

Experimento 2 – Resultados preliminares da indução de calogênese em embriões zigóticos imaturos de híbrido interespecífico dendê x caiaué.

Da mesma maneira que os embriões imaturos do experimento anterior, os explantes imaturos ao final de 7-10 apresentaram intumescimento, e em seguida o rompimento dos tecidos para formação dos calos, ou em alguns casos o início da germinação entre 15-20 dias após cultura.

Os embriões imaturos apresentaram uma resposta morfogênica ao final de 30 dias, onde a porcentagem de germinação média foi de 8 e 12%, nos tratamentos de 453 e 679,5 μM de 2,4-D, respectivamente (Tabela 2). Esta reação pode estar relacionada à exigência nutricional do explante para que ocorra o desenvolvimento e o crescimento do embrião imaturo. Entretanto, o meio utilizado foi mais eficiente na indução de calos primários tanto na base de embriões com germinação parcial, com 60 e 38% (453 e 679,5 μM de 2,4-D) ou sobre todo o explante 24 e 38% (453 e 679,5 μM de 2,4-D). A ocorrência de embriões sem reação morfogênica após 30 dias de cultura pode ser consequência da viabilidade do embrião e de danos mecânicos no processo de extração da amêndoa.

Conforme Ammirato (1983), na maioria das plantas e em especial nas monocotiledôneas, o 2,4-D é responsável por conferir competência embriogênica aos tecidos cultivados *in vitro*, e desta forma o estágio de desenvolvimento do explante torna-se particularmente importante no processo embriogênico. Neste sentido, a porcentagem de calos formados neste ensaio pode ser considerada elevada em ambas as concentrações, como consequência da interação entre a fase de maturação do embrião com a concentração do 2,4-D.

Tabela 2 – Comportamento de explantes de híbrido interespecífico dendê x caiaué, após 30 dias de cultura em meio de indução de calos. Embrapa Amazônia Ocidental, 2010.

2,4-D (em μM)	% embriões germinados	% germinados com calo	% calo	% explante inerte
453	8,0	60,0	24,0	8,0
650	12,0	38,0	38,0	12,0

Diversos estudos foram realizados atualmente para a verificação do estágio ideal do embrião que promova maior porcentagem de calogênese e embriogênese somática com vistas à regeneração. Guerra e Handro (1998) obtiveram sucesso com embriões de 180 dias de *Euterpe edulis*, enquanto para Teixeira et al. (1993) a porcentagem de calos embriogênicos compactos foi de 28,6% para embriões de 91 dias e de 0% para embriões maduros com 140 dias.

Experimento 3 – Resultados preliminares do efeito de diferentes meios de cultura na indução da embriogênese somática a partir de embriões zigóticos imaturos de híbrido interespecífico dendê x caiaué.

Quando se avaliou a influência dos meios de cultura na indução de embriogênese somática, verificou-se que a formação de calos friáveis foi similar entre os dois meios. No entanto, o meio N6 apresentou 17,5% de calos compactos, superior aos 5,6% do meio Y3. Resultados similares foram obtidos por Muniran et al. (2008) que ao compararem a eficiência de meio Y3 e N6 suplementados por 2,4-D na indução de calos em *E. guineensis*, verificaram que ao final de 120 dias somente o meio Y3 formou calos embriogênicos, enquanto no meio N6 os calos eram compactos.

Tabela 3 – Efeito da composição do meio de cultura na formação de calos embriogênicos a partir de embriões zigóticos de híbrido interespecífico dendê x caiaué, após 120 dias de cultura.

Meio de cultura	% de calo friável	% de calo compacto	% de calos oxidados
Y3	47.2	5.6	38.9
N6	40.0	17.5	42.5

A suplementação do meio de cultura com carvão ativado e PVP em razão da elevada concentração da auxina (680 μM), não foi eficiente no controle do processo degenerativo dos calos ao decorrer dos 120 dias de cultura em ambos meios. Em determinadas espécies, períodos prolongados em meios de cultura com elevada concentração de 2,4-D, resultaram na perda da competência, senescência e morte de calos embriogênicos (COSTA, 2006). De acordo com Teixeira (1993) o nível de oxidação pode ser reduzido com o uso de compostos nitrogenados tais como arginina, asparagina, glutamina e caseína, visto que o efeito destes está relacionado com o favorecimento do crescimento do calo, resultando no menor acúmulo de compostos fenólicos e escurecimento do tecido. O mesmo autor afirma que subculturas frequentes para meio de mesma formulação de tecidos não oxidado contribuem para o controle deste processo.

A indução de calos friáveis foi considerada baixa em ambos meios testados, comprometendo a fase seguinte de manutenção para o estabelecimento de processos de multiplicação clonal massal para o dendê. Visando a progressão das culturas embriogênicas, é recomendável que novas condições de cultura sejam

investigadas, tais como a alteração na concentração do carvão ativado, reguladores de crescimento pelas possíveis interações com reguladores endógenos dos calos friáveis, e suplementações com vitaminas e aminoácidos.

Experimento 4 – Resultados preliminares do efeito de diferentes reguladores de crescimento na indução da embriogênese somática em embriões zigóticos imaturos de híbrido interespecífico dendê x caiaué.

De acordo com a Tabela 4, as respostas morfológicas foram distintas no meio Y3 suplementado com os reguladores 2,4-D, picloram e dicamba, ao final de 90 dias de cultivo. A germinação completa dos embriões somente ocorreu no meio suplementado com 498,3 μM de 2,4-D.

Tabela 4 – Influência de diferentes reguladores de crescimento na formação de calos embriogênicos a partir de embriões zigóticos imaturos de híbrido interespecífico dendê x caiaué. Embrapa Amazônia Ocidental, 2010.

Regulador de crescimento	% germinação	% calo	% germinação e calo
2,4-D	61,7	4,3	34,0
Picloram	0	96,8	4,2
Dicamba	0	86,8	13,2

Em geral, os tecidos competentes a partir do explante utilizado se diferenciaram em calos embriogênicos com aspecto granular principalmente sob a ação do Picloram, enquanto que os calos obtidos com 2,4-D eram menores e pouco friáveis e, com o Dicamba, mais compactos. Resultado similar foi obtido por Steimacher et al. (2007) trabalhando com embriogênese somática de pupunha (*Bactris gasipaes*), que obtiveram a melhor resposta na produção de calos embriogênicos em tecido de inflorescência com 300 μM de Picloram. Maciel et al. (2010) em explantes embriões zigóticos imaturos de pupunha obtiveram de 20 a 34% de calos cultivados em 2,4-D e Picloram, respectivamente.

CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho indicaram a necessidade de ajustes nas condições de cultura *in vitro* de embriões zigóticos de híbrido interespecífico de dendê africano x caiaué, considerando que:

- o 2,4-D em altas concentrações promoveu a germinação de embriões maduros em meio de indução à calogênese;
- a adição de agentes oxidantes em meio Y3 e N6 com 2,4-D não inibiu completamente a oxidação de calos embriogênicos;
- o uso do Picloram promoveu melhor formação de estruturas friáveis a partir de embriões zigóticos imaturos.

AGRADECIMENTOS

À FINEP – Financiadora de Estudos e Projetos, por proporcionar recursos para o desenvolvimento deste projeto de pesquisa.

Ao CNPq, pela cessão de bolsas de pesquisas de Desenvolvimento Tecnológico e Industrial (DTI).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVARD, D., COTE, F., TEISSON, C. Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.32, p.55-60, 1993.
- AMMIRATO, P. V. Embryogenesis. In: EVANS, D.A., SHARP, W.R., AMMIRATO, P.V., YAMADA, Y. **Handbook of plant cell culture**, v.1., p.82-123, 1983.

- ANGELO, P.C.S., MORAES, L.A.C.; SOUSA, N.R., LOPES, R., CUNHA, R.N.V. Germinação *in vitro* de embriões do híbrido dendezeiro (*Elaeis guineensis*) x Caiaué (*E. oleifera*). In: 2º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel, 2005, Varginha, MG. **Anais do 2º CBPO**, Disponível em CD-ROM. 2005.
- BARCELOS, E., LOPES, R., CUNHA, R.N.V. Uso do germoplasma caiaué (*Elaeis oleifera* Kunth, Cortez) no melhoramento genético do dendezeiro (*E. guineensis* Jacq.). In: 1º ENCONTRO DE GENÉTICA DA REGIÃO NORTE/4º ENCONTRO DE GENÉTICA DO AMAZONAS, 2003, Manaus, AM. **Sociedade Brasileira de Genética**, p. 34, 2003.
- BARCELOS, E., MORALES, E.A.V. **Limitações, avanços tecnológicos e perspectivas para a transferência de tecnologia no Agronegócio do dendê**. In: MÜLLER, A.A., FURLAN JÚNIOR, J. Agronegócio do dendê: uma alternativa social, econômica e ambiental para o desenvolvimento sustentável da Amazônia. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2001. p.125-130.
- CHEHMALEE, S., TE-CHATO, S. Induction of somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured zygotic embryo of oil palm. **J.Agr. Tech**, v.4, p.137-46, 2007.
- CHU, C.C., WANG, C.C., SUN, C.C., HSU, C., YIN, K.C., CHU, C.Y., BI, F.Y. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. **Sci.Sin.**, v.18, p.659, 1975.
- COSTA, A.S. Sustentabilidade da produção de alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham.): **Micropropagação visando à conservação *in vitro***. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) - Universidade Federal de Sergipe, Sergipe. 2006. 70 f.
- CUNHA, R.N.V., LOPES, R., BARCELOS, E., RODRIGUES, M.R.L., TEIXEIRA, P.C., ROCHA, R.N.C. Produção de híbridos interespecíficos entre o Caiaué (*Elaeis oleifera* Kunt, Cortez) e o Dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.). In: 2º CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL, 2005, Varginha, MG. **Anais...** Disponível em CD-Rom. 2005.
- EEUWENS, C.J. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera* L.) and culture *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, v. 36. p. 23-28, 1976.
- GORRET, N., ROSLI, S.K., OPPENHEIM, S.F., WILLIS, L.B., LESSARD, P.A., RHA, C., SINSKEY, A.J. Bioreactor culture of oil palm (*Elaeis guineensis*) and effects of nitrogen source, inoculum size, and conditioned medium on biomass production. **Journal of Biotechnology**, v.108, p.253-263, 2004.
- GUERRA, M. P.; HANDRO, W. Somatic embryogenesis and plant regeneration in different organs of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae): Control and structural features. **Journal of Plant Research**, v. 111, n. 1, p. 65-71, 1998.
- HARDON, J. J., TAN, G.Y. Interspecific hybrids in the *Elaeis*. I. Crossability, cytogenetics and fertility of F1 hybrids of *E. guineensis* x *E. oleifera*. **Euphytica**, v. 18, p. 372-379, 1969.
- HARTLEY, C.S.W. **The oil palm**. England: Tropical Agriculture, 1988. 761p.
- HU, C. Y., FERREIRA, A.G. Cultura de embriões. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/SPI, 1998. v. 1. p. 371-393.
- JACQUEMAND, J.H.; DURAN-GASSELIN, T. Production of improved oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). Planting material: production from seed and clonal methods. In: International Symposium on the Science of Oil Palm Breeding. **Proceedings**. Montpellier, França, 1992.
- JALIGOT, E., RIVAL, A., BEULE, T., DUSSERT, S., VERDEIL, J.L. Somaclonal variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.): the DNA methylation hypothesis. **Plant Cell Reports**, v.19, p.684-690, 2000.
- LEDO, A. da S., LAMEIRA, O.A., BENBADIS, A.K., MENEZES, I.C. de, OLIVEIRA, M. do S.P. de, FILHO, S. M. Embriogênese somática em embriões zigóticos de *Euterpe oleracea* Mart. **Revista Brasileira Fruticultura**, v.24, n.3, 2002.
- LORENZO, J.C., GONZALEZ, B.L., ESCALONA, M., TEISSON, C., ESPINOSA, P., BORROTO, C. Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.54, p.197-200, 1998.
- MACIEL, S. de A., FERMINO Junior, P.C.P., SILVA, R.A. da, SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. Morpho-anatomical characterization of embryogenic calluses from immature zygotic embryo of peach palm during somatic embryogenesis. **Acta Scientiarum**, v. 32, n. 2, p. 263-267, 2010.
- MUNIRAN, F., BHORE, S.J., SHAH, F.H. Micropropagation of *Elaeis guineensis* Jacq. 'Dura': Comparison of three basal media for efficient regeneration. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.46, p.79-82, 2008.
- oil palm. **Plant Cell Reports**, v. 13, n. 5, p. 247-250, 1994.
- OIL WORLD. Oil World Annual, 2005. Hamburg: ISTA Mielke.
- RIVAL A., PARVEEZ, M. *Elaeis guineensis*, oil palm. In: Litz, R. **Biotechnology of fruit and nut crops**. Biotechnology in agriculture series. CABI Publishing: Wallingford, p.113-143, 2004.

- SCHWENDIMAN, J., PANNETIER, C., MICHAUX-FERRIERE, N. Histology of Somatic Embryogenesis from Leaf Explants of the Oil Palm *Elaeis guineensis*. **Annals of Botany**, v.62, p.43-52, 1988.
- STEINMACHER, D.A., CANGAHUALA-INOCENTE, G.C., CLEMENT, C.R., GUERRA, M.P. Somatic embryogenesis from peach palm zygotic embryos. **In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant**, v.43, p.124-132, 2007.
- TEIXEIRA, J. B., SÖNDAHL, M. R., NAKAMURA, T., KIRBY, E. G. Establishment of oil palm cell suspensions and plant regeneration. **Plant Cell Tissue, and Organ Culture**, v. 40, p.105 - 111, 1995.
- TEIXEIRA, J.B., SÖNDAHL, M.R., KIRBY, E.G. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of oil palm. **Plant Cell Tissue, and Organ Culture**, v. 34, p. 227-233, 1993.
- TOUCHET, B., DUVAL, Y., PANNETIER, C. Plant regeneration from embryogenic suspension culture of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Plant Cell Reports**, v.10, p. 529, 1991.