



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**

**Embrapa**

**Amazônia Oriental**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA - UFRA**

**EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA**

**DOUTORADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**SEBASTIÃO DA CUNHA LOPES**

**REGENERAÇÃO *IN VITRO* DE HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS DA PALMA DE ÓLEO**

**(*E. oleifera* x *E. guineensis*)**

**BELÉM**

**2013**



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**

**Embrapa**

**Amazônia Oriental**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA - UFRA**

**EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA**

**DOUTORADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**SEBASTIÃO DA CUNHA LOPES**

**REGENERAÇÃO *IN VITRO* DE HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS DA PALMA DE ÓLEO**

**(*E. oleifera* x *E. guineensis*)**

Tese apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Curso de Doutorado em Ciências Agrárias: área de concentração Agroecossistemas da Amazônia, para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Alberto Gazel Yared

Co-orientador: Dr. Oriel Filgueira de Lemos.

**BELÉM**

**2013**



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

**Embrapa**

*Amazônia Oriental*

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA – UFRA

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA

DOUTORADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

SEBASTIÃO DA CUNHA LOPES

REGENERAÇÃO *IN VITRO* DE HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS DA PALMA DE  
ÓLEO (*E. oleifera* x *E. guineensis*)

Tese apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do  
Curso de Doutorado em Ciências Agrárias: área de concentração Agroecossistemas da  
Amazônia, para obtenção do título de Doutor.

Aprovada em 30 outubro de 2013

BANCA EXAMINADORA

Dr. Jorge Alberto Gazel Yared - Orientador

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

Dra. Simone de Miranda Rodrigues - 1º Examinador

Embrapa Amazônia Oriental

Prof. Dra. Demora Gomes de Araujo - 2º Examinador

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

Dr. Sergio Augusto Oliveira Alves - 3º Examinador

BIOVALE

Dra. Elisa Ferreira Moura Cunha - 4º Examinador

Embrapa Amazônia Oriental

## DEDICATÓRIA

Dedico primeiramente ao Senhor Jesus por está presente em todos os momentos de minha vida permitindo que eu aprenda com os meus erros e acertos durante minha existência nesse mundo. A minha mãe Joana por ter me gerado, alimentado, educado e me criado com todas as dificuldades. A minha esposa Surama que com paciência nunca desistiu de mim, a meus filhos flexa de minha continuidade que me deram sempre força para eu continuar minha caminhada, a minha eterna parceira Darlene que ao confiar em mim compartilhou com muita paciência seu conhecimento comigo. *In memoriam* ao meu pai Sebastião Nunes, que me ensinou a ser um ser cada vez melhor.

## AGRADECIMENTOS

À FAPESPA pelo financiamento do projeto, que sem esse recurso seria difícil à realização dessa tese.

À Embrapa Amazônia oriental por permitir a utilização do laboratório de Biotecnologia, em que foram realizados todos os experimentos.

Ao meu orientador Dr. Jorge Alberto Yared que sem me conhecer diretamente confiou em participar da orientação.

Ao Dr. Oriel Filgueiras pela amizade, confiança e com brilhantes sugestões contribuiu para o desenvolvimento dessa tese.

A Dra. Simone Miranda que em conversas contribuiu para sanar minhas dúvidas.

Ao pesquisador José Edmar Urano pelas sugestões e apoio na realização dos experimentos.

A pesquisadora Walnice Maria do Nascimento pelas sugestões durante a realização dos experimentos.

A Assistente A Aline que ao repassar dicas importantes também contribui para essa tese e minha formação.

Ao assistente José Gilberto e ao Técnico José Carlos Dias que deram todo apoio na realização dos experimentos.

As colegas de curso Brígida, Katia, Ruth, pela amizade e companheirismo durante a realização do curso de pós-graduação.

A amiga Ilmarina Campos de Menezes pela amizade e presença durante minha formação no laboratório.

E a todos que contribuíram direta e indiretamente para realização dessa tese eu agradeço.

## BIOGRAFIA

Sebastião da Cunha Lopes, nascido em Belém do Pará no dia 01 de Julho de 1969, filho de Sebastião Nunes Lopes e Joana da Cunha Lopes, engenheiro agrônomo formado em 1997 na Universidade Federal Rural da Amazônia, antiga FCAP, é mestre em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas (UFPel) em 2000, iniciou o doutorado em 2009 finalizando em 2013. Atualmente é professor da Universidade do Estado do Pará.

---

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| LISTA DE SÍMBOLOS                                                                                                                                                        | 10 |
| LISTA DE FIGURAS                                                                                                                                                         | 11 |
| LISTA DE TABELAS                                                                                                                                                         | 15 |
| RESUMO                                                                                                                                                                   | 18 |
| ABSTRACT                                                                                                                                                                 | 20 |
| 1. CONTEXTUALIZAÇÃO                                                                                                                                                      | 22 |
| 1.2. OBJETIVO GERAL                                                                                                                                                      | 30 |
| 1.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS                                                                                                                                               | 30 |
| 1.4. PROBLEMA                                                                                                                                                            | 30 |
| 1.5. HIPÓTESES                                                                                                                                                           | 30 |
| 1.6. REFERÊNCIAS                                                                                                                                                         | 32 |
| 2. PRODUÇÃO DE MUDAS <i>IN VITRO</i> DE HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS ( <i>ELAEIS GUINEENSIS</i> X <i>ELAEIS OLEÍFERA</i> ) DA PALMA DE ÓLEO, A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS | 36 |
| RESUMO                                                                                                                                                                   | 36 |
| ABSTRACT                                                                                                                                                                 | 37 |
| 2.1 INTRODUÇÃO                                                                                                                                                           | 38 |
| 2.2 MATERIAL E MÉTODOS                                                                                                                                                   | 43 |
| 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO                                                                                                                                               | 46 |
| 2.4 CONCLUSÃO                                                                                                                                                            | 68 |
| 2.5 REFERÊNCIAS                                                                                                                                                          | 69 |
| 3. ASPECTOS SOBRE A EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM INFLORESCÊNCIA DE HÍBRIDO INTERESPECÍFICO DE PALMA DE ÓLEO ( <i>ELAEIS GUINEENSIS</i> X <i>ELAEIS OLEÍFERA</i> )            | 73 |
| RESUMO                                                                                                                                                                   | 74 |
| ABSTRACT                                                                                                                                                                 | 75 |
| 3.1 INTRODUÇÃO                                                                                                                                                           | 76 |
| 3.2 MATERIAL E MÉTODOS                                                                                                                                                   | 79 |
| 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO                                                                                                                                               | 82 |
| 3.4 CONCLUSÃO                                                                                                                                                            | 97 |
| 3.5 REFERÊNCIAS                                                                                                                                                          | 98 |

### 3.6 CONCLUSÕES GERAIS

102

### LISTA DE TABELA DO APÊNDICE

105

## Lista de símbolos

- MS- Meio de cultura MS (Murashigue; Skoog, 1962)
- $\frac{1}{2}$  MS- Metade dos sais de MS
- % U- percentagem de umidade
- $\mu$ M- unidade de concentração em micro mol
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ - Ácido fosfórico
- 2,4-D- Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
- ANA- Ácido naftaleno acético
- AIB- Ácido indol butírico
-

| Lista de figura                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | pág. |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| <b>Figura 1.</b> Inflorescência feminina imatura do Híbrido interespecífico (HIE): a- Inflorescência Feminina aderida à planta; b-Inflorescência fechada; c- Espata interna (ei) e externa (ex); d- Rafes imaturas; e- flores femininas (botão floral); f- flor masculina rudimentar (estaminódio).                                                                            | 23   |
| <b>Figura 2.</b> Embrião do híbrido interespecífico da palma de óleo ( <i>E. oleífera</i> x <i>E. guineensis</i> ) colorido pelos sais de tetrazólio, evidenciando: parte superior e haustório.                                                                                                                                                                                | 44   |
| <b>Figura 3.</b> Embrião do híbrido interespecífico da palma de óleo ( <i>E. oleífera</i> x <i>E. guineensis</i> ): a- embrião; b- eixo embrionário. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013.                                                                                                                                                                               | 48   |
| <b>Figura 4.</b> Percentagem (%) de germinação de híbridos de palma de óleo ( <i>E. oleífera</i> x <i>E. guineensis</i> ), na primeira semana, em que foram submetidos às temperaturas de 25 e 39 °C (médias seguidas pelas letras minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, não diferiram entre si, pelo teste de Tukey, a 5%). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013. | 50   |
| <b>Figura 5.</b> Percentagem (%) de germinação de híbridos de palma de óleo ( <i>E. oleífera</i> x <i>E. guineensis</i> ), na terceira semana, em que foram submetidos às temperaturas de 25 °C e 39 °C (médias seguidas pelas letras minúsculas, não diferiram entre si, pelo teste de Tukey, a 5%). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013.                              | 51   |
| <b>Figura 6.</b> Média do número de embriões contaminados de híbridos de palma de óleo ( <i>E. oleífera</i> x <i>E. guineensis</i> ), na terceira semana, em que foram submetidos às temperaturas de 25 °C e 39 °C (médias seguidas pelas letras minúsculas, não diferiram entre si, pelo teste de Tukey, a 5%). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013.                   | 52   |

**Figura 7.** Altura média de híbridos de palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineensis*), na terceira semana, em temperaturas de 25 °C e 39 °C (médias seguidas pelas letras minúsculas, na linha e coluna não diferiram entre si, pelo teste de Tukey, a 5%). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013.

53

**Figura 8.** Enraizamento de plântulas de híbridos interespecíficos de palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineensis*), submetidos a diferentes concentrações de ANA após transferência para o meio de cultura MS. Evidenciando: a- Plântulas do híbrido CQ 362 com raiz; b- Plântula vigorosa do híbrido com dois folíolos; c- Raiz primária e secundária, sem pelos absorventes do híbrido CQ 362; d- Plântulas enraizadas do híbrido CQ362 nas concentrações de 1,0 e 2,0 mg L<sup>-1</sup>, da esquerda para direita. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013.

55

**Figura 9.** Comparação de médias para o número de plantas enraizadas *in vitro* de híbridos de palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineensis*), submetidos a diferentes concentrações de ANA (1,0; 2,0 e 3,0 mg L<sup>-1</sup>). (médias seguidas pelas letras minúsculas, não diferiram entre si, pelo teste de  $\chi^2$ , a 5% de probabilidade). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013.

56

**Figura 10.** Comparação de médias para o número de plantas enraizadas *in vitro* de híbridos CQ 362 e CQ 246 de palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineensis*), submetidos a diferentes concentrações de ANA. (médias seguidas pelas letras minúsculas, não diferiram entre si, pelo teste de  $\chi^2$ , a 5% de probabilidade). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013.

58

**Figura 11.** Comparação de médias do número de raízes formadas em plantas enraizadas de híbridos de palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineensis*), submetidos a diferentes concentrações (1,0; 2,0 e 3,0 mg L<sup>-1</sup>) de ANA. (médias seguidas pelas letras minúsculas, não diferiram entre si, pelo teste de  $\chi^2$ , a 5% de probabilidade). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013.

59

**Figura 12.** Raízes de plântulas de híbridos interespecíficos de palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineensis*). Evidenciando: a- Raiz primária (rp) e secundária (rs) do

híbrido CQ 246 obtida da germinação *in vitro* em meio MS; b- Raízes do híbrido CQ 362 obtida da germinação *in vitro* em meio MS; c- Raízes do híbrido CQ 362 induzidos na concentração de 1,0 mg L<sup>-1</sup> ANA; d- Raízes do híbrido CQ 362 induzidos na concentração de 2,0 mg L<sup>-1</sup> ANA, adventícia (ra);. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013.

60

**Figura 13.** Comparação do comprimento médio de raízes formadas em plântulas de híbridos de palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineensis*), submetidos a diferentes concentrações (1,0; 2,0 e 3,0 mg L<sup>-1</sup>) de ANA. (médias seguidas pelas letras minúsculas, não diferiram entre si, pelo teste de  $\chi^2$ , a 5% de probabilidade). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013.

61

**Figura 14.** Percentagem (%) de sobrevivência de plântulas de híbridos interespecíficos (CQ 246 e CQ 362) de palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineensis*), aclimatizadas em tubetes com diferentes substratos. (médias seguidas pelas letras minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, não diferiram entre si, pelo teste de Tukey, a 5%). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013.

64

**Figura 15.** Número de folhas de plântulas dos híbridos interespecíficos (CQ 246 e CQ 362) de palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineensis*), aclimatizadas em tubetes com diferentes substratos. (médias seguidas pelas letras minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, não diferiram entre si, pelo teste de Tukey, a 5%). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013.

66

**Figura 16.** Aclimatização de plântulas normais de híbridos interespecíficos de palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineensis*), em tubetes. Evidenciando: a- Híbrido CQ 362, no substrato terra preta + pó de coco; b- Testemunha do Híbrido CQ 362, no substrato terra preta + palha de arroz; c- vigor da plântula do híbrido CQ 362, no substrato de terra preta + palha de arroz ; d- vigor da plântula do híbrido CQ 362, no substrato de terra preta. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013.

67

**Figura 17.** Desinfestação de segmento de ráquila da inflorescência de híbridos interespecíficos de palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineensis*), com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio por 15 minutos, durante 30 dias de cultivo *in vitro*. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013.

85

**Figura 18.** Ráquila da Inflorescência de híbridos interespecíficos de palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineensis*), em cultivo *in vitro*: a- Ráquila sendo segmentada; b- Botão floral (bf) aderido pela base a ráquila; c- Ráquila com botão floral inserido; d- Ráquila em corte transversal; e- Ráquila segmentada com botão floral (bf) e tecidos fibroso (tf), ambos não oxidados; f- Ráquila com tecidos fibrosos oxidados e botões florais alongados. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013.

86

**Figura 19.** Gráfico de regressão polinomial para concentrações de Picloram combinado com BAP (0,0; 25 e 50  $\mu$ M) em relação a média da variável percentagem (%) de intumescimento de botão floral de híbrido interespecífico de palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineensis*). Durante 90 dias em cultivo *in vitro*. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013.

90

**Figura 20.** Ráquila de híbrido interespecífico da palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineensis*), submetidos a auxinas Picloram e 2,4-D em combinação com BAP. Durante 90 dias em cultivo *in vitro*. Evidenciando: a- Botão floral com sépalas (se) e gineceu (g) intumescidos; b- Botão floral oxidado e não alongado; c- botão floral alongado e não intumescido; d- verticilos protetores internos e externos do botão floral. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013.

91

**Figura 21.** Explantes de inflorescência utilizados para indução da embriogênese somática de híbrido interespecífico da palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineensis*), submetidos à concentração de 450  $\mu$ M de Picloram. Durante 66 dias em cultivo *in vitro*. Evidenciando: a- Botão floral inteiro (se); b- Estaminódio (stm) inserido na ráquila pelo pedúnculo (pd); c- Bráctea; d- Estaminódio aberto com verticilo protetor (vp) e estames (et); e- Ráquila com botão; f- Ráquila sem botão; g- Botão segmentado; h- Espata interna. Embrapa Amazônia Oriental,

Belém, PA, 2013

93

### Lista de tabela

pág.

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1.</b> Percentagem de umidade em sementes dos híbridos interespecífico de palma de óleo ( <i>E. oleífera</i> x <i>E. guineensis</i> ), sob teor de água em base úmida. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013                                                                                                                                    | 46 |
| <b>Tabela 2.</b> Teste de tetrazólio para embriões (x16) de híbridos interespecíficos de palma de óleo ( <i>E. oleífera</i> x <i>E. guineensis</i> ), submetidos a imersão por 17 horas em solução de sais de tetrazólio a 0,5% a 39 °C, no escuro. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013.                                                                | 47 |
| <b>Tabela 3.</b> Análise da variância para percentagem (%) de germinação na primeira (1ª sem.) e terceira semana (3ª sem.); percentagem (%) de contaminação e altura das Plântulas (Alt.) dos híbridos interespecíficos ( <i>E. oleífera</i> x <i>E. guineensis</i> ), submetidos a temperaturas de 25 °C e 39 °C. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013. | 49 |
| <b>Tabela 4.</b> Teste de qui-quadrado para comparação de plantas enraizadas <i>in vitro</i> nos híbridos interespecíficos de palma de óleo ( <i>E. oleífera</i> x <i>E. guineensis</i> ).                                                                                                                                                                     | 56 |
| <b>Tabela 5.</b> Teste de qui-quadrado para comparação entre concentrações de ANA no enraizamento de plantas <i>in vitro</i> de híbridos interespecíficos de palma de óleo ( <i>E. oleífera</i> x <i>E. guineensis</i> ).                                                                                                                                      | 56 |
| <b>Tabela 6.</b> Teste de qui-quadrado para comparação das interações entre híbridos e concentrações de ANA no enraizamento de plantas HIE de palma de óleo ( <i>E. oleífera</i> x <i>E. guineensis</i> ).                                                                                                                                                     | 57 |
| <b>Tabela 7.</b> Análise da variância para as variáveis número e comprimento de raízes de plântulas de híbridos interespecíficos de palma de óleo ( <i>E. oleífera</i> x <i>E. guineensis</i> ), após transferência para o meio de cultura MS. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013.                                                                     | 58 |

**Tabela 8.** Análise da variância para as variáveis percentagem (%) de sobrevivência e número de folhas de plântulas de híbridos interespecíficos de palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineensis*), aclimatizadas em tubetes com diferentes substratos. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013.

63

**Tabela 9.** Efeito de hipoclorito de sódio e estreptomicina na assepsia de inflorescência de híbrido interespecífico de palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineensis*) quanto a contaminação e oxidação de botões florais, durante 15 dias de cultivo *in vitro*. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013.

83

**Tabela 10.** Efeito do antibiótico estreptomicina e Timentin na assepsia de inflorescência de híbrido interespecífico de palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineensis*) quanto a contaminação e oxidação de ráquila, durante 15 dias de cultivo *in vitro*. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013.

84

**Tabela 11.** Comparação de médias das variáveis percentagem (%) de contaminação por fungo, por bactéria e oxidação de ráquila de inflorescência de híbrido interespecífico de palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineensis*), com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (NaOCl) por 15 minutos, durante 30 dias de cultivo *in vitro*. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013.

87

**Tabela 12.** Análise da variância para o efeito dos fatores auxina, concentração de BAP em relação às variáveis percentagem (%) intumescimento, alongamento e oxidação de botões florais de híbridos interespecíficos de palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineensis*) durante 90 dias em cultivo *in vitro*. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013.

88

**Tabela 13.** Comparação de médias das variáveis percentagem (%) de intumescimento, alongamento e oxidação de botão floral de híbrido interespecífico de palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineensis*), submetidos a concentração (0; 225; 450 e 675  $\mu$ M) de auxinas Picloram e 2,4-D em

combinação com BAP (0; 25 e 50  $\mu\text{M}$ ). Durante 90 dias em cultivo *in vitro*. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013.

89

**Tabela 14.** Caracterização das fases de formação das estruturas semelhantes a embriões somáticos obtidas a partir de explantes de botão inteiro da inflorescência do híbrido interespecífico de palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineensis*) submetidos à concentração de 450  $\mu\text{M}$  de Picloram, durante 66 dias em cultivo *in vitro*. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013.

96

**Tabela 15.** Análise da variância para efeito do tipo de explante de inflorescência do híbrido interespecífico de palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineensis*), submetidos à concentração de 450  $\mu\text{M}$  de Picloram, em relação as variáveis percentagem (%) de: intumescimento, embriões somáticos e oxidação. Durante 66 dias em cultivo *in vitro*. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013

94

**Tabela 16.** Comparação de média para tipos de explante obtidos da inflorescência do híbrido interespecífico de palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineensis*), submetidos à concentração de 450  $\mu\text{M}$  de Picloram, em relação as variáveis percentagem (%) de: intumescimento, embriões somáticos e oxidação, durante 66 dias em cultivo *in vitro*. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013.

95

## RESUMO

O híbrido interespecífico da palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineensis*) tem se mostrado dessa espécie. Apesar do lançamento do Híbrido BRS Manicoré, a expansão da cultura tem sido realizada com a importação de sementes de variedades sem a avaliação prévia do comportamento em solo brasileiro. As técnicas de resgate de embrião e embriogênese somática são alternativas a serem aplicadas para solucionar o desafio da oferta de propágulos vegetativos de híbridos. Esse trabalho teve como objetivo produzir mudas a partir do cultivo *in vitro* de embriões zigóticos, desenvolver protocolo de assepsia e selecionar explantes de inflorescência competentes para embriogênese somática de híbrido interespecífico. Para produção de mudas via cultivo de embriões, as pesquisas foram realizadas em três fases: a primeira consistiu em germinar os embriões dos híbridos CQ266, CQ246 e CQ362 em temperaturas de 25 e 39 °C em meio MS; a segunda consistiu em testar o enraizamento das plântulas dos híbridos CQ362 e CQ246 em ANA nas concentrações (1,0; 2,0 e 3,0 mg L<sup>-1</sup>) em meio MS/2 e a terceira foi realizado a aclimatização em tubete das plântulas dos híbridos (CQ362 e CQ246) em substratos (terra preta + pó de coco, terra preta e terra preta + palha de arroz carbonizada). O híbrido CQ362 teve o maior percentual de germinação com 91,5% em temperatura de 39 °C e crescimento de 36,5 mm em três semanas. A concentração de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA foi responsável pelo enraizamento de 100% das plântulas do híbrido CQ362, com número de folhas e tamanho médio de 3,2 e 17,4 mm, respectivamente. O substrato terra preta + pó de coco permitiu que 100% das plântulas do híbrido CQ362 sobrevivessem. Para estabelecimento de condições assépticas, as inflorescências abertas e fechadas foram imersas em álcool (70%), hipoclorito de sódio (1,0 a 2,5%), antibióticos (Estreptomicina e Timentin) e lavagens com água estéril e cultivo em meio básico de cultura com metade da concentração dos sais de MS (MS/2). As variáveis analisadas semanalmente foram: % (percentagem) de contaminação e oxidação. Para indução da embriogênese somática foram testadas diferentes estruturas da inflorescência (brácteas, estaminódios, ráquila, botão floral e espata externa) em meio de cultura MS suplementado com as auxinas Picloram e 2,4-D (0, 225, 450 e 675 µM) e a citocinina BAP (0, 25 e 50 µM). As variáveis analisadas foram % de formação de calos, alongamento, oxidação, intumescimento do botão floral e formação de embriões, semanalmente durante 90 dias. Os resultados indicaram que a inflorescência deve ser coletada fechada, pois reduz a incidência de agentes contaminantes e é desnecessário o uso de antibiótico para assepsia. Constatou-se também que o Picloram é a auxina mais indicada para

induzir o crescimento celular do tecido do botão floral, sendo esta estrutura da inflorescência feminina mais indicada para indução da embriogênese somática de híbridos interespecíficos de palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineensis*).

# ABSTRACT

The interspecific hybrid of oil palm (*E. oleifera* x *E. guineensis*) has been shown to be the only viable alternative to control the advance of the Fatal Yellowing (AF), mainly in northern of Brazil is the largest producer of oil from this species. Despite the launch of the hybrid BRS Manicoré, the expansion of cultivation has been carried out with the importation of seed varieties without prior assessment of behavior in Brazilian soil. The techniques of embryo rescue and the somatic embryogenesis are alternatives to be implemented to solve the challenge of offering hybrid vegetative propagules. This study aimed to produce seedlings from in vitro culture of zygotic embryos develop aseptic protocol and select the appropriate inflorescence explants for somatic embryogenesis of interspecific hybrid. For seedlings via embryo culture, surveys were conducted in three phases: the first consisted of germinating embryos of hybrid CQ266, CQ246 and CQ362 at temperatures of 25 and 39 °C in MS medium, the second was to test rooting of seedlings of hybrid CQ362 and CQ246 in NAA concentrations (1.0, 2.0, and 3.0 mg L<sup>-1</sup>) MS / 2 medium and the third acclimatization was carried out on seedlings of hybrid cartridge (CQ362 and CQ246) substrates (black earth + coconut powder, black soil and black earth + carbonized rice straw). The hybrid CQ 362 had the highest percentage of germination with 91.5 % in the temperature of 39 °C and growth of 36.5 mm in three weeks. The concentration of 1.0 mg L<sup>-1</sup> NAA was responsible for the rooting of seedlings to 100% of hybrid CQ 362, with leaf number and mean size of 3.2 and 17.4 mm, respectively. The black soil substrate + coconut powder allowed 100% of the seedlings of the hybrid CQ362 survived. To establish aseptic conditions, open and closed inflorescences were immersed in ethanol (70%), sodium hypochlorite (1.0 to 2.5%), antibiotics (Streptomycin and Timentin) and washes with sterile water and culture in basal medium culture with half concentration of MS salts (MS/2). The variables analyzed were weekly: % (percent) of contamination and oxidation. For induction of somatic embryogenesis were tested different structures of the inflorescence (bracts, staminodes, ráquila, flower bud and outer sheath) on MS medium supplemented with Picloram and 2,4- D (0, 225, 450 and 675 µM) auxin and BAP (0,25 and 50 µM). The variables analyzed were % of callus formation, elongation, rust, floral bud swelling and formation of embryoid weekly for 90 days. The results indicated that the inflorescence should be collected closed because it reduces the incidence of contaminants and is unnecessary antibiotic use for disinfection. It was also found that the auxin Picloram is the most appropriate to induce cell tissue growth and flower

bud, which is the female inflorescence structure most suitable for induction of somatic embryogenesis in interspecific hybrids of oil palm (*E. oleifera* x *E. guineensis*).

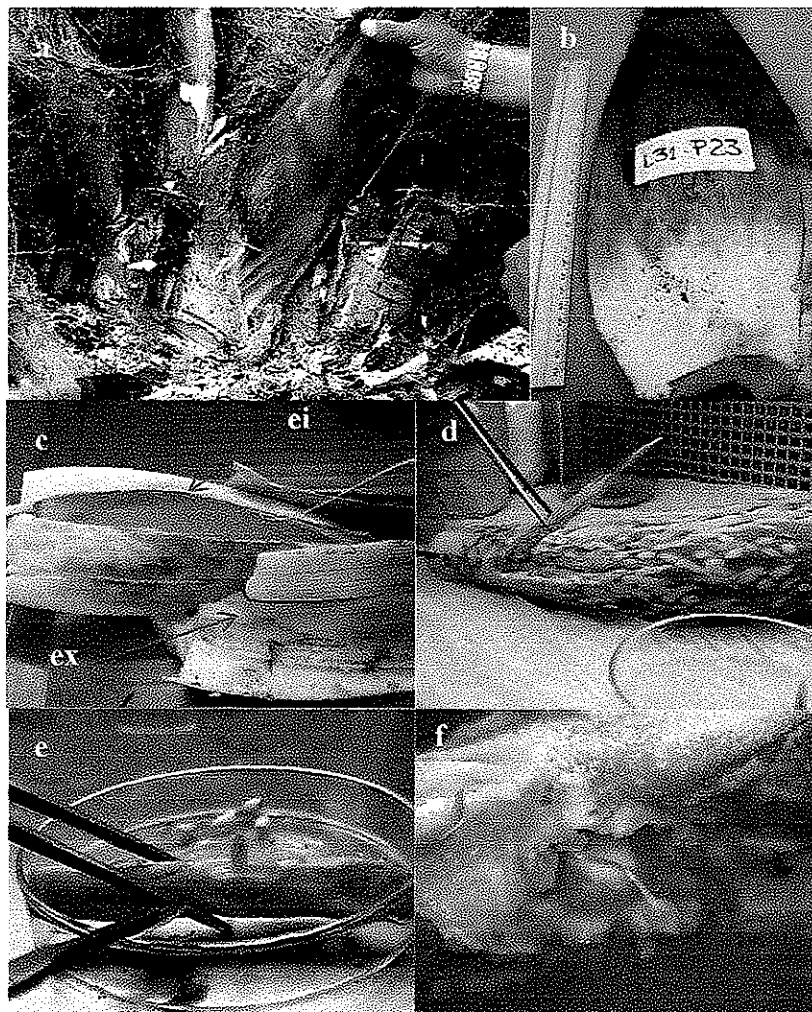
## 1. CONTEXTUALIZAÇÃO

A palma de óleo (*Elaeis guineenses* Jacq.), denominação utilizada internacionalmente e nacionalmente tem-se empregado o mesmo termo em algumas publicações brasileiras a partir de 2010, em substituição a “dendezeiro” ou “Dendê”, pertence a família Arecaceae ou Palmae e cujo o gênero *Elaeis* é de distribuição tropical (África e América Tropical), subfamília Arecoideae, subtribo Elaeidinae, tribo Cocoseae, ordem Arecales foi descrita em 1763 por Nicholas Joseph Jacquim. *Elaeis* é derivado da palavra grega “elaion” que significa óleo e *guineensis* atribuída a sua origem à Costa da Guiné, com duas espécies *E. guineensis* e *E. oleífera* (H.B.K) Cortés (caiaué) (GOMES, 2011).

Segundo informações históricas a palma de óleo foi trazida para o Brasil no século XVII por escravos vindos de diversas regiões da África e que se disseminou espontaneamente principalmente na costa da Bahia, porém teve sua maior expansão por incentivo fiscal do governo na Região Norte do país. A cultura da palma de óleo encontrou no Norte do país condições edafoclimáticas satisfatórias para seu pleno desenvolvimento (MECEDO; RODRIGUES, 2000; CABRAL, 2000; BASTOS, 2000).

A palma de óleo é uma planta monóica, cujas inflorescências possuem sexos separados na mesma planta. As inflorescências são protegidas por duas brácteas fibrosas (espadas), são espádices compostas por espigas na axila de cada folha (Figura 1). As inflorescências possuem dois sexos, porém um é rudimentar (Gomes, 2011). Os frutos são do tipo drupa séssil, mais ou menos esférico e alongado, possuindo 2 a 5 cm de comprimento e 3 a 30 g de peso. A principal característica comercial do fruto é a espessura do endocarpo, controlada por um gene principal, classificando as variedades em três grupos: Dura (sh+ sh+); Psífera (sh-sh-) e Tenera (sh+ sh-), cujas sementes são recomendadas para o plantio comercial (CARVALHO, 2009).

A palma de óleo é considerada a mais produtiva das espécies oleaginosas, seu rendimento de cerca de 3,94 ton./ ha/ano de óleo, enquanto que a soja na mesma área produz 0,38 ton.ha/ano, isto equivale a aproximadamente dez vezes a produtividade da soja, podendo ser explorada pelo menos até 25 anos, somando-se a isso e uma atividade que necessita de muita mão de obra local auxiliando a geração de emprego e renda nos locais de cultivo, além do que palma de óleo é a única espécie oleaginosa que se pode extrair dois óleos: o de palma ou dendê (do fruto) e o de palmiste (da semente)(VILLELA, 2009).



**Figura 1.** Inflorescência feminina imatura do Híbrido interespecífico (HIE): a- Inflorescência Feminina aderida à planta; b-Inflorescência fechada; c- Espata interna (ei) e externa (ex); d- Rafes imaturas; e- flores femininas (botão floral); f- flor masculina rudimentar (estaminódio).

A produção mundial de óleo vegetal na safra 2012/2013 foi de 159,86 milhões de toneladas e a palma de óleo foi responsável por 34,6% dessa produção, superando os 26,9% gerados pela soja. Quanto ao consumo, foi a espécie mais consumida com 53,61 milhões de toneladas (USDA, 2013).

Os maiores produtores de palma de óleo no mundo são Indonésia e Malásia que na safra 2012/2013 produziram cerca de 28,5 e 19, 2 milhões de toneladas de óleo, respectivamente e juntas foram responsáveis por 86,2 % de toda produção mundial que foi de 55,3 milhões de toneladas. Na América Latina o destaque foi para Colômbia que ocupa a quarta posição no ranque mundial com 960 mil toneladas (USDA, 2013). O Brasil em 2011 estava ocupando a 11<sup>a</sup> posição, com cerca de 270 mil de toneladas, entre os anos de 2008 e 2009 foi observado o maior incremento na produção de cerca de 30 mil toneladas (FAOSTAT, 2011). Acredita-se que esse incremento foi resultado do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel

(PNPB), lançado pelo governo federal em 2004, assim como a implementação em 2010 do Programa de produção sustentável da palma de óleo no Brasil que tem como objetivo disciplinar a expansão da produção de óleo de palma no Brasil e ofertar instrumentos para garantir uma produção em bases ambientais e sociais sustentáveis.

O óleo da palma de óleo tem uma gama de utilizações e pode se utilizado pela indústria alimentícia para produção de margarina, cremes, maioneses, tortas, sorvetes, chocolates etc; na indústria de cosmético, na indústria farmacêutica e também na indústria petro-química para produção de biodiesel. De acordo com o contexto nacional, o óleo de palma é uma alternativa para diversificação da matriz energética brasileira, uma vez que pode ser utilizada para produção de biodiesel, com enfoque na inclusão social e no desenvolvimento regional, por se tratar de uma cultura que demanda grande quantidade de mão de obra, principalmente de agricultores familiares, e geradora de emprego e renda.

Segundo o Ministério de Minas e Energia em 2012, a oferta total de bioenergia foi responsável por 28,1% da matriz energética brasileira. Os produtos da cana (bagaço e etanol) responderam por 54,8% da biomassa e por 15% da matriz. A lenha foi responsável por 32,4% da biomassa e por 9,1% da matriz. Outras biomassas (lixívia, resíduos de madeira e da agroindústria e biodiesel) responderam por 12,8% da biomassa e por 3,6% da matriz, enquanto que a produção de biodiesel representou 0,8% da matriz energética brasileira.

Quanto ao aspecto ambiental reduz a produção de CO<sub>2</sub> pela queima de combustível fóssil, protege o solo, sequestradora de carbono, reduz a pressão sobre a floresta etc. Desta forma o governo federal, para incentivar o processo de inclusão social tanto de agricultores quanto de empresas, criou em 2004 o Selo de Combustível Social, que é fornecido às empresas que comprarem matéria-prima de agricultores familiares para produção de biodiesel, com vantagens de acessos a financiamentos, desoneração de certos tributos (PIS/PASEP e COFINS) e participação nos leilões de biodiesel. Enquanto que para o agricultor as vantagens englobam acesso a linha de crédito junto aos bancos, além da assistência técnica oferecida pela empresa.

A participação no Brasil da palma de óleo como mix de matéria-prima para produção de biodiesel ainda é muito pequena e com distribuição irregular durante o ano. Em 2012 a produção de biodiesel foi de 2,7 milhões de m<sup>3</sup> o percentual de participação media da palma de óleo foi apenas de 0,22 % e que gerou a produção de 4,0 mil m<sup>3</sup>, enquanto que a participação da soja foi de 68,74% gerando cerca de 2,0 milhões de m<sup>3</sup> (TAVARES, 2013).

O Pará atualmente não produz biodiesel, apesar de ter duas usinas construídas, uma localizada no município de Tailândia, com capacidade de 13 mil toneladas/ ano, pertencente a Agropalma, outra em Belém com capacidade de 11 mil toneladas/ano, porém ambas se encontram paradas. E a terceira que ainda esta em planejamento pertencente a Petrobras com capacidade de 120 mil toneladas/ano. (HERMAN, 2013).

Apesar do incentivo que houve por parte do Governo Brasileiro a produção de óleo de palma ainda está muito aquém das necessidades nacionais, uma vez que em 2011 o governo importou 214,5 mil toneladas que corresponde a 79,4 % do que se produziu no mesmo período. Segundo Nunes (2013), para satisfazer a demanda nacional seria necessário plantio de 445 mil ha e a produção de 1,7 milhões de toneladas.

Para Venturieri (2011), somente o Pará concentrava em 2010 cerca de 90% dos plantios com a palma de óleo no país, e que a cultura tem necessitado novas áreas para se expandir. De acordo com Nunes (2013), o Pará tem 140 mil ha plantados com a cultura e que segundo o planejamento das nove empresas instaladas no estado, deverá alcançar cerca de 329 mil ha, tornando o Pará o terceiro maior produtor mundial de palma de óleo.

Conforme informações da Secretaria Especial de Estado de Desenvolvimento Econômico e Incentivo a Produção (Sedip), no Pará serão utilizados para plantio nos próximos 15 anos cerca de um milhão de ha de palma. A previsão é que em 10 anos o Pará seja um dos maiores produtores de óleo de palma do mundo (BIODIESEL.COM, 2012).

Ramalho-Filho et al. (2010), ao realizar o zoneamento agroecológico para palma de óleo nas áreas desmatadas da Amazônia Legal, de acordo com a aptidão agrícola e adotando-se o tipo de manejo classificado como B, menos tecnificado, classificaram as áreas em preferencial, regular, marginal e ináptas para o plantio com cerca de 1,45, 4,42, 0,4; 7,67% da Amazônia legal, respectivamente. Para esses autores as áreas aptas correspondem a cerca de 29.655.133 ha, que corresponde 5,87% da Amazônia Legal. Com destaque para o estado do Pará que ocupa o primeiro lugar com 13.121.766 ha.

A expansão da cultura na região deve ser tratada com certa cautela, uma vez que mais estudos necessitam ser realizados no sentido de estigar, avaliar e discutir as atuais políticas públicas, bem como de que forma essa expansão acelerada está influenciando as questões relacionadas as demandas sociais, ambientais e econômicas trazidos por esse empreendimento no entorno das comunidades. Existem ainda poucas informações sobre os benefícios que a expansão da palma de óleo tem gerado aos agricultores no que se refere: aos lucros financeiros nessa atividade, a segurança alimentar, as condições de saúde física e mental, bem como os possíveis impactos ambientais causados pelo uso de insumos agrícolas nos igarapés.

A cultura da palma de óleo tem encontrado alguns entraves regionais para sua expansão dentre as quais tem-se destacado principalmente as questões de regularização fundiária, uma vez que a maioria das terras no Pará não são regularizadas e isso dificulta a participação da agricultura familiar na cadeia produtiva, pela dificuldade de se conseguir financiamento junto aos bancos. Assim como as empresas são impedidas de adquirir novas terras. Outro entrave está relacionado com a parte tecnológica da produção de sementes de cultivares de alta performance que é muito inferior a demanda atual das empresas. E por último, a questão de fitossanidade das variedades da palma de óleo africana que são susceptíveis ao Amarelecimento Fatal (AF), doença que ainda não se sabe o agente etiológico, e que segundo Albertazzi et al. (2005 apud BOARI, 2010) só ocorre na América tropical e tem dizimado grandes plantações comerciais em países como Panamá, Nicarágua, Colômbia, Equador, Suriname e Brasil.

Segundo Brito e Barreto (2011), o programa do governo federal Terra Legal que objetivava fazer a regularização fundiária de terras ocupadas na Amazônia Legal e cuja meta era regularizar no Pará 31.935 posses informais em terras públicas até 2011, no entanto essa meta não foi atingida, pois durante a implantação do programa apenas foram concedidos 332 títulos de terra, que correspondeu a 0,8% dos cadastros e 1,73% da área. Os municípios contemplados com títulos foram: Novo progresso, Concordia do Pará, Altamira, Bujaru, Marabá e Itaituba.

É importante que o programa Terra Legal tenha continuidade, para que as políticas públicas sejam melhor implementadas com a garantia da participação dos demais municípios na cadeia de produção da palma de óleo, visto que os municípios citados acima somente Concordia do Pará e Bujaru estão inseridos como municípios produtores de palma de óleo e tiveram participação em 2011 de 2,22% e 0,42%, respectivamente da produção de palma de óleo (NUNES, 2013).

A produção integrada com as empresas produtoras de palma de óleo no Pará teve início em 2002 com a integradora Agropalma no município de Mojú, na comunidade de Soledade com a participação inicial de 50 famílias. Mais tarde, em 2006 esse número chegaria a 185 famílias com 1700 ha plantados com a palma de óleo (Banco da Amazônia, 2012). No Pará, 889 famílias são responsáveis por 26.095 ha plantados dos 141.653 ha. A estimativa é chegar a 329.000 ha, em 2012 foram gerados 10.914 empregos diretos (NUNES, 2013).

Somente a Biopalma Vale será responsável pela expansão de 80.000 ha, sendo 60.000 em terras próprias e 20.000 ha com agricultura familiar. O projeto prevê também a instalação de duas usinas de extração. A primeira já se encontra em operação com capacidade de 120

toneladas de cachos frutos frescos por hora (cff/h), com rendimento de 25 toneladas de óleo/h. A segunda será iniciada no segundo semestre de 2013, e terá capacidade de extração de 570 toneladas de cachos frutos frescos por hora (cff/h). Além disso, está no planejamento a inauguração em 2015, no município do Acará, uma usina para produção de 200 mil toneladas de biodiesel ano, para atender a demanda da empresa com B20, em toda Região Norte. (HERMAN, 2013).

Segundo o Banco da Amazônia (2013) os financiamentos realizados pelo Pronaf Eco dende na safra 2012/2013 as integradoras: Agropalma, ADM do Brasil, Petrobrás, BioPalma, Marborges e Belém Bioenergia foram responsáveis pela demanda de cerca de 1610 contratos originados com agricultores familiares em 15300 ha plantados com a palma de óleo, gerando o montante de R\$ 124.800.000,00 em crédito de fomento no Pará.

Em relação a doença Amarelecimento Fatal (AF) o primeiro relato no Brasil ocorreu no Pará em 1974, no município de Benevides em plantações com a palma de óleo africana (*E. guineensis*), com explosão epidemiológica dizimando dez anos depois praticamente todo o plantio e se entendendo por um raio de 20 Km (TRINDADE; FURLAN JÚNIOR, 2001).

Segundo Boari (2010), AF é uma ameaça para o desenvolvimento da produção de palma de óleo no Pará, sendo que sua ocorrência ainda está restrita às áreas dos municípios de Benevides, Santa Bárbara, Santa Isabel do Pará, Tomé-açu, Santa Bárbara, Santo Antônio do Tauá, Bujaru, Moju, Belém e Acará.

Nesse contexto pesquisas têm sido realizadas há 30 anos, através de programas de melhoramento para conter o avanço do AF. A alternativa encontrada foi transferência de genes de resistência da variedade *E. oleifera*, denominada de palma americana (Caiaué) de ocorrência espontânea nas Américas, através da hibridação com a palma africana *E. guineenses* (Tenera), que resultou no híbrido interespecífico (HIE) que apresenta características importantes como: porte reduzido, menor acidez e maior teor de insaturação no óleo, resistente ao AF, porém apresenta menor produtividade de óleo e baixa atratividade da inflorescência feminina aos insetos polinizadores, resultando na necessidade da polinização assistida.

Para Cunha et al. (2005) apesar da baixa produtividade do HIE, a variabilidade genética das populações Manicoré e a produtividade das variedades africanas indicam que é possível obter, através do melhoramento genético, variedades de híbridos interespecíficos tão ou mais produtivas que a palma de óleo cultivado comercialmente, bem com se apresenta como opção para plantio em áreas com AF.

Em 2010, foi lançado o híbrido BRS Manicoré, resultante do cruzamento entre a palma de óleo africana de origem La Mé e o caiaué de origem Manicoré, da região Amazônica. A comercialização das sementes dessa cultivar são realizadas pela Embrapa e Denpasa que juntas tem capacidade para produção de 3 milhões de sementes pré-germinadas. (TAVARES, 2013).

O Brasil ainda não é suficiente na produção de sementes e está aquém da demanda atual, nos anos de 2011 e 2012 foram importadas 11.047.445 sementes, totalizando US\$ 21.104.724, cujos principais exportadores foram Costa Rica, Colômbia e Equador. A Costa Rica foi o maior fornecedor da variedade híbrida intraespecífica, enquanto que a Colômbia foi o único fornecedor da variedade HIE (MAPA, 2012).

Apesar da ameaça iminente dos plantios no Pará, as empresas ditas integradoras ainda importam sementes para o plantio da palma de óleo africana da variedade Tenera, que segundo os dados de importação de sementes dos anos de 2011 e 2012 do Ministério da Agricultura, cerca de 74,5% das sementes importadas são Tenera, enquanto que 25,5% são híbridos interespecíficos (HIE).

Para Alves (2011), as empresas que plantam palma de óleo no Pará compram sementes de quatro centros produtores, ASD (Costa Rica), CIRAD (França), Univanish (Tailândia) e Embrapa (CERU), e que os plantios são classificados em três senários. O primeiro com plantas de 25 a 30 anos, que estão sendo renovadas, pertencente a variedade Tenera compradas do CIRAD. O segundo de 15 a 20 anos, com variedades HIE compradas do CIRAD e Embrapa, e a terceira de 0 a 4 anos, compradas da ASD, Univanish, CIRAD e Embrapa.

Acredita-se que as empresas ainda continuam plantando a variedade Tenera em regiões que não houve registro do AF, por serem plantas mais produtivas e não necessitar de polinização assistida, aumentando a rentabilidade do cultivo. Alves (2011) fez recomendação para os quatro polos de produção de palma de óleo, polo Belém, polo Bonito, polo Moju e polo Tomeaçu, levando em consideração a precipitação pluviométrica, casos de AF e resistência a seca. Para o polo Belém deve ser utilizada as variedades *Compacta x Ghana*, *Compacta x Nigéria* e *Deli compacta*; para os polos bonito e Moju foram feitas as mesmas recomendações usadas para o polo Belém e *Deli LaMe* e para o polo Tomeaçu recomendou *Deli Ghana*, *Deli LaMe*, *Compacta x Ghana*, *Compacta x Nigeria* e *Deli Avros*.

Nesse sentido, apesar da utilização de híbridos interespecíficos de palma de óleo ser uma alternativa para conter o avanço do AF, apresenta inconveniente de apresentar baixa

germinação, entorno de 30 a 35,6% (ANGELO et al., 2007; MAQUINE et al., 2012). A produção de sementes pré-germinadas é um processo que demanda longo tempo desde a coleta e beneficiamento do fruto até a exposição do eixo do embrião. Segundo Green (2012) o processo convencional de germinação da palma de óleo africana (*E.guineensis*) é de aproximadamente 130 dias, podendo ser reduzido o período de germinação no termogerminador passando de 80 dias para 60 dias, dependendo do genótipo utilizado.

Diante desse contexto, o desenvolvimento de técnicas biotecnológicas pode ser uma alternativa para permitir desenvolver ou aprimorar protocolos de micropropagação tanto para obtenção de clones quanto para melhorar o processo de germinação de sementes de HIE a patamares de produção comercial, ao auxiliar o mercado brasileiro com a oferta de mudas produzidas *in vitro* e dessa forma oferecer materiais genéticos tanto para o mercado interno quanto para o externo.

Os primeiros trabalhos realizados com resgate de embriões de palma de óleo foi realizado no Brasil com o híbrido interespecífico, focando em estudo de desinfestação, oxidação e formação da plântula *in vitro* (Alves, 2007). Enquanto que Angelo et al. (2007) testou a germinação de HIE em meio MS sólido e líquido e obteve 97 % de germinação em meio líquido.

Segundo Soh et al. (2011), o primeiro registro de regeneração de planta de palma de óleo foi realizada por grupos Britânicos (Unilever) e franceses (CIRAD) em 1974. Porém somente em 1986, a Pesquisa da Agricultura Aplicada (AAR), na Malásia, regenerou e plantou um clone. No mesmo ano foi reportado o surgimento de anormalidade nos frutos resultantes da feminilização das flores masculinas (estames) e estaminoides de flores femininas que se caracteriza pela formação de carpelos suplementares denominados de “Mantled”, podendo causar a total esterilidade das inflorescência ou a redução na taxa de extração do óleo de frutos (CORLEY et al., 1986; GUZMÁN, 2010).

Apesar da presença de anormalidades florais observada nas plantas estabelecidas através de embriogênese somática direta ou indireta, estudos têm indicado que é possível minimizar a presença de flores “Mantled” mediante o controle dos processos *in vitro* como: tempo de cultivo, uso de hormônios, condições de estresse etc. Desta forma é possível a produção comercial de clones de palma de óleo, desde que essa anormalidade fique abaixo de 5% (GUZMÁN, 2010). Para Eeuwens (2002), o surgimento de flores “Mantled” pode variar de 0 a 100% dependendo do status de risco do clone que pode ser: baixo, médio e alto, da duração do intervalo de transferência dos embriões e da composição do regulador de crescimento usado no meio.

Segundo trabalhos recentes publicados sobre propagação da palma de óleo, somente foi realizada para variedades africanas, portanto não se encontrou trabalhos de propagação via embriogênese somática para o híbrido interespecífico. Tem se utilizado vários tipos de explantes para clonagem da palma de óleo dentre os quais: folha e inflorescência imaturas de plantas adultas, raízes (BALZON et al., 2013; EEUWENS, 2002; GUZMÁN, 2010; TEIXEIRA, 1988; TEIXEIRA, 1994), embrião zigótico (KANCHANAPOMM; DOMYOAS, 1999; SILVA et al., 2012; TEIXEIRA et al., 1995; THUZAR et al., 2011,) assim como caule e folhas de planta jovem (CARVALHO, 2009; GUEDES, 2008).

Para produção comercial, tem-se preferido utilizar folha imatura de planta adulta apesar de que o uso desse explante causa maior dano a planta levando maior tempo para a mesma se recuperar, contudo esse tecido produz maior quantidade de calo e maior taxa de clonagem, porém a formação dos embriões ocorre por vias indiretas, que pode ser considerada uma desvantagem. Enquanto o uso de inflorescência imatura tem a vantagem de reduzir o dano a planta, porém com desvantagem de produzir baixa taxa de calos e alta frequência de embriogênese direta (GUZMÁN, 2010).

Segundo Soh et al. (2011), a estimativa mundial para produção de plântulas de palma de óleo, através da cultura de tecido e de cerca de 3,5 milhões/ano e os países produtores são: a Malásia, Costa Rica e Indonésia que produziram cerca de 2,5, 0,5 e 0,5 milhões, respectivamente e que para 2010 a previsão é que esse valor chegasse a 4,81 milhões/ano.

**1.2. Objetivo Geral:** Desenvolver protocolos para produção *in vitro* de plântulas do híbrido interespecífico de palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineensis*).

### **1.3. Objetivos específicos:**

1.3.1. Obtenção de protocolo de cultura de tecidos para o desenvolvimento de plântulas completas *in vitro*, apartir de embriões zigóticos;

1.3.2. Obter protocolo de micropropagação para a indução da embriogênese somática em inflorescência de HIE.

**1.4. Problema:** Baixa produção de sementes e mudas melhoradas e adaptadas as condições edafoclimáticas regionais do híbrido interespecífico (*E. oleífera* x *E. guineensis*) para atender a demanda da expansão da cultura no Brasil.

**1.5.1. Hipótese 1:** Pode-se maximizar a produção de mudas saudáveis do híbrido interespecífico (*E. oleífera* x *E. guineensis*) cultivados *in vitro*, através do resgate de embriões.

**1.5.2. Hipótese 2:** É possível a propagação em grande escala de mudas, através de embriões somáticos do híbrido interespecífico (*E. oleífera* x *E. guineensis*) pela utilização tecido somático de inflorescência feminina.

### **Estrutura da Tese**

A presente tese está estruturada em uma introdução geral, contendo a contextualização do desenvolvimento da dendeicultura no país e no Pará, os objetivos gerais e específicos. Os temas de trabalho são apresentados na forma de capítulos, sendo que o Capítulo I abordará o desenvolvimento de protocolo para produção de plântulas completas de embriões zigóticos *in vitro* de híbridos interespecíficos da palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineensis*); no Capítulo II será estabelecido protocolo de assepsia de inflorescência, assim como avaliar diferentes explantes e meios de para indução da embriogênese somática de híbridos interespecíficos da Palma de Óleo (*E. oleífera* x *E. guineensis*).

## 1.6 REFERÊNCIAS

- ALVES, S. A. O; LEMOS, O. F. de; SANTOS FILHO, B.G. dos; SILVA, A.L.L. da. *In vitro* embryo rescue of interspecific hybrids of palm (*Elaeis oleífera* x *Elaeis guineensis*). **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v.2, n.2, p.1-6, 2011.
- ANGELO, P. C. da S; MORAES, L.A.C; SOUSA, N.R; LOPES, R; CUNHA, R.N.V. da. Resgate de embriões Híbridos de dendezeiro x Caiaué. **Comunicado Técnico**. Manaus, Embrapa. 2007.
- BALZON, T. A.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. New approaches to improve the efficiency of somatic embryos. **In Vitro Cell Dev. Biol. Plant**, v.49, p.41-50, 2013.
- BANCO DA AMAZÔNIA. A experiência do banco da Amazônia com projetos integrados de dendê familiar. Belém. Ano 5, n. 22, jun., 2012.
- BASTOS, T. X. Aspectos agroclimáticos do dendezeiro na Amazônia Oriental. In: VIÉGAS, I. de J. M; MÜLLER. A.A. A cultura do dendezeiro na Amazônia brasileira. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2000. 374p., il.
- Biodiesel.com. Pará investe na produção de biodiesel e do óleo de palma. Disponível em: <http://www.revistabiodieselbr>. Acesso em 12 de dezembro de 2012.
- BOARI, A. de J. O desafio das pesquisas com a etiologia do Amarelecimento Fatal (AF) da cultura da palma de óleo. In: Ramalho Filho et al., A. Zoneamento Agroecológico, Produção e Manejo para a Cultura da Palma de Óleo na Amazônia. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2010. 216 p.il.
- BRITO, B; BARRETO, P. A regularização fundiária avançou na Amazônia? Os dois anos do programa Terra Legal. Belém, PA: Instituto do Homem e Meio Ambiente da Amazônia-IMAZON, 2011. 72 p.
- CABRAL, O. M. R. Microclima de dendezaís na Amazônia ocidental. In: VIÉGAS, I. de J. M; MÜLLER. A. A. A cultura do dendezeiro na Amazônia brasileira. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 374p., il. 2000.
- CARCALHO, M. Embriogênese somática a partir de folhas imaturas e flores desenvolvidas in vitro de dendezeiro (*Elaeis guineenses* Jacq). 2009. 86 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

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

CUNHA, R. N. V. da C; LOPES, R; BARCELOS, E. RODRIGUES, M.do R.L; TEIXEIRA, P.C; ROCHA, R.N.C da. Produção de híbridos interespecíficos entre o Caiaué (*Elaeis oleifera* kunt, cortez) e o dendezeiro (*Elaeis guineensis* jacq.). In: II CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEO, GORDURAS E BIODIESEL REALIZAÇÃO: UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS E PREFEITURA MUNICIPAL DE VARGINHA. 2005, Lavras. Anais. Lavras, p. 292-297, 2005.

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

FAOSTAT. Disponível em: <http://www.faostat.gov> .Acesso em agost. 2013.

GOMES, S. M. da S. Polinizadores e semioquímicos do dendezeiro híbrido (*Elaeis oleifera* (H.B.K.) CORTÉS X *Elaeis guineenses* JACQ). 2011. 65 f. il. Tese (Doutorado em entomologia)- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

GREEN, M. Avaliação da qualidade de sementes de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) produzidas pela Embrapa Amazônia Ocidental. 2012. 79 f. il. Tese (Doutorado em agronomia) – Universidade Federal do Amazonas, 2012.

GUEDES, R. da S. Embriogênese somática e regeneração de plantas de dendezeiro.2008. 126 f. Dissertação (Mestrado em produção vegetal). Universidade Federal do Acre. Rio Branco, 2008.

GUZMAN, N. M. Curso internacional palma aceitera. Costa Rica. ASD de Costa Rica SA. p. 1-13, 2010.

HERMAN, P. Vale avança com megaprojeto de Biodiesel. **Revista BiodieselBR**, Curitiba, ano 6, n.35, p.34-37, jun/jul. 2013.

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

MAQUINÉ, T. M.; QUEIROZ, A. C.; ABREU, S. C.; LIMA, W.A.A. de.; GREEN, M.; RIOS, S. de A. Despolpa mecânica sobre a germinação de sementes do híbrido interespecífico

BRS Manicoré (*Elaeis oelifera* x *Elaeis guineenses*). In: II Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos, 2012, Belém, PA. Anais... Belém, PA: Sociedade Brasileira de recursos genéticos, 2012. p. 664-667.

MAPA. Relatório de importação de sementes no Estado do Pará. Belém, 2012. 10p. (Documento Técnico).

MME. Ministério de Minas e Energia. Energias Renováveis no Brasil. Disponível em <http://www.mme.gov.br/>. Acesso em jul. 2013.

NUNES, I. Programa de dendê estado do Pará. In: I workshop do programa de produção sustentável de palma de óleo no Brasil: Agricultura familiar e P, D & I., Belém, 2013. Anais eletrônicos. Belém: Embrapa, 2013. Disponível em: <http://palmadeoleo.cpatu.embrapa.br>. Acesso em: junho de 2013.

RAMALHO FILHO, A; MOTTA, P.E.F. de; NAIME, U.J; GONÇALVES, A.O; TEIXEIRA, W. G. Zoneamento Agroecológico para a cultura da palma de óleo nas áreas desmatadas da Amazônia Legal. In: Ramalho Filho et al., A. Zoneamento Agroecológico, Produção e Manejo para a Cultura da Palma de Óleo na Amazônia. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2010. 216p.il.

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

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

TAVARES, J. A esperança na palma. **Revista BiodieselBR**, Curitiba, ano 6, n.33, p.34-37, fev/marc. 2013.

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

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

TRINDADE, D. R.; FURLAN JUNIOR, J. Amarelecimento fatal do dendezeiro. In: FURLAN JUNIOR, J.; MULLER, A. A. AGRONEGÓCIO DO DENDÊ: UMA ALTERNATIVA SOCIAL, ECONÔMICA E AMBIENTAL PARA O DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL DA AMAZÔNIA. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2001.p.1-288.

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

USDA (United States departamento of Agriculture). Disponível em: <http://www.fas.usda.gov>. Acesso em jun. 2013.

VENTURIERI, A. Evolução da área plantada com palma de óleo no Brasil, com ênfase no estado do Pará. **Agroenergia em Revista**. ed. 2. P.18, 2011.

VILLELA, A. A. O dendê como alternativa energética sustentável em áreas degradadas da Amazônia. 2009. 65 f. il. Dissertação (Mestrado em planejamento energético)- Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

## Capítulo I

Produção de mudas *in vitro* de híbridos interespecíficos (*E. oleífera* x *E. guineensis*) da Palma de óleo a partir de embriões zigóticos.

### Resumo

O híbrido interespecífico (*E. oleífera* x *E. guineensis*) é atualmente uma alternativa para conter o avanço do Amarelecimento Fatal no Brasil, mas a produção de sementes pré-germinadas dessa variedade é limitada por problemas de ordem fisiológica e não atende empresas do setor para a expansão do cultivo desse material na região. Esse trabalho teve como objetivo desenvolver plântulas a partir do cultivo *in vitro* de embriões zigóticos e aclimatados para produção de mudas de híbridos interespecíficos (HIE). Foram realizados testes básicos de umidade das sementes e testes de tetrazólio nos embriões para verificar a viabilidade. A pesquisa foi realizada em três fases: a primeira consistiu em germinar os embriões dos híbridos CQ266, CQ246 e CQ362 em temperaturas de 25 e 39 °C em meio MS, suplementado com sacarose a 3%, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,017% e phytigel 0,22%; a segunda consistiu em induzir o enraizamento para a produção de plântulas normais dos híbridos CQ 362 e CQ246 em ANA nas concentrações (1,0; 2,0 e 3,0 mg L<sup>-1</sup>) em meio MS/2 suplementado com 3% de sacarose, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,017%, phytigel 0,22% e 3g L<sup>-1</sup> carvão ativado e a terceira consistiu na aclimatização das plântulas dos híbridos (CQ362 e CQ246) em tubetes contendo substratos regionais na proporção de 1:1 (Terra preta + pó de coco; terra preta e terra preta + palha de arroz carbonizada). A imersão de embriões zigóticos por 17 horas em solução de tetrazólio na concentração de 0,5% em temperatura de 39 °C permitiu verificar a viabilidade. O híbrido CQ362 apresentou o maior percentual de germinação de 91,5% em temperatura de 39°C e crescimento de 36,5 mm em três semanas. A concentração de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA foi responsável pelo enraizamento de 100% das plântulas do híbrido CQ362, com número e tamanho médio de raízes de 3,2 e 17,4 mm, respectivamente. O substrato mais indicado para aclimatização em tubete foi a terra preta + pó de coco que permitiu que 100% das plântulas do híbrido CQ 362 sobrevivessem.

Palavras-chave: resgate de embrião, germinação *in vitro*, cultura de tecidos, micropropagação.

### Abstract

The interspecific hybrid (*E. oleifera* x *E. guineensis*) is currently an alternative to stop the progress of Fatal Yellowing in Brazil, but the production of pre - germinated seeds of this variety is limited by problems of physiological order and does not meet companies in the industry to expand the cultivation of this material in the region. This study aimed to develop plantlets from in vitro culture of zygotic and acclimated for seedlings of interspecific hybrids (HIE) embryos. Basic tests of seed moisture and tetrazolium tests on embryos were performed to verify the feasibility. The survey was conducted in three phases: the first consisted of germinating embryos of hybrid CQ266, CQ246 and CQ362 in the temperatures of 25 and 39 °C on MS medium supplemented with 3% sucrose, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.017% and phytagel 0.22 % and the second consisted of inducing rooting in the production of normal seedlings of the hybrid CQ362 and CQ246 in NAA concentrations (1.0, 2.0, and 3.0 mg L<sup>-1</sup>) MS/2 medium supplemented with 3 % sucrose, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.017%, phytagel 0.22% and 3g L<sup>-1</sup> activated charcoal and the third consisted of acclimatization of the plants of hybrids (CQ362 and CQ246) in vials containing substrates regional 1:1 (Earth black + coconut powder, black soil and black earth + carbonized rice straw). The immersion of zygotic embryos for 17 hours tetrazolium solution at a concentration of 0.5 % at a temperature of 39 °C demonstrated the feasibility. The hybrid CQ362 had the highest percentage of germination of 91.5% at a temperature of 39°C and a growth of 36.5 mm in three weeks. The concentration of 1.0mg L<sup>-1</sup> NAA was responsible for the rooting of seedlings to 100% of hybrid CQ362, with number average size of roots and 3.2 and 17.4 mm, respectively. The most suitable substrate for acclimatization in cartridge was black earth + coconut powder that allowed 100% of the seedlings of the hybrid CQ362 survived.

Keywords: embryo rescue, *in vitro* germination, tissue culture, micropropagation.

## 2.1 INTRODUÇÃO

As pesquisas com o híbrido interespecífico surgiram com a necessidade de conter o avanço na América Latina da anomalia amarelecimento fatal (AF) que apesar das intensas pesquisas, não foi encontrado correlação com insetos, problemas fisiológicos, solo e fitopatológicos (BOARI, 2010).

Devido à estreita base genética das variedades africanas introduzidas no banco de germoplasma da Embrapa Amazônia Ocidental, não foi encontrado fonte de resistência nessas variedades. A melhor alternativa para o avanço dos programas de melhoramento genético da palma de óleo foi trabalhar com a introgressão da resistência com a espécie selvagem Americana Caiaué (*E. oleifera*), através da hibridação interespecífica, que além da resistência a pragas, doenças e ao AF, apresenta outras características importantes como maior proporção de ácidos graxos insaturados e crescimento vertical reduzido (ALVES, 2011; CHIA, 2008).

Os primeiros relatos do surgimento de AF na América Latina foram reportados em 1963, na Colômbia, se estendendo pelo Peru, Equador, Suriname, Venezuela e Panamá. No Brasil, foi observado inicialmente nos plantios da empresa Dendê do Pará S/A (DENPASA) em 1974, localizada em Benevides/PA, que dizimou milhares de plantas, e concomitantemente a necessidade da formação de competência tecnológica nacional. Pesquisas têm sido desenvolvidas através do melhoramento genético para desenvolver variedades resistentes ou tolerantes a essa anomalia, fato esse que levou a criação em 1982 do Campo Experimental de Dendê do Rio Urubu (CERU) em Manaus/AM, cujo objetivo é desenvolver variedades promissoras em relação à produção e qualidade de óleo, resistência a doenças e crescimento em altura e produção de sementes (BOARI, 2010).

Após trinta anos de pesquisa com a cultura conseguiu-se grandes avanços na criação de variedades com alta performance, tanto na produção de óleo quanto a resistência a doenças e redução do crescimento vertical. Em 2010 graças ao intenso trabalho nos programas de melhoramento genético foi lançado a cultivar BRS Manicoré que foi resultado do cruzamento entre a palma de óleo Africana (*E. guineensis*) de origem *La Mé* e o a palma de óleo Americana (*E. oleifera*) de origem Manicoré (BIODIESEL.COM, 2012).

Segundo Cunha e Lopes (2010) a produção de cacho do BRS Manicoré é similar a produção das variedades do dendezeiro africano Tenera entorno de 25 a 30 t/ha/ano, contudo com taxa de extração de óleo inferior variando de 18 a 20%, com produtividade de 4,5 a 6 t de óleo de palma/ha/ano, crescimento de caule de 17 a 24 cm/ano, contudo os autores ressaltam que devido a baixa viabilidade do grão de pólen e a pouca atratividade das flores femininas, há necessidade de se fazer a polinização artificial para que as plantas desenvolvam todo seu

potencial genético, caso não seja realizada a produtividade poderá ser inferior a 10 t/ha/ano e a extração de óleo reduzida em até 12%.

De acordo com Gomes (2011), ao comparar a taxa de formação de frutos com sementes de plantas de HIE e Tenera, verificou que a menor taxa cerca de 13% foi obtida com a polinização natural do HIE, em relação ao tenera e a polinização assistida do HIE, que obtiveram 60 e 40%, respectivamente, evidenciando nesse estudo a necessidade da polinização assistida para o HIE. No mesmo estudo verificou-se que ao se comparar a produção de estragole, substância volátil liberada pelas inflorescências masculinas e femininas utilizada pelas palmeiras como estratégia reprodutiva para atrair polinizadores, entre o Caiaué, HIE e Tenera verificou-se que tanto o Caiaué quanto o HIE produzem baixa quantidade daquela substância em relação ao Tenera.

Outro inconveniente para os HIE é o surgimento de anomalias florais nas flores masculinas, fenômeno conhecido como ginandromorfia, que se caracteriza pela formação de flores femininas na inflorescência masculina, o que evita a produção de pólen nessa inflorescência, havendo a redução da polinização das flores femininas em áreas de plantio do híbrido em que não há dendezaís nas proximidades e consequentemente reduzindo a formação de frutos, na ausência de pólen se faz necessária a polinização assistida (CHIA, 2008).

Segundo Chia (2008) a obtenção de HIE através do cruzamento com o Caiaué e os genitores do dendezeiro das variedades Tenera, Dura e Psífera, em relação a frequência mensal de formação de inflorescência ginandromorfa, verificou que a maior frequência mensal de formação de inflorescência ginandromorfa foi de 60,42% para o cruzamento interespecífico entre Caiaué e o dendezeiro Psífera (O x P), não sendo reversível e de ocorrência mensal, portanto restrita ao gene do dendezeiro da variedade psífera. O mesmo autor verificou também que a percentagem de germinação do pólen dos híbridos foi superior a 50%, apesar de ser inferior a apresentada pelo dendezeiro e Caiaué, que obtiveram percentuais de 84,81 e 73,13%, respectivamente. Esse autor sugeriu que aquele percentual não deva restringir a boa frutificação e produtividade em plantios híbridos desde que haja inflorescência suficiente em antese e população de polinizadores para assegurar a dispersão adequada de grãos de pólen.

Para Moura (2008), ao avaliar a ação dos polinizadores *Elaeodobius Kamerunicus* e *Elaeodobius subvitattus* na fecundação de dendezeiro e HIE no sul da Bahia, verificou que a menor taxa de fecundação foi de 28,3% para o HIE, enquanto que o do dendezeiro foi de 79,4%. Esse resultado foi devido a inflorescência feminina do HIE atrair menor quantidade desses polinizadores.

No entanto com todas as limitações na utilização de HIE, ainda é uma alternativa que empresas e produtores de óleo de palma têm para investir na expansão da cultura, uma vez que não se encontrou nas áreas plantadas da região indivíduos acometidos pelo AF, assegurando seu potencial de resistência, além de apresentar alto teor de ácidos graxos insaturados muito indicado para o uso na indústria alimentícia e para produção de biodiesel. Acredita-se que as limitações, devido tanto a produtividade quanto em relação a anomalias florais, serão resolvidas através do melhoramento genético, pois existe na variedade Manicoré grande diversidade genética, principalmente nas encontradas em sub-regiões Amazônicas.

No Brasil, atualmente somente as empresas Denpasa e Embrapa são responsáveis pela comercialização de sementes do HIE BRS Manicoré, entretanto a produção de sementes ainda é baixa não atendendo as necessidades de expansão da cultura. De acordo com o MAPA (2012) no período de 2009/2011 cerca de 15,6 milhões de sementes foram importadas pelas empresas produtoras de óleo de palma no Pará, sendo que 80% foi importada da Costa Rica, para plantio de 80 mil ha.

Nesse contexto, a produção atual de sementes pré-germinadas do híbrido não atende a demanda existente, havendo a necessidade de ampliação dos campos de produção de sementes. Contudo, ainda serão necessários alguns anos para atender essa demanda (Cunha, et al., 2010). E concomitante a isso, as pesquisas têm mostrado que a germinação do híbrido BRS Manicoré é baixa e oscila em torno de 30 a 35,6 % (ANGELO, et al., 2007; CARDOSO, 2010; MAQUINE et al., 2012).

Estima-se que para atender a demanda nacional para produção de óleo de palma há necessidade de plantio de cerca de 445.000 ha. No Pará, em 2012, já haviam sido plantados 140.000 ha e estima-se, segundo dados das empresas, que a previsão é de plantar mais 329.000 ha.

No Pará, segundo informações da Secretaria Especial de Estado de Desenvolvimento Econômico e Incentivo a Produção (Sedip), serão utilizados para plantio nos próximos 15 anos cerca de um milhão de ha de palma. A previsão é que em 10 anos o Pará será um dos maiores produtores de óleo de palma do mundo. (Revista Biodiesel, 2012).

Algumas empresas internacionais são fornecedoras de outras variedades de HIE dentre elas ASD (Agricultural Services & Development), sediada na costa Rica, fornecedora dos híbridos Brunca e Amazon, La Cabaña, empresa colombiana, responsável pelo desenvolvimento do híbrido “Marborges Inducoaril” e PalmElit empresa subsidiária do Cirad (Centro de Cooperação Internacional em Pesquisa Agrônômica para o desenvolvimento) (CUNHA et al., 2010).

A grande dúvida sobre a aquisição de propágulos, seja sementes pré-germinadas ou plântulas *in vitro*, de empresas internacionais fornecedoras de HIE é como será a adaptação dessas variedades nas condições edafoclimáticas regionais, no que se diz respeito a produtividade e sanidade, uma vez que essas variedades foram desenvolvidas para terem seu vigor pleno em condições diferentes. Assim, necessitam que seu desenvolvimento possa ser avaliado em condições locais por empresas nacionais e internacionais validando ou não seu potencial.

Alves (2011) em seu trabalho listou dez variedades de palma de óleo que são plantadas pelas principais empresas no estado do Pará, obtidas do campo experimental da Embrapa e a maioria da ASD, a partir de 1990. Dessas variedades somente três são HIE (Compacta x Ghana, Compacta x Nigeria e Deli x compacta).

Apesar do risco de plantar outras variedades não resistente ao AF, empresas que produzem óleo de palma no Pará importam variedades susceptíveis ou sem comprovação sobre sua resistência ao AF. Acredita-se que esta decisão seja devido ainda a alta produtividade das variedades africanas e a dificuldade em se obter sementes pré-germinadas de HIE. Segundo o Ministério da Agricultura em 2012, foram importadas cerca de 80% de sementes pré-germinadas das variedades africanas por empresas do Pará.

Para o Ministério da Agricultura, no Registro Nacional de Cultivares até julho de 2013 haviam cerca de 29 registros de variedades de híbridos distribuídos entre intraespecífico e interespecífico, das quais apenas dois são interespecíficos BRS Manicoré sob registro nº 26031, cujo requerente do registro foi a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-Embrapa, e Marborges Inducoari 1, sob registro nº 20642, cujo requerente foi Marborges Agroindústria S.A. (MAPA, 2013)

Diante desse contexto, o desenvolvimento de técnicas biotecnológicas pode ser uma alternativa que permita a melhoria do processo de germinação de sementes de HIE para patamares de produção comercial, ao auxiliar a oferta ou inovar o mercado brasileiro com mudas produzidas *in vitro*, e dessa forma aumentar a oferta tanto para o mercado interno quanto externo.

O resgate de embriões é uma ferramenta da cultura de tecido que oferece todas as condições necessárias para que os embriões possam se desenvolver originando uma plântula normal semelhante ao processo convencional.

Na tentativa de contribuir para o incremento da produção de sementes híbridas de dendê esforços têm sido feitos para auxiliar a produção de mudas sadias, através do resgate de embriões dos híbridos interespecíficos para o desenvolvimento de mudas sadias (ANGELO et al., 2007; ALVES, 2011; CARDOSO, 2010).

Nos trabalhos realizados com cultivo de embriões de híbridos interespecíficos de dendê não foram reportados problemas de enraizamento dos explantes, uma vez que não houve a necessidade de submeter os explantes a indução por auxinas (ALVES, 2007; CARDOSO, 2010).

Por outro lado, verifica-se a utilização tanto de ANA ( $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ), quanto de AIB ( $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) no enraizamento de palma de óleo (*E. guineensis*) a partir de plântulas, originados de embriões zigóticos e brotações de tecido somático, respectivamente (KONAN et al., 2007; MUNIRAN et al., 2008).

Acredita-se que os laboratórios de produção comercial de clones intraespecíficos de palma de óleo na Malásia utilizam algum tipo de auxina para aumentar a indução de enraizamento das brotações obtidas por embriogênese somática. Porém essa informação não é divulgada diretamente por se tratar de segredo comercial.

Alves (2007), ao trabalhar com resgate de embriões de híbridos interespecíficos de dendê, aclimatizou em substrato de vermiculita cerca de 133 plântulas sem registro e após 60 dias não houve registro de plântulas mortas. Enquanto Angelo et al. 2007, na tentativa de descrever um protocolo para obtenção de plântulas de híbridos interespecífico de dendê, também através de embriões zigóticos e utilizando substrato comercial obteve plântulas bem formadas e aclimatizadas aos 125 dias.

Na tentativa de eliminar a fase de pré-viveiro para a produção de mudas *ex vitro* pesquisas tem sido realizadas com tubetes para reduzir os gastos nessa fase e obter mudas de alta qualidade. Para Teixeira et al. (2009), verificando o crescimento de mudas de dendezeiro através do método de sacolas plásticas e tubetes de  $120 \text{ cm}^3$ , observaram que não existe diferenças entre as mudas produzidas.

Para Fabiano et al. (2008), testando tubetes plásticos para produção de mudas de híbrido intraespecífico de dendê (Tenera), verificaram que as mudas produzidas até os três meses em viveiro apresentaram maior crescimento em altura e diâmetro e maior produção de matéria seca em relação ao método convencional (sacolas plásticas) em pré-viveiro.

Essa pesquisa tem como objetivo otimizar o processo de produção de mudas completas e aclimatizadas através da utilização de embriões zigóticos de híbridos interespecíficos (*Elaeis guineensis* x *Elaeis oleifera*) cultivados *in vitro*.

## 2.2. MATERIAL E MÉTODOS

Essas pesquisas constaram do resgate dos embriões zigóticos, enraizamento das plântulas dos híbridos que não formaram raízes e aclimatização das plantas.

As atividades de pesquisas foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia de Plantas da Embrapa Amazônia Oriental, Belém/PA. Os frutos dos híbridos CQ266, CQ246, CQ267, CQ362 e CQ396, provenientes da Embrapa Amazônia ocidental, Manaus/AM, vieram despolidos mecanicamente e com endocarpo tratado com fungicida. Esses híbridos estão sendo caracterizados agronomicamente e avaliados no campo, quanto a produção de cachos e parâmetros genéticos.

O endocarpo foi quebrado com auxílio de martelo de madeira sobre um pedaço de madeira contendo um pano cobrindo a superfície cuidadosamente para evitar danos à amêndoa (endosperma) e aos embriões.

As sementes com tegumento foram lavadas com sabão líquido e água corrente por cerca de cinco minutos, e em câmara de fluxo laminar foram desinfestadas com álcool a 70% por um minuto, hipoclorito de sódio a 2,5% por 15 minutos e enxaguadas com água autoclavada por três vezes e imersão por 24 horas em água esterelizada.

Os embriões foram retirados da região da protuberância do tegumento da semente, com auxílio de bisturi, removendo cuidadosamente o tecido adjacente do embrião sem causar danos. Com auxílio de pinças o embrião foi removido do endosperma para placas de Petri e mantidos em água destilada e autoclavada até o momento da assepsia.

A assepsia nos embriões constou de álcool a 70% por um minuto e hipoclorito de sódio a 1% por dez minutos, seguido de três lavagens com água autoclavada antes da inoculação em meio MS (MURASHIGUE e SKOOG, 1962), suplementado com 3% de sacarose,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,017% e phytigel 0,22%.

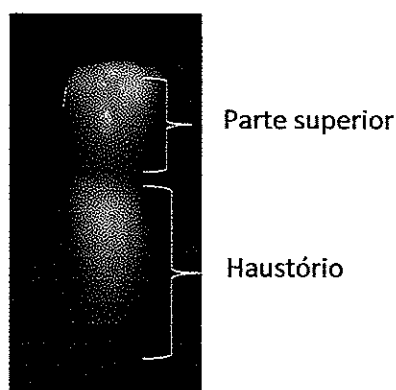
Para determinação da umidade, as sementes dos híbridos com endocarpo inteiro foram previamente pesadas e submetidas a estufa a  $103 \pm 2^\circ\text{C}$  por 24 horas de acordo com Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009), com quatro repetições contendo 10 sementes para cada híbrido e determinada pela fórmula:  $\%U = (\text{Pu} - \text{Ps} / \text{Pu}) \times 100$ , onde:

$\% U$  = teor de água; Pu = peso úmido das sementes; Ps = peso seco das sementes

Para verificação da viabilidade e/ou vigor dos embriões, utilizou-se o teste de tetrazólio utilizado para a maioria das espécies listadas pela RAS (Brasil, 2009). Os embriões foram pré-umidecidos por cerca de uma hora, seguido da imersão por 17 horas em solução de tetrazólio a 0,5%, no escuro a temperatura de  $39^\circ\text{C}$ , sendo utilizados cinco embriões por híbrido.

Para a avaliação individual do teste foi observado as seguintes características: coloração, resultante da redução do sal de tetrazólio (2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio ou TCT) pela desidrogenase do ácido málico; intensidade; uniformidade; local da coloração; e turgescência dos tecidos do embrião.

Foram considerados viáveis os embriões que apresentaram coloração vermelho claro brilhantes, na parte superior, e turgidez no haustório e inviáveis aqueles que apresentaram coloração vermelho intenso e flácidos no haustório (Figura 2). Os testes de percentual de umidade e tetrazólio realizados nos híbridos foram considerados como preliminares.



**Figura 2.** Embrião do híbrido interespecífico da palma de óleo (*E. oleifera* x *E. guineensis*) colorido pelos sais de tetrazólio, evidenciando: parte superior e haustório.

### 2.2.2 Influência da temperatura na Germinação *in vitro* de híbridos interespecíficos de palma de óleo

Os embriões dos híbridos CQ266, CQ246 e CQ362 foram submetidos a dois níveis de temperatura (25 e 39 °C) para germinar em estufa modelo EL 202/4 no escuro.

O delineamento utilizado foi o fatorial 3 X 2 (Híbrido X temperatura), inteiramente casualizado com cinco repetições por tratamento e a unidade experimental foi composta por cinco tubos de ensaio contendo um embrião em cada tubo. Foram avaliados a percentagem (%) de germinação após uma e três semanas após a inoculação, número de embriões contaminados e altura das plântulas. Foi considerado germinado o embrião que apresentou a saída lateral do eixo embrionário. Os dados discretos da variável % de germinação e número de embriões contaminados foram transformados por  $\sqrt{x + 0,5}$ . Para o teste de comparação de médias foi utilizado o teste Tukey a 5% de probabilidade. Para a análise estatística foi utilizado o programa SANEST (ZONTA; MACHADO, 1984).

### 2.2.3 Enraizamento de híbridos submetidos a diferentes concentrações de ANA.

As plântulas dos híbridos CQ362 e CQ246 sem raízes tiveram as bases levemente cortadas em bizel e inoculadas em meio MS suplementado com sacarose a 3%, phytigel a 0,22% e ANA nas concentrações de 1,0; 2,0 e 3,0 mg L<sup>-1</sup> que foram cultivados por seis dias em estufa modelo EL 202/4 no escuro a 25°C. Em seguida foram transferidos para meio MS/2 com a mesma constituição do anterior e suplementado de carvão ativado a 3g L<sup>-1</sup> e em fotoperíodo de 16 horas, e intensidade luminosa de 52  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$  de irradiância fornecidas por lâmpadas fluorescentes brancas.

O experimento foi em fatorial 2 X 3, inteiramente casualizado com cinco repetições, e a unidade experimental foi composta por dois tubos com um explante cada. Para a variável percentagem (%) de enraizamento foi utilizado o teste de qui-quadrado, enquanto que para número e comprimento de raízes foi utilizada a análise de variância e teste de comparação de medias Tukey a 5% de probabilidade. Os dados discretos da variável número de raízes foram transformados por  $\sqrt{x + 0,5}$ . As observações foram realizadas quinzenalmente durante 40 dias.

### 2.2.4 Aclimatização de híbridos em tubetes

As plântulas dos híbridos enraizadas *in vitro* usadas nos experimentos de aclimatização foram transferidas para viveiro com sistema de nebulização do Laboratório de Ecofisiologia da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, Pará. Inicialmente, as raízes foram lavadas com água corrente para retirar o excesso de meio de cultura. Nesse experimento foram utilizados tubetes de polipropileno com cerca de 19 X 5 cm. Foram testados os fatores: híbridos (CQ362 e CQ 246); substrato na proporção de 1:1 (Terra preta + Pó de coco, Terra Preta e Terra preta + Palha arroz carbonizada).

Em cada tubete foi adicionado cerca de 0,4 g Osmocot, adubo de liberação lenta, após uma semana do plantio. A nebulização era diária e intermitente com frequência de cerca de 2 minutos.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com cerca de cinco repetições, a unidade experimental foi composta de duas plântulas. As variáveis analisadas foram % de sobrevivência, que foi transformada através de  $\sqrt{x + 0,5}$ , e número de folhas. As observações foram realizadas mensalmente durante 90 dias. Para a análise estatística foi utilizado o programa SANEST (ZONTA; MACHADO, 1984).

## 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.3.1 Testes preliminares

Os resultados dos testes preliminares deram um indicativo da qualidade fisiológica (vigor e viabilidade) dos embriões que haviam sido beneficiados no mês de julho de 2011 e somente foram utilizados em outubro do mesmo ano.

A umidade das sementes dos híbridos CQ246 e CQ362, variaram de 15,69% e 18,61%, respectivamente (Tabela 1). Sugere-se que as sementes dos híbridos têm capacidade de armazenar uma quantidade maior de água em relação ao Tenera (*E. guineensis*), uma vez que Green (2012) observou que sementes de Tenera armazenadas em câmaras frias por cerca de um e cinco meses, após a coleta obtiveram percentuais médios de umidade em base úmida em torno de 14,78% e 14,66%, respectivamente.

Esses resultados mostram que a dormência causada pelo tegumento da semente do híbrido evita que as mesmas percam umidade para o ambiente, sugerindo que essas sementes apresentam viabilidade longa, como também foi reportado por Costa e Marchi (2008). A umidade não deve ser o único fator importante para determinação da germinação de embriões do híbrido, as características físicas também devem ser consideradas, uma vez que sementes com menor percentual de umidade apresentaram maior viabilidade comparada aquelas com maior percentual, como será visto na tabela 2.

**Tabela 1.** Percentagem de umidade em sementes dos híbridos interespecífico de palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineensis*), sob teor de água em base úmida. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013.

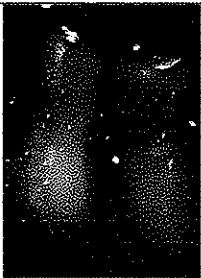
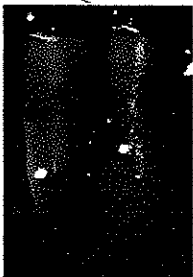
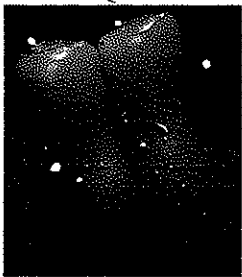
| Híbrido | % Umidade |
|---------|-----------|
| CQ-246  | 15,69     |
| CQ-396  | 16,65     |
| CQ-266  | 17,07     |
| CQ-267  | 17,46     |
| CQ-362  | 18,61     |

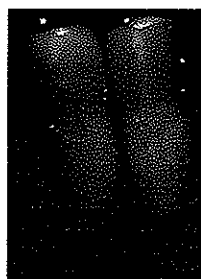
Quanto ao teste de tetrazólio realizado inicialmente nos embriões dos híbridos foi verificado que todos sofreram reação de redução dos sais pela desidrogenase do ácido málico em temperatura de 39 °C, no escuro, imersos por 18 horas. A coloração do embrião apresentou tonalidades variando de vermelho intenso ao vermelho claro. Todos os embriões foram coloridos, porém somente com a mudança de cor não foi possível classificar com precisão a viabilidade dos mesmos, havendo necessidade de associar outra característica como o

intumescimento para afirmar a respeito de sua viabilidade, que só foi confirmada após a germinação.

Foram considerados viáveis os embriões dos híbridos CQ266, CQ246, CQ362, e não viáveis os embriões CQ396 e CQ267 (Tabela 2). Todos os híbridos viáveis originaram plântulas com parte área bem formada e vigorosa, contudo apenas 22% das plântulas apresentaram raízes.

**Tabela 2.** Teste de tetrazólio para embriões (x16) de híbridos interespecíficos de palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineensis*), submetidos a imersão por 17 horas em solução de sais de tetrazólio a 0,5% a 39 °C, no escuro. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013.

| Híbrido                                                                             | Coloração                                       | Característica física          | Classificação           |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|--------------------------------|-------------------------|
|    | Vermelho claro não uniforme na parte superior   | Turgido brilhante no haustório | Viável/vigorosa         |
| CQ 246                                                                              |                                                 |                                |                         |
|   | Vermelho claro não uniforme na parte superior   | Turgido brilhante no haustório | Viável/vigorosa         |
| CQ 266                                                                              |                                                 |                                |                         |
|  | Vermelho intenso não uniforme na parte superior | Flácido no haustório           | Não viável/não vigorosa |
| CQ 267                                                                              |                                                 |                                |                         |
|  | Vermelho claro não uniforme na parte superior   | Turgido brilhante no haustório | Viável/vigor            |
| CQ 362                                                                              |                                                 |                                |                         |



CQ 396

Vermelho claro não  
uniforme na parte  
superior

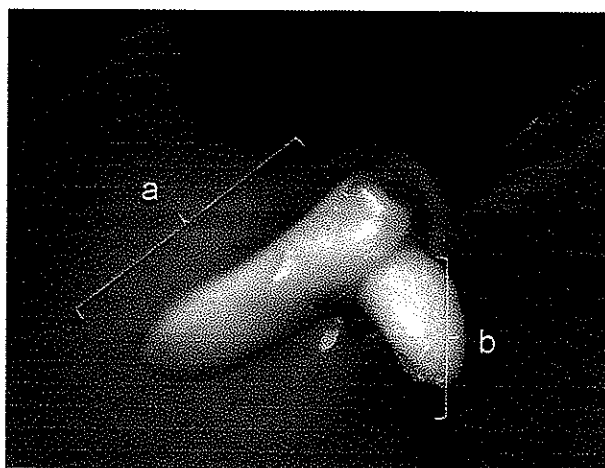
Flácido no haustório

Não viável/não  
vigorosa

### 2.3.2 Germinação de híbridos em diferentes temperaturas

Os resultados aqui obtidos da germinação *in vitro* corroboraram com os obtidos pelo teste de tetrazólio que evidenciou que os embriões dos híbridos CQ267 e CQ396 não se encontravam viáveis, portanto não germinaram, ambos com percentual endógeno de contaminação médio de 61,9% de origem bacteriana. Por esse motivo não foram utilizados nesse experimento sendo, portanto descartados da análise estatística.

A germinação *in vitro* é morfologicamente bem distinta da germinação *ex vitro*, enquanto nesta ocorre a formação de uma massa denominada de botão germinativo (COSTA; MARCHI, 2008), na *in vitro* surge lateralmente na região superior do embrião, com a formação de um eixo cilíndrico esbranquiçado com encurvamento em direção ao meio de cultura (Figura 3). Observou-se que o embrião apresenta duas regiões bem distintas uma mais alargada de coloração creme, denominada aqui de superior, e outra branco-leitosa definida como haustório, região que permite a nutrição do embrião no interior da semente. Na germinação *in vitro* esse tecido desaparece lentamente durante o desenvolvimento da plântula.



**Figura 3.** Embrião do Híbrido da palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineensis*): a-embrião e b-eixo embrionário. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013.

A germinação dos embriões teve início aos seis dias em temperatura de 39 °C, enquanto a 25 °C iniciara a partir de 14 dias, com características semelhantes de germinação.

A fase inicial de germinação dos embriões na primeira semana teve influência altamente significativa ( $p < 0,001$ ), somente para o fator temperatura (Tabela 3). Mantendo-se o mesmo resultado na terceira semana, evidenciando que não houve influência do genótipo (híbrido) durante a germinação, que essa dependeu exclusivamente das temperaturas 25 e 39 °C.

Para a variável número de embriões contaminados, verificou-se que a contaminação foi ocasionada somente pelos genótipo com ( $p < 0,01$ ).

No entanto, para a variável altura de plântulas foi verificado que esta característica é mais dependente do genótipo e que a temperatura tem influencia para essa manifestação (Tabela 3).

**Tabela 3.** Análise da variância para percentagem (%) de germinação na primeira (1ª sem.) e terceira semana (3ª sem.), número de embriões contaminados e altura das plântulas (Alt.) dos híbridos interespecíficos (*E. oleifera* x *E. guineensis*) submetidos a temperaturas de 25 e 39 °C. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013.

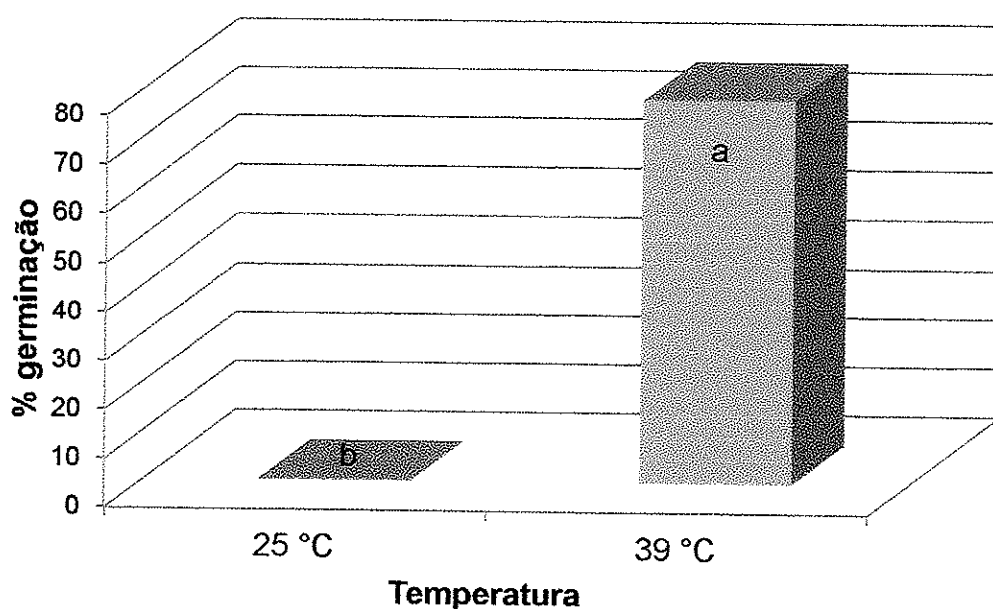
| Fonte de variação | GL | QM <sup>(1)</sup>    |                    |                    |                     |
|-------------------|----|----------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
|                   |    | % Germinação         |                    | N.emb. cont.       | Alt. (mm)           |
|                   |    | 1ª sem.              | 3ª sem.            |                    |                     |
| Híbrido (Hb)      | 2  | 3,9 <sup>ns</sup>    | 0,52 <sup>ns</sup> | 0,11 <sup>*</sup>  | 258,7 <sup>*</sup>  |
| Temp.(Tp)         | 1  | 545,8 <sup>***</sup> | 4,3 <sup>*</sup>   | 0,1 <sup>ns</sup>  | 842,7 <sup>**</sup> |
| Hb X Tp           | 2  | 1,5 <sup>ns</sup>    | 0,18 <sup>ns</sup> | 0,02 <sup>ns</sup> | 317,5 <sup>*</sup>  |
| Resíduo           | 24 | 1,6                  | 0,71               | 0,03               | 59,23               |
| Total             | 29 |                      |                    |                    |                     |
| CV(%)             |    | 27,8                 | 9,0                | 22,3               | 36,8                |

<sup>(1)</sup>Quadrado médio. <sup>ns</sup> Não significativo a 5% de probabilidade pelo teste F. <sup>\*\*</sup> e <sup>\*\*\*</sup> Significativo a 1% e 0,1%, de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

De acordo com a Figura 4, verifica-se que a temperatura de 39°C induziu na primeira semana o maior percentual de germinação de 77,9%, enquanto que os embriões submetidos à temperatura de 25 °C, apenas 0,1 % germinaram, diferindo estatisticamente entre si. Acredita-se que a maior temperatura (39 °C) desencadeou mais rápido o processo germinativo nos embriões, uma vez que induz a aceleração dos processos físicos e metabolismo, como a embebição e ativação das enzimas desidrogenases que catalisam as reações respiratórias no interior das mitocôndrias, durante a glicólise e o ciclo de Krebs, no embrião.

Costa e Marchi (2008) citam vários trabalhos com temperaturas na faixa de 38 a 42 °C utilizadas para acelerar o processo germinativo pelo início das atividades metabólicas em sementes de *E. guineensis*, durante o tempo de 30 a 80 dias.

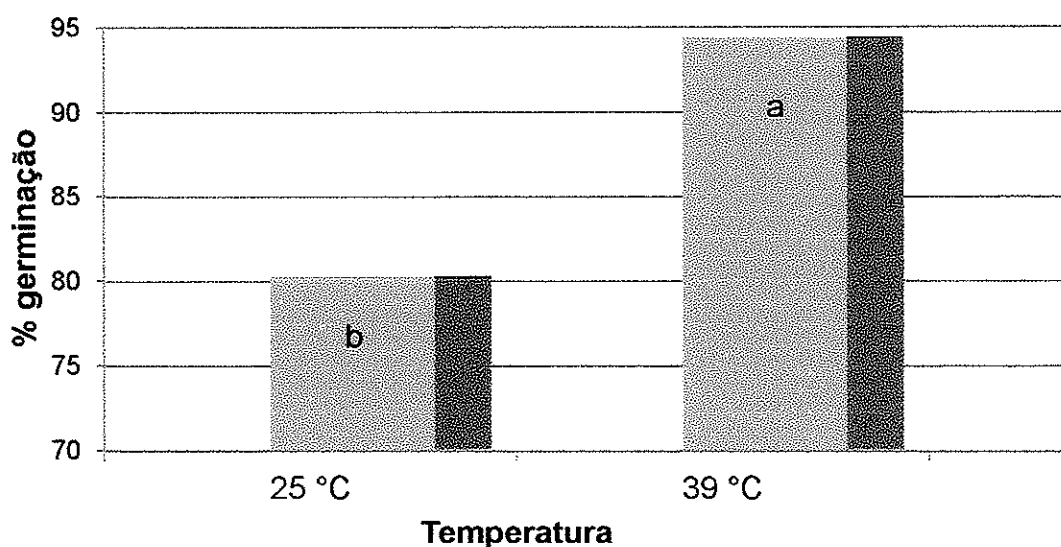
Logo, o teste de tetrazólio feito com objetivo de verificar a qualidade fisiológica dos embriões indicou grande atividade das enzimas desidrogenases na temperatura de 39 °C, que resultou na coloração vermelho fraco, principalmente na região superior do embrião, sinalizando grande atividade respiratória, que culminou na germinação daqueles embriões.



**Figura 4.** Percentagem (%) de germinação de híbridos de palma de óleo (*E. oleifera* x *E. guineensis*), na primeira semana, em que foram submetidos às temperaturas de 25 e 39 °C. (médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas, não diferiram entre si, pelo teste de Tukey, a 5%). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013.

Na terceira semana, o percentual de germinação foi superior em ambas as temperaturas se comparado com percentual da primeira semana. Portanto os embriões submetidos a temperatura de 39 °C apresentaram percentual de germinação de 94,4%, em comparação a 25 °C cujo percentual foi de 80,3%, diferindo estatisticamente entre si. (Figura 5). Os embriões submetidos a temperatura mais baixa tiveram um tempo maior para ativação do processo germinativo que ocorreu de forma mais lenta até o final da avaliação. Nessa fase, observou-se que os embriões que se encontravam viáveis e que foram inoculados na temperatura de 25 °C tiveram comportamento semelhante aos inoculados em 39 °C, mesmo que as respostas para diferenciação tenha ocorrido para germinar na menor temperatura em maior tempo, o que

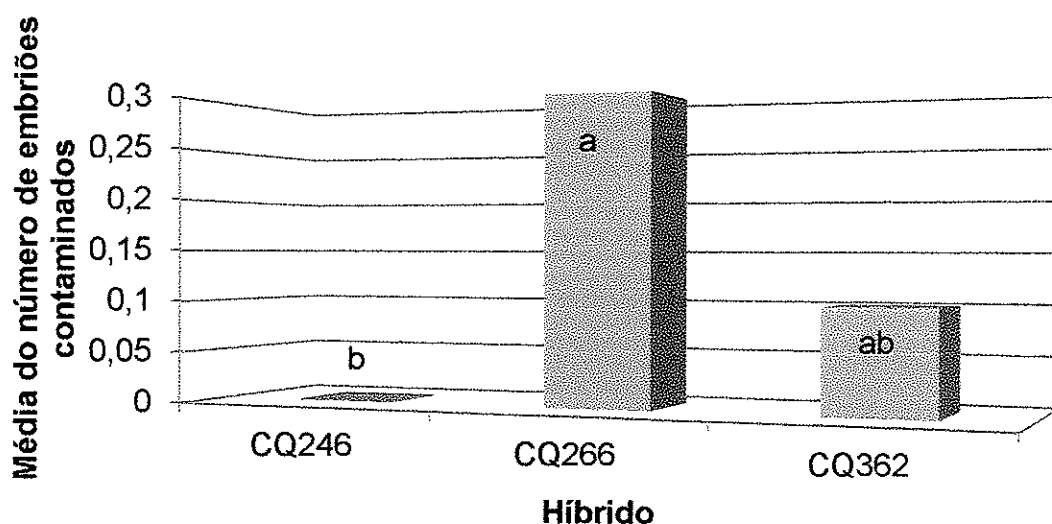
esta relacionado às enzimas desidrogenases responsáveis por desencadear o processo germinativo.



**Figura 5.** Percentagem (%) de germinação de híbridos de palma de óleo (*E. oleifera* x *E. guineensis*), na terceira semana, em que foram submetidos às temperaturas de 25 °C e 39 °C. (médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas, não diferiram entre si, pelo teste de Tukey, a 5%). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013.

Em relação a variável número de embriões contaminados, verificou-se que a contaminação dos embriões foi baixa e que o híbrido CQ266 apresentou maior incidência com média de 0,3 embriões, não diferindo estatisticamente do CQ362 que alcançou média de 0,1 embriões. E a ausência de contaminação foi obtida pelo CQ246. As contaminações foram exclusivamente causadas por fungos (Figura 6). Em experimentos anteriores foi verificada a grande incidência de contaminação, inviabilizando os experimentos montados, principalmente por bactérias que fez com que fossem realizados dois procedimentos de assepsia. Essa dupla assepsia realizada não foi verificada em outros trabalhos já realizados com palmeiras (ALVES, 2011; CARDOSO et al. 2010; MOURA 2007; PÁDUA, 2012).

Acredita-se que esses baixos valores de contaminação foi devido a dupla assepsia realizada, uma na semente e outra no embrião, contribuíram para tal, pois percentuais foram menores que os obtidos por Cardoso et al. (2010), em sementes de 17 variedades de híbridos de palma de óleo, que variaram de 7,5% a 37%.



**Figura 6.** Média do número de embriões contaminados de híbridos de palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineensis*), na terceira semana, em que foram submetidos às temperaturas de 25 °C e 39°C. (médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas, não diferiram entre si, pelo teste de Tukey, a 5%). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013.

As plântulas dos híbridos produzidas *in vitro*, durante as três semanas, apresentaram crescimento do epicótilo normal semelhante àquelas desenvolvidas pelo processo convencional com diferencial de serem esbranquiçados pela ausência de luz. Também foi observada a ausência de raízes em 78% das plântulas formadas, e surgimento de 22% de raízes no híbrido CQ 246, o que pode estar relacionada a constituição genética do híbrido, ao meio de cultura, à fonte e concentração de sacarose ou a outros fatores intrínsecos.

Cardoso et al. (2010), ao estudar a germinação de HIE em diferentes meios de cultura durante 12 semanas, não reportaram a ocorrência de plântulas sem raízes e nem a qualidade do sistema radicular formado, obtendo até 100% de germinação, dependendo do híbrido, em meio Y<sub>3</sub>. Enquanto que Alves et al. (2011), ao resgatar embriões zigóticos de HIE obtiveram durante 60 dias 57,9% e 37,9% das plântulas com formação de folhas e raízes, respectivamente, em meio MS e ½ MS livres de reguladores de crescimento.

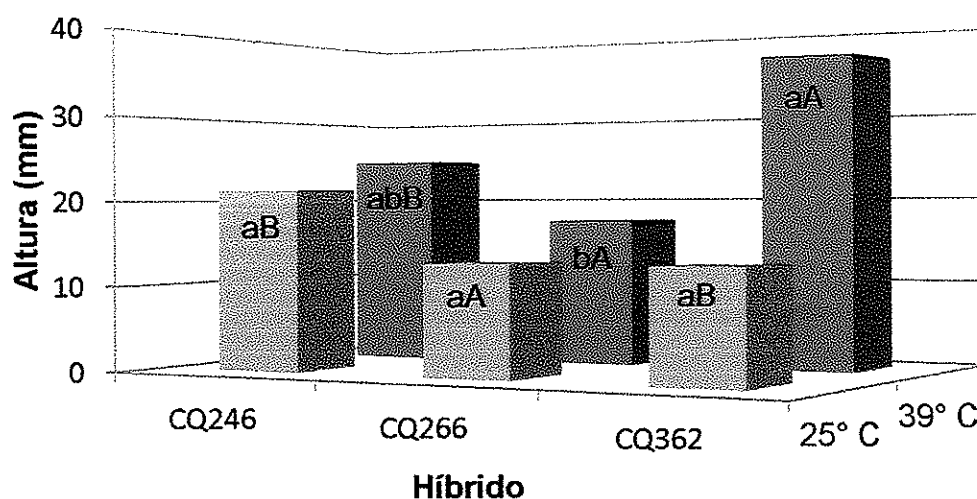
Segundo Angelo et al. (2011) ao testarem diferentes fontes de carbono em meio MS para estudar o desenvolvimento de embriões zigóticos de HIE, verificaram que a maior quantidade de raízes formadas foi obtida com fonte de glicose na concentração de 20g L<sup>-1</sup>, em relação ao uso de sacarose em concentrações de 30, 20 e 10g L<sup>-1</sup>, as quais apresentaram menores número de raízes formadas. Enquanto que para Muniran et al. (2008), ao utilizarem o meio N<sub>6</sub>, MS e

Y<sub>3</sub> no desenvolvimento de embriões de *E. guineensis*, verificaram que os maiores percentuais de plântulas enraizadas foram obtidas em meio Y<sub>3</sub> com a adição de 2 mg L<sup>-1</sup> de AIB.

Konan et al. (2007) ao enraizarem plântulas incompletas de *E. guineensis* obtidas via embriogênese somática, verificaram que os percentuais de enraizamento variaram segundo o material genético e tamanho da parte aérea em meio de cultura MS com adição de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA.

A altura de plântula foi influenciada pela temperatura de 39°C, na qual o maior crescimento foi de 36,4 mm no híbrido CQ362, que não diferiu estatisticamente, apenas do CQ246 (Figura 7). Enquanto que na temperatura de 25 °C, a maior altura alcançada foi de 21,2 mm para o híbrido CQ246, semelhante estatisticamente ao CQ266 e CQ362, que atingiram 13 mm e 12,9 mm, respectivamente após 21 dias. Percebe-se que com o aumento da temperatura houve maior crescimento das plântulas *in vitro* de acordo com o genótipo.

Angelo et al. (2011) ao inocularem embriões de HIE em meio MS em temperatura de 26 ± 2 °C, com diferentes fontes de açúcar e concentração obteve aos 60 dias de cultivo, plântulas com 6,5 cm de comprimento. Enquanto que Cardoso et al. (2010) à temperatura de 25 ± 3 °C em 12 semanas obtiveram maior comprimento em híbrido com 3,8 cm em meio Y<sub>3</sub>, e Alves (2007), na mesma temperatura, HIE cultivados por 60 dias, 2,61 cm em meio ½ MS.



**Figura 7.** Altura médias de híbridos de palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineensis*), na terceira semana, em temperaturas de 25 °C e 39 °C. (médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na linha e maiúsculas na coluna não diferiram entre si, pelo teste de Tukey, a 5%). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013.

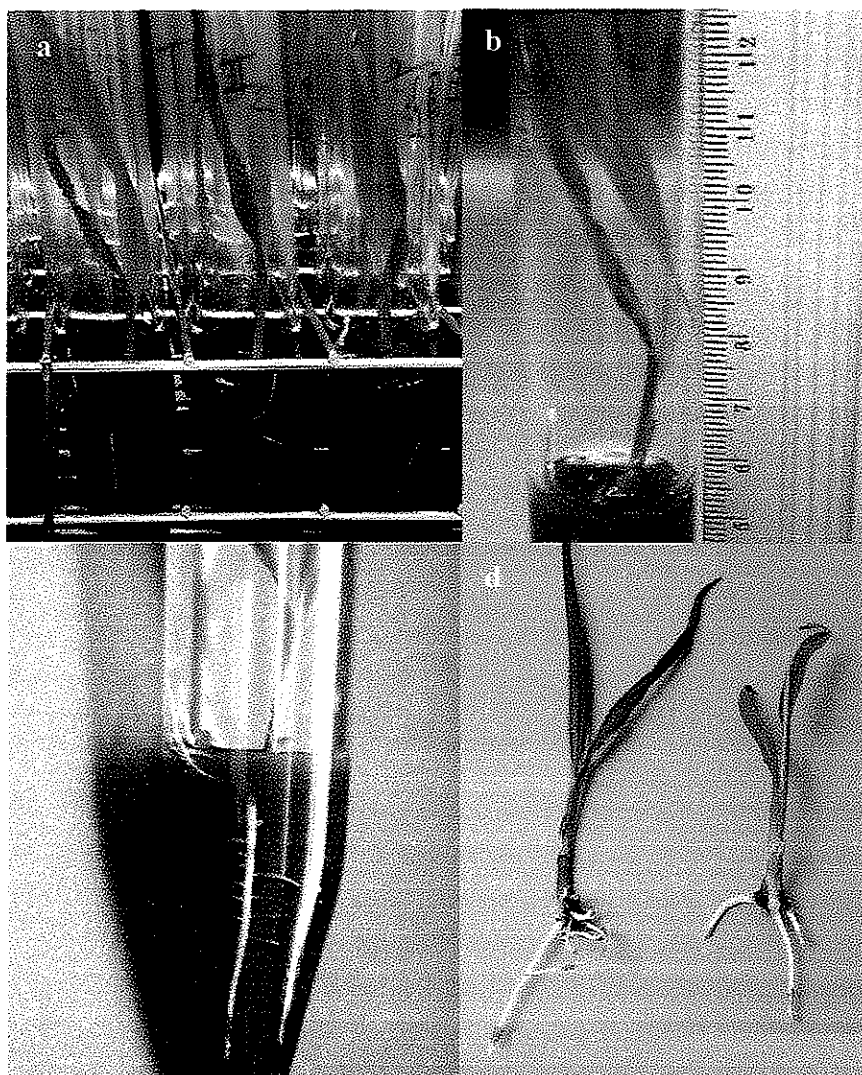
### **2.3.3 Enraizamento de híbridos submetidos a diferentes concentrações de ANA**

Na primeira avaliação após 15 dias de cultivo houve certa dificuldade de visualização do momento exato da indução dos primórdios radiculares, devido a presença do carvão ativado no meio de cultura, o que deve ter ocorrido com cerca de 10 dias de cultivo. Iniciando primeiramente pelo híbrido CQ362 na concentração de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA (Figura 8-a) em 60% das plântulas após 17 dias de cultivo. O enraizamento do híbrido CQ 246 só foi verificado após 34 dias, na mesma concentração, em 40% das plântulas que se estendeu até aos 40 dias de cultivo quando mais de 50% das plântulas apresentavam raízes.

As plântulas apresentavam-se vigorosas e de coloração verde, com número médio de folíolos de 2,8 e 2,4 para os híbridos CQ362 e CQ 246, respectivamente. A altura média alcançada pelo híbrido CQ362 foi de 80,2 mm, seguido pelo CQ246 de 24,6 mm de comprimento (Figura 8-b).

As raízes formadas apresentavam-se esbranquiçadas, com formação de raízes secundárias no híbrido CQ362, mas sem presença de pelos absorventes (Figura 8-c,d). Enquanto que para o híbrido CQ246 as raízes eram mais grossas, não houve a formação de raízes secundárias e nem pêlos absorventes.

Acredita-se que as plântulas do híbrido CQ362 apresentaram maior crescimento vegetativo devido as características do sistema radicular, que se encontravam bem formado com distribuição de raízes secundárias no entorno da raiz primária.



**Figura 8.** Enraizamento de plântulas de híbridos interespecíficos de palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineensis*), submetidos a diferentes concentrações de ANA após transferência para o meio de cultura MS. Evidenciando: a- Plântulas do híbrido CQ362 com raiz; b- Plântula vigorosa do híbrido com dois folíolos; c- Raiz primária e secundária, sem pelos absorventes do híbrido CQ362; d-Plântulas enraizadas do híbrido CQ362 nas concentrações de 1,0 e 2,0 mg L<sup>-1</sup>, da esquerda para direita. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013.

As plântulas enraizaram independente do híbrido (Tabela 4) mas a concentração de ANA (Tabela 5) apresentou diferença significativa com ( $p < 0,05$ ) quanto ao número de raízes obtidas, sendo que maior número de plântulas enraizadas, com 16 indivíduos, ocorreu em ANA a 1,0 mg L<sup>-1</sup>, entretanto, observa-se que a concentração mais indicada não diferiu significativamente da concentração de 2,0 mg L<sup>-1</sup> que proporcionou o enraizamento de 12 indivíduos (Figura 9). Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Konan et al. (2007), ao enraizarem brotações de três clones de *E. guineensis* obtidos através de embriogênese somática, usando concentração de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA e obtendo 81,5% de taxa de enraizamento.

Ledo et al. (2007) ao transferir plântulas germinadas *in vitro* de coqueiro-anão-verde para meio Y<sub>3</sub>, suplementado com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA e 0,5 mg L<sup>-1</sup> BAP, verificaram o incremento no número de raízes formadas.

**Tabela 4.** Teste de qui-quadrado para comparação de plantas enraizadas *in vitro* nos híbridos interespecíficos de palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineensis*).

| Híbridos | Plântulas enraizadas | Plântulas não enraizadas | Total |
|----------|----------------------|--------------------------|-------|
| CQ362    | 20                   | 10                       | 30    |
| CQ246    | 16                   | 14                       | 30    |
| Total    | 36                   | 24                       | 60    |

$\chi^2 = 1,1$  <sup>ns</sup>, g.l. = 1

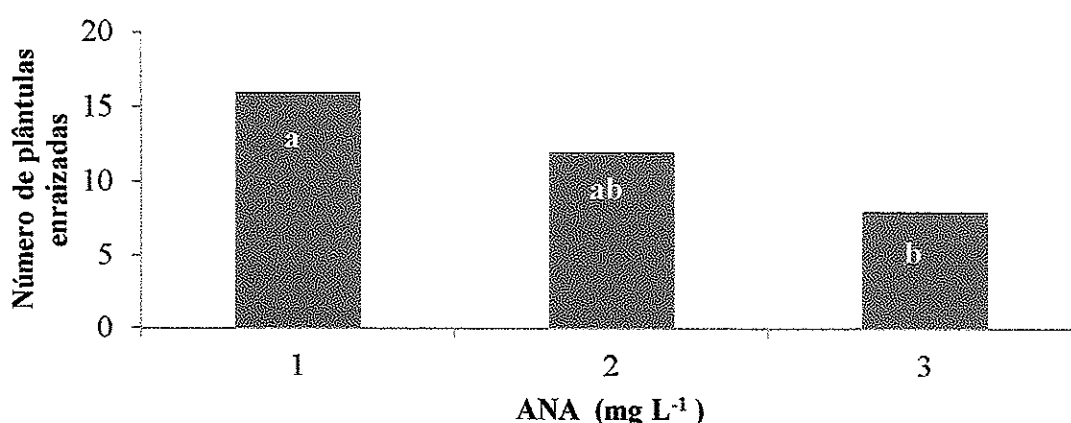
<sup>ns</sup> Não significativo

**Tabela 5.** Teste de qui-quadrado para comparação entre concentrações de ANA no enraizamento de plantas *in vitro* de híbridos interespecíficos de palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineensis*).

| ANA (mg L <sup>-1</sup> ) | Plântulas enraizadas | Plântulas não enraizadas | Total |
|---------------------------|----------------------|--------------------------|-------|
| 1,0                       | 16                   | 4                        | 20    |
| 2,0                       | 12                   | 8                        | 20    |
| 3,0                       | 8                    | 12                       | 20    |
| Total                     | 36                   | 24                       | 60    |

$\chi^2 = 6,6^*$ ; g.l. = 2

\* Significativo a 5 % de probabilidade



**Figura 9.** Comparação de médias para o número de plantas enraizadas *in vitro* de híbridos de palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineensis*), submetidos a diferentes concentrações de ANA (1,0; 2,0 e 3,0 mg L<sup>-1</sup>). (médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferiram entre si, pelo teste de  $\chi^2$ , a 5% de probabilidade). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013.

Nesse trabalho a interação entre genótipo e regulador de crescimento para enraizamento foi significativa com ( $p < 0,05$ ) de probabilidade, indicando que pelo menos um genótipo em determinada concentração se diferenciou das demais combinações quanto ao número de plantas enraizadas (tabela 6). As combinações que proporcionaram maior número de plântulas enraizadas com cerca de 10 e 7 indivíduos foram as combinações T1(CQ362 + 1,0 mg L<sup>-1</sup> ANA) e T5 (CQ246 + 2,0 mg L<sup>-1</sup> ANA), respectivamente, as quais não diferiram entre si (Figura 10).

**Tabela 6.** Teste de qui-quadrado para comparação das interações entre híbridos e concentrações de ANA no enraizamento de plantas HIE de palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineensis*).

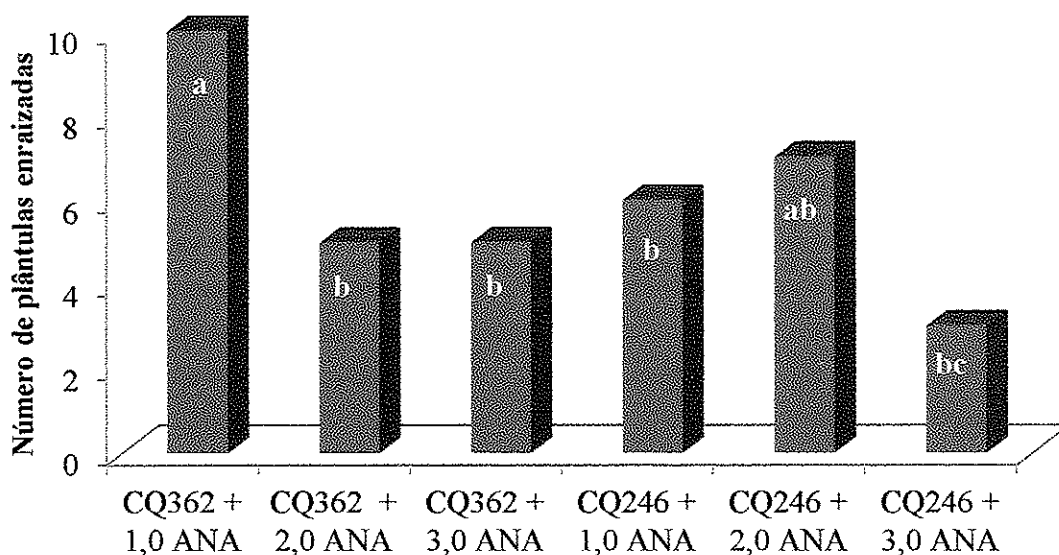
| Tratamentos       | Plântulas enraizadas | Plântulas não enraizadas | Total |
|-------------------|----------------------|--------------------------|-------|
| T1-CQ362 + 1,0ANA | 10                   | 0                        | 10    |
| T2-CQ362 + 2,0ANA | 5                    | 5                        | 10    |
| T3-CQ362 + 3,0ANA | 5                    | 5                        | 10    |
| T4-CQ246 + 1,0ANA | 6                    | 4                        | 10    |
| T5-CQ246 + 2,0ANA | 7                    | 3                        | 10    |
| T6-CQ246 + 3,0ANA | 3                    | 7                        | 10    |
| Total             | 36                   | 24                       | 60    |

$\chi^2 = 11,65^*$ ; g.l. = 5

\* Significativo a 5% de probabilidade

Verificou-se também que foram induzidas raízes de três tipos: raízes primárias de maior diâmetro e comprimento diferenciadas do mesmo eixo da parte aérea; adventícias diferenciadas lateralmente; e raízes secundárias que surgiram das primárias e estavam bem distribuídas ao longo do eixo radicular e caracterizavam-se por terem menor diâmetro e comprimento. Não foi observado a formação de pelos absorventes nas raízes formadas nas plântulas.

As raízes apresentaram diferentes distribuições do sistema radicular, denominadas de polimórficas (MUNIRAN et al., 2008). Foram registradas as seguintes arquiteturas radiculares: Raiz primária vertical para baixo e para cima, secundária vertical para cima e adventícia para baixo e para cima. Muniran et al. (2008) observaram que embriões germinados *in vitro* de *E. guineensis* formaram somente dois tipos polimórficos de sistema radicular, o vertical e o horizontal. Acredita-se que no atual trabalho, houve maior polimorfismo do sistema radicular, devido ao corte feito na base das plântulas expondo maior quantidade de tecidos organogênicos ao meio de cultura, que culminaram na formação de raízes.



**Figura 10.** Comparação de médias para o número de plantas enraizadas *in vitro* de híbridos CQ362 e CQ246 de palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineensis*), submetidos a diferentes concentrações de ANA. (médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferiram entre si, pelo teste de  $\chi^2$ , a 5% de probabilidade). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013.

Ocorreu diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quanto ao número de raízes induzidas (Tabela 7), considerando como fator de variação a concentração de ANA e o comprimento das raízes, considerando os híbridos a concentração de ANA muito significativo com ( $p < 0,01$ ), altamente significativo com ( $p < 0,001$ ), e interação também considerada significativa com ( $p < 0,05$ ).

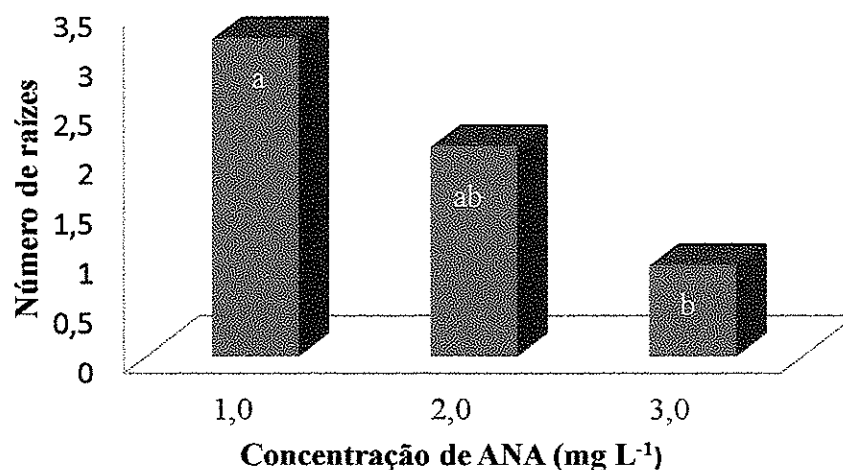
**Tabela 7.** Análise da variância para as variáveis número e comprimento de raízes de plântulas de híbridos interespecíficos de palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineensis*), após transferência para o meio de cultura MS. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013.

| Fonte de variação | GL | QM <sup>(1)</sup>  |                       |
|-------------------|----|--------------------|-----------------------|
|                   |    | Número raízes      | Comprimento raiz      |
| Híbrido (Hb)      | 1  | 1,07 <sup>ns</sup> | 146,34 <sup>**</sup>  |
| ANA               | 2  | 1,35 <sup>*</sup>  | 249,36 <sup>***</sup> |
| Hb X ANA          | 2  | 0,78 <sup>ns</sup> | 69,6 <sup>*</sup>     |
| Resíduo           | 24 | 0,25               | 16,16                 |
| Total             | 29 |                    |                       |
| CV (%)            |    | 31,9               | 61,3                  |

<sup>(1)</sup> Quadrado médio. <sup>ns</sup> Não significativo. <sup>\*\*\*</sup>, <sup>\*\*</sup> e <sup>\*</sup> Significativo a 0,1; 1 e 5%, de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

O maior número de raízes foi verificado a 1,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA com média (3,2), cuja diferença não significativa a 2,0 mg L<sup>-1</sup> foi de 2,1 (Figura 11). As plântulas enraizadas através desse

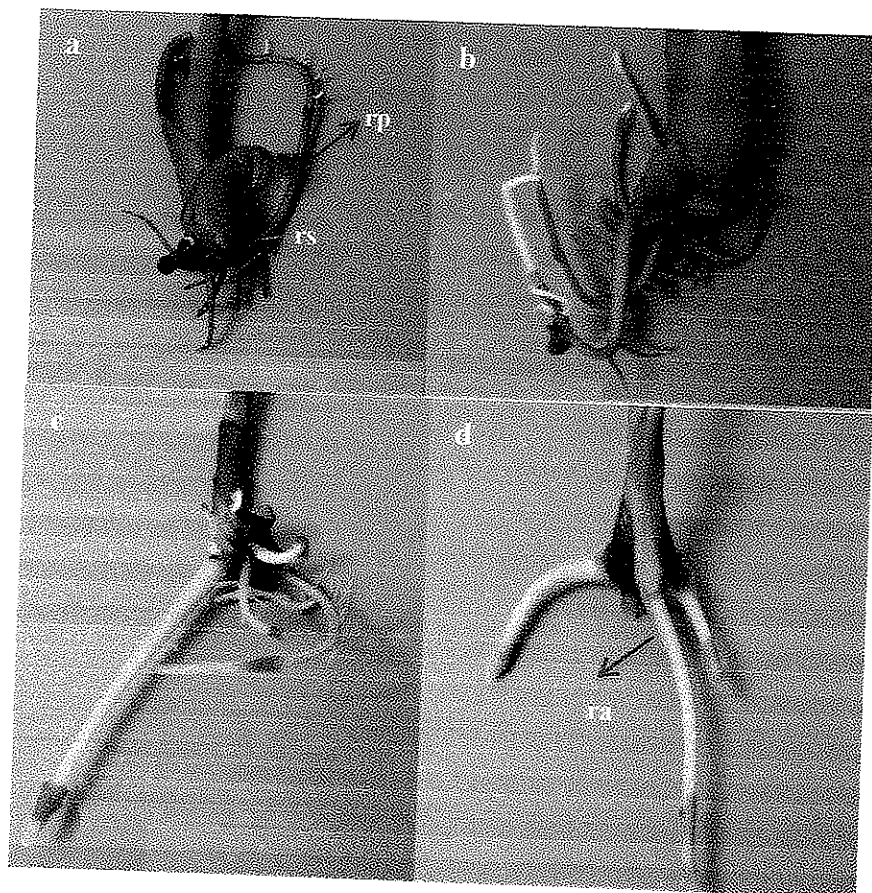
experimento foram comparadas com outras obtidas *in vitro* que enraizaram naturalmente, ou seja, sem a adição de reguladores de crescimento. Morfologicamente ambas apresentaram as mesmas estruturas que se caracterizavam por raízes primárias, secundárias e ausência de pêlos radiculares, porém com a diferença da presença de raízes adventícias nas plântulas induzidas a enraizar (Figura 12).



**Figura 11.** Comparação de médias do número de raízes formadas em plantas enraizadas de híbridos de palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineensis*), submetidos a diferentes concentrações (1,0; 2,0 e 3,0 mgL<sup>-1</sup>) de ANA. (médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferiram entre si, pelo teste de  $\chi^2$ , a 5% de probabilidade). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013.

Os resultados mostraram que plântulas *in vitro* foram enraizadas com maior percentual e em menor tempo com a utilização de ANA, se comparado com outros trabalhos publicados. Alves (2007), ao utilizar variações do meio MS sem regulador de crescimento para o desenvolvimento de plântulas de duas variedades de HIE, obteve em 60 dias média de 1,4 raízes por plântula, enquanto Angelo et al. (2011) a partir de embriões de HIE em meio MS com diferentes fontes de carbono (glicose e sacarose) e sem regulador de crescimento, obtiveram em glicose na concentração de 30 g L<sup>-1</sup> aos 50 dias média de 3,3 raízes por plântula.

Os resultados evidenciaram que a indução de raízes *in vitro* é semelhante à formação natural de raízes nos embriões de HIE germinados nas mesmas condições, e que essa técnica pode ser uma solução para resolver o problema de enraizamento que variedades de híbridos apresentam, assim como para o enraizamento de brotações obtidas via embriogênese somática.

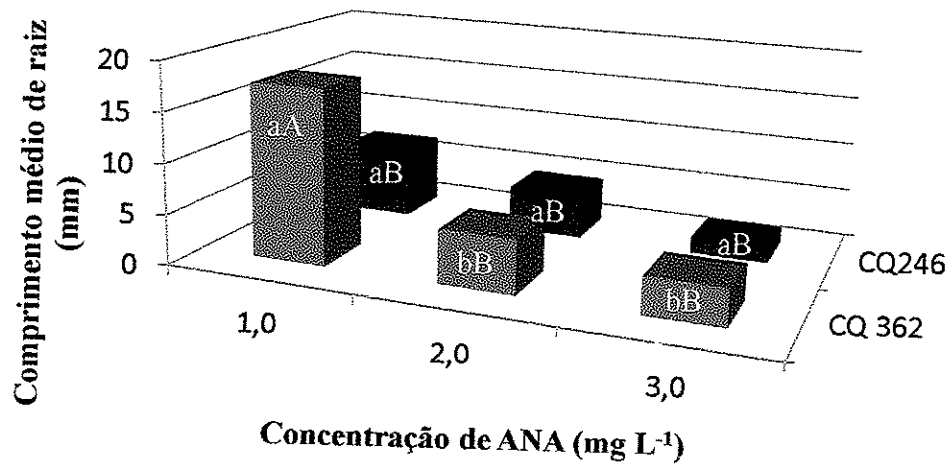


**Figura 12.** Raízes de plântulas de híbridos interespecíficos de palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineensis*). Evidenciando: a- Raíz primaria (rp) e secundária (rs) do híbrido CQ246 obtida da germinação *in vitro* em meio MS; b- Raízes do híbrido CQ362 obtida da germinação *in vitro* em meio MS; c- Raízes do híbrido CQ362 induzidos na concentração de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  ANA; d- Raízes do híbrido CQ362 induzidos na concentração de  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  ANA, adventícia (ra); Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013.

Os híbridos apresentaram comprimento de raiz diferente, ao serem submetidos às diferentes concentrações de ANA (Figura 13). Para as plântulas do híbrido CQ362 o maior comprimento foi de 17,4 mm, obtido na concentração de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA, diferindo estatisticamente das demais concentrações. Enquanto que para as plântulas do híbrido CQ246 o maior comprimento foi de 6,9 mm, apesar de não diferir estatisticamente nas demais concentrações. Ocorreu que ambos os híbridos, nas concentrações de 2,0 e  $3,0 \text{ mg L}^{-1}$  apresentaram crescimento das raízes semelhantes.

Esses resultados, apesar de terem sido obtidos através da indução ao enraizamento de plântulas com a utilização de ANA no decorrer de 40 dias, são similares aos obtidos por Alves (2007) que obteve plântulas de HIE com raiz medindo no máximo 2,4 cm de comprimento, assim como os obtidos por Cardoso (2010) que obteve plântulas de HIE com comprimento de raiz de 2,22 cm e Angelo et al. (2011) que obtiveram plântulas de HIE com 1,82 cm de comprimento de raiz.

A resposta morfogênica ao regulador de crescimento ANA foi diferente e dependeu do tipo de tecido, do genótipo, da concentração e da especificidade desse regulador ao tecido vegetal exposto. O ANA teve maior especificidade para a rizogênese no híbrido CQ362, na concentração de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  e tornou-se de menor efeito em maiores concentrações, assim como não foi tão eficiente para o híbrido CQ246.



**Figura 13.** Comparação do comprimento médio de raízes formadas em plântulas de híbridos de palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineensis*), submetidos a diferentes concentrações ( $1,0$ ;  $2,0$  e  $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) de ANA. (médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na linha e maiúsculas na coluna não diferiram entre si, pelo teste de  $\chi^2$ , a 5% de probabilidade). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013.

#### 2.3.4 Aclimatização de híbridos em tubetes

A utilização de tubetes para substituição de sacolas plásticas na produção de mudas de palma de óleo na fase de pré-viveiro é uma técnica recente e pouco adotada pelas empresas que fazem plantio na região, que preferem o método de produção convencional de mudas pelo uso de sacolas plásticas não renováveis. Acredita-se que essa escolha seja cultural, a limitada informação sobre as características do uso da técnica e a falta de empresas locais que possam fornecer material para atender a grande demanda. Poucos trabalhos foram realizados com objetivo de suprir essa importante informação, principalmente com a palma de óleo (TEIXEIRA et al., 2009), que oportunizará tanto a redução dos custos de manejo, quanto a pressão sobre os recursos naturais das áreas utilizadas, durante essa fase.

Até o momento não se tem relato de trabalhos que tenham utilizado a produção de HIE em tubetes e nem aclimatização de mudas obtidas *in vitro* tanto da variedade Tenera quanto do HIE. Portanto, essa pesquisa é pioneira em se tratando de aclimatização de plântulas de HIE produzidas *in vitro*.

As plântulas aclimatizadas dos híbridos CQ246 e CQ362 que apresentavam sistema radicular bem formado em tubetes contendo substratos regional e de fácil obtenção. A aclimatização ocorreu no período conhecido como inverno amazônico, que caracteriza-se por chuvas intensas principalmente no período da tarde. A estufa de nebulização era coberta apenas com sombrite, o que submetia as plântulas ao excesso de umidade, principalmente no substrato de difícil percolação.

Durante as avaliações verificou-se que as plântulas estavam sendo atacadas por insetos que danificavam as folhas, o que inviabilizou a coleta dos dados em relação ao tamanho das folhas. Nas primeiras duas semanas a mortalidade foi de 31,67% de plântulas, independentemente do tipo de substrato, sendo que o maior percentual (21,67%) foi verificado no híbrido CQ246, enquanto que o menor percentual de 10% no CQ362. Aos 90 dias, foi realizada a avaliação final que apresentou taxa de 61,7% de mortalidade das plântulas, sendo a maior (38,3%) no CQ246, seguido pelo CQ362 com 23,3%. Acredita-se que essas mortes foram devidas principalmente ao excesso de umidade no substrato e às chuvas constantes.

A sobrevivência das plântulas durante a aclimatização foi significativa considerando o tipo de híbrido e substrato com ( $p < 0,05$ ) e muito significativo ( $p < 0,01$ ), sendo também significativa a interação ( $p < 0,05$ ). Fato semelhante foi observado para o número de folhas desenvolvidas (Tabela 8).

**Tabela 8.** Análise da variância para as variáveis percentagem (%) de sobrevivência e número de folhas de plântulas de híbridos interespecíficos de palma de óleo (*E. oleifera* x *E. guineensis*), aclimatizadas em tubetes com diferentes substratos. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013.

| Fonte de variação | GL | QM <sup>(1)</sup> |                  |
|-------------------|----|-------------------|------------------|
|                   |    | % sobrevivência   | Número de folhas |
| Híbrido (Hb)      | 1  | 44,91 *           | 1,8*             |
| Substrato (Sb)    | 2  | 84,41**           | 2,88 ***         |
| Hb X Sb           | 2  | 41,01 *           | 1,75 **          |
| Resíduo           | 24 | 8,7               | 0,27             |
| Total             | 29 |                   |                  |
| CV (%)            |    | 63,2              | 37,3             |

<sup>(1)</sup> Quadrado médio. ns Não significativo pelo teste F. \*\* e \*\*\* Significativo a 1% e 0,1%, de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

Verificou-se que 100% das plântulas do híbrido CQ362 sobreviveram no substrato composto por terra preta + pó de coco, apesar de não apresentar diferenças estatisticamente significativas do substrato somente contendo terra preta. Quanto às plântulas do híbrido CQ 246 o melhor substrato foi somente terra preta, com percentual de sobrevivência de 25,8%, porém não diferindo estatisticamente dos demais (Figura 14).

Há indicação de que o substrato de terra + pó de coco seja mais propício na fase de aclimatização das plantas, devido ao pó de coco ter agido como barreira para evitar que o excesso de água fosse distribuído por todo o substrato, uma vez que foi observada a formação de lamina de água na superfície, e abaixo dessa não foi observado excesso de água, permitindo que as raízes não fossem estressadas pelo excesso de água. As trocas gasosas foram realizadas provavelmente pela abertura inferior do tubete, evitando o apodrecimento das raízes, concomitante a isso o sistema radicular do híbrido CQ362 foi bem formado durante o processo de enraizamento com desenvolvimento de raiz adventícia, principal e secundárias bem distribuídas.

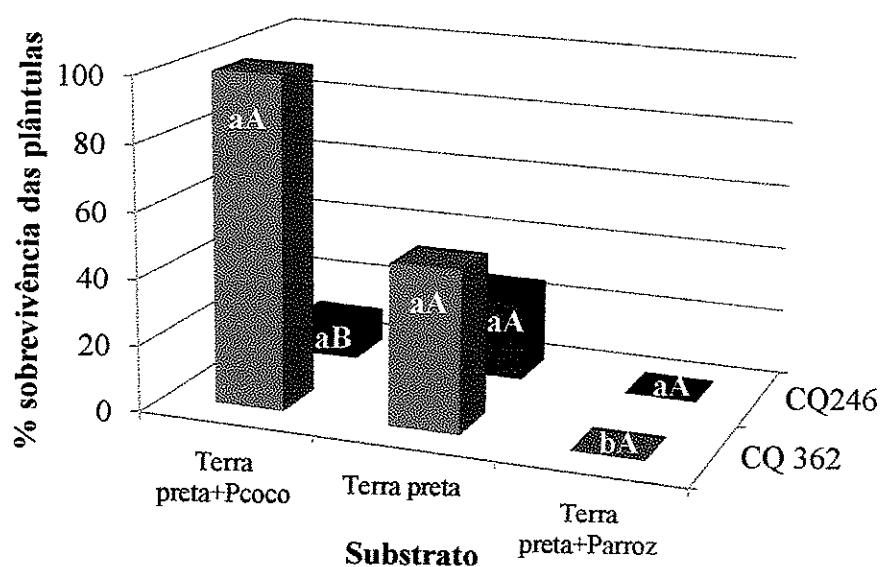
Segundo Ramos et al. (2012), a fibra ou pó de coco é um excelente substrato agrícola por apresentar estrutura física vantajosa, proporcionando alta porosidade e potencial de retenção de umidade, porém seu melhor efeito está associado ao uso de soluções nutritivas.

Ao comparar a densidade dos substratos terra preta, terra preta + pó de coco e terra preta + palha de arroz, verificou-se que a terra preta apresenta maior densidade em torno de 3,27 g cm<sup>-3</sup> em relação aos demais substratos testados, enquanto os dois últimos apresentam

praticamente a mesma densidade entorno de  $2,43 \text{ g cm}^{-3}$ , isso nas mesmas condições. Desta forma evidenciando que o pó de coco e palha de arroz são substratos que fazem com que o tubete fique mais leve facilitando o manejo no campo.

Esses resultado foram semelhantes aos obtidos por Saidelles et al. (2009) que testaram a utilização da casca de arroz carbonizada em diferentes proporções de solo em tubetes para formação de mudas de Tamboril-da-mata (*Enterolobium contortisiliquum*) e Garapeira (*Apuleia leiocarpa*) e verificaram que com a adição de arroz carbonizado ao solo houve a redução na densidade do substrato e concluíram que a melhor proporção é de 1:1, por favorecer o maior desenvolvimento da muda de *E. contortisiliquum*, enquanto que o aumento da proporção diminui o desenvolvimento das mudas de *A. leiocarpa*.

Para Teixeira et al. (2010), a utilização de tubetes em substituição a sacolas plástica na fase de pré-viveiro para palma de óleo apresenta vantagens onde se destacam a boa formação do sistema radicular, rápido crescimento inicial das mudas, menor consumo de substrato, maior número de mudas por área, possibilidade de reciclagem e facilidades operacionais, como peso, transporte e transplante das mudas.



**Figura 14.** Percentagem (%) de sobrevivência de plântulas de híbridos interespecíficos (CQ 246 e CQ362) de palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineensis*), aclimatizadas em tubetes com diferentes substratos. (médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na linha e maiúsculas na coluna não diferiram entre si, pelo teste de Tukey, a 5%). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013.

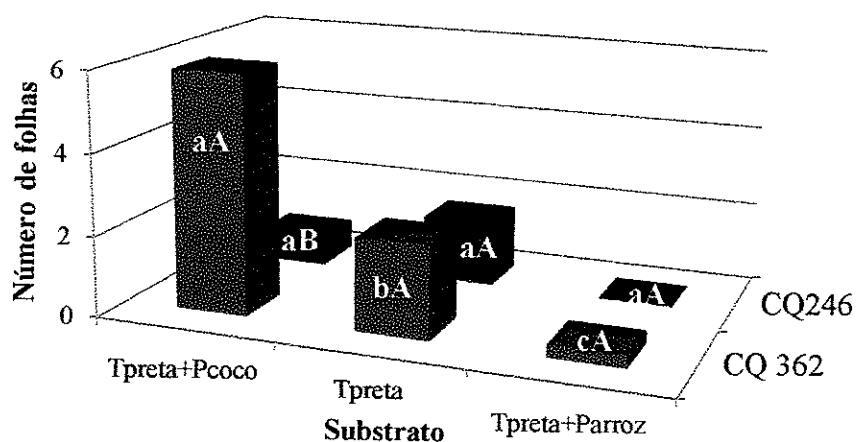
Verificou-se também que em relação ao número de folhas o melhor substrato foi terra preta + pó de coco, que resultou na formação de 5,9 folhas no híbrido CQ362, apresentou diferenças estatisticamente significativas em relação aos dois outros substratos (Figura 15). No entanto para o híbrido CQ246, o melhor substrato foi terra preta com 1,6 folhas formadas, apesar de não diferir estatisticamente da combinação de terra preta com pó de coco e palha de arroz.

Resultados promissores também foram obtidos por Reis et al. (2013) ao testarem diferentes composição de substratos em tubetes para adaptação e desenvolvimento de mudas de pupunheira (*Bactris galsipaes*) aos 4 e seis meses. Verificaram que as melhores composições foram utilizando 80% de fibra de coco + 20% de Plantmax e 80% de fibra de coco + 20% de fibra de pupunheira composta que obtiveram os maiores valores para as características altura, diâmetro do coleto e número de folhas e maior peso de massa seca.

A utilização de tubetes para realizar a aclimatização de plântulas produzidas *in vitro*, pode ser uma alternativa viável para produção de mudas bem formadas. Essa pesquisa obteve resultados que corroboram com os de Texeira et al. (2009), que ao testar tubetes juntamente com adubo de liberação lenta, mostraram que se pode fazer a substituição do sistema convencional da produção de mudas pela utilização de tubetes sem comprometer o desenvolvimento final das mudas.

Acredita-se que todos os substratos testados possam ser utilizados não ficando evidenciado nesse experimento, provavelmente pelo excesso de umidade no ambiente durante a execução do experimento. Torna-se importante a mistura da terra preta com outros substratos leves regionais de fácil obtenção, boa qualidade e de baixo custo, dessa forma resultando na redução tanto do impacto nas áreas de pré-viveiro, causada pela grande pressão de utilização do terriço no local, quanto da redução do custo na fase de pré-viveiro.

Vieira e Pauletto (2009) ao testarem o uso de polímero condicionador hidroabsorvente sobre os atributos físicos da casca de arroz carbonizada, concluíram que a adição desse polímero aumenta a água de reserva da casca de arroz facilitando o desenvolvimento da muda em períodos secos do ano.



**Figura 15.** Número de folhas de plântulas dos híbridos interespecíficos (CQ246 e CQ362) de palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineensis*), aclimatizadas em tubetes com diferentes substratos. (médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na linha e maiúsculas na coluna não diferiram entre si, pelo teste de Tukey, a 5%). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013.

Ao comparar plântulas dos híbridos CQ246 e CQ362 com raízes formadas durante o processo de germinação *in vitro*, com aquelas cujas raízes foram induzidas pela presença do ANA, percebeu-se que durante a aclimatização, as plântulas obtidas pelos dois processos apresentaram ambos desenvolvimento vigoroso caracterizando-se por apresentar folhas bem desenvolvidas, aparência normal e boa adaptação ao ambiente externo (Figura 16).



**Figura 16.** Aclimatização de plântulas normais de híbridos interespecíficos de palma de óleo (*E. oleifera* x *E. guineensis*), em tubetes. Evidenciando: a- Híbrido CQ362, no substrato terra preta + pó de coco; b- Plântula do Híbrido CQ362 formada sem adição de ANA, no substrato terra preta + palha de arroz; c- vigor da plântula do híbrido CQ362, no substrato de terra preta + palha de arroz ; d- vigor da plântula do híbrido CQ362, no substrato de terra preta. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013.

## 2.4 CONCLUSÃO

- 1) A temperatura de 39 °C acelera o início da germinação e o desenvolvimento *in vitro* em embriões de híbridos interespecíficos de palma de óleo.
- 2) As concentrações de 1,0 e 2,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA são indicadas para induzir maiores quantidade de plântulas enraizadas, assim como maior número de raízes nos híbridos CQ362 e CQ246;
- 3) Plântulas dos híbridos interespecífico CQ246 e CQ362, que foram enraizadas *in vitro*, podem ser eficientemente aclimatizadas em tubetes contendo substrato recomendado, desde que seja evitado a exposição das mesmas ao excesso de umidade durante o processo;

## 2.5 REFERÊNCIAS

- ALVES, S. A. O; LEMOS, O.F. de; SANTOS FILHO, B.G. dos; SILVA, A.L.L. da. *In vitro* embryo rescue of interspecific hybrids of palm (*Elaeis oleifera* x *Elaeis guineensis*). **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v.2, n.2, p.1-6, 2011.
- ALVES, S. A. O. Resgate *in vitro* de híbridos interespecíficos de dendezeiro (*Elaeis guineensis* x *Elaeis oleifera*). 2007. 62 f. Dissertação (Mestrado em Mestrado em Botânica da Universidade Federal Rural da Amazônia/ Museu Paraense Emilio Goeldi)- Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2007.
- ANGELO, P.C. da S.; MORAES, L.A.C.; SOUSA, N. R.; LOPES, R.; CUNHA, R. N. V. da. Resgate de Embriões Híbridos de Dendezeiro X Caiaué. Comunicado Técnico, Embrapa, Manaus, Julho, 2007.
- ANGELO, P.C. da S.; MORAES, L.A.C.; LOPES, R.; SOUSA, N. R.; CUNHA, R. N. V. da. *In vitro* rescue of interspecific embryos from *Elaeis guineenses* x *E. oleifera* (Recaceae). *Rev. Biol.trop.* v. 59 (3), p. 1081-1088, 2011.
- BIODIESEL.COM. Embrapa lança cultivar de dendê BRS Manicoré. Disponível em: <http://www.revistabiodieselbr>. Acesso em 12 de dezembro de 2012.
- BOARI, A. de J. O desafio das pesquisas com a etiologia do Amarelecimento Fatal (AF) da cultura da palma de óleo. In: Ramalho Filho et al., A. Zoneamento Agroecológico, Produção e Manejo para a Cultura da Palma de Óleo na Amazônia. Rio de janeiro: Embrapa Solos, 2010. 216 p.il., 2010.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Brasília: Mapa/ACS, 2009.
- CARDOSO, J. de N. O. Conversão *in vitro* de embriões zigóticos de híbridos de dendezeiro (*Elaeis guineensis* x *E.oleifera*) em plântulas. 2010. 74 f. Dissertação (Mestrado em agronomia)- Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2010.
- CARDOSO, J. de N. O.; MIRANDA, V. S.; LEMOS, O. F. de; COLEHO, I. L. Obtenção de plântulas de híbridos de dendezeiro por cultivo *in vitro*. **Revista de Ciências Agrárias**. v. 53, n.2, p. 177-181, 2010.

CHIA, G.S. Repetibilidade da produção de cachos, anomalias florais e germinação de pólen de híbridos interespecíficos entre o Caiaué e o dendezeiro. 2008. 60 f. Dissertação (Mestrado em biologia tropical e recursos naturais) - Universidade Federal do Amazonas, 2008.

COSTA, C.J.; MARCHI, E. C. S. Germinação de sementes de palmeiras com potencial para produção de agroenergia. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 35p., 2008.

CUNHA, R. N. V. da; LOPES, R. BRS Manicoré: híbrido interespecífico entre o Caiaué e o dendezeiro africano recomendado para áreas de incidência da amarelamento fatal Manaus: Embrapa Amazônia ocidental, 2010. 4p. (Embrapa Amazônia Ocidental Comunicado Técnico, 85).

CUNHA, R. N. V. da; LOPES, R.; JUNIOR GOMES, R. A.; RODRIGUES, M. do R. L.; TEIXEIRA, P. C.; ROCHA, R. N. C. da; LIMA, W. A. de. Material genético utilizado para a produção sustentável da cultura da palma de óleo na Amazônia. In: Ramalho Filho et al., A. Zoneamento Agroecológico, Produção e Manejo para a Cultura da Palma de Óleo na Amazônia. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2010. 216 p.il.

FABIANO, M. P. et al. Crescimento e Produção de Matéria Seca de Mudas de Dendezeiro em Função do Tempo de Pré-viveiro e da Percentagem de Ocupação da Bandeja pelos Tubetes. In: Anais da III Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental. 2008, p.78-88.

GOMES, S. M. da S. Polinizadores e semioquímicos do dendezeiro híbrido (*Elaeis oleífera* (H.B.K.) CORTÉS X *Elaeis guineenses* JACQ). 2011. 65 f. il. Tese (Doutorado em entomologia)- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

GREEN, M. Avaliação da qualidade de sementes de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) produzidas pela Embrapa Amazônia Ocidental. 2012. 79 f. il. Tese (Doutorado em agronomia) – Universidade Federal do Amazonas, 2012.

KONAN, E. K.; KOUADIO, J. Y.; GASSELIN-DURAND, T.; RIVAL, A. Evidence for an interaction effect during in vitro rooting of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq) somatic embryo-derived plantlets. **In vitro Cell. Dev. Biol.** v. 43, p. 456-466, 2007.

LÉDO, A. da S.; GOMES, K. K. P.; BARBOZA, S. B. S. C.; VIEIRA, G. S. S.; TUPINAMBÁ, E. A.; ARAGÃO, W.M. de. Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos e

- aclimação de plântulas de coqueiro-anão. **Pesq. Agropec. Bras.** v. 42, n. 2, p. 147-154, 2007.
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em 12 de dezembro de 2013.
- MAQUINÉ, T. M.; QUEIROZ, A. C.; ABREU, S. C.; LIMA, W.A.A. de.; GREEN, M.; RIOS, S. de A. Despolpa mecânica sobre a germinação de sementes do híbrido interespecífico BRS Manicoré (*Elaeis oelifera* x *Elaeis guineenses*). In: II Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos, 2012, Belém, PA. Anais... Belém, PA: Sociedade Brasileira de recursos genéticos, 2012. p. 664-667
- MOURA, E.F. Embriogênese somática em macacaúba: indução, regeneração e caracterização anatômica. 2007. 66 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento)- Universidade Federal, Viçosa MG, 2007.
- MOURA, J. I. L. Polinização do dendezeiro por *Elaeidobius subvittatus* Faust e *Elaeidobius Kamerunicus* Faust (Coleoptera, Curculionidae) no Sul do Estado da Bahia. 2008, 59 f. Tese (Doutorado em agronomia)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias- Unesp, 2008.
- 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.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum** v.15, p. 473-497, 1962.
- PÁDUA, M. S. Germinação *in vitro*, indução e caracterização de massas pró-embriogênicas de dendezeiro (*Elaeis guineenses* Jacq.). 2012. 118p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia vegetal)- Universidade Federal de Lavras, 2012.
- RAMOS, A. R. P.; DIAS, R. de C.; ARAGÃO, C. A.; MENDES, A. M. S. Mudanças de melancia produzidas com substrato à base de pó de coco e soluções nutritivas. **Horticultura Brasileira**, v. 30, p. 339-344, 2012.
- REIS, E. L.; SODRÉ, G. A.; SILVA, M. das G. P. C.; ABOBOREIRA NETO, M. Avaliação de substrato na formação de mudas de pupunheira (*Bactris gasipaes* H. B. K.) em tubetes. **Agrotrópica**. v. 25, n. 1, p. 61-64, 2013.

- SAIDELLES, F. L. F.; CALDEIRA, M. V. W.; SCHIRMER, W. N.; SPERANDIO, H. V. Casca de arroz carbonizada como substrato para produção de mudas de tamboril-da-mata e garapeira. Semina: **Ciências Agrárias**, v. 30, p. 1173-1186, 2009.
- TEIXEIRA, P. C.; RODRIGUES, H. S.; LIMA, W. A. A. L.; ROCHA, R. N. C.; CUNHA, R. N. V.; LOPES, R. Influência da disposição dos tubetes e da aplicação de fertilizantes de liberação lenta, durante o pré-viveiro, no crescimento de mudas de dendezeiro (*Elaeis guineenses* Jacq.). **Ciências Florestal**, v. 19, n.2, p. 157- 168, 2009.
- VIEIRA, M. A.; PAULETTO, E. A. Avaliação de atributos físicos dos substrato de casca de arroz (*Oryza sativa* L.) carbonizada e tratada com polímeros hidromórficos sintéticos. **Biosci. J.**, v. 25, n. 1, p. 1-6, 2009.
- ZONTA, E. P; MACHADO, A. A. SANEST- Sistema de análise estatística para microcomputadores. Pelotas: UFPel- SESI, 1984.

## Capítulo II

### Aspectos sobre a embriogênese somática em inflorescência de híbrido interespecífico de palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineensis*)

#### Resumo

O híbrido interespecífico da palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineensis*) tem sido plantado por apresentar boas características como baixo porte, qualidade de óleo e resistência a doenças, apesar da baixa produtividade em relação às variedades africanas e necessitar de polinização assistida. No entanto, trabalhos para sua propagação em alta escala são inexistentes no Brasil. Esse trabalho foi realizado com objetivo de desenvolver um protocolo para assepsia e a indução da embriogênese somática em inflorescência de plantas de híbrido interespecífico (HIE) obtidos em campo. As inflorescências femininas foram coletadas em plantas adultas no campo, aberta e fechada, e as estruturas da inflorescência submetidas a diferentes tratamentos para assepsia, testando-se álcool (70%) hipoclorito de sódio NaOCl (1,0 a 2,5%), antibióticos (Estreptomicina, Timentin), lavagens com água destilada e autoclavada, secagem em papel esterilizado antes da inoculação. O meio utilizado para esses testes foi o MS/2, suplementado com sacarose a 30 g L<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,17 g L<sup>-1</sup> e phytigel 0,22%. As condições de cultivo dos explantes foram de escuro e temperatura a 25°C, e as características avaliadas semanalmente consistiram de % (percentagem) de contaminação e oxidação. Para indução da embriogênese somática, inflorescência asséptica foi utilizada. As ráquias foram cortadas transversalmente com cerca de 0,5 cm de espessura. Foram testadas as auxinas Picloram e 2,4-D nas concentrações (0, 225, 450 e 675 µM) e a citocinina BAP nas concentrações (0, 25 e 50 µM). As variáveis analisadas foram % de formação de calos, alongamento, oxidação e intumescimento do botão floral. Para indução da embriogênese diferentes explantes de inflorescência foram utilizados (brácteas, estaminódios, ráquila botão floral e espata externa). As variáveis analisadas foram % de intumescimento, de calo formado, de oxidação e formação de embrióides, inoculados em 450 µM de Picloram. O meio de cultura utilizado foi MS, suplementado com sacarose a 30 g L<sup>-1</sup>, phytigel 0,22% e carvão ativado a 0,3%, mantidos no escuro a 25 °C e avaliados semanalmente por 90 dias. Não há necessidade do uso de antibióticos, desde que as inflorescências sejam coletadas imaturas caracterizadas por apresentar suas espatas intactas e fechadas. Picloram é a auxina mais indicada para induzir o crescimento celular do tecido do botão floral. O botão floral inteiro é o explante mais indicado

da inflorescência feminina para a indução da embriogênese somática de híbridos interespecíficos de palma de óleo (*E. guineensis* x *E. oleifera*).

Palavras-chave: micropropagação, produção de mudas, regeneração de plantas, calos embriogênicos.

### Abstract

The interspecific hybrid of oil palm (*E. oleífera* x *E. guineensis*) has been planted to provide good feature such as low size, oil quality and disease resistance, despite the low productivity in relation to African varieties and require assisted pollination. However, jobs for the propagation in large scale are inexistent in Brazil. This study was conducted to develop a protocol for disinfection and induction of somatic embryogenesis in inflorescences of plants of interspecific hybrid (HIE) obtained in the field. Female flowers were collected from mature plants in the field, open and closed, and the inflorescence structures subjected to different treatments for disinfection, testing alcohol (70%) sodium hypochlorite NaOCl (1.0 to 2.5%), antibiotics (Streptomycin, Timentin) washes with autoclaved distilled water, drying in a sterile paper before inoculation. The medium used for these tests was the MS/2 medium supplemented with sucrose at 30 g L<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.17 g L<sup>-1</sup> and 0.22% phytigel. Growing conditions of explants were dark and temperature at 25 °C, and the characteristics evaluated weekly consisted of % (percentage) of contamination and oxidation. For induction of somatic embryogenesis, aseptic inflorescence was used. The rachilles were spliced with approximately 0.5 cm thick. The auxins Picloram and 2,4-D were tested at concentrations (0, 225, 450 and 675 µM) and BAP concentrations (0, 25 and 50 µM). The variables analyzed were % of callus formation, elongation, rust and swelling of the bud. For induction of different explants embryogenesis inflorescence (bracts, staminodes, ráquila bud and outer sheath) were used. The variables analyzed were % swelling, callus formed, oxidation and formation of embryoid inoculated in 450 µM of Picloram. The culture medium used was MS supplemented with sucrose at 30 g L<sup>-1</sup>, phytigel 0.22% and 0.3% activated charcoal, kept in the dark at 25°C and evaluated weekly for 90 days. No need to use antibiotics since collected immature inflorescences are characterized by having their sheaths intact and close. Picloram is the most suitable auxin to induce cell tissue growth and flower bud. The whole flower bud is the most suitable explant female inflorescence for induction of somatic embryogenesis from interspecific hybrids of oil palm (*E. oleífera* x *E. guineensis*).

**Keywords:** micropropagation, plant propagation, plant regeneration, embryogenic calli.

### 3.1 INTRODUÇÃO

Em 2010 foi lançado o híbrido BRS Manicoré, resultante do cruzamento entre a palma de óleo africana de origem La Mé e o caiaué da origem Manicoré, da região Amazônica. A comercialização das sementes dessa cultivar são realizadas pela Embrapa e Denpasa que juntas tem capacidade para produção de 3 milhões de sementes pré-germinadas. (TAVARES, 2013).

O Brasil ainda não é suficiente na produção de sementes de híbridos estando aquém da demanda atual. Nos anos de 2011 e 2012 foram importadas 11.047.445 sementes, totalizando US\$ 21.104.724, cujos principais exportadores foram Costa Rica, Colômbia e Equador. A Costa Rica foi o maior fornecedor da variedade híbrida intraespecífica, enquanto que a Colômbia foi o único fornecedor da variedade HIE (MAPA, 2012).

A embriogênese somática surge como alternativa para auxiliar a propagação da palma de óleo, principalmente de híbridos interespecíficos (HIE) que atualmente é única alternativa para conter o avanço do Amarelecimento fatal (AF) no Brasil (CUNHA et al., 2010). Além de que essa técnica pode permitir que sejam produzidas plantas que mantenham as características desejáveis apresentadas pelos HIE, como reduzido crescimento de caule, maior insaturação de óleo e tolerância a pragas e doenças.

A embriogênese somática é uma das aplicações muito utilizada na cultura de tecidos para propagação em larga escala de plantas, em que células haplóides ou somáticas desenvolvem plantas normais com características genéticas idênticas ou não da planta que se quer propagar, dependendo da via de regeneração se direta ou indireta (GUERRA et al., 1998).

A descontaminação do explante é um passo fundamental para iniciar a cultura de tecidos de qualquer espécie de interesse (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). As plantas crescidas em condições naturais estão submetidas aos microorganismos presentes no ambiente, sob equilíbrio não afetando o desenvolvimento daquelas, porém esse estado pode ser alterado pela mudança das condições externas.

A coleta de inflorescência em estado juvenil tem sido adotada em alguns trabalhos com dendê (*E. guineensis*) usando as variedades Dura, Psífera e Tenera para iniciar a propagação vegetativa (CARVALHO, 2009; GUEDES, 2008; TEIXEIRA et al., 1994), porém comercialmente os laboratórios da Malásia tem utilizado principalmente folhas novas para propagação de clones (SOH et al., 2011).

Viñas e Jiménez (2011), ao relatar os fatores que afetam a embriogênese somática em palmeiras citam que são utilizados inflorescência, folhas e embriões zigóticos como explantes para indução da embriogênese somática em *E. guineensis*.

Até o momento não foram registrados trabalhos publicados na íntegra com assepsia de inflorescência de híbrido interespecífico (HIE), apesar de que essa tecnologia já vem sendo desenvolvida por laboratórios na Malásia para variedade africana e sugerida como uma das alternativas para reduzir o surgimento de anormalidades nas inflorescências e frutos “Mantled” (SOH et al. 2011). Enquanto que na Costa Rica, a Empresa ASD produz clones através do uso de inflorescência, por apresentar menor taxa de surgimento de “mantled” (GUZMÁN, 2010). No campo, a adoção dessa metodologia para inflorescência de HIE tem sido dificultosa, principalmente pelo seu porte baixo que induz o crescimento das folhas de forma mais compactada, que torna a retirada da inflorescência mais trabalhosa e demorada, causando grande injúria à planta fornecedora de explante (Matriz), sem contudo levá-la a morte.

Para produção de plantas de palma de óleo são raros os trabalhos de regeneração via embriogênese somática direta (GUEDES, 2008), em que os embriões são formados diretamente dos tecidos somáticos, e indireta, em que os embriões são originados a partir de calo. Os trabalhos publicados em nível de pesquisa reportam somente a utilização dessa técnica para a variedade africana. Em se tratando de produção comercial a maior frequência de informações também se reporta à variedade africana, enquanto que para o HIE são raras as informações e quando disponíveis são incompletas.

Os primeiros trabalhos registrados com a calogênese em dendê, utilizando embrião zigótico foi realizado por Rabechault et al. (1970), seguido por Smith e Thomas (1973), apud Teixeira (1996). Outros trabalhos foram realizados com a palma de óleo africana (*E. guineensis*) utilizaram embriões zigóticos como explante para iniciar a indução de calos embriogênicos (KANCHANAPOOM et al., 2010; MONTEIRO et al., 2012; MUNIRAN et al., 2008; SILVA et al., 2012; TEIXEIRA et al., 1993, 1995).

Segundo Viñas e Jiménez (2011) existem quatro etapas para embriogênese somática indireta que ocorre de maneira geral nas palmeiras. Calo pró-embriogênico (CP): onde se estabelece o estímulo celular e a formação de massa pró-embriogênica, em resposta a reguladores de crescimento, usualmente as auxinas; Desenvolvimento pró-embriogênico (DP): crescimento da massa celular; Maturação de pró-embriões (MP): estimula a conversão de pró-embriões em embriões e acúmulo de reserva e Desenvolvimento de embriões (DE): que estimula o crescimento dos embriões que passam pelas fases características de seu desenvolvimento

(globular, escutelar e coleoptilar) e se convertem em pequenas plantas completas (germinação dos embriões).

Os fatores que mais influenciam a embriogênese somática em ordem de importância são: Os reguladores de crescimento, o tipo de explante, o genótipo, o estado de desenvolvimento do explante, o meio de cultivo e o tamanho do explante. (VIÑAS; JIMÉZ, 2011). Os mesmos autores comentam que tanto em palma como em outras famílias de plantas, as auxinas são os reguladores de crescimento mais amplamente utilizados para induzir calo com potencial embriogênico.

Os trabalhos publicados mostram que as auxinas mais utilizadas para indução da embriogênese somática direta ou indireta são: 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenóxiacético), Picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico) e Dicamba (ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico) que podem ser utilizadas em diferentes concentrações dependendo do tipo de explante e sua resposta morfogênica, em palma de óleo (BALZON et al., 2013; GUEDES 2008, SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2010; THUZAR et al., 2011,) e outras palmeiras (SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2012; STEINMACHER et al., 2007).

A propagação de plantas via embriogênese indireta pode ocasionar o surgimento de variabilidade genética ou somaclonal, a mais conhecida é a formação de frutos “mantlet”, anormalidade no fruto resultante da feminilização das flores masculinas (estames) e estaminóides de flores femininas que se caracteriza pela formação de carpelos suplementares, que pode causar a total esterilidade das inflorescência ou a redução na taxa de extração do óleo de frutos. (CORLEY et al., 1986; GUZMÁN, 2010).

Gomes et al. (2012) estudando a fidelidade de clones de dendezeiro, via RAPD, produzidos via embriogênese somática, verificaram que ao comparar 2,4-D em relação ao Picloram, constataram que verificou-se que esse último não causa mutações genômicas nas plântulas produzidas.

Segundo Soh et al. (2011), os laboratórios que trabalham com a produção comercial de clones na Malásia têm reportado que as taxas de formação de “Mantled” estão abaixo de 5%, enquanto que Guzmán e Peralta (2010) na Costa Rica tem verificado taxas inferiores a 1%.

Esse trabalho tem como objetivo desenvolver um protocolo para assepsia e estudos sobre a indução da embriogênese somática em inflorescência de híbrido interespecífico (HIE) obtidos em campo.

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1 Material genético

Inflorescência de híbridos interespecíficos de Palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineenses*) foram coletadas na indústria MARBORGES localizada no município de Moju/PA.

A definição do processo de assepsia de inflorescência foi realizada em três etapas:

### 3.2.2 Assepsia de inflorescência com antibiótico estreptomicina

A inflorescência com a espata aberta, do híbrido (L31 P21) foi inicialmente coletada de planta com cerca de seis anos e no laboratório foram lavadas com detergente líquido e água em abundância. As ráquias foram removidas e na câmara de fluxo laminar foram imersas em álcool a 70% por um minuto, hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2,5% por 15 minutos e lavadas por três vezes com água destilada e autoclavada. Em seguida, os botões florais foram retirados e submetidos à assepsia, testando-se dois fatores: NaOCl nas concentrações de 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5%, e antibiótico estreptomicina 200 mg L<sup>-1</sup> (com e sem), com imersão por 15 minutos. O meio utilizado foi MS/2, suplementado com sacarose a 30 g L<sup>-1</sup>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,17 g L<sup>-1</sup> e phytigel 0,22%. Os botões foram inoculados em tubos de ensaio e mantidos em estufa modelo EL 202/4 no escuro a 25 °C, sendo avaliados semanalmente. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com cinco repetições por tratamento a unidade experimental foram cinco botões florais. As variáveis analisadas foram % de contaminação e % de oxidação. Para o teste de comparação de média foi utilizado Tukey a 0,5% de probabilidade, utilizado o programa Sanest (ZONTA; MACHADO, 1984).

### 3.2.3 Assepsia de inflorescência com antibiótico Timentin e Estreptomicina

Nesse experimento, inflorescência com a espata fechada do híbrido (L31 P21) foi removida dentro da câmara de fluxo laminar e após o procedimento de assepsia, sendo o mesmo do experimento anterior, diferindo apenas pela imersão de toda a inflorescência na solução de assepsia. Para assepsia, as ráquias foram imersas em NaOCl a 2% por 15 minuto, seguido do corte transversal com cerca de 0,5 cm de espessura e imersas em estreptomicina a 200 mg L<sup>-1</sup> por cerca de 30 minutos, e secas em papel de filtro autoclavado antes da inoculação. Os explantes foram inoculados em meio MS/2, suplementado com sacarose a 30 g L<sup>-1</sup>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,17 g L<sup>-1</sup> e phytigel 0,22% e adição de Timentin (Ticarclina + Clavulanato de potássio) a 0,0, 200, 300 e 400 mg L<sup>-1</sup>. Os botões inoculados em tubos de ensaio foram mantidos em estufa modelo EL 202/4 no escuro a 25 °C e avaliados semanalmente.

O delineamento foi inteiramente casualizado com cinco repetições por tratamento, a unidade experimental constituída de cinco explantes. As variáveis analisadas foram percentagem (%)

de contaminação e de oxidação. Para o teste de comparação de média foi utilizado Tukey a 0,5% de probabilidade, usando o programa estatístico Sanest (ZONTA; MACHADO, 1984).

### **3.2.4 Assepsia de inflorescência com uso de hipoclorito de sódio.**

A inflorescência com a espata fechada do híbrido (L31 P23) tiveram removidas suas espatas externa e a interna, sendo a interna dentro da câmara de flux laminar. A assepsia constou de imersão de toda inflorescência em álcool a 70% por um minuto e NaOCl a 1% por 30 minutos, seguida de lavagens por três vezes com água destilada autoclavada. As ráquulas das inflorescências foram removidas e passaram por outra assepsia com hipoclorito de sódio (0,0; 1,0; 1,5 e 2,0%), por 15 minutos, seguido de três lavagens com água destilada autoclavada, sendo cortadas transversalmente com cerca de 0,5 cm de espessura. Os explantes foram inoculados em meio MS/2, suplementado com sacarose a  $30 \text{ g L}^{-1}$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$   $0,17 \text{ g L}^{-1}$  e phytigel 0,22%. Os segmentos de raves foram mantidos em estufa modelo EL 202/4 no escuro a  $25^\circ\text{C}$  e avaliados semanalmente. O delineamento foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos e cinco repetições, a unidade experimental com cinco seções de raves. As variáveis analisadas foram % de contaminação e % de oxidação. Para o teste de comparação de médias foi utilizado Tukey a 0,5% de probabilidade.

### **3.2.5 Indução da embriogênese somática em inflorescência feminina**

Nesse experimento, a inflorescência com as espatas fechadas, do híbrido (L31 P20) foram lavadas com água e sabão previamente à remoção da espata externa. Em câmara de fluxo laminar a assepsia constou de álcool a 70% por um minuto e NaOCl a 2,5% por 15 minutos, com lavagem por três vezes com água destilada autoclavada, para retirar o excesso de cloro. As ráquulas foram retiradas individualmente, com auxílio de pinça e bisturi, e transferidas para frascos autoclavados com hipoclorito de sódio a 2% por 15 minutos, seguido de três lavagens com água destilada autoclavada.

As ráquulas receberam cortes transversais com cerca de 0,5 cm de comprimento e foram inoculados em potes plásticos de polipropileno com capacidade máxima de 250 ml. As auxinas (Picloram e 2,4-D) nas concentrações (0, 225, 450 e  $675 \mu\text{M}$ ) e a citocinina BAP (0, 25 e  $50 \mu\text{M}$ ) foram testadas em meio MS, suplementado com sacarose a  $30 \text{ g L}^{-1}$ , phytigel 0,22 % e carvão ativado a 0,3%. Os explantes foram mantidos em estufa modelo EL 202/4 no escuro a  $25^\circ\text{C}$  e avaliados semanalmente por cerca de 90 dias.

O experimento foi instalado em fatorial  $2 \times 4 \times 3$ , inteiramente casualizado com vinte e quatro tratamentos e cinco repetições, sendo a unidade experimental constituída de cinco

seções de ráquila. As variáveis analisadas foram percentual (%) de formação de calos, alongamento, oxidação e intumescimento do botão floral. Para o teste de comparação de médias foi utilizado Tukey a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram executadas no programa Sanest (ZONTA; MACHADO, 1984).

### **3.2.6 Indução da embriogênese somática em diferentes explantes da inflorescência**

Nesse experimento foram utilizada inflorescência com espata fechada da planta adulta de híbrido interespecífico de palma de óleo (*E. guineensis*) coletados em Moju/PA, em área de plantio da empresa MARBORGES S/A. A inflorescência no Laboratório de Biotecnologia de Plantas da Embrapa Amazônia Oriental, lavada com água e sabão líquidos por cerca de 5 minutos em água corrente em abundância, e removida a espata externa. A inflorescência, em câmara de fluxo laminar, passou por assepsia que constou de imersão em álcool a 70% por um minuto, NaOCl a 2,5% por 15 minutos, seguido de três lavagens com água destilada autoclavada. As ráquulas removidas passaram por outra etapa de assepsia que constou de imersão em hipoclorito de sódio a 2% por 15 minutos e lavagens com água autoclavada por três vezes. Os explantes foram excisados com auxílio de bisturi inoculados em meio MS, suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> sacarose, carvão ativado 3 g L<sup>-1</sup>, 450 µM de Picloram e solidificado com fitagel a 0,22%. O meio teve seu pH ajustado para 5,8 e autoclavado por 15 minutos a 120°C.

Foram testados os seguintes tipo de explante: T1-Brácteas, T2-Estaminódios, T3-Ráquila com botão floral, T4-Ráquila sem botão floral, T5- Botão floral segmentado, T6- Botão floral inteiro e T7- Espata interna.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, com sete tratamentos e cinco repetições, sendo a unidade experimental constituída por um frasco com cinco explantes. Os explantes foram mantidos em estufa modelo EL 202/4 a 25 ± 1 °C, no escuro e observados mensalmente. As variáveis observadas foram percentagem (%) de intumescimento de calo formado, de oxidação e de formação de embrióides. Para o teste de comparação de médias foi utilizado Tukey a 5% de probabilidade, sendo as análises estatísticas executados usando o programa Sanest (ZONTA; MACHADO, 1984).

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 3.3.1. Assepsia de inflorescência com antibiótico estreptomicina

O uso somente hipoclorito de sódio ou combinado com o antibiótico estreptomicina, em todas as concentrações, foram eficientes no controle de fungos nos botões florais em cultura. No entanto, não houve controle de bactérias, uma vez que em 100% dos explantes ocorreram esse tipo de contaminante (Tabela 9).

Esses resultados estão de acordo com Picolotto et al. (2007) que ao utilizar NaOCl nas concentrações de 2,5 e 5% para desinfestar sementes de jabuticabeira (*Myrciaria spp*), eliminaram 100% dos fungos, porém o mesmo não ocorreu com as bactérias obtendo até 86,73% de contaminação em baixa temperatura. Enquanto que Brondani et al. 2009 ao realizar assepsia em mini cepas de clones de híbridos de Eucalyptus com NaOCl nas concentrações de 0,5; 1,0; 1,5 e 2%, não reduziu a incidência de fungos que alcançou em média 41,33%, no entanto a contaminação por bactéria variou de 0 a 9% e ressaltaram a importância de identificar a fonte de contaminação durante o estabelecimento para auxiliar a estratégia de manejo fitossanitários na planta matriz que servirá de fonte de explante.

No trabalho atual acredita-se que as bactérias responsáveis pela contaminação dos botões são endógenas, uma vez que a inflorescência se encontrava madura, a espata aberta com exposição dos botões ao meio externo. A contaminação endógena é aquela que está presente nas células dos tecidos e que dificulta a ação dos agentes de descontaminação por necessitar de tempo maior para sua atuação.

Para Ribeiro e Bastos (2008), deve-se tomar cuidado com órgãos cronologicamente mais velhos, pois estão mais contaminados de que os juvenis, devido ao maior tempo de exposição aos agentes contaminantes.

Não foi observado Oxidação nos explantes, o que indica que os agentes usados não provocaram fitotoxidez dos tecidos do botão floral, que permaneceram esbranquiçados. Para Pereira e Fortes (2003), que avaliaram toxicidade dos antibióticos ampicilina, tetraciclina, clorafenicol e estreptomicina na cultura de batata *in vitro*, verificaram que os antibióticos tetraciclina, cloranfenicol e estreptomicina apresentam efeito fitotóxico, afetando a taxa de sobrevivência, altura de brotações e taxa de multiplicação, quando usado nas concentrações a partir de 64 até 1024 mg L<sup>-1</sup>, enquanto que a ampicilina não apresentou esse efeito. Para Palú et al. (2011) uma das limitações no uso de antibióticos adicionado em meio nutritivo, juntamente com o explante, é a fitotoxidez dessas substâncias em altas concentrações.

**Tabela 9.** Efeito de hipoclorito de sódio e estreptomicina na assepsia de inflorescência aberta de híbrido interespecífico de palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineensis*) quanto a contaminação e oxidação de botões florais, durante 15 dias de cultivo *in vitro*. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013.

| Tratamentos     |                                      | % contaminação |          | % oxidação |
|-----------------|--------------------------------------|----------------|----------|------------|
| Hipoclorito (%) | Estreptomicina (mg L <sup>-1</sup> ) | Fungo          | Bactéria |            |
| 1,0             | 0                                    | 0              | 100      | 0          |
| 1,5             | 0                                    | 0              | 100      | 0          |
| 2,0             | 0                                    | 0              | 100      | 0          |
| 2,5             | 0                                    | 0              | 100      | 0          |
| 1,0             | 200                                  | 0              | 100      | 0          |
| 1,5             | 200                                  | 0              | 100      | 0          |
| 2,0             | 200                                  | 0              | 100      | 0          |
| 2,5             | 200                                  | 0              | 100      | 0          |

### 3.3.2 Assepsia de inflorescência com antibiótico Timentin e estreptomicina

A contaminação e a oxidação não ocorreram, e os antibióticos estreptomicina e Timentin combinados não apresentaram efeito fitotóxico nos explantes (Tabela 10). Esses resultados foram semelhantes aos mostrados por Mantovani (2007) que verificou a adição no meio de cultura de PPM<sup>TM</sup> (Plant Preservative Mixture) a 1% e dos antibióticos Timentin e Agrimicina isoladamente ou combinados não ocasionaram efeito fitotóxico aos explantes de urucum. No entanto, Palú et al. (2011), ao utilizarem os antibióticos (cloranfenicol 30, cefalotina sódica 150, norfloxacin 400, ampicilina sódica 250, ácido nalidíxico 500 e tetraciclina 500 mg L<sup>-1</sup>) em meio de cultura, verificaram que os mesmos apresentam diferentes fitotoxidez em figueira (*Ficus carica*), evidenciado pelo percentual de sobrevivência dos explantes, que foi de 90,6% usando ampicilina sódica 250 e de 33,5% com a norfloxacin 400 mg L<sup>-1</sup>.

Observou-se também que não há necessidade do uso dos antibióticos, pois os resultados no tratamento usando álcool e hipoclorito de sódio se mostraram eficiente para a desinfestação superficial. Acredita-se que esse resultado foi devido à inflorescência ter sido coletada ainda imatura, com as espátas interna e externa intactas e fechadas envolvendo as ráquias e botões

florais, reduzindo assim o contato com o meio externo durante o desenvolvimento da inflorescência.

As inflorescências fechadas indicam que não há necessidade de uso de antibióticos na assepsia, podendo serem usadas com estratégia para evitar o uso dos antibióticos quando se pretende obter explantes assépticos, já que muitos retardam o crescimento de plantas *in vitro*, a formação de calos embriogênicos, assim como são tóxicos aos vegetais mesmo em baixas concentrações (BIASI, 1995; DODDS; GRATAPAGLIA; MACHADO, 1990; ROBERTS, 1985; PALÚ et al., 2011; PEREIRA; FORTES, 2003).

Para Biasi, (1995), o uso de antibióticos para o controle de bactérias, deve ser feito somente em extrema necessidade e em concentração necessária para seu controle.

Em se tratando de contaminações endógenas por bactérias, Donato et al. (2005) relataram que os antibióticos em meio de cultura têm apenas ação bacteriostática e não bactericida, apenas paralisando o crescimento nos tecidos da planta.

Segundo Reed et al.(1998), verificaram que a fitotoxidade dos antibióticos Timentin, gentamicina e estreptomicina é baixa, quando adicionados simultaneamente. Enquanto que em explantes de *Eucalyptus* concentrações de Timentin e carbenicilina de até 600 mg L<sup>-1</sup> não prejudicaram o processo morfogênico dessa espécie (PICOLI et al., 2005).

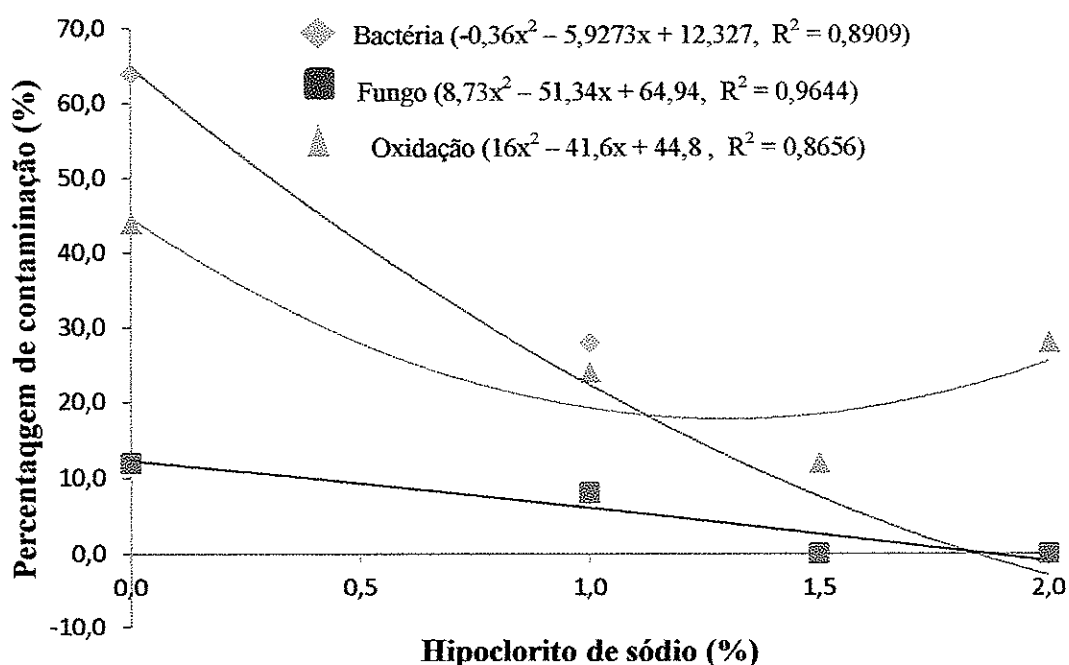
**Tabela 10.** Efeito do antibiótico estreptomicina e Timentin na assepsia de inflorescência de híbrido interespecífico de palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineensis*) quanto a contaminação e oxidação de ráquila, durante 15 dias de cultivo *in vitro*. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013.

| Antibióticos (mg.L <sup>-1</sup> ) |          | % contaminação |          | % oxidação |
|------------------------------------|----------|----------------|----------|------------|
| Estreptomicina                     | Timentin | Fungo          | Bactéria |            |
| 0                                  | 0        | 0              | 0        | 0          |
| 200                                | 200      | 0              | 0        | 0          |
| 200                                | 300      | 0              | 0        | 0          |
| 200                                | 400      | 0              | 0        | 0          |

### 3.3.3 Assepsia de inflorescência com uso de hipoclorito de sódio.

A assepsia realizada por 15 minutos somente nas ráquulas com hipoclorito de sódio, controlaram a contaminação tanto de fungos quanto de bactérias a zero “0” nas concentrações de 1,5 e 2,0% (Figura 17). Esse efeito foi mais evidente nas bactérias com o aumento da concentração do desinfestante, que mesmo após a realização da primeira assepsia ainda

permaneceu nos explantes com elevado percentual de 64%, enquanto que os fungos estavam presentes em níveis aceitáveis, cerca de 12%. Logo fica indicado que a maior contaminação externa apresentada pela inflorescência fechada é causada principalmente por bactérias que se encontram superficialmente nos explantes, e que podem ser eliminadas facilmente com desinfestação superficial utilizando NaOCl.

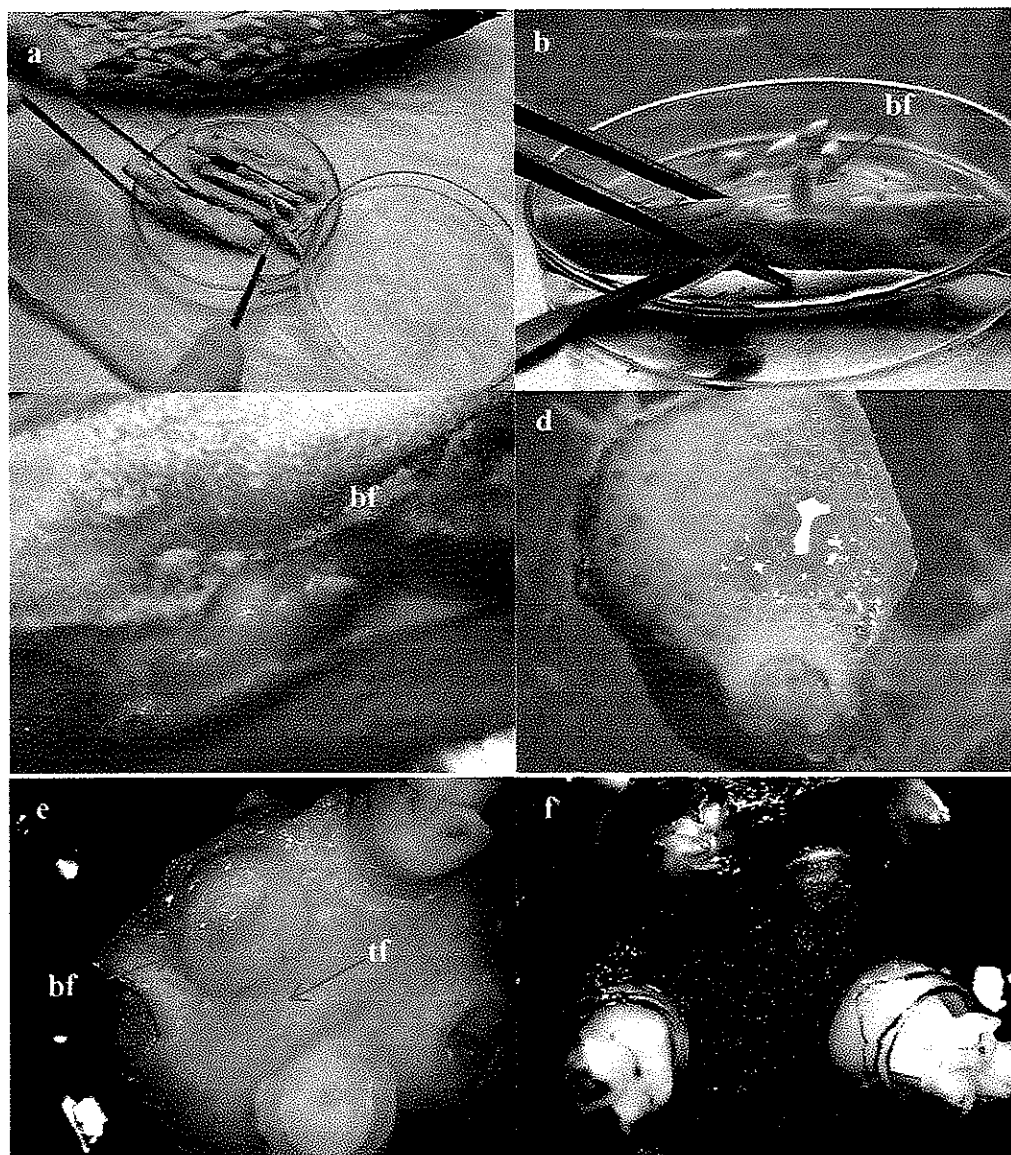


**Figura 17.** Desinfestação de segmentos de ráquila da inflorescência de híbridos interespecíficos de palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineensis*), usando diferentes concentrações de hipoclorito de sódio por 15 minutos, durante 30 dias de cultivo *in vitro*. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013.

Em relação a oxidação dos explantes, o uso de hipoclorito de sódio a partir de 1,0% provocou tendência ao aumento da porcentagem de oxidação das ráquulas, o que não ocorreu na ausência (0,0%). Acredita-se que o maior percentual de oxidação na ausência do reagente foi devido a dois fatores. O primeiro devido ao maior tempo de exposição do explante ao hipoclorito de sódio durante a primeira assepsia, que foi de 30 minutos e o segundo em relação ao número de enxague realizados nos explantes, uma vez que nessa fase houve apenas um, enquanto que após a imersão em NaOCl nas concentrações de 1,0; 1,5 e 2% houve mais um enxague, que acredita-se ter reduzido o excesso daquela substância nos explantes.

Ressalta-se que durante o corte da ráquila observou-se que a mesma era composta por tecidos fibrosos e por botões florais, os quais foram cortados em várias alturas, apresentando-se esbranquiçados no início do experimento (Figura 18- d).

A oxidação sofrida pelo segmento da ráquila somente ocorreu nos tecidos fibrosos, caracterizados pelo escurecimento progressivo desse tecido, enquanto que os botões que receberam cortes em locais aleatórios permaneceram esbranquiçados em toda sua extensão (Figura 18- c, d, f). Contudo, verificou-se que os tecidos fibrosos tendem a oxidar com o passar do tempo, em ambas as situações necessitando de uma atenção especial em trabalhos futuros que possam testar antioxidantes no controle dessa oxidação.



**Figura 18.** Ráquila da Inflorescência de híbridos interespecíficos de palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineensis*), em cultivo *in vitro*: a- Ráquila sendo segmentada; b- Botão floral (bf) aderido pela base a ráquila; c- Ráquila com botão floral inserido; d- Ráquila em corte transversal; e- Ráquila segmentada com botão floral (bf) e tecidos fibroso (tf), ambos não oxidados; f- Ráquila com tecidos fibrosos oxidados e botões florais alongados. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013.

Pelo teste de comparação de médias das variáveis analisadas contaminação por fungo, bactéria e oxidação (Tabela 11), os tratamentos não diferiram estatisticamente entre si quanto ao percentual de contaminação de fungo, porém não houve contaminação nas concentrações de NaOCl entre 1,5 e 2,0%. Para o percentual de contaminação por bactérias, o maior percentual de contaminação (60,78%) foi observado na ausência de NaOCl que diferiu estatisticamente em relação as demais concentrações. A ausência de contaminação bacteriana foi observado na concentração de 1,5 a 2,0%, enquanto que o percentual de oxidação não diferiu estatisticamente para as concentrações utilizadas, apresentando leve tendência para aumentar a oxidação com o aumento das concentrações de NaOCl. Os botões florais permaneceram sem oxidação em todas as concentrações usadas.

**Tabela 11.** Comparação de médias das variáveis percentagem (%) de contaminação por fungo, por bactéria e oxidação de ráquila de inflorescência de híbrido interespecífico de palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineensis*), com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (NaOCl) por 15 minutos, durante 30 dias de cultivo *in vitro*. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013.

| Tratamento<br>NaOCl (%) | Percentual (%)        |                          |          |
|-------------------------|-----------------------|--------------------------|----------|
|                         | Contaminação<br>Fungo | Contaminação<br>Bactéria | Oxidação |
| 0,0                     | 6,27 a                | 60,78 a                  | 34,9 a   |
| 1,0                     | 2,88 a                | 22,36 b                  | 19,73 a  |
| 1,5                     | 0,0 a                 | 0 c                      | 8,49 a   |
| 2,0                     | 0,0 a                 | 0 c                      | 27,19 a  |

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna, não diferiram entre si, pelo teste de Tukey, a 5%)

### 3.3.4 Indução da embriogênese somática em inflorescência

A embriogênese como via de regeneração de plantas pode ocorrer direta ou indiretamente a partir do tecido. Nesta última, os embriões são originados a partir de calos formados dos tecidos, mas há possibilidade de variação somaclonal, que consiste na falta de fidelidade genética, enquanto que a primeira ocorrer diretamente do tecido originário sem alterações genéticas.

Na palma de óleo verificou-se que o botão floral é composto de sépalas e gineceu que está protegido por um perianto com dois conjuntos de sépalas, em níveis distintos, que segundo Drude (1874) esta estrutura é característica apenas das flores femininas, que ficam distribuídas em dois verticilos, enquanto que as masculinas possuem sépalas e pétalas bem distintas.

Nesse experimento não houve a formação de calo em nenhum dos tratamentos aplicados, porém foi observado que houve o intumescimento tanto do tecido das sépalas quanto da base

do gineceu. Embora tivesse ocorrido o intumescimento em ambos os tecidos, as sépalas apresentaram desenvolvimento de células no local do corte e entre as mesmas, enquanto que o tecido do gineceu somente se expandiu. Acredita-se que pelas características mostradas pelos tecidos das sépalas, as mesmas podem servir como indicativo de células competentes para iniciar processos embriogênicos em HIE da palma de óleo.

Pelos resultados de percentagem (%) de intumescimento, alongamento e oxidação, verificou-se que a auxina e citocinina (BAP) nas concentrações testadas apresentaram efeitos significativos isoladamente ( $p < 0,001$ ), porém sem influência significativa da citocinina quanto a oxidação dos explantes (Tabela 12). Enquanto que a interação entre os fatores apresentou efeitos altamente significativos ( $p < 0,001$ ) com exceção para a análise da interação tendo a citocinina como fator para a variável oxidação, em que não apresentou diferença significativa.

**Tabela 12.** Análise da variância para o efeito dos fatores auxina, concentração e BAP em relação às variáveis percentagem (%) de intumescimento, alongamento e oxidação de botões florais de híbridos interespecíficos de palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineensis*) durante 90 dias em cultivo *in vitro*. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013.

| Fonte de variação | GL | QM (%)         |             |           |
|-------------------|----|----------------|-------------|-----------|
|                   |    | Intumescimento | Alongamento | Oxidação  |
| Auxina (A)        | 1  | 577,74 ***     | 21,7***     | 1112,9*** |
| Concentração (C)  | 3  | 144,96***      | 446,8 ***   | 126,4***  |
| BAP (B)           | 2  | 11,09***       | 11,75***    | 0,58 ns   |
| A X C             | 3  | 78,14***       | 26,2 ***    | 119,2***  |
| A X B             | 2  | 9,9***         | 10,6***     | 0,193 ns  |
| C X B             | 6  | 8,17***        | 10,2***     | 0,57 ns   |
| A X C X B         | 6  | 5,13***        | 10,5***     | 0,69 ns   |
| Resíduo           | 72 | 8,7            | 0,67        | 0,41      |
| Total             | 95 |                |             |           |
| CV (%)            |    | 17,5           | 23,5        | 9,8       |

QM-Quadrado médio

ns- Não significativo pelo teste F

\*\*\* Altamente significativo 0,1%, de probabilidade, pelo teste F.

De acordo com os resultados de comparação de média (Tabela 13) de percentagem (%) de intumescimento dentre as auxinas, destaca-se o Picloram a 225  $\mu\text{M}$ , sem a presença de BAP, com os maiores percentuais, alcançando 100 % dos botões, diferente estatisticamente das

demais concentrações de BAP. Entretanto, a presença de BAP, mesmo com o aumento da concentração de Picloram, não favoreceu ao intumescimento do botão floral.

Guedes (2008), ao utilizar o meio MS e Y<sub>3</sub> com a adição de 450 µM de 2,4-D e diferentes concentrações de BAP (0, 25 e 50 µM) para indução da embriogenese somática em segmentos transversais de inflorescência feminina de *E. guineensis*, verificou que o melhor meio foi o MS que induziu em média 54,8% embriões somáticos pela via direta após 90 dias independente da concentração de BAP.

Verificou-se que o percentual (%) de alongamento é um processo natural que ocorreu no botão floral, principalmente no tecido do gineceu, uma vez que os maiores percentuais foram obtidos na ausência das auxinas Picloram e 2,4-D, que inibiram esse processo nas células, com exceção da concentração de 225 µM de 2,4-D, combinado com 25 µM de BAP, que alcançou cerca de 94,8% de explantes alongados, diferindo estatisticamente das demais concentrações de BAP (Tabela 13).

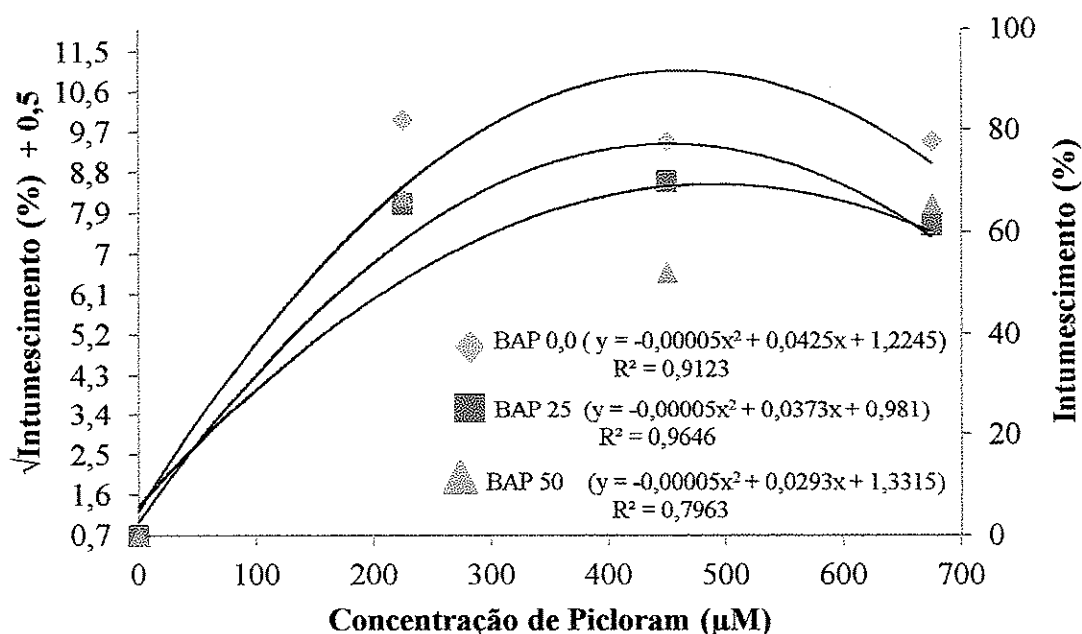
Esses resultados são contrários aos que relatam que as auxinas são efetivas para o aumento da extensibilidade da parede celular, que poderá ocorrer através de três etapas: absorção osmótica da água pela membrana plasmática; aumento da pressão de turgidez; e afrouxamento bioquímico da parede resultante da extrusão de prótons pelo aumento do pH do meio (TAIZ; ZEIGER, 2009). Segundo os mesmos autores a auxina também tem aplicação comercial na indução do crescimento do gineceu de flores de frutos não polinizados denominados de partenocarpos.

**Tabela 13.** Comparação de médias das variáveis percentagem (%) de intumescimento, alongamento e oxidação de botão floral de híbrido interespecífico de palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineensis*), submetidos a concentração (0, 225, 450 e 675 µM) de auxinas Picloram e 2,4-D em combinação com BAP (0, 25 e 50 µM). Durante 90 dias em cultivo *in vitro*. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013.

|          |      | Intumescimento |         |         | Alongamento |         |         | Oxidação |
|----------|------|----------------|---------|---------|-------------|---------|---------|----------|
|          |      | BAP (µM)       |         |         | BAP (µM)    |         |         |          |
| Auxina   | (µM) | 0              | 25      | 50      | 0           | 25      | 50      |          |
| Picloran | 0    | 0,0 aA         | 0,0 aA  | 0,0 aA  | 94,8 aA     | 100 aA  | 100 aA  | 97,4 A   |
|          | 225  | 100 aB         | 64,7 bB | 68,1 bB | 0,0 aB      | 0,0 aB  | 0,0 aB  | 0,0 B    |
|          | 450  | 89,7 aB        | 74,1 aB | 43,2 bB | 0,0 aB      | 0,0 aB  | 0,0 aB  | 0,9 B    |
|          | 675  | 89,7 aB        | 57,8 bB | 64,7 bB | 0,0 aB      | 0,0 aB  | 0,0 aB  | 0,0 B    |
| 2,4-D    | 0    | 0,0 aA         | 0,0 aA  | 0,0 aA  | 89 aA       | 94,8 aA | 94,8 aA | 100 A    |
|          | 225  | 29,2 bB        | 0,0 cA  | 49,5 aB | 0 cB        | 94,8 aA | 14,6 bB | 92,6 A   |
|          | 450  | 0,0 aA         | 0,0 aA  | 0,0 aA  | 0,0 aB      | 0,0 aB  | 0,0 aB  | 100 A    |
|          | 675  | 0,0 aA         | 0,0 aA  | 0,0 aA  | 0,0 aB      | 0,0 aB  | 0,0 aB  | 100 A    |

Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5%

Quando se analisa a atuação do Picloram combinado com diferentes concentrações de BAP, mostrado no gráfico de análise de regressão (Figura 19), percebe-se que a medida que se aumenta a concentração dessa auxina o percentual de intumescimento tende a aumentar até atingir o percentual máximo 104,5% com 425  $\mu\text{M}$ , na ausência de BAP, e verifica-se que essa citocinina inibiu o intumescimento do botão floral e por conseguinte do tecido que compõem o gineceu e as sépalas.

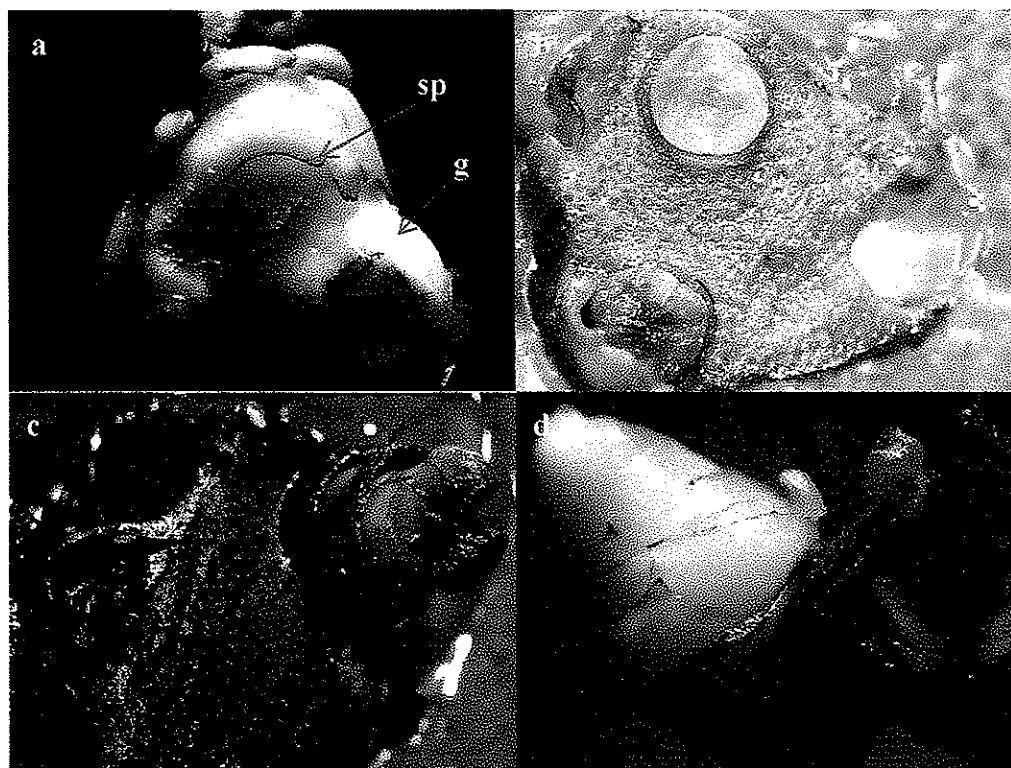


**Figura 19.** Gráfico de regressão polinomial para concentrações de Picloram combinado com BAP (0,0, 25, 50  $\mu\text{M}$ ) em relação a média da variável percentagem (%) de intumescimento de botão floral de híbrido interespecífico de palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineensis*), durante 90 dias em cultivo *in vitro*. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013.

Observou-se que as menores taxas de oxidação ocorreram na presença de Picloram nas concentrações de 225, 450 e 675  $\mu\text{M}$ , que não diferiram estatisticamente entre si. No entanto, as maiores taxas foram obtidas na ausência das auxinas e em todas as concentrações de 2,4-D. Acredita-se que o Picloram induz a multiplicação celular evitando a necrose dos tecidos das sépalas e gineceu (Figura 20).

Esses resultados foram semelhantes aos obtidos por Steinmacher et al. (2007) ao testarem diferentes concentrações (150, 300 e 600  $\mu\text{M}$ ) das auxinas Picloram, 2,4-D e Dicamba para indução da embriogenese somática em inflorescência imatura de dois genótipos de *Bactris gasipaes*, verificando que as maiores taxas de oxidação foram obtidas com 2,4-D para ambos os genótipos avaliados.

Acredita-se que as respostas da oxidação dos tecidos pela ação das auxinas são diferentes e dependem do tipo de explante que será definido, uma vez que Thuzar et al. (2011) ao utilizarem embriões zigóticos nos meios de cultura N6 e MS com as auxinas Picloram, 2,4-D e Dicamba na concentração de  $2 \text{ mg L}^{-1}$  para indução da embriogênese somática, verificaram que a maior taxa de oxidação foi de 11,5; 9,8 e 9,3% com Picloram, 2,4-D e Dicamba, respectivamente, apesar de não diferirem estatisticamente, nos calos durante os três meses de avaliação.



**Figura 20.** Ráquila de híbrido interespecífico da palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineensis*), submetidos a auxinas Picloram e 2,4-D em combinação com BAP, durante 90 dias em cultivo *in vitro*. Evidenciando: a- Botão floral com sépalas (se) e gineceu (g) intumescidos, b- Botão floral oxidado e não alongado, c- botão floral alongado e não intumescido; d- verticilos protetores internos e externos do botão floral. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013.

### 3.3.5 Indução da embriogênese somática em diferentes explantes da inflorescência

Na busca de definição de tecidos competentes embriogenicamente foram testados diferentes tipos de explantes (Figura 21) obtidos de apenas uma inflorescência, pois havia dúvidas de quais tecidos florais são mais eficientes na formação de linhagens embriogênicas, de qual local são formados e quanto tempo devem permanecer na fase de indução.

A contaminação dos explantes, foi muito baixa, com exceção da espata interna que apresentou cerca de 17,1% de contaminação, o que deve estar associado a ter passado por apenas uma etapa de assepsia. Logo, esse experimento comprovou que o procedimento de assepsia adotado foi eficiente.

O experimento foi conduzido durante 66 dias e foi finalizado quando houve a formação de estruturas semelhantes a embriões somáticos. Considerando o tempo abaixo do observado para formação de linhas embriogênicas em palma de óleo, superior a 90 dias (BALZON et al., 2013; GUEDES, 2008; SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2012; STEINMACHER et al., 2007; THUZAR et al., 2011;), houve sinalização que outros explantes são competentes.

A avaliação final aos 66 dias permitiu observar características morfológicas externas semelhantes a embriões somáticos que foram avaliadas quanto ao número e tamanho dessas estruturas, indicando que as mesmas foram formadas em menor tempo, provavelmente entre o período de 45 a 66 dias.

Verificou-se que na ráquila existem brácteas que constituem o apêndice de proteção tanto para os botões florais quanto para os estaminódios, que se caracterizam como flores masculinas inférteis, que também estão inseridos na ráquila. Os estaminódios formam um par localizado na parte superior do botão e tendo seu pedúnculo aderido à ráquila (Figura 22-b), são inférteis e abortivos e formam com as flores femininas uma tríade, conjunto de duas flores masculinas ao redor de uma feminina, também encontrada em outras palmeiras (BURQUEZ et al., 1987; KÜCHMEISTER et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2003). No caso da palma de óleo, essas informações sobre a morfologia da inflorescência são raras ou incompletas na literatura, pois não descrevem com exatidão os detalhes.

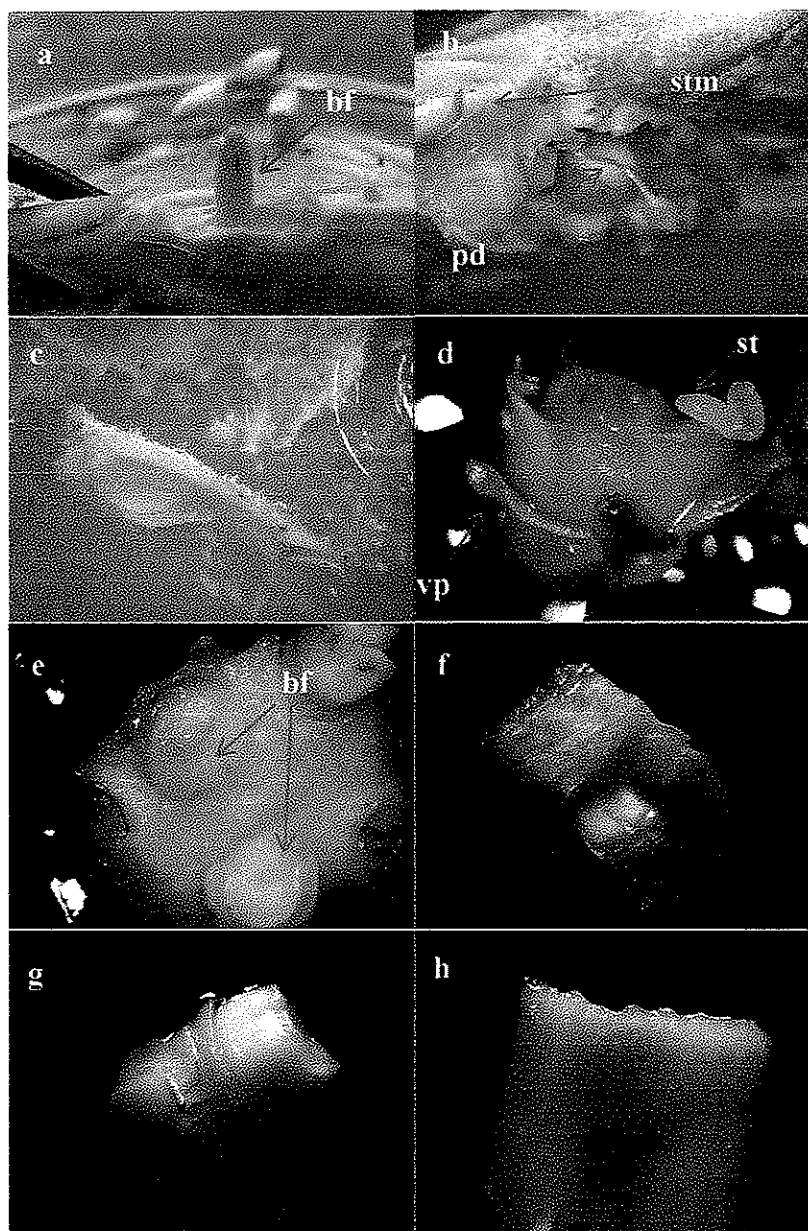
As flores femininas são constituídas por cálice e corola, cada uma constituída por três verticilos protetores, porém a corola é semelhante às sépalas em tamanho e cor, por isso denominada de estrutura sepalóide.

O intumescimento do explante foi um bom indicativo para a formação de estruturas semelhantes a embriões somáticos, apesar de que o seu surgimento não implicou na formação de embriões, como foi verificado para os tecidos das brácteas, estaminódios e botão segmentado.

O termo intumescimento utilizado aqui nesse experimento pode ser considerado como expansão celular, uma vez que Raven et al. (2007) descreveram que dois fatores são importantes para multiplicação dos seres multicelulares: a expansão celular e a divisão celular, e que a primeira compreende ao aumento do volume celular na fase G1 do ciclo

celular, enquanto a segunda é responsável para originar uma réplica perfeita da informação genética ou hereditária da célula-mãe.

Os explantes que sofreram intumescimento apresentaram as seguintes características: bordas dos tecidos aumentadas e enrugadas e ausência de oxidação caracterizado pelo tecido de coloração esbranquiçada. É importante relatar que durante as avaliações do experimento, o pistilo dos botões inteiro teve crescimento exagerado, intumescceu e não oxidou, mas não induziu a formação de calos, nem a formação de embriões, mantendo a parede lisa e brilhante do tecido (Tabela 14).



**Figura 21.** Explantes de inflorescência utilizados para indução da embriogênese somática de híbrido interespecífico da palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineensis*), submetidos à concentração de 450  $\mu$ M de Picloram. Durante 66 dias em cultivo *in vitro*. Evidenciando: a- Botão floral inteiro (bf), b- Estaminódio (stm) inserido na ráquila, pelo pedúnculo (pd), c- Bráctea; d- Estaminódio aberto com verticilo protetor (vp) e estames infértis (et); e- Ráquila

com botão; f- Ráquila sem botão; g- Botão segmentado; h- Espata interna. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013.

Segundo a análise da variância (Tabela 15), para o fator tipo de explante, as variáveis analisadas (percentagem de: intumescimento, embriões somáticos e oxidação), foram altamente significativa ( $p < 0,001$ ), indicando que pelo menos um tipo de explante diferiu estatisticamente em relação aos demais.

**Tabela 15.** Análise da variância para efeito do tipo de explante de inflorescência do híbrido interespecífico de palma de óleo (*E. oleifera* x *E. guineensis*), submetidos à concentração de 450  $\mu$ M de Picloram, em relação as variáveis percentagem (%) de: intumescimento, embriões somáticos e oxidação. Durante 66 dias em cultivo *in vitro*. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013.

| Fonte de variação | GL | QM             |                    |          |
|-------------------|----|----------------|--------------------|----------|
|                   |    | (%)            |                    |          |
|                   |    | intumescimento | embriões somáticos | oxidação |
| Tipo de explante  | 6  | 118,4 ***      | 14,8***            | 58,7 *** |
| Resíduo           | 28 | 0,34           | 0,14               | 2,74     |
| Total             | 34 |                |                    |          |
| CV (%)            |    | 10,1           | 28                 | 59,8     |

QM-Quadrado médio

ns- Não significativo pelo teste F

\*\*\* Altamente significativo 0,1%, de probabilidade, pelo teste F.

Os explantes que apresentaram maiores taxas de intumescimento (Tabela 16) foram: brácteas (100%), botão floral segmentado (100%), botão floral inteiro (100%) e estaminódios (81,9%), diferindo estatisticamente dos demais tipos. Porém somente o botão floral inteiro teve percentual de formação de estruturas semelhantes a embriões somáticos de 27,2%, diferindo estatisticamente em relação aos demais explantes avaliados. As evidências indicam a presença de células meristemáticas nos tecidos das sépalas, com grande potencial para formação de linhagens embriogênicas e que respondem a indução pela auxina Picloram em espaço curto de tempo em relação a outros trabalhos realizados.

Esses resultados são semelhantes aos obtidos por Balzon et al. (2013), que ao induzirem embriogênese somática em embriões zigóticos maduros da variedade Tenera, submetidos as auxinas Picloram e 2,4-D na concentração de 450  $\mu$ M, obtiveram com o uso Picloram 97,5% de calos embriogênicos formados na presença de carvão ativado, enquanto que no meio de cultura contendo 2,4-D houve a formação de 79,4% de calos embriogênicos. Enquanto que Scherwinski-Pereira et al. (2012) ao utilizarem embriões zigóticos imaturos da palmeira açaí

(*Euterpe oleracea*) em meio de cultura MS com as auxinas Picloram e 2,4-D nas concentrações (0,0; 250 e 450  $\mu\text{M}$ ), obtiveram 72% de calos embriogênicos com embriões somáticos formados em meio contendo Picloram na concentração de 250  $\mu\text{M}$ , enquanto que não houve formação de embriões somáticos nas concentrações de utilizadas de 2,4-D.

Até o momento esses resultados são inéditos, pois não se verifica na literatura referências sobre a utilização de sépalas para indução da calogênese ou embriogênese somática em HIE da palma de óleo.

Durante a indução da embriogênese não houve a formação de calos ou massa pré-embriogênica. As estruturas embriogênicas foram formadas diretamente do tecido do explante, indicando via de regeneração por embriogênese direta, sendo considerado um dos pouco casos com sucesso em palma de óleo (GUEDES, 2008).

Em relação a oxidação, os explantes que menos oxidaram foram botão inteiro, botão segmentado, espádice interna, estaminódio e bráctea, com 0, 0, 0, 7,8 e 12,8%, respectivamente, semelhantes estatisticamente entre si. Enquanto que as maiores oxidações foram das ráquulas com e sem botão que alcançaram 100% e diferiram dos demais. É importante mencionar que a oxidação foi somente do tecido fibroso das ráquulas, enquanto que os botões inseridos nelas não oxidaram.

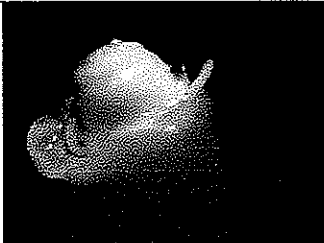
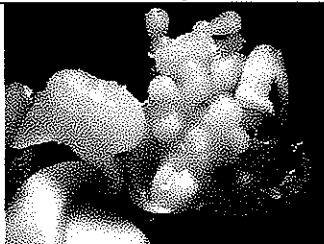
**Tabela 16.** Comparação de média para tipos de explantes obtidos da inflorescência do híbrido interespecífico de palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineensis*), submetidos à concentração de 450  $\mu\text{M}$  de Picloram, em relação as variáveis percentagem (%) de: intumescimento, embriões somáticos e oxidação, durante 66 dias em cultivo *in vitro*. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013.

| Tipo de explante  | % (Percentagem) |                    |          |
|-------------------|-----------------|--------------------|----------|
|                   | Intumescimento  | Embriões somáticos | Oxidação |
| Bráctea           | 100 a           | 0 b                | 12,8 b   |
| Estaminódio       | 81,9 a          | 0 b                | 7,8 b    |
| Ráquila com botão | 0 b             | 0 b                | 100 a    |
| Ráquila sem botão | 0 b             | 0b                 | 100 a    |
| Botão segmentado  | 100 a           | 0 b                | 0 b      |
| Botão inteiro     | 100 a           | 27,2 a             | 0 b      |
| Espádice interna  | 0 b             | 0 b                | 0 b      |

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5%

Acredita-se que os demais tecidos poderão formar embriões somáticos, porém com tempo maior de exposição ao Picloram na concentração testada.

**Tabela 14.** Caracterização das fases de formação das estruturas semelhantes a embriões somáticos obtidas a partir de explantes de botão inteiro da inflorescência do híbrido interespecífico de palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineensis*) submetidos à concentração de 450  $\mu$ M de Picloram. Durante 66 dias em cultivo *in vitro*. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2013.

| Fases                                                                               | Característica                                                                                                                                                                               |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    | Botão floral da flor feminina composto por dois grupos de verticilos (sépalas e sepalóide) protetores e um pistilo trifido, retirado da ráquila                                              |
| <b>Assepsia/Isolamento</b>                                                          |                                                                                                                                                                                              |
|   | Botão floral com sépalas intumescidas envolvendo o pistilo em meio MS suplementado com 450 $\mu$ M de Picloram, após 9 dias de cultivo.                                                      |
| <b>Estabelecimento</b>                                                              |                                                                                                                                                                                              |
|  | Crescimento do pistilo evidenciando tecido liso e intumescimento das sépalas e sepalóides, após 19 dias de cultivo.                                                                          |
| <b>Indução</b>                                                                      |                                                                                                                                                                                              |
|  | Formação de estruturas globulares semelhantes a embriões somáticos em fase globular formadas diretamente da base do tecido da sépala, sem passar pela fase de calo, após 66 dias de cultivo. |
| <b>Formação de estruturas embriogênicas</b>                                         |                                                                                                                                                                                              |

### 3.4 CONCLUSÃO

- 1) O hipoclorito de sódio a partir de 1,5% controlam a contaminação por fungos em botões florais de HIE da palma de óleo;
- 2) A utilização do antibiótico estreptomicina a  $200 \text{ mg L}^{-1}$  não controla a infestação dos botões florais por bactérias;
- 3) A utilização de hipoclorito de sódio e estreptomicina não provocam oxidação nos tecidos dos botões florais de HIE.
- 4) A combinação dos antibióticos estreptomicina e Timentin não causam efeitos de fitotoxicidade aos botões florais de HIE;
- 5) Picloram na concentração de  $450 \text{ } \mu\text{M}$  é a auxina mais indicada para induzir o crescimento celular do tecido do botão floral do híbrido interespecífico de palma de óleo;
- 6) As sépalas são explantes mais competentes para iniciar a multiplicação de células embriogênicas;
- 7) As características da embriogênese somática a partir de explantes florais de HIE de palma de óleo indica ocorrer de forma direta sem passar pela fase de calo, ou seja, ocorre diretamente das células meristemática.

### 3.5 REFERÊNCIAS

- BALZON, T. A.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. New approaches to improve the efficiency of somatic embryos. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant*, v.49, p.41-50, 2013.
- BIASI, L.A. Fitotoxicidade de três antibióticos na cultura *in vitro* de abacateiro. *Bragantia*, Campinas, v. 54, n. 2, p. 251-256, 1995.
- BRONDANI, G. E.; DUTRA, L. F.; GROSSI, F.; WENDLING, I.; HORNIG, F. Estabelecimento, multiplicação e alongamento *in vitro* de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden. *Revista árvore*, v. 33, n. 1, p.11-19, 2009.
- CARCALHO, M. Embriogênese somática a partir de folhas imaturas e flores desenvolvidas *in vitro* de dendezeiro (*Elaeis guineenses* Jacq). 2009. 86 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.
- CORLEY, R. H. V.; LEE, C. H. LAW, I. H.; WONG, C. Y. Abnormal flower development in oil palm clones. *The Planter*, v. 62, p. 233-240, 1986.
- CUNHA, R. N. V. da; LOPES, R.; JUNIOR GOMES, R. A.; RODRIGUES, M. do R. L.; TEIXEIRA, P. C.; ROCHA, R. N. C. da; LIMA, W. A. de. Material genético utilizado para a produção sustentável da cultura da palma de óleo na Amazônia. In: Ramalho Filho et al., A. Zoneamento Agroecológico, Produção e Manejo para a Cultura da Palma de Óleo na Amazônia. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2010. 216 p.il.
- DONATO, V. M. T. S.; ANDRADE, A. G. de; TAKAKI, G. M. de C.; MARIANO, R. de L. R.; MACIEL, G. A. Plantas de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* com antibióticos. *Ciênc. Agrotec.*, Lavras, v. 29, n. 1, p. 134-141, 2005.
- DRUDE, C. G. O. Palmae (Arecaceae). In: MARTIUS, C. F. P. V.; EICHLER, A. W. *Flora brasiliensis*. v.3, part 2, p. 455-459, tab 105, 1874.
- GOMES, H. T.; MATA, L. R. da; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; AZEVEDO, V. C. R. Análise da fidelidade genética de clones de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.). produzidos via embriogênese somática por marcadores RAPD. In: II Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos, 2012, Belém, PA. Anais... Belém, PA: Sociedade Brasileira de recursos genéticos, 2012. p. 304-307.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, A. J. (eds.). Cultura de tecidos e transformação de plantas. Brasília: EMBRAPA-SPI/CNPH, 1998, v. 1, p. 183-260.

GUEDES, R. da S. Embriogênese somática e regeneração de plantas de dendezeiro. 2008. 126 f. Dissertação (Mestrado em produção vegetal). Universidade Federal do Acre. Rio Branco, 2008.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: EMBRAPA-SPI, EMBRAPA-CNPH, v. 1, p. 533-568, 1998.

GUZMAN, N. M. Curso internacional palma aceitera. Costa Rica. ASD de Costa Rica SA. p. 1-13, 2010.

MANTOVANI, N. C. Propagação vegetativa e cultivo *in vitro* de *Bixa orellana* L. e *Ginkgo biloba* L. 2007. 135 f. Tese (doutorado em Botânica)- Universidade Federal de Viçosa. 2007.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em 12 de dezembro de 2013.

MAPA. Relatório de importação de sementes no Estado do Pará. Belém, 2012. 10p. (Documento Técnico).

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.

MONTEIRO, T. R.; BALZON, T. A.; SCHERWINSKI-PEREIRA. Estabelecimento de cultivos embriogênicos em suspensão em dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.). In: II Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos, 2012, Belém, PA. Anais... Belém, PA: Sociedade Brasileira de recursos genéticos, 2012. p. 584-587.

KANCHANAPOOM, K.; PHONGDARA, A.; KANCHANAPOOM, K. The Effect of Chitosan on the Organogenesis of Oil Palm Embry-Derived Callus. Not. Bot. Hort. Agrobot. Chuj. v.38, p.213-217, 2010.

OLIVEIRA, M. do S. P. de; COUTURIER, G.; BESERRA, P. Biologia da polinização da palmeira tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart.) em Belém, Pará, Brasil. Acta botânica bras. v. 17, n. 3, p. 343-353, 2003.

PALÚ, E. G.; CORRÊA, L. de S.; SUZUKI, A. N.; BOLIANI, A. C. Uso de antibióticos para o controle de bactérias endógenas visando à micropropagação da figueira. Rev. Bras. Frut. v. 33, n. 2, p. 587-592, 2011.

PICOLI, E. A. T.; ALFENAS, A. C.; DIAS, L. L. C.; NEVES, D. A.; OTONI, W. C. In vitro morphogenesis of *Eucalyptus grandis*: effects of antibiotic and explante sources. Crop Breeding and Applied Biotechnology, v. 5, n.2, p.234-240, 2005.

PICOLOTTO, L.; SCHUCH, M. W.; SOUZA, J. A. de; SILVA, L. C.; FERRI, J.; FACHINELLO, J. C. Efeito do hipoclorito de sódio, fotoperíodo e temperatura no estabelecimento in vitro de jabuticabeira. Scientia Agraria, Curitiba, v. 8, n. 1, p. 19-23, 2007.

PEREIRA, J.; FORTES, G. Toxicidade de antibióticos no cultivo in vitro da batata em meios semissólido e líquido. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, n.11, v.38, p. 1273- 1279, 2003.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. Biologia Vegetal. 7 ed. Guanabara koogan, p. 856, 2007.

REED, B.M.; MENTZER, J.; TANPRASERT, P.; YU, X. Internal bacterial contamination of micropropagated hazelnut: Identification and antibiotic treatment. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Netherlands, v.52, p. 67-70, 1998.

RIBEIRO, J. M.; BASTOS, D. C. Biorreatores: Aspectos gerais e sua utilização para cultura de tecidos vegetais. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 26p. 2008.

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

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

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

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

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.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 954 p.2012.

TAVARES, J. A esperança na palma. **Revista BiodieselBR**, Curitiba, ano 6, n.33, p.34-37, fev/marc. 2013.

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.

TEIXEIRA, J. B. A cultura de tecidos de dendê. In: WORKSHOP SOBRE A CULTURA DO DENDÊ, 1996, Manaus. Anais...Manaus: Embrapa CPAA, 1996. 120 p. (Embrapa CPAA. Documentos, 5).

VIÑAS, M.; JIMÉZ, V.M. Factores que influyen em la embriogénesis somática in vitro de palmas (Arecaceae). Ver. Colomb. Biotecnol. v. XIII, n. 2, p. 229-242, 2011.

ZONTA, E. P; MACHADO, A. A. SANEST- Sistema de análise estatística para microcomputadores. Pelotas: UFPel- SESI, 1984.

### 3.6 CONCLUSÕES GERAIS

A palma de óleo é uma espécie que tem se destacado no cenário nacional e internacional, devido a seus inúmeros usos pelas indústrias e por sua alta produtividade de óleo, entorno de 4 a 6 ton.ha<sup>-1</sup>, superior a muitas commodities agrícolas como a soja e outras. No entanto, os maiores países produtores têm sido questionados pela comunidade internacional, quanto, aos impactos gerados ao meio ambiente por essa atividade, tais como na redução das áreas florestadas e da biodiversidade, principalmente na Malásia e Indonésia, principais países produtores.

No Brasil, particularmente no estado do Pará, destacam-se os impactos relacionados a baixa oferta de alimentos pelos pequenos agricultores, pois essa atividade tem concorrido com a produção de farinha, milho e feijão, comprometendo a segurança alimentar.

Por outro lado, a cultura da palma de óleo tem se caracterizado como geradora de emprego, com a absorção da mão de obra local que reflete na redução da pressão das comunidades sobre a floresta e protege o solo contra a erosão etc.

Em relação ao uso da técnica de embriogênese somática para produção de mudas da palma de óleo, países como Malásia, Costa Rica e Equador têm dominado essa tecnologia e produzem comercialmente clones, principalmente de variedades africanas, além de serem os maiores fornecedores de sementes pré-germinadas. O uso da clonagem tem garantido aos países detentores dessa tecnologia alcançarem maior uniformidade e produtividade das plantas nas áreas plantadas, pois são selecionadas e propagadas as variedades mais produtivas.

O Brasil está muito aquém no uso dessa técnica para produção comercial, estima-se atraso de cerca de 30 anos, e para tanto, necessita de maior investimentos e de políticas voltadas para o fortalecimento da pesquisa e desenvolvimento da cultura para dar suporte à produção. As pesquisas de propagação da palma de óleo tem utilizado a variedade comercial Tenera com resultados promissores via embriogênese somática indireta. Essa tese apresenta resultados inéditos com o HIE, tanto para embriogênese somática quanto para a germinação *in vitro*, e dará suporte para outros trabalhos futuros. Foi possível verificar também que não há informação sobre a atuação de empresas brasileiras aplicando os resultados das pesquisas de clonagem para a produção de mudas, seja de variedades intraespecíficas ou interespecíficas.

Os laboratórios que utilizam a técnica de propagação em larga escala da palma de óleo já trabalham na redução de gastos e fazem estudos para redução da mão de obra por meio do uso de biorreatores. Agora a meta é testar e desenvolver biorreatores para produzir clones superiores em larga escala, com o cuidado de selecionar na fase inicial mudas que não apresente variação somaclonal, adotando marcadores genéticos e moleculares para detectar quaisquer alterações genética ou cromossomal nas células.

Os resultados obtidos no trabalho atual mostram que é possível acelerar o processo de germinação de embriões de HIE maduros ao serem submetidos a temperatura de 39°C em até 21 dias, permitindo a produção de mudas em três meses, e maiores taxas de obtenção de plantas pelo aproveitamento dos embriões isolados.

Os resultados obtidos indicam a utilização de botões florais de inflorescência para regenerar plantas via embriogênese somática, pois ocorre indução e formação de estruturas semelhantes a embriões somáticos, diretamente do tecido reprodutivo, sem passar pela fase de calo, em meio básico de cultura MS com a adição da auxina Picloram a 450  $\mu\text{M}$  durante 60 dias de cultivo.

## APÊNDICE

