



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Botânica

Análise morfoanatômica, bioquímica e molecular de dendezeiros (*Elaeis guineensis* Jacq.) regenerados por embriogênese somática em sistema de imersão temporária

Hugo Teixeira Gomes

Brasília – DF

2016

Análise morfoanatômica, bioquímica e molecular de dendezeiros (*Elaeis guineensis* Jacq.) regenerados por embriogênese somática em sistema de imersão temporária

Tese apresentada ao Departamento de Botânica, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Botânica.

Aluno: Hugo Teixeira Gomes

Orientador: Jonny E. Scherwinski-Pereira

Brasília – DF

2016

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

GG633a Gomes, Hugo Teixeira
Análise morfoanatômica, bioquímica e molecular de
dendezeiros (*Elaeis guineensis* Jacq.) regenerados
por embriogênese somática em sistema de imersão
temporária / Hugo Teixeira Gomes; orientador Jonny
Everson Scherwinski-Pereira. -- Brasília, 2016.
189 p.

Tese (Doutorado - Doutorado em Botânica) --
Universidade de Brasília, 2016.

1. Arecaceae. 2. Micropropagação. 3. Histologia.
4. Fisiologia. 5. Genética. I. Scherwinski-Pereira,
Jonny Everson, orient. II. Título.

Análise morfoanatômica, bioquímica e molecular de dendezeiros (*Elaeis guineensis* Jacq.) regenerados por embriogênese somática em sistema de imersão temporária

Hugo Teixeira Gomes

‘Esta Tese foi julgada adequada para a obtenção do Título de Doutor e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Botânica’.

Banca examinadora:

Jonny Everson Scherwinski-Pereira
Doutor em Agronomia
Presidente da Banca

João Batista Teixeira
Doutor em Biologia Vegetal
Membro titular

Vânia Cristina Rennó Azevedo
Doutora em Biologia Molecular
Membro titular

Marilia Santos Silva
Doutora em Ciências Biológicas
Membro titular

Cristiane da Silva Ferreira
Doutora em Ciências Biológicas
Membro titular

Maria Elvira de Rezende
Doutora em Produção Vegetal
Membro suplente

Dedico este trabalho aos meus pais Arlindo da Cruz Gomes Júnior e Branca Regina Teixeira, e à minha esposa, amiga e companheira Patrícia Monah Cunha Bartos.

“Nunca se vence uma guerra lutando sozinho”

Raul Seixas – Por quem os sinos dobram

AGRADECIMENTOS

À minha esposa Patrícia Monah Cunha Bartos, por todas as emoções que me fez sentir, por todos os momentos inesquecíveis que passamos juntos, por todo amor, carinho, paciência e dedicação, e por tudo que faz pra que eu seja feliz;

Aos meus pais Arlindo da Cruz Gomes Júnior e Branca Regina Teixeira, à Jeanice Maria Gomes, ao meu filho(a) que está pra chegar, ao meu irmão Bruno Teixeira Gomes e aos meus sobrinhos Vinícius Rambo Gomes e Ana Beatriz Gomes Mota, pelo amor, carinho, amizade, compreensão e confiança destinados a mim e ao meu crescimento;

Aos meus amigos Sidney Avelar, Francisco Bruno Marinho, Anderson Claiton da Silveira, Jeuel Lopes, Hudson Gabriel, André Matos, Joyce Santos, Lucas Gomes, Paulo Henrique Macedo, Vinicius Henrique Mariano, Raphael Chaves e Ronaldo Viveiros, pela amizade e pela história que construímos juntos;

Aos meus colegas de laboratório Paulo Cezar, Stenio Steferson, Elínea Freitas, Tatiane Monteiro, Talita Balzon, Jaqueline Vasconcelos, Giuliano Fruger, Raphael Ferreira, Luciana Lacerda, Anderson Lucas, Filipe Sathler, Glória Almeida e Allan Laid, pelo convívio diário e pela amizade construída;

Ao meu orientador Jonny Everson Scherwinski Pereira, pela orientação, confiança, dedicação e respeito;

Aos analistas André Luís Xavier de Souza, Lorena Ramos da Mata e Zilneide Pedrosa de Souza Amaral, pelo apoio técnico, compreensão, amizade e orientação;

Ao professor e pesquisador Thomas Christopher Rhys Williams, pelo apoio e orientação na realização das análises bioquímicas;

À pesquisadora Vânia Cristina Rennó Azevedo, pela orientação e apoio na realização das análises genéticas;

Ao pesquisador Peter Ward Inglis pela orientação na realização das análises por marcadores AFLP;

Ao pesquisador João Batista Teixeira, pelos concelhos e por todas as participações em minhas bancas;

À Patrícia Monah Cunha Bartos, pela elaboração dos esquemas ilustrados utilizados no trabalho;

Aos secretários do Programa de Pós-graduação em Botânica da Universidade de Brasília Eduardo Barreto e Sarah Lee, pelo apoio e pela dedicação no trabalho prestado aos alunos e pela amizade adquirida;

Ao Programa de Pós-graduação em Botânica da Universidade de Brasília, pelo conhecimento transmitido;

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e à Universidade de Brasília, pela estrutura física fornecida para a realização dos experimentos;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo apoio financeiro ao projeto e pela concessão de bolsa;

Ao Programa de Melhoramento Genético de Dendzeiro da Embrapa Amazônia Ocidental, pelo fornecimento do material vegetal utilizado no trabalho.

Muito obrigado !!!

ÍNDICE DE ASSUNTOS

FICHA CATALOGRÁFICA.....	i
BANCA EXAMINADORA.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
EPÍGRAFE.....	iv
AGRADECIMENTOS.....	v
ÍNDICE DE ASSUNTOS.....	vii
ÍNDICE DE TABELAS.....	xii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiv
SÍMBOLOS E ABREVIACÕES.....	xix
RESUMO.....	xxiii
ABSTRACT.....	xxv
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1 Dendzeiro (<i>Elaeis guineensis</i> Jacq.)	5
2.2 Embriogênese somática.....	10
2.3 Biorreatores de imersão temporária.....	16
2.4 Fidelidade genética e variação somaclonal.....	23
2.5 Marcadores moleculares.....	25
2.5.1 Marcadores ISSR.....	28
2.5.2 Marcadores AFLP.....	30
2.6 Anatomia vegetal.....	34
2.7 Bioquímica vegetal.....	37
3. OBJETIVOS.....	41
3.1. Objetivo geral.....	41
3.2. Objetivos específicos.....	41
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

CAPÍTULO 1

Sistemas de imersão temporária na multiplicação de calos e regeneração de plantas de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) durante a embriogênese somática de folhas imaturas de plantas adultas

RESUMO.....	60
ABSTRACT.....	62
1. INTRODUÇÃO.....	64
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	66
2.1 Local de realização dos experimentos.....	66
2.2 Material vegetal.....	66
2.3 Obtenção dos explantes.....	66
2.4 Multiplicação de calos em biorreatores de imersão temporária.....	67
2.5 Diferenciação de embriões somáticos.....	69
2.6 Regeneração de embriões somáticos em biorreatores de imersão temporária.....	69
2.7 Descrição dos biorreatores de imersão temporária utilizados.....	71
2.8 Enraizamento <i>in vitro</i>	72
2.9 Condições de cultivo.....	72
2.10 Aclimatização das mudas.....	72
2.11 Análises estatísticas.....	73
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	74
3.1 Multiplicação de calos em biorreatores de imersão temporária.....	74
3.2 Regeneração de embriões somáticos em biorreatores de imersão temporária.....	79
4. CONCLUSÕES.....	85
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86

CAPÍTULO 2

Análise molecular de dendezeiros (*Elaeis guineensis* Jacq.) regenerados por embriogênese somática em sistema de imersão temporária (R.I.T.A.®)

RESUMO.....	90
ABSTRACT.....	91
1. INTRODUÇÃO.....	92
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	94
2.1 Local de realização dos experimentos.....	94
2.2 Material vegetal.....	94
2.3 Obtenção dos explantes.....	94
2.4 Análise da fidelidade genética e epigenéticas dos clones por marcadores ISSR e AFLP (MSAP)	96
2.4.1 Extração do DNA genômico.....	96
2.4.2 Análise ISSR.....	97
2.4.3 Análise AFLP (MSAP).....	99
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	103
3.1 Análise da fidelidade genética por marcadores ISSR.....	103
3.2 Análise da fidelidade epigenética por marcadores AFLP (MSAP).....	105
4. CONCLUSÕES.....	113
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	114

CAPÍTULO 3

Análise dos eventos morfoanatômicos envolvidos durante a embriogênese somática do dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) em sistema de imersão temporária (R.I.T.A.®)

RESUMO.....	117
ABSTRACT.....	118
1. INTRODUÇÃO.....	119
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	121
2.1 Local de realização do experimento.....	121

2.2 Material vegetal.....	121
2.3 Obtenção dos explantes.....	121
2.4 Caracterização morfoanatômica dos estádios de desenvolvimento.....	122
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	124
4. CONCLUSÕES.....	139
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	140

CAPÍTULO 4

Análise bioquímica dos eventos associados com a embriogênese somática do dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) em sistema de imersão temporária (R.I.T.A.®)

RESUMO.....	144
ABSTRACT.....	146
1. INTRODUÇÃO.....	148
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	150
2.1 Local de realização dos experimentos.....	150
2.2 Material vegetal.....	150
2.3 Obtenção dos explantes.....	150
2.4 Caracterização bioquímica dos estádios de desenvolvimento.....	151
2.4.1 Açúcares solúveis.....	152
2.4.2 Amido.....	153
2.4.3 Ácidos graxos (ésteres metílicos de ácidos graxos).....	154
2.4.4 Aminoácidos livres.....	155
2.4.5 Proteínas totais.....	156
2.5 Análises estatísticas.....	157
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	158
3.1 Açúcares solúveis.....	158
3.2 Amido.....	163
3.3 Ácidos graxos (ésteres metílicos de ácidos graxos).....	166
3.4 Aminoácidos livres.....	173

3.5 Proteínas totais.....	178
4. CONCLUSÕES.....	182
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	184

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Influência dos sistemas de cultivo no ganho de biomassa fresca e seca (%), em função do tempo de cultivo, na multiplicação de calos de dendezeiro (C2328) obtidos via embriogênese somática de folhas imaturas.....75

Tabela 2. Influência da variedade nas médias referentes ao ganho de biomassa fresca (%), em função do tempo de cultivo, durante a multiplicação de calos de dendezeiro, obtidos por embriogênese somática de folhas imaturas em biorreatores de imersão temporária modelo R.I.T.A.®78

Tabela 3. Influência dos sistemas de cultivo no ganho de biomassa (%), número de plantas regeneradas, percentagem de plantas com altura na classe 1 ($\leq 1,25$ cm), classe 2 ($> 1,25$ e $\leq 2,5$ cm), classe 3 ($> 2,5$ e $\leq 5,0$ cm) e classe 4 ($> 5,0$ cm), percentagem de plantas com raiz e no número de embriões secundários neoformados, por grama de material vegetal inoculado, durante a regeneração de embriões somáticos de dendezeiro (C2328) obtidos via embriogênese somática de folhas imaturas.....80

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Lista dos 28 *primers* utilizados na análise da fidelidade genética de clones de dendezeiro produzidos via embriogênese somática por marcadores ISSR e suas respectivas sequências.....97

Tabela 2. Sequências (5' - 3') dos adaptadores e *primers* utilizados na análise da fidelidade genética de clones de dendezeiro produzidos via embriogênese somática por marcadores AFLP (MSAP).....100

Tabela 3. Análise da fidelidade genética de clones de dendezeiro propagados via embriogênese somática de folhas imaturas por marcadores ISSR.....103

Tabela 4. Análise da fidelidade epigenética de clones de dendezeiro propagados via embriogênese somática de folhas imaturas por marcadores AFLP (MSAP).....105

Tabela 5. Análise de variância molecular (AMOVA) dos locos submetidos ou não ao processo de metilação.....106

Tabela 6. Frequência (%) dos diferentes estados de metilação nos 203 locos sujeitos a esta alteração química nos indivíduos provenientes dos diferentes sistemas de cultivo.....112

CAPÍTULO 4

Tabela 1. Teores dos ácidos graxos que constituem os lipídeos entre as etapas de multiplicação e regeneração da embriogênese somática de folhas imaturas de dendezeiro.....170

ÍNDICE DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1.** Aspectos gerais da morfologia de um genótipo superior de dendezeiro de alta produtividade de óleo e crescimento vertical do caule reduzido. **A)** Morfologia da planta; **B)** Morfologia dos cachos; **C)** Morfologia dos frutos.....9
- Figura 2.** Etapas da embriogênese somática indireta, realizada a partir de embriões zigóticos de dendezeiro. **A-B)** Indução de calos; **C)** Multiplicação dos massivos celulares; **D)** Diferenciação de embriões somáticos; **E-F)** Regeneração de plantas.....14
- Figura 3.** Recipiente de imersão temporária automatizado (R.I.T.A.[®]).....19
- Figura 4.** Sistema de biorreator frascos gêmeos BIT (Embrapa).....20
- Figura 5.** Análise da regeneração de embriões somáticos de dendezeiro em sistemas de imersão temporária. **A)** Regeneração em meio semi-sólido (controle); **B)** Regeneração em R.I.T.A.[®]; **C)** Regeneração em BIT; **D)** Clusters de embriões somáticos regenerados em BIT; **E)** Plantas enraizadas, plantas $\geq 5,0$ cm, plantas $> 2,5$ e $< 5,0$ cm e plantas $\leq 2,5$ cm, respectivamente; **F)** Embriões secundários neoformados.....22
- Figura 6.** Aspectos gerais de frutos de dendezeiro oriundos de plantas propagadas *in vitro*. **A)** Fruto normal; **B)** Fruto anormal fértil; **C)** Fruto anormal infértil.....25
- Figura 7.** Marcador ISSR na análise da fidelidade genética de clones de dendezeiro micropropagados via embriogênese somática.....30
- Figura 8.** Marcadores AFLP (MSAP) na análise da fidelidade genômica de clones de dendezeiro micropropagados via embriogênese somática.....34
- Figura 9.** Análise morfoanatômica do processo de diferenciação e maturação de embriões somáticos de dendezeiro, obtidos por embriogênese somática de embriões zigóticos. **A)** Aspectos morfológicos; **B)** Aspectos anatômicos.....37

CAPÍTULO 1

- Figura 1.** Esquema ilustrado do experimento de multiplicação de calos primários de dendezeiro em biorreatores de imersão temporária.....68
- Figura 2.** Esquema ilustrado do experimento de regeneração de embriões somáticos de dendezeiro em biorreatores de imersão temporária.....70
- Figura 3.** Esquema ilustrado do experimento de aclimatização das mudas de dendezeiro regeneradas em biorreatores de imersão temporária.....73
- Figura 4.** Multiplicação de calos de dendezeiro (C2328) obtidos via embriogênese somática de folhas imaturas. **A)** Multiplicação em meio semi-sólido; **B)** Multiplicação em meio líquido sob agitação; **C)** Multiplicação de biorreator BIT; **D)** Multiplicação em biorreator R.I.T.A.[®].....76
- Figura 5.** Regeneração, enraizamento e aclimatização de plantas de dendezeiro (C2328) produzidas via embriogênese somática de folhas imaturas. **A)** Regeneração em biorreator modelo R.I.T.A.[®]; **B)** Morfologia de plantas classes 1, 2, 3 e 4 e plantas com raiz, respectivamente; **C)** Aspecto de uma planta obtida por embriogênese somática enraizada *in vitro*; **D)** Planta de dendezeiro clonada aclimatizada.....83

CAPÍTULO 2

- Figura 1.** Análise da fidelidade genética de clones de dendezeiro micropropagados via embriogênese somática de folhas imaturas. **A-B)** *Primers* 2 e 12 zm na amplificação do DNA dos indivíduos provenientes da multiplicação e regeneração em meio semi-sólido, respectivamente; **C-D)** *Primers* 10 ps e 16 zm na amplificação do DNA das culturas oriundas da multiplicação e regeneração em R.I.T.A.[®], respectivamente; **E-F)** *Primers* 55 e 4 zm na amplificação do DNA dos propágulos provenientes da multiplicação em meio líquido e regeneração em meio semi-sólido, respectivamente.....104
- Figura 2.** Análise de coordenadas principais (PCoA) dos locos sujeitos (A) ou não (B) a metilação para a diferenciação epigenética dos clones de dendezeiros produzidos pela embriogênese somática. As coordenadas C1 e C2

são mostradas com a percentagem de variância explicada entre eles. Pontos diferentes representam indivíduos diferentes. Nome do grupo mostra o centro da sua nuvem de pontos. Elipse representa a dispersão média dos pontos ao redor de seu centro. O eixo mais comprido da elipse mostra a direção de dispersão máxima e, o eixo menor a direção de dispersão mínima.....107

Figura 3. Variações epigenéticas observadas nos clones de dendezeiro obtidos pela embriogênese somática de folhas imaturas.....109

Figura 4. Análise da fidelidade epigenética de clones de dendezeiro micropropagados via embriogênese somática de folhas imaturas. **A-B)** *Primers* Eco-AGG/Hpa-TTA e Eco-AGG/Msp-TTA na amplificação do DNA dos indivíduos oriundos da multiplicação e regeneração em biorreatores R.I.T.A.[®], respectivamente (bandas entre 50 e 550 pb).....110

CAPÍTULO 3

Figura 1. Aspectos morfológicos e anatômicos de calos primários de dendezeiro, obtidos de folhas imaturas de plantas adultas, utilizados no início da etapa de multiplicação. **A)** Morfologia externa; **B-C-D)** Secções anatômicas.....125

Figura 2. Aspectos morfológicos e anatômicos de calos embriogênicos de dendezeiro utilizados no início da etapa de multiplicação. **A)** Morfologia externa; **B-C-D)** Secções anatômicas.....126

Figura 3. Aspectos morfológicos e anatômicos de calos de dendezeiro com formação de embriões somáticos obtidos após 180 dias de cultivo em meio de diferenciação. **A)** Morfologia externa; **B-C-D)** Secções anatômicas.....128

Figura 4. Aspectos morfológicos e anatômicos de calos embriogênicos de dendezeiro com formação de proembriões obtidos após cerca de 90 dias de cultivo em meio de diferenciação. **A)** Morfologia externa; **B-C-D)** Secções anatômicas.....130

Figura 5. Aspectos morfológicos e anatômicos de calos embriogênicos de dendezeiro com formação de embriões somáticos, após 180 dias de cultivo em

meio de diferenciação. **A)** Morfologia externa; **B-C-D)** Secções anatômicas.....132

Figura 6. Aspectos morfológicos e anatômicos de embriões somáticos de dendezeiro em estágio globular inoculados em meio de MS isento de reguladores de crescimento. **A)** Morfologia externa; **B-C-D)** Secções anatômicas.....134

Figura 7. Aspectos morfológicos e anatômicos de embriões somáticos de dendezeiro em estágio torpedo obtidos após 90 dias de cultivo em meio de MS isento de reguladores de crescimento. **A)** Morfologia externa; **B-C-D)** Secções longitudinais.....136

Figura 8. Aspectos morfológicos e anatômicos do embrião zigótico de dendezeiro em estágio de torpedo obtido a partir de frutos maduros. **A)** Morfologia externa; **B-C-D)** Secções longitudinais.....137

CAPÍTULO 4

Figura 1. Aspecto morfológico dos cultivos utilizados na caracterização bioquímica dos estádios entre a multiplicação e regeneração da embriogênese somática de folhas imaturas de dendezeiro. **A)** Calo primário; **B)** Calo embriogênico; **C)** Calo embriogênico com embriões somáticos diferenciados; **D)** Embriões somáticos em estágio torpedo; **E)** Embrião somático em regeneração; **F)** Planta em crescimento.....152

Figura 2. Teores de açúcares solúveis totais entre as etapas de multiplicação e regeneração da embriogênese somática de folhas imaturas de dendezeiro.....158

Figura 3. Teores de glicose, frutose e sacarose entre as etapas de multiplicação e regeneração da embriogênese somática de folhas imaturas de dendezeiro.....161

Figura 4. Abundâncias relativas de glicose, frutose e sacarose entre as etapas de multiplicação e regeneração da embriogênese somática de folhas imaturas de dendezeiro.....162

Figura 5. Teores de amido entre as etapas de multiplicação e regeneração da embriogênese somática de folhas imaturas de dendezeiro.....	164
Figura 6. Teores de ácidos graxos totais entre as etapas de multiplicação e regeneração da embriogênese somática de folhas imaturas de dendezeiro.....	167
Figura 7. Teores de açúcares solúveis totais (AST), amido e ácidos graxos totais (AGT) entre as etapas de multiplicação e regeneração da embriogênese somática de folhas imaturas de dendezeiro.....	169
Figura 8. Abundâncias relativas dos ácidos graxos de maior relevância na constituição dos lipídeos entre as etapas de multiplicação e regeneração da embriogênese somática de folhas imaturas de dendezeiro.....	172
Figura 9. Teores de aminoácidos totais livres entre as etapas de multiplicação e regeneração da embriogênese somática de folhas imaturas de dendezeiro.....	174
Figura 10. Teores de prolina entre as etapas de multiplicação e regeneração da embriogênese somática de folhas imaturas de dendezeiro.....	177
Figura 11. Teores de proteínas totais entre as etapas de multiplicação e regeneração da embriogênese somática de folhas imaturas de dendezeiro.....	179

SÍMBOLOS E ABREVIações

% – Por cento

μg – Micrograma

μmol – Micromol

\pm – Mais ou menos

® – Marca registrada

μL – Microlitro

μM – Micro molar

μm – Micrometro

2,4-D – Ácido diclorofenoxiacético

2-iP – Isopenteniladenina

5'-CmCGG-3' – Metilação da citosina interna da respectiva sequência

5'-mCCGG-3' – Metilação da citosina externa da respectiva sequência

A – Adenina

AFLP – Polimorfismo no comprimento de fragmentos amplificados

AGT – Ácidos graxos totais

AIB – Ácido indolbutírico

AMOVA – Análise de variância molecular

ANA – Ácido naftalenoacético

ANOVA – Análise de variância

AST – Açúcares solúveis totais

atm – Atmosfera

ATP – Trifosfato de adenosina

BIT – Biorreator tipo frascos gêmeos

BSA – Albumina de soro bovino

C – Citosina

C14:0 – Ácido mirístico
C15:0 – Ácido pentadecílico
C16:0 – Ácido palmítico
C18:0 – Ácido esteárico
C18:1 – Ácido oléico
C18:2 – Ácido linoléico
C18:3 – Ácido linolênico
C20:0 – Ácido araquídico
C20:1 – Ácido gadoléico
C22:0 – Ácido behênico
C22:1 – Ácido erúcico
CE – Calo embriogênico
CEE – Calo embriogênico com embriões somáticos
cm – Centímetro
cm² – Centímetro quadrado
CP – Calo primário
CR – Planta em crescimento
DNA – Ácido desoxirribonucleico
dNTPs – Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EcoRI – Enzima de restrição extraída de *Escherichia coli*
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
ES – Embrião somático
ET – Embrião torpedo
et al. – E colaboradores
g – Grama
G – Guanina

HCl – Ácido clorídrico

HpaII – Enzima de restrição extraída de *Hemophilus parainfluenza*

Hz – Hertz

ISSR – Entre sequências simples repetidas

Kb – Quilo pares de base

kg – Quilograma

L – Litro

LEA – *Late embryogenesis abundant*

m – Metro

M – Molar

m² – Metro quadrado

mg – Miligrama

mL – Mililitro

mm – Milímetro

mM – Milimolar

MS – Massa seca

MSAP – Amplificação de polimorfismo sensível a metilação

MSL – Locos submetidos à metilação

MspI – Enzima de restrição extraída de *Moraxella* sp.

N – Normal

NaOCl – Hipoclorito de sódio

NaOH – Hidróxido de sódio

ng – Nanograma

NML – Locos não metilados

nmol – Nanomol

O₂ – Oxigênio

°C – Grau Celsius

p/v – Parte por volume

pb – Pares de base

PCoA – Análise de coordenadas principais

PCR – Reação em cadeia da polimerase

pH – Potencial hidrogeniônico

Picloram – Ácido aminotricloropicolínico

PMF – Peso da massa fresca

PMS – Peso da massa seca

R – Purina (G ou A)

R.I.T.A.[®] – Recipiente de imersão temporária automatizado

RAPD – DNA polimórfico amplificado ao acaso

REG – Regeneração

RFLP – Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição

RNase – Ribonuclease

rpm – Rotação por minuto

s – Segundo

SNP – Polimorfismo de nucleotídeo único

SSR – Sequências simples repetidas

T – Timina

U – Unidade

v/v – Volume por volume

VNRT – Número variável de repetições em tandem

W – Watt

Y – Pirimidina (T ou C)

Análise morfoanatômica, bioquímica e molecular de dendezeiros (*Elaeis guineensis* Jacq.) regenerados por embriogênese somática em sistema de imersão temporária

RESUMO

O objetivo do trabalho foi avaliar a utilização de sistemas de imersão temporária na embriogênese somática de dendezeiros (*Elaeis guineensis* Jacq.), a partir de folhas imaturas de plantas adultas, caracterizar morfoanatômica e bioquimicamente os estádios embriogênicos obtidos no processo, além analisar os clones regenerados por marcadores ISSR e AFLP (MSAP). Num primeiro experimento, calos primários da variedade C2328 foram multiplicados por cinco subcultivos de 30 dias, em quatro diferentes sistemas de cultivo: semi-sólido, líquido sob agitação, além dos biorreatores de imersão temporária R.I.T.A.[®] e tipo frascos gêmeos (BIT). Em seguida, o biorreator mais eficiente foi avaliado isoladamente na multiplicação de calos de outras três variedades: B35-2932, B35-4323 e B35-1729. Posteriormente, a diferenciação dos embriões somáticos foi realizada em meio de MS suplementado com 12,3 µM de 2-iP e 0,54 µM de ANA. Após esse processo, calos contendo embriões somáticos em estágio torpedo foram cultivados por cinco subcultivos de 30 dias em sistema semi-sólido, R.I.T.A.[®] e BIT, para a regeneração de plantas. Ao final do cultivo, a fidelidade genética e epigenética dos regenerantes foi avaliada por ISSR e AFLP (MSAP). Num segundo experimento, calos primários, embriogênicos e pró-embriogênicos, calos com embriões diferenciados, embriões somáticos globulares e torpedos, além de embriões zigóticos maduros (controle), foram analisados e caracterizados morfoanatomicamente. Por fim, foram quantificados os níveis de açúcares, amido, ácidos graxos, aminoácidos e proteínas contidos em calos primários e embriogênicos, calos embriogênicos com embriões somáticos diferenciados, embriões somáticos torpedo e em regeneração, e plantas regeneradas. Observou-se que na multiplicação o uso de meio líquido e sistema R.I.T.A.[®] proporcionou aos cultivos as maiores taxas de propagação, propiciando índices de acúmulo de biomassa fresca de até 293,3%. Já na regeneração, observou-

se que os melhores resultados foram obtidos quando o R.I.T.A.[®] foi utilizado, promovendo em média a regeneração de 14,1 plantas por grama de material inoculado. Com o uso desse sistema, além de não terem sido constatadas variações na sequência do DNA dos propágulos produzidos, observou-se ainda a redução dos índices de alteração do padrão de metilação do epigenoma dos indivíduos regenerados e a diminuição das taxas de ocorrência de hipometilação do DNA das culturas propagadas. Em relação às análises morfoanatômicas, verificou-se que calos primários são constituídos por células meristemáticas apenas em sua região mais interna, enquanto que calos embriogênicos são compostos inteiramente por este padrão celular. A partir do desenvolvimento destes cultivos foi verificada a formação de embriões somáticos sem conexão com os tecidos de origem, constituídos inicialmente pela protoderme e pelo meristema fundamental. Com a maturação destes propágulos, observou-se também a presença de regiões procambiais dispersas pelo meristema fundamental, característica também constatada nos embriões zigóticos maduros. Quanto às análises bioquímicas, verificou-se que no início da multiplicação os calos primários foram os propágulos que apresentaram as maiores concentrações de açúcares solúveis e amido, e os calos embriogênicos os maiores índices de ácidos graxos, aminoácidos livres e proteínas. Após o fim dessa etapa, verificou-se que os teores de ácidos graxos, aminoácidos livres e proteínas não apresentaram variações expressivas. Por outro lado, constatou-se na diferenciação que os níveis de açúcares solúveis aumentaram consideravelmente ao mesmo tempo em que um significativo processo de mobilização do amido foi observado. Já na maturação, os açúcares solúveis e as proteínas foram os compostos que não apresentaram grandes alterações. Nessa etapa, verificou-se uma queda considerável nos valores dos ácidos graxos e aminoácidos livres concomitantemente a elevação dos níveis de amido. Por fim, na regeneração observou-se que os teores de açúcares solúveis, ácidos graxos e proteínas decaíram enquanto que as taxas de amido e aminoácidos livres aumentaram de forma significativa.

Palavras-chave: Arecaceae; micropropagação; biorreatores de imersão temporária; embrião somático; variação somaclonal; marcadores moleculares; ISSR; AFLP; MSAP; morfogênese; ontogênese; histologia; fisiologia.

Morphological, biochemical and molecular analysis of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) regenerated via somatic embryogenesis in temporary immersion system

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the use of temporary immersion systems in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryogenesis from immature leaves of adult plants, to characterize morphoanatomical and biochemically the embryogenic stages, and assessing regenerated clones through Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) and Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) (MSAP) markers. In a first experiment, primary calli from C2328 variety of oil palm were multiplied by up to five 30-days subcultures in four different culture systems: semi-solid, liquid under agitation, R.I.T.A.[®] (Recipient for Automated Temporary Immersion) bioreactors, and Twin Flask - TIS (Temporary Immersion System) bioreactors. Then, the most efficient system was evaluate individually for calli multiplication of another three oil palm varieties: B35-2932, B35-4323 e B35-1729. After multiplication, the calli were transferred to a MS medium with 12.3 μ M 2-iP and 0.54 μ M NAA in order to differentiate somatic embryos. Under these condition, the material was cultivated until most of the somatic embryos reached the torpedo stage, when they were transferred to R.I.T.A.[®] and TIS systems for additional five 30-days subcultures for plant growth. At the end, ISSR and AFLP (MSAP) were used to evaluate the genetic and epigenetic fidelity among the regenerate plants. In a second experiment, primary calli, embryogenic calli, calli with pro-embryos, calli with differentiated somatic embryos, and globular and torpedo-shaped embryos, as well as mature zygotic embryos (control), were characterized morphoanatomically. Finally, the sugars, starch, fatty acids, amino acids and proteins were extracted, identified and quantified at various stages of embryogenesis: primary and embryogenic calli, embryogenic calli with differentiated somatic embryos, torpedo somatic embryos, including those under regeneration, as well as regenerated plants. It was observed that the calli multiplication using liquid medium and R.I.T.A.[®] bioreactors provided the

highest rates of propagation, providing fresh biomass accumulation rates of up to 293.3%. In the regeneration, the best results were also obtained in the R.I.T.A.[®] bioreactors, with an average of 14.1 plants per gram of inoculated material. Using this system, variations in the DNA sequence of propagules produced were not found. There was also a reduction of the epigenome methylation and decrease in DNA hypomethylation levels from evaluated regenerants. Regarding morphoanatomical analysis, it was found that primary calli are composed of meristematic cells only in its most inner region, whereas embryogenic calli are entirely composed by this cellular pattern. From these cultures was observed the formation of somatic embryos, without connections with the parental tissue, initially constituted by protoderm and fundamental meristem. With the maturation, the somatic embryos presented procambial regions, a characteristic also observed in mature zygotic embryos. Biochemical analyzes showed that at the onset of multiplication, the primary calli were the propagules with the highest concentrations of soluble sugars and starch, and the embryogenic calli the ones with the highest levels of fatty acids, free amino acids and proteins. At the end of this stage, the levels of fatty acids, free amino acids and proteins showed no significant changes. During the differentiation phase, the soluble sugar levels increased considerably, at the same time as a significant starch mobilization process was observed. In the maturation, soluble sugars and proteins were compounds that did not show significant changes. At this stage, a considerable decrease in the amounts of fatty acids and free amino acids was observed, concomitantly with the increase in starch levels. In the regeneration, the levels of soluble sugars, fatty acids and proteins declined, while the starch and free amino acids increased significantly.

Key words: Arecaceae; micropropagation; temporary immersion bioreactors; somatic embryo; somaclonal variation; molecular markers; ISSR; AFLP; MSAP; morphogenesis; ontogenesis; histology; plant physiology.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.), originário da Costa Ocidental do Continente Africano, é uma das espécies vegetais com maior produtividade de óleo no mundo. O rendimento anual dessa cultura pode atingir de 5 a 7 toneladas de óleo por hectare, correspondendo a pelo menos 10 vezes a produtividade da soja. Além disso, o dendezeiro ainda apresenta a vantagem de poder ser explorado comercialmente por períodos superiores a 25 anos, quando cultivado sob condições adequadas de desenvolvimento (Wahid *et al.*, 2005).

Contudo, um problema a ser contornado na dendeicultura é a multiplicação dos genótipos superiores, pois a produção de mudas por sementes torna praticamente impossível a obtenção de culturas uniformes e a perpetuação das características de indivíduos de alto valor genético, devido ao fato dos genitores serem plantas alógamas com alta heterozigose (Martine *et al.*, 2009; Myint *et al.*, 2010; Chanprasert *et al.*, 2012).

Para contornar esse problema, metodologias que possibilitem a clonagem são de grande importância, podendo propiciar a produção de indivíduos elite ao setor produtivo, ou então, para apoiar programas de melhoramento genético da cultura, a partir da produção de mudas de alta qualidade geneticamente certificadas (Duval *et al.*, 1988; Durand-Gasselin *et al.*, 1990; Rival *et al.*, 1997a; Khaw & Ng, 1998; Scherwinski-Pereira *et al.*, 2010; Balzon *et al.*, 2013).

No entanto, por tratar-se de uma espécie monocotiledônea que não perfilha, o dendezeiro possui impedimentos para ser multiplicado vegetativamente utilizando-se métodos convencionais (Jouannic *et al.*, 2011). Nesse contexto, a micropropagação via embriogênese somática surge como uma das únicas alternativas para a multiplicação clonal da espécie (Staritsky, 1970; Pannetier *et al.*, 1981; Teixeira *et al.*, 1994; Silva *et al.*, 2012; Constantin *et al.*, 2015).

A embriogênese somática consiste no desenvolvimento de embriões a partir de células que não são o produto da fusão gamética (células somáticas).

Como resultado desse processo, é possível originar milhares de mudas idênticas à planta matriz em espaços físicos relativamente reduzidos e em qualquer época do ano (Reinert, 1958; Williams & Maheswaran, 1986; Soh *et al.*, 2011).

Atualmente, diversos trabalhos de embriogênese somática de dendezeiro são encontrados na literatura (Rabéchault & Martin, 1976; Corley *et al.*, 1977; Pannetier *et al.*, 1981; Teixeira *et al.*, 1995; Duval *et al.*, 1995; Rival *et al.*, 1997a; Choi *et al.*, 2008; Jayanthi *et al.*, 2015). Contudo, grande parte dos protocolos desenvolvidos baseiam-se na utilização de embriões zigóticos como explante inicial (Teixeira *et al.*, 1993; Thuzar *et al.*, 2011; Balzon *et al.*, 2013; Gomes *et al.*, 2016) que, embora apresentem diversas vantagens e aplicações, não permitem a clonagem de indivíduos já fenotipados em campo. Sendo assim, metodologias que utilizem tecidos somáticos de plantas adultas devem ser desenvolvidas e otimizadas (Te-Chato *et al.*, 2002; Constantin *et al.*, 2015).

Outro obstáculo a ser contornado na embriogênese somática do dendezeiro é a necessidade de semi-automatizar as etapas do processo e aumentar a capacidade dos sistemas de cultivo. Dessa forma, pode-se reduzir o contingente de mão-de-obra requerido, o espaço laboratorial necessário e, conseqüentemente, os custos de produção, uma vez que, na maioria das vezes essas metodologias de micropropagação são realizadas a partir do cultivo de um número reduzido de propágulos em pequenos frascos contendo meio de cultura gelificado (Thuzar *et al.*, 2012), tornando estes métodos, em muitos casos, economicamente pouco viáveis (Marbun *et al.*, 2015).

Para tanto, sistemas de cultivo com maior capacidade, que utilizem meios nutritivos de consistência líquida e que permitam certa automação do processo devem ser testados e validados. Biorreatores de imersão temporária são equipamentos semi-automatizados baseados na utilização de meio de cultivo líquido e recipientes de cultivo relativamente maiores. A partir da utilização destes sistemas pode-se reduzir a manipulação das culturas, os gastos com agentes gelificantes, o número de frascos envolvidos no processo,

e, conseqüentemente, os custos das mudas produzidas (De Touchet *et al.*, 1991; Teixeira *et al.*, 1995; Tarmizi *et al.*, 2008).

No mundo, pesquisas a respeito do uso de biorreatores para a clonagem de genótipos de dendezeiros ainda são raros, muito embora, até o momento, os resultados obtidos tenham indicado que o uso destes sistemas pode beneficiar algumas etapas do processo, em especial, as fases de multiplicação de calos e de regeneração de embriões somáticos. Portanto, o aprofundamento das pesquisas na área poderia proporcionar, além da redução dos custos, facilidades e aumentos significativos na produção de mudas (Tarmizi *et al.*, 2004; Choi *et al.*, 2008; Tarmizi *et al.*, 2008; Marbun *et al.*, 2015; Gomes *et al.*, 2016).

Mas, apesar da embriogênese somática ser apontada como uma ferramenta de grande utilidade para a propagação vegetativa do dendezeiro, a possibilidade de ocorrência de variações genéticas e epigenéticas no material propagado, conhecidas como variações somaclonais (Lakin & Scowcroft, 1981), vem sendo demonstrada em diversos estudos (Corley, 1986; Besse *et al.*, 1992; Rival *et al.*, 1997b; Jaligot *et al.*, 2000; Morcillo *et al.*, 2006; Jaligot *et al.*, 2011; Mgbeze & Iserhienrhien, 2014; Ong-Abdullah *et al.*, 2015). Desta forma, torna-se fundamental a avaliação periódica da fidelidade genética dos propágulos produzidos pela embriogênese somática do dendezeiro por métodos precisos, como por exemplo, pelo uso de marcadores moleculares (Sharma *et al.*, 2008; Bairu *et al.*, 2011).

Marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats* ou Entre Sequências Simples Repetidas) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism* ou Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos Amplificados) são marcadores moleculares que permitem identificar padrões genéticos diferenciados sem o conhecimento prévio do genoma em estudo (Semagn *et al.*, 2006; Kumar *et al.*; 2009; Arif *et al.*, 2010). Na embriogênese somática do dendezeiro, a utilização destas ferramentas pode possibilitar a quantificação dos índices de variações genéticas em razão dos diferentes tipos de protocolos utilizados, tornando mais segura a produção de mudas de qualidade para a formação de plantios comerciais (Matthes *et al.*, 2001; Lei *et al.*, 2006; Gantait *et al.*, 2015).

Entanto, o processo de embriogênese somática ainda está longe de ser dominado e compreendido. Assim, a realização de estudos morfoanatômicos e bioquímicos durante as diferentes etapas do processo pode gerar uma grande quantidade de informação a respeito da multiplicação de células meristemáticas, da indução da competência embriogênica e da mobilização de reservas durante a evolução dos estádios embriogênicos. Assim, além de produzir conhecimentos para melhorar o entendimento dos processos, as informações obtidas podem ser utilizadas ainda como marcadores morfológicos e fisiológicos das etapas de desenvolvimento, auxiliando dessa forma, a otimização destas metodologias (Silva *et al.*, 2014b; Gomes *et al.*, 2014).

O objetivo do trabalho foi avaliar a viabilidade e eficiência do uso de sistemas de imersão temporária na embriogênese somática de dendezeiros (*Elaeis guineensis* Jacq.) a partir de folhas imaturas de plantas adultas, caracterizar morfoanatômica e bioquimicamente os diferentes estádios embriogênicos obtidos no processo, além de realizar análises moleculares nos clones por marcadores ISSR e AFLP (MSAP).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.)

O dendezeiro é uma espécie oleaginosa originária da região Noroeste do Continente Africano. Sua denominação taxonômica foi proposta em 1763 pelo botânico Nicholas Joseph Jacquin, onde o nome genérico *Elaeis* derivou-se da palavra grega elaion, que significa óleo, e o nome específico *guineensis*, do centro de origem da espécie (Guiné-Bissau). Na classificação atual, a espécie pertence à classe Liliopsida (monocotiledônea), ordem Arecales, família Arecaceae, subfamília Arcoideae e gênero *Elaeis* (Tregear *et al.*, 2011).

O dendezeiro é uma palmeira monocaule que na idade adulta pode atingir de 25 a 30 metros de altura. Na base, a espécie assemelha-se a uma coluna cônica, que a partir do primeiro metro de altura torna-se constante quanto ao diâmetro, que varia de 22 a 75 cm. Seu sistema radicular, do tipo fasciculado, é composto por milhares de raízes adventícias primárias, que emergem do bulbo radicular, formado a partir dos entrenós da base do estipe (Jourdan & Rey, 1997; Adam *et al.*, 2005).

Na parte superior, o dendezeiro possui uma coroa de folhas pinadas formadas pelo meristema apical. Em plantas adultas, esta estrutura possui entre 30 e 45 folhas funcionais que podem atingir até 7 m de comprimento. Estas folhas são compostas por um pecíolo ligeiramente triangular, de aproximadamente 1,5 m de comprimento, com espinhos regularmente dispostos sobre as arestas laterais. Suas folhas são compostas também por uma raque longa e afilada de aproximadamente 5 m de comprimento, composta de 250 a 350 folíolos, com ângulos de inserção variados, repartidos em ambos os lados (Adam *et al.*, 2005; Jouannic *et al.*, 2011).

Quanto à floração, o dendezeiro é classificado como uma espécie monóica, ou seja, produz flores masculinas e femininas na mesma planta. Nessa cultura as flores masculinas e femininas apresentam-se separadas em inflorescências masculinas e femininas, que são protegidas por duas brácteas fibrosas denominadas espatas. Estas inflorescências desenvolvem-se em sequências unissexuais denominadas ciclos, que por não se sobrepujarem,

ocasionam a fecundação cruzada. Sendo assim, o dendezeiro é classificado ainda como uma espécie alógama (Adam *et al.*, 2011).

A dendeicultura é uma cultura que se desenvolve bem em regiões de clima quente e úmido, com temperaturas médias variando entre 25 e 28°C, precipitação de 1.800 a 2.200 mm distribuída uniformemente durante o ano todo, umidade relativa superior a 75% e solos profundos, com boa drenagem e pH entre 4,5 e 7,5. Nessas condições, a produção de frutos se inicia entre o 24º e 30º mês após o plantio, originando em média, de 12 a 14 cachos de fruto durante todo o ano (Basiron, 2007; Legros *et al.*, 2009; Carr, 2011).

Os cachos de fruto do dendezeiro possuem formato ovóide, comprimento de aproximadamente 50 cm, largura média de 35 cm, peso entre 20 e 30 kg e são compostos por cerca de 1.500 frutos. Estes frutos dividem-se em epicarpo, camada que recobre o fruto, mesocarpo, camada onde se encontra o óleo de dendê, e endocarpo, camada composta por uma casca e por amêndoas, nas quais encontra-se um óleo com características físico-químicas diferentes da do óleo de dendê, denominado de óleo de palmiste (Adam *et al.*, 2005; Wahid *et al.*, 2005).

O óleo de dendê é usado direta ou indiretamente na alimentação, fazendo parte de margarinas, gorduras, sorvetes, manteigas vegetais, óleos de cozinha, óleos de salada e azeites de dendê. Na indústria, o óleo de dendê é usado na produção de sabões, sabões em pó, sabonetes, xampus, velas, tintas, detergentes e, nos últimos anos, também vêm constituindo um importante insumo para a produção de bicomcombustíveis, como o biodiesel. Já o óleo de palmiste, além de ser utilizado na alimentação animal e em adubos vegetais, é utilizado pela indústria na fabricação de batons, perfumes e nos últimos anos, também vêm constituindo um importante insumo para a produção de bicomcombustíveis (Sundram *et al.*, 2003; Hameed *et al.*, 2009; Mukherjee & Sovacool, 2014; Oosterveer, 2015).

O óleo vegetal produzido por esta cultura tem ocupado nos últimos anos um lugar de destaque na produção mundial de óleos e gorduras. Prova disso foi o expressivo crescimento na participação do mesmo no mercado internacional, que com uma produção de aproximadamente 60 milhões de

toneladas ao ano, consolidou-se como o óleo vegetal mais produzido em todo o mundo (Hansen *et al.*, 2015).

Em nível internacional, a dendeicultura é predominantemente realizada na América Latina, na África e no Sudeste Asiático, tendo a Indonésia e a Malásia como os maiores produtores e exportadores de óleo e derivados de dendê do mundo, com produções superiores a 20 milhões de toneladas ao ano (Mukherjee & Sovacool, 2014).

No Brasil, o dendezeiro foi introduzido pelos escravos africanos no final do século XVII, adaptando-se bem ao clima tropical úmido das Regiões Norte e Nordeste. Atualmente, essa cultura já atinge mais de 60 mil hectares do território nacional, sendo sua maioria nos estados do Amazonas, Amapá, Bahia e, principalmente Pará, que juntos produzem cerca de 300 mil toneladas de óleo por ano. Entretanto, a produção do país não chega a 1% do total produzido pela Indonésia e Malásia, e nem a 0,6% da produção mundial (Gontijo *et al.*, 2011; Abrapalma, 2016).

No ranking internacional do cultivo dessa oleaginosa, o Brasil ocupa o 9º lugar. Já no ranking da América Latina, o país ocupa o 3º lugar, logo atrás da Colômbia e do Equador. No entanto, estima-se que o Brasil disponha da maior área apta para a expansão do cultivo de dendezeiro no mundo, cerca de 70 milhões de hectares degradados, área suficiente para produzir óleo para absorver grandes demandas internas e externas, além de tornar o país um dos maiores produtores de óleo vegetal do mundo (Clement *et al.*, 2005; Gontijo *et al.*, 2011; Abrapalma, 2016).

O Brasil iniciou o programa de melhoramento genético do dendezeiro em 1982, estabelecendo no território nacional bancos de germoplasma tanto da espécie africana *Elaeis guineensis* (dendezeiro), quanto da espécie americana *Elaeis oleifera* (caiaué). Atualmente, estes bancos de germoplasma possuem juntos cerca de 330 acessos de dendezeiro, compostos por 3.587 plantas de 18 origens distribuídas em 25 hectares, além de 238 acessos de caiaué, contendo cerca de 4.000 plantas de 17 origens distribuídas em 28 hectares (Rios *et al.*, 2012).

As variedades comerciais de dendezeiro encontradas no mercado (Figura 1) são produzidas pelo cruzamento das variedades: *Dura* x *Pisífera*, originando o híbrido *Tenera*, que possui menor espessura do endocarpo, maior teor de polpa e, conseqüentemente, maior quantidade de óleo. Recentemente o programa de melhoramento genético do dendezeiro, que visava principalmente à produção de híbridos intraespecíficos do tipo *Tenera*, passou também a produzir híbridos interespecíficos, utilizando para tanto o caiaué, que embora tenha o cultivo economicamente inviável, devido ao baixo rendimento de óleo, apresenta resistência a doenças, baixo crescimento vertical do caule e boa qualidade de óleo (Cochard *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2012).

Contudo, em ambos os híbridos o plantio comercial é realizado a partir de sementes da geração F1. Esse método apresenta o inconveniente da formação de plantios heterogêneos, causando desuniformidade na produção e dificultando o manejo da cultura (Jalani *et al.*, 1997; Hayati *et al.*, 2003; Barcelos *et al.*, 2015). Por este motivo, existe uma grande preocupação quanto à reprodução vegetativa dos genótipos superiores, pois além de promover a segregação genética, a multiplicação por sementes requer um período relativamente longo até que novas mudas sejam formadas, que em alguns casos pode levar até três anos (Martine *et al.*, 2009; Myint *et al.*, 2010; Chanprasert *et al.*, 2012).

Portanto, torna-se imprescindível que se avance nas pesquisas para a obtenção de protocolos seguros e confiáveis para a propagação clonal de genótipos elite da espécie, seja para auxiliar programas de melhoramento genético da cultura, seja para promover a propagação em larga escala de genótipos de interesse comercial, especialmente para o Brasil que deseja ser referência nas áreas de agroenergia e biocombustíveis (Duval *et al.*, 1988; Durand-Gasselin *et al.*, 1990; Rival *et al.*, 1997a; Khaw & Ng, 1998; Scherwinski-Pereira *et al.*, 2010; Balzon *et al.*, 2013).



Figura 1. Aspectos gerais da morfologia de um genótipo superior de dendezeiro de alta produtividade de óleo e crescimento vertical do caule reduzido. **A)** Morfologia da planta; **B)** Morfologia dos cachos; **C)** Morfologia dos frutos. Fotos: Jonny Everson Scherwinski-Pereira, Manaus – AM, Brasil, 2015.

2.2 Embriogênese somática

A embriogênese somática, também denominada de embriogênese assexual ou adventícia, é definida como o processo a partir do qual células haploides ou somáticas desenvolvem-se por meio de uma sequência ordenada de estádios embriogênicos característicos, sem que ocorra fusão de gametas. A partir desse processo, originam-se estruturas bipolares semelhantes a embriões zigóticos, denominadas de embriões somáticos, que darão origem a novas plantas com a mesma identidade genética da planta matriz (Reinert, 1958; Williams & Maheswaran, 1986).

A embriogênese somática é uma das técnicas de propagação clonal mais promissora dos últimos tempos. Esta metodologia, em relação aos métodos tradicionais de propagação, apresenta inúmeras vantagens como: a possibilidade de multiplicação em larga escala de genótipos superiores (Soh *et al.*, 2011), poder ser realizada em qualquer condição climática, permitir a sincronização da produção de mudas (Thuzar *et al.*, 2011), além do fato de possibilitar um alto grau de automatização (Marbun *et al.*, 2015).

No mais, para algumas espécies vegetais, como para a maioria das palmeiras, entre elas o dendezeiro, essa metodologia é uma das únicas alternativas possíveis de serem aplicadas visando à clonagem (Staritsky, 1970; Duval *et al.*, 1988; Durand-Gasselin *et al.*, 1990; Khaw & Ng, 1998; Rival *et al.*, 1997a; Silva *et al.*, 2012). Além disso, a embriogênese somática ainda representa uma importante ferramenta para a transformação genética de plantas, uma vez que pode possibilitar a hibridização interespecífica mediante a fusão de protoplastos, bem como, a inserção de genes de interesse em propágulos embriogênicos com posterior regeneração de plantas (Litz & Gray, 1995). Ademais, a embriogênese somática também constitui uma excelente maneira para a obtenção de um sistema biológico ideal para o estudo dos eventos morfológicos, fisiológicos, anatômicos, moleculares e bioquímicos que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário das plantas superiores (Zimmerman, 1993).

A embriogênese somática é um processo que pode se dar tanto pela via natural quanto pela via artificial. No primeiro caso, células dos tecidos

embrionários podem ser naturalmente direcionadas para esta rota de desenvolvimento e gerar embriões geneticamente idênticos à planta mãe, possibilitando assim, a perpetuação de populações clonais por meio de sementes. Já no segundo caso, conhecido também como embriogênese somática *in vitro*, células somáticas, em diferentes estádios de diferenciação, são induzidas por meio de estímulos físicos e/ou químicos a se reprogramarem para adquirir competência embriogênica (Fehér *et al.*, 2003).

Nesse último caso, a formação dos embriões somáticos pode ser realizada a partir de dois padrões básicos de desenvolvimento: embriogênese somática direta e indireta. A embriogênese somática direta ocorre a partir do explante inicial, o qual possui células programadas para a formação de embriões somáticos, sem que ocorra a formação de estádios intermediários de calo. Nesse processo, são necessárias apenas pequenas quantidades exógenas de reguladores de crescimento para promover a expressão embriogênica (Jayanthi *et al.*, 2011; Constantin *et al.*, 2015).

Já na embriogênese somática indireta, a que ocorre na maioria dos casos, a formação dos embriões somáticos acontece a partir da desdiferenciação celular, da proliferação de calos e da diferenciação de células embriogênicas. Nesse processo, são necessárias geralmente, elevadas quantidades de reguladores de crescimento para que as células induzidas sejam estimuladas a reentrarem em mitose e determinarem o estado embriogênico dos calos (Marbun *et al.*, 2015).

Em ambos os casos, o desenvolvimento dos embriões somáticos se dá pelos mesmos estádios embriogênicos observados na embriogênese zigótica: globular, torpedo e cotiledonar. Quanto às características morfoanatômicas, os embriões somáticos também se assemelham muito aos embriões zigóticos, apresentando uma estrutura bipolar, composta por órgãos tipicamente embriogênicos, como a radícula, o hipocótilo e o cotilédone, e um sistema vascular fechado, sem conexão com o tecido de origem. De forma geral, estas rotas embriogênicas diferem-se apenas pelo fato de os embriões somáticos não se tornarem dormentes e não serem revestidos por tegumento e endosperma (Dodeman *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 2014b).

O processo tradicional de embriogênese somática *in vitro* é composto, na maioria dos casos, por quatro etapas (Figura 2). A fase de indução (Figura 2-A-B) é normalmente realizada a partir do cultivo de explantes embrionários, juvenis e/ou maduros em meios nutritivos semi-sólidos, suplementados com altos níveis de auxinas. Durante esta etapa, células somáticas adquirem novas competências morfogênicas e proliferam-se como células embriogênicas (Fehér *et al.*, 2002; Te-chato *et al.*, 2002; Gueye *et al.*, 2009).

Porém, na indução da embriogênese somática existem vários outros fatores que devem ser considerados para assegurar o sucesso do processo, entre eles destacam-se: o tamanho e o tipo do explante, a facilidade de obtenção de culturas assépticas, as condições fisiológicas e nutricionais dos cultivos, além da variedade a ser propagada (Elmeer, 2013).

Entre os explantes comumente utilizados nessa fase do cultivo, os embriões zigóticos são de grande interesse por diversos motivos, tais como: frequente disponibilidade de frutos, alto grau de uniformidade fisiológica e o fato de os mesmos poderem ser mais facilmente transportados e armazenados (Teixeira *et al.*, 1993; Silva *et al.*, 2012; Balzon *et al.*, 2013).

Entretanto, o uso de embriões zigóticos como explante inicial não permite a clonagem fidedigna de indivíduos adultos. Sendo assim, protocolos de embriogênese somática realizados a partir de tecidos somáticos de plantas adultas, como folhas, também devem ser desenvolvidos, otimizados e validados para a propagação clonal de plantas elite (Scherwinski-Pereira *et al.*, 2010; Constantin *et al.*, 2015).

Já a fase de multiplicação (Figura 2-C), visa proporcionar condições adequadas para o estabelecimento de ciclos repetitivos de divisão celular e controle restrito do processo de diferenciação. A manutenção das culturas embriogênicas em ciclos repetitivos de multiplicação é realizada, geralmente, com a redução dos níveis de reguladores de crescimento do meio de cultura (Tarmizi *et al.*, 2008; Marbun *et al.*, 2015).

Por outro lado, a fase de diferenciação e maturação dos embriões somáticos (Figura 2-D) consiste em interromper os ciclos repetitivos de divisão

celular e fornecer estímulos fisiológicos, bioquímicos e/ou ambientais para a diferenciação celular, originando uma grande quantidade de embriões somáticos maduros aptos a converterem-se em plantas. Nessa etapa do processo, o aumento da osmolaridade do meio de cultivo normalmente é responsável por proporcionar a transição do ciclo de divisão para o ciclo de diferenciação celular (De Touchet *et al.*, 1991; Kanchanapoom & Domyoas, 1999; Silva *et al.*, 2012).

Por fim, a fase de regeneração dos embriões somáticos (Figura 2-E-F) visa propiciar condições adequadas para a conversão dos embriões somáticos maduros em plantas completas, sendo usualmente realizada em meios nutritivos isentos de reguladores de crescimento (Gomes *et al.*, 2016).

Durante todo esse processo, diversos fatores podem atuar de maneira direta ou indireta nos resultados obtidos. Entre eles destacam-se: o genótipo (Silva *et al.*, 2012), a formulação salina do meio nutritivo (Muniran *et al.*, 2008), a quantidade de agente gelificante e carvão ativado acrescida aos meios de cultura (Gomes *et al.*, 2014), o tipo e a concentração de reguladores de crescimento (Thuzar *et al.*, 2011) e de carboidratos utilizados (Te-chato & Hilay, 2007), bem como, a duração das fases do processo (Elmeer, 2013).

Culturas embriogênicas foram descritas pela primeira vez na literatura na década de 1950, por Reinert e Steward independentemente, a partir de calos e suspensões celulares de cenoura. Atualmente, culturas embriogênicas provenientes de uma grande variedade de explantes iniciais, como embriões zigóticos, folhas, inflorescências e raízes, além de células cultivadas *in vitro*, vêm sendo utilizadas para a propagação clonal de diversas espécies vegetais (Guerra & Handro, 1998; Saxena & Dhawan, 1999; Rezende *et al.*, 2008; Menéndez-Yuffá *et al.*, 2010; Soh *et al.*, 2011; You *et al.*, 2012).

Em dendezeiro, a produção de mudas por embriogênese somática via folhas jovens, inflorescências imaturas e embriões zigóticos de frutos maduros e imaturos, também é descrita na literatura (Rabéchault & Martin, 1976; Corley *et al.*, 1977; Pannetier *et al.*, 1981; Duval *et al.*, 1988; De Touchet *et al.*, 1991; Teixeira *et al.*, 1993; Rival *et al.*, 1997a; Choi *et al.*, 2008; Konan *et al.*, 2010; Scherwinski-Pereira *et al.*, 2010; Thuzar *et al.*, 2011; Balzon *et al.*, 2013).

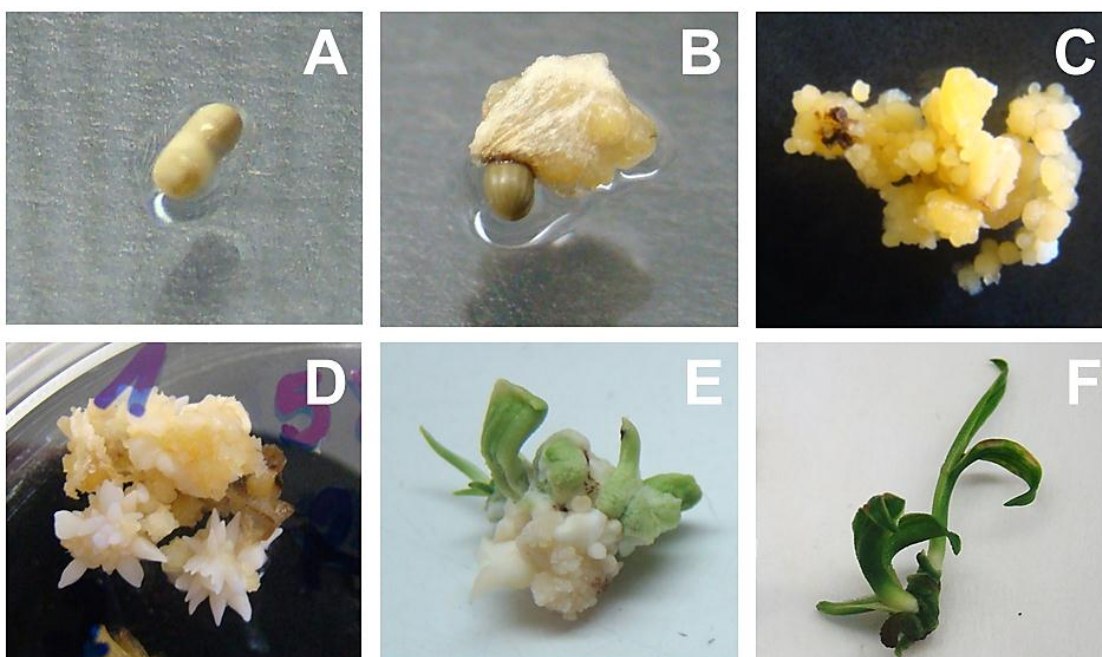


Figura 2. Etapas da embriogênese somática indireta, realizada a partir de embriões zigóticos de dendezeiro. **A-B)** Indução de calos; **C)** Multiplicação dos massivos celulares; **D)** Diferenciação de embriões somáticos; **E-F)** Regeneração de plantas. Fonte: Gomes (2012).

Para determinar as condições ideais para a indução de calos e formação de embriões somáticos de *Elaeis guineensis* a partir de folhas imaturas de plantas adultas, Constantin *et al.* (2015) avaliaram os meios de MS (Murashige & Skoog, 1962) e Y3 (Eeuwens e Blake, 1976), contendo 107,4 μM de ANA (ácido naftalenoacético) associado a 0; 22,6; 45,2 ou 67,8 μM de 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético). Nesse estudo foi analisado também o meio de MS suplementado com 450 μM de Picloram (ácido aminotricloropicolínico) ou 450 μM de 2,4-D. Após 270 dias de cultivo, verificou-se que o meio de MS acrescido apenas de 107,4 μM de ANA induziu o maior percentual de formação de calos (30,5%). Já para a diferenciação de embriões somáticos, constatou-se que os melhores resultados (38,3%) foram obtidos com a suplementação do meio de MS com a combinação de 107,4 μM de ANA com 45,2 μM de 2,4-D.

Já Jayanthi *et al.* (2015) desenvolveram um método para a propagação clonal de plantas adultas da espécie por meio da embriogênese somática de inflorescências imaturas. Para tanto, foi testado o meio nutritivo Y3 suplementado com quatro diferentes combinações de auxinas: 300 μM de 2,4-D, 300 μM de Picloram, 150 μM de 2,4-D associado a 150 μM de Picloram e 300 μM de ANA. Então, os autores verificaram que o Picloram proporcionou as maiores percentagens de formação de calo (82%), não diferindo estatisticamente do 2,4-D e da associação de 2,4-D com Picloram. Por outro lado, a indução de calos com ANA foi de apenas 54%, resultado significativamente inferior aos demais tratamentos. Em relação à diferenciação de embriões somáticos, constatou-se que os melhores resultados foram obtidos com a combinação de 2,4-D com Picloram (4,9%), seguida do Picloram utilizado isoladamente (3,4%).

Mas apesar do certo conhecimento adquirido nos últimos anos, incluindo trabalhos realizados por grupos do exterior, há um consenso mundial entre os pesquisadores que trabalham com a clonagem do dendezeiro que os métodos convencionais utilizados atualmente, baseados no uso de meios de consistência semi-sólida, são inviáveis tecnicamente quando se pensa em clonagem em larga escala. Isso se deve ao fato, primeiramente, de que em meios de consistência semi-sólida, a taxa de regeneração máxima obtida estar na ordem de 100 a 10.000 clones por ano (Soh *et al.*, 2011). Contudo, são pouquíssimos os genótipos responsivos e capazes de proporcionarem esta taxa anual, mesmo considerando-se todas as etapas do processo de um programa de propagação clonal dominadas (Chehmalee & Te-chato, 2008; Silva *et al.*, 2012).

Num segundo aspecto, e não menos importante já que está diretamente relacionado, não se pode esquecer dos custos de produção da unidade deste tipo de material *in vitro* que, embora sejam difíceis de calcular, podem ser de quatro a sete vezes superior ao valor de uma semente híbrida (Duval *et al.*, 1995; Soh *et al.*, 2011).

Portanto, torna-se imprescindível que se avancem nas pesquisas sobre a clonagem do dendezeiro, pelo aprofundamento das questões de viabilidade

de tais protocolos para produção em larga escala, utilizando-se para isso biorreatores de imersão temporária (Marbun *et al.*, 2015; Gomes *et al.*, 2016). E para melhorar a qualidade e o entendimento do processo, também não se pode esquecer da avaliação da estabilidade genética dos materiais regenerados (Lei *et al.*, 2006; Gantait *et al.*, 2015), nem do acompanhamento morfoanatômico e bioquímico dos propágulos formados nas diferentes etapas do processo (Silva *et al.*, 2014b; Gomes *et al.*, 2014).

2.3 Biorreatores de imersão temporária

Biorreatores são sistemas semi-automatizados originalmente desenvolvidos para o cultivo de células e microorganismos visando à fermentação e a produção de metabólitos secundários para fins industriais. Na micropropagação de plantas, um dos primeiros relatos sobre o uso deste sistema de cultivo foi feito por Takayama & Misawa (1981), na propagação *in vitro* de begônias ornamentais.

Desde então, a utilização de biorreatores vem sendo observada na multiplicação *in vitro* de diversas espécies vegetais (Takayama & Akita, 1994; Ziv *et al.*, 1998; Etienne *et al.*, 2006; Tarmizi *et al.*, 2008; Debnath, 2011). Atualmente, a tecnologia proporcionada por este sistema de cultivo tem possibilitado a produção de mudas em larga escala com maior rapidez e eficiência em relação aos sistemas tradicionais de cultivo, além da diminuição dos preços das mudas micropropagadas (Rizvi & Kukreja, 2014).

Nesse processo, diversas vantagens são atribuídas ao emprego dos biorreatores, dentre elas destacam-se: a possibilidade de renovação da atmosfera das culturas; a redução da quantidade de recipientes utilizados e do espaço laboratorial necessário; a facilidade de manipulação dos propágulos, diminuindo os riscos de contaminação microbiana, e o aumento da capacidade dos cultivos adsorverem nutrientes e reguladores de crescimento, devido ao fato de toda a superfície do explante estar sempre em contato com o meio nutritivo, aumentando suas taxas de crescimento e seu acúmulo de biomassa. Ademais, o uso de biorreatores ainda possibilita a quebra da dominância

apical, ocasionada pelo movimento das culturas nos biorreatores, estimulando o crescimento das gemas laterais e o desenvolvimento de brotos, além da possibilidade de mudança e adequação do meio de cultura, de acordo com o estágio de desenvolvimento do explante (Paek *et al.*, 2001; Choi *et al.*, 2008).

Atualmente, diversos tipos de biorreatores estão disponíveis no mercado, destacando-se os modelos: aerador agitador, tambor rotatório, filtro rotatório, borbulhamento, levantamento de ar, fase gasosa, aeração por membrana porosa e sobreaeração. No entanto, na maioria destes sistemas os explantes são cultivados completamente submersos no meio de cultura líquido, limitando a realização de trocas gasosas (Paek *et al.*, 2005). Esse fato pode resultar ainda na hiperhidricidade dos tecidos em cultivo, uma desordem fisiológica severa provocada pelo acúmulo de água no apoplasto, que pode afetar o crescimento e o desenvolvimento do material vegetal propagado (Gogoi & Borua, 2014).

Na tentativa de evitar este problema, novos sistemas de biorreatores foram então desenvolvidos. Dentre eles, os biorreatores de imersão temporária foram os que ganharam maior popularidade, principalmente devido a sua simplicidade e eficiência na produção de mudas, com a mínima ocorrência de desordens fisiológicas (Teisson *et al.*, 1995; Escalona *et al.*, 1999; Teixeira, 2002).

Biorreatores de imersão temporária são tipos de biorreatores cujo objetivo básico é a transferência periódica e automatizada do meio de cultura líquido, por meio da força do ar bombeado por um compressor, do recipiente onde fica armazenado para o recipiente onde os explantes são cultivados. Ao ser transferido, o meio nutritivo líquido cobre os explantes, mantendo-os submersos por um período de tempo pré-determinado por um temporizador eletrônico. Em seguida, o meio líquido é transferido de volta para o seu recipiente de armazenamento, por gravidade ou pelo auxílio de uma válvula solenóide que direciona o fluxo de ar do compressor para o recipiente de cultivo (Georgiev *et al.*, 2014).

Com isso, os biorreatores de imersão temporária além de proporcionarem um melhor aproveitamento do meio nutritivo líquido, propiciam

ainda, melhorias no aproveitamento do ambiente gasoso dentro dos frascos de cultivo. Desta forma, os biorreatores de imersão temporária apresentam diversas vantagens quando comparados a outros sistemas de biorreatores, como a redução da hiperidricidade; a possibilidade do controle do crescimento e do desenvolvimento das culturas pela manipulação da frequência e da duração das imersões de meio líquido, além da diminuição do estresse mecânico, proporcionada pela ausência de agitação (Etienne & Berthouly, 2002; Teixeira, 2002; Martin & Vermette, 2005).

Steward *et al.* (1952), por meio da construção de um sistema de cultivo denominado “auxophyton”, foram os primeiros a aplicarem a ideia do sistema de imersão temporária na tecnologia dos biorreatores. Nesse biorreator, os frascos de cultivo eram movimentados sobre uma roda, de tal forma que, em determinados momentos, os explantes eram submersos no meio nutritivo líquido e nos demais momentos ficavam expostos ao ar. Posteriormente, Aitken-Cristie *et al.* (1988) desenvolveram um modelo semi-automático de cultivo *in vitro* sob imersão temporária, no qual o material vegetal era cultivado em grandes recipientes contendo meio gelificado, com adição e remoção automatizada e periódica de meio de cultura de consistência líquida. Em seguida, Simonton *et al.* (1991) desenvolveram um sistema automático, no qual o meio nutritivo líquido era injetado sobre as culturas de acordo com um intervalo de tempo preestabelecido.

Atualmente diversos sistemas de biorreatores de imersão temporária são comercializados em todo o mundo (Georgiev *et al.*, 2014), sendo mais conhecido o sistema pioneiro francês R.I.T.A.[®] (Recipiente de Imersão Temporária Automatizado), desenvolvido pelo CIRAD (Figura 3). Entre suas principais vantagens estão a facilidade de utilização, a economia de espaço, já que o recipiente do meio de cultura fica dentro do recipiente de cultivo e a facilidade para sua esterilização, uma vez que todos os componentes que entram em contato direto ou indireto com os explantes são autoclaváveis (Teisson *et al.*, 1995).

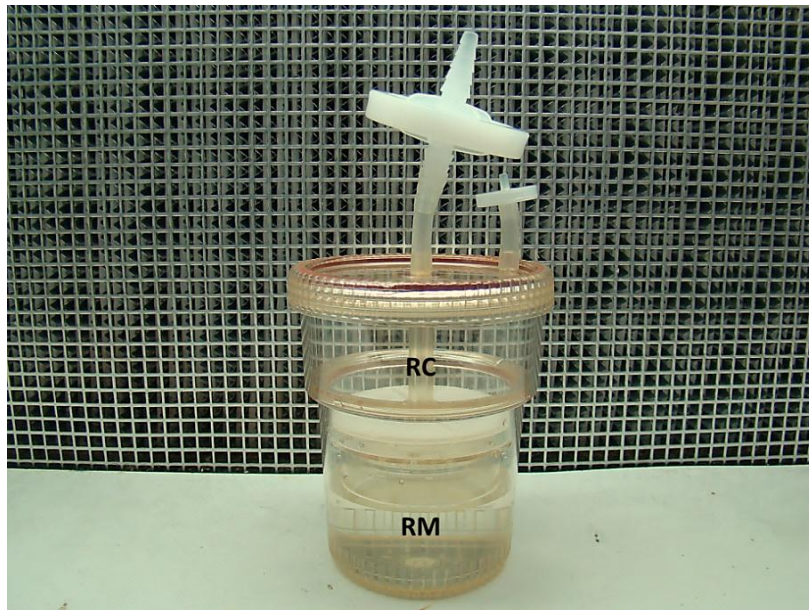


Figura 3. Recipiente de imersão temporária automatizado (R.I.T.A.[®]). Abreviações: RC = recipiente de cultivo; RM = recipiente do meio. Fonte: Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília – DF, Brasil, 2016.

No Brasil, biorreatores de imersão temporária também foram desenvolvidos, sendo o mais conhecido o sistema de biorreator de frascos gêmeos BIT, desenvolvido pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Figura 4). Entre suas principais vantagens estão a possibilidade de se utilizar diferentes tipos de frascos, os quais podem variar em tamanho, forma, constituição e transparência; a possibilidade de o sistema ser utilizado tanto em regime de imersão temporária quanto em regime de imersão permanente; e a capacidade do mesmo de poder ser utilizado tanto para o cultivo de células e embriões como para o cultivo de gemas, brotos e raízes. Além disso, esse modelo ainda possui a habilidade de poder utilizar fontes artificiais de ar, com dosagens específicas de oxigênio e gás carbônico (Teixeira, 2002).



Figura 4. Sistema de biorreator frascos gêmeos BIT (Embrapa). Abreviações: RC = recipiente de cultivo; RM = recipiente do meio. Fonte: Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília – DF, Brasil, 2016.

Em diversas espécies vegetais, estudos experimentais vêm demonstrando que a micropropagação em biorreatores de imersão temporária pode ser um método eficiente para a produção de mudas em larga escala (Espinosa *et al.*, 2002; Roels *et al.*, 2005; Niemenak *et al.*, 2008; Debnath, 2011; Steinmacher *et al.*, 2011; Heringer *et al.*, 2014).

No entanto, em dendezeiro pesquisas a este respeito ainda são limitadas, embora estudos prévios demonstrem que a utilização de biorreatores de imersão temporária na propagação *in vitro* da espécie pode proporcionar bons resultados (Gomes *et al.*, 2016). Analisando a melhor maneira para aumentar as taxas de proliferação de calos de *Elaeis guineensis*, a partir do uso de biorreatores de imersão temporária, Marbun *et al.* (2015) avaliaram o efeito de diferentes intervalos de tempo (1, 3 e 6 horas) entre subsequentes imersões de 3 minutos. Após 60 dias de cultivo, os resultados obtidos demonstraram que o melhor intervalo de tempo entre as imersões de meio

líquido foi de 3 horas, proporcionando aos propágulos um incremento de biomassa fresca de aproximadamente 7 vezes.

Já Gomes *et al.* (2016) estudaram o emprego de biorreatores de imersão temporária no processo de regeneração de embriões somáticos de dendezeiro obtidos por meio da embriogênese somática de embriões zigóticos. Nesse trabalho foi avaliada a viabilidade e a eficiência dos respectivos modelos de biorreatores de imersão temporária: R.I.T.A.[®] e sistema de biorreator frascos gêmeos - BIT. Após 60 dias de cultivo, constatou-se que sistemas de biorreator frascos gêmeos BIT proporcionam ao processo maior acúmulo de biomassa fresca, plantas regeneradas e mudas com altura superior a 5 cm, além de aumentarem o número de embriões secundários neoformados (Figura 5).

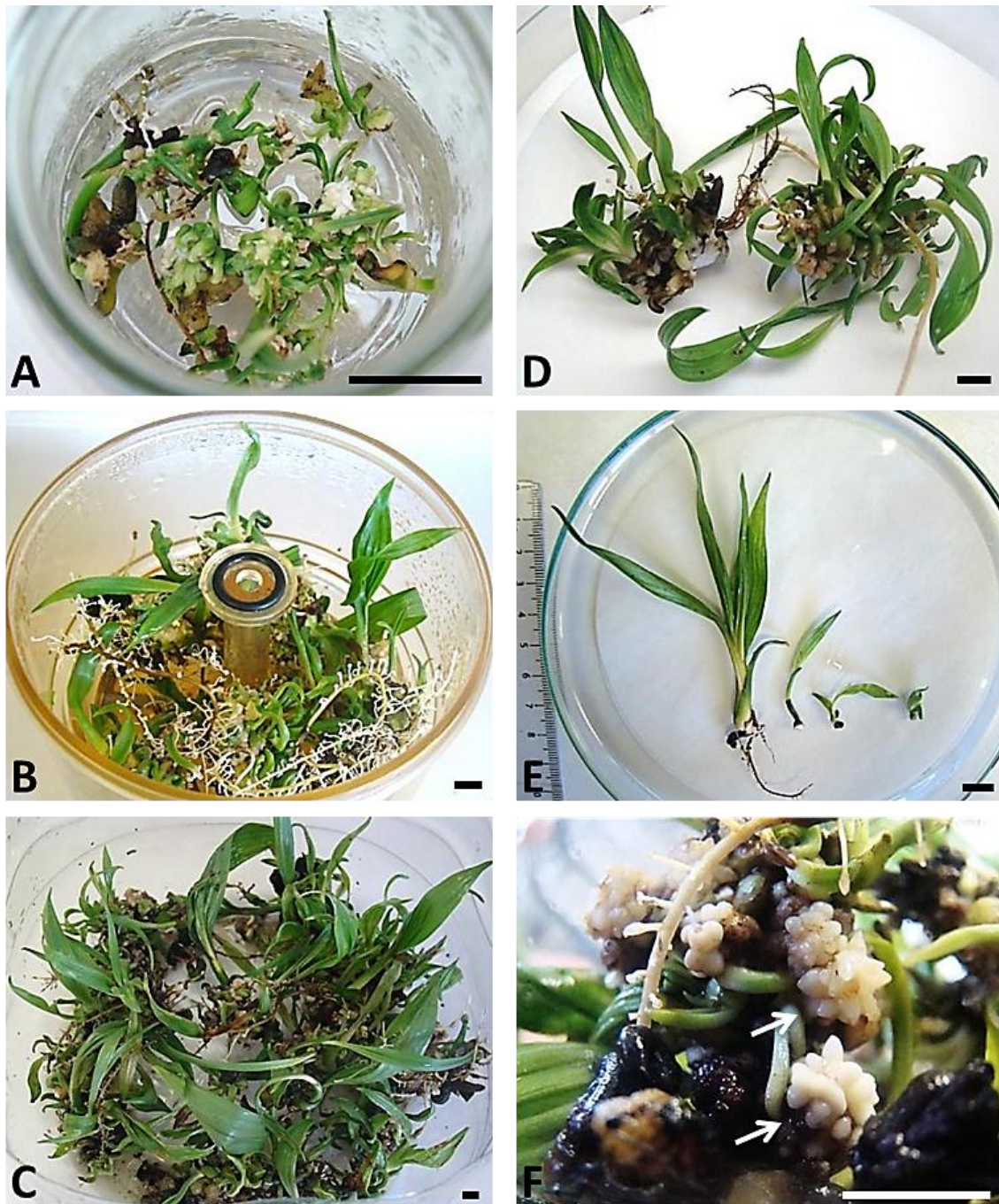


Figura 5. Análise da regeneração de embriões somáticos de dendezeiro em sistemas de imersão temporária. **A)** Regeneração em meio semi-sólido (controle); **B)** Regeneração em R.I.T.A.[®]; **C)** Regeneração em BIT; **D)** Clusters de embriões somáticos regenerados em BIT; **E)** Plantas enraizadas, plantas $\geq 5,0$ cm, plantas $> 2,5$ e $< 5,0$ cm e plantas $\leq 2,5$ cm, respectivamente; **F)** Embriões secundários neoformados. Fonte: Gomes *et al.* (2016).

2.4 Fidelidade genética e variação somaclonal

A embriogênese somática é uma técnica do cultivo *in vitro* importante para a clonagem e multiplicação rápida de genótipos de interesse comercial, produzindo mudas, teoricamente, com a mesma identidade genética do material vegetal de origem. Entretanto, tem se observado que esta metodologia pode ocasionar, em algumas situações, o aparecimento de modificações genéticas e/ou epigenéticas espontâneas nos propágulos regenerados (Jaligot *et al.*, 2011; Mgbeze & Iserhienrhien, 2014). Estas anomalias gênicas são denominadas variações somaclonais (Lakin & Scowcroft, 1981).

Durante muito tempo foi discutido se estas variações genéticas resultavam da variabilidade genética pré-existente nas células vegetais ou eram induzidas pelas condições de cultivo *in vitro*. Atualmente, sabe-se que este fenômeno é provocado por ambos os fatores. Segundo Bairu *et al.* (2011), os variantes somaclonais podem surgir em decorrência de uma série de fatores, entre eles destacam-se: a presença de elevadas concentrações de reguladores de crescimento no meio nutritivo, o aumento do tempo de permanência *in vitro*, o estresse provocado pela desprogramação e reprogramação celular e o cultivo indireto, através da indução e proliferação de massivos celulares.

Dentre os mecanismos causadores de variações somaclonais destacam-se: as variações cromossômicas, as ativações de transposons, as metilações do DNA (ácido desoxirribonucleico), as poliploidias e as mutações nucleares e citoplasmáticas. No entanto, nem sempre as variantes somaclonais ocorrem por meio de macordesarranjos na estrutura do DNA, acarretando grandes variações fenotípicas. Às vezes essas variações são bem mais pontuais, como por exemplo, em nível de base do DNA, podendo ocasionar dessa forma, alteração na síntese de aminoácidos e, conseqüentemente, prejuízos na produção de compostos orgânicos essenciais ao metabolismo dos cultivos (Skirvin *et al.*, 1994; Lee & Phillips, 1988; Miguel & Marum, 2011; Wang & Wang, 2012).

Variações somaclonais foram relatadas pela primeira vez na literatura em 1967, por Butenko e colaboradores, analisando culturas regeneradas de

calos de fumo. Desde então variantes somaclonais vêm sendo detectadas em diversas espécies vegetais propagadas *in vitro*, como no arroz, tomate, batata, banana, além de algumas espécies de palmeiras, como na pupunheira e tamareira (Steinmacher *et al.*, 2007; Nistor *et al.*, 2009; Ahmed *et al.*, 2009; Baránek *et al.*, 2010; Shooshtari *et al.*, 2013).

Em dendezeiro, a ocorrência de variações somaclonais em populações regeneradas a partir de embriões somáticos foi relatada pela primeira vez em 1986, por Corley e colaboradores. Estes autores observaram que alguns clones de dendezeiro cultivados em campo não estavam florescendo normalmente. Observou-se que estes indivíduos, denominados de *mantled*, apresentavam uma grande incidência de flores com estruturas carnosas, que se assemelhavam a carpelos, substituindo os estames nas flores masculinas, e os estaminoides (estames primitivos rudimentares) nas flores femininas.

Desde então a ocorrência de variações somaclonais em plantas de dendezeiro obtidas a partir da embriogênese somática vem sendo relatada em diversos estudos (Besse *et al.*, 1992; Jones, 1998; Jaligot *et al.*, 2000; Morcillo *et al.*, 2006; Beulé *et al.*, 2011). Segundo Ong-Abdullah *et al.* (2015), cerca de 5% dos dendezeiros micropropagados via embriogênese somática apresentam estas anomalias em seu desenvolvimento floral. Para estes autores, essa anormalidade pode resultar na redução da produtividade de óleo destes indivíduos e, nos casos mais graves, na esterilidade de suas flores ou frutos (Figura 6).

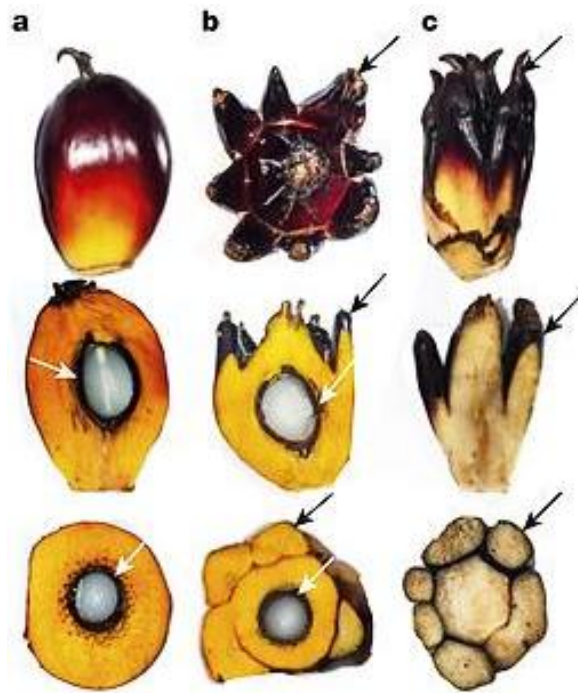


Figura 6. Aspectos gerais de frutos de dendezeiro oriundos de plantas propagadas *in vitro*. **A)** Fruto normal; **B)** Fruto anormal fértil; **C)** Fruto anormal infértil. Setas pretas = pseudocarpelos desenvolvidos; setas brancas = amêndoa. Fonte: Ong-Abdullah *et al.* (2015).

2.5 Marcadores moleculares

Marcadores são marcas herdadas de acordo com as leis da herança Mendeliana que permitem o estudo comparativo dos genótipos. Os marcadores são classificados em três diferentes tipos: morfológicos, bioquímicos e moleculares. Os marcadores morfológicos e bioquímicos, até a década de 1980, possuíam grande importância na realização de estudos genéticos, de ligações gênicas, de construção de mapas genéticos, entre outros (Pontikis *et al.*, 1980; Landry *et al.*, 1987). Entretanto, no geral, para a realização de estudos de diversidade genética, devido à limitação da disponibilidade destes marcadores e devido à influência que o meio ambiente e outros genes exercem na expressão do fenótipo, ambos caíram em desuso com o passar do tempo e acabaram sendo substituídos ou complementados pelos marcadores moleculares (Kumar *et al.*; 2009; Arif *et al.*, 2010).

Marcadores moleculares são ferramentas biotecnológicas que possibilitam a detecção de polimorfismos diretamente das sequências do DNA, permitindo a diferenciação rápida e precisa de dois ou mais genótipos. Entre as vantagens atribuídas ao emprego dos marcadores moleculares, destacam-se: a identificação direta dos genótipos em estudo e o fato dos mesmos poderem ser utilizados em qualquer estágio do desenvolvimento e em gerações altamente segregadas (Joshi *et al.*, 1999; Sharma *et al.*, 2008).

Os marcadores moleculares são classificados em três grandes categorias: por hibridização, por PCR (*Polymerase Chain Reaction* ou Reação em Cadeia da Polimerase) e por sequenciamento. Os marcadores moleculares cujo polimorfismo é revelado por hibridização são basicamente o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism* ou Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição) e o VNRT (*Variable Number of Tandem Repeat* ou Número Variável de Repetições em Tandem). Nesta classe, os locos polimórficos são detectados pela diferença no comprimento dos fragmentos, gerados por restrição e revelados a partir da hibridização com sondas marcadas. No geral, a alta reprodutibilidade e a herança co-dominante, ou seja, a capacidade de diferir genótipos homocigotos de genótipos heterocigotos em organismos diploides, são suas principais vantagens. Entretanto, devido à complexidade da técnica envolvida na geração destes marcadores, como a necessidade de marcação radioativa e a impossibilidade de automação do processo, estes marcadores acabaram tornando-se obsoletos (Agarwal *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2009).

Já os marcadores moleculares cujo polimorfismo é detectado por PCR são basicamente os marcadores dominantes RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA* ou DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso), ISSR e AFLP (que depende também do processo de digestão enzimática). Nesta classe, os locos polimórficos são detectados pela amplificação de um segmento de DNA em um indivíduo e no outro não. Nesse grupo, a detecção do polimorfismo também pode ocorrer pelo reconhecimento de regiões do DNA genômico com a presença ou não de metilação, como acontece em alguns casos do AFLP (Semagn *et al.*, 2006).

Dentro do grupo dos marcadores moleculares cujo polimorfismo é detectado por PCR também se encontra o marcador co-dominante SSR ou microssatélite (*Simple Sequence Repeat* ou Sequências Simples Repetidas). Nesse marcador, o polimorfismo entre os indivíduos é revelado por meio da identificação do tamanho dos alelos amplificados e pela diferenciação de genótipos homocigotos de heterocigotos (Sharma *et al.*, 2008).

Em comparação com os marcadores baseados em hibridização, os marcadores baseados em PCR, geralmente, são mais baratos, de execução experimental menos elaborada, mais fáceis de serem implementados e necessitam de menor tempo para a obtenção dos resultados (Arif *et al.*, 2010).

Por fim, entre os marcadores moleculares baseados em sequenciamento destaca-se o SNP (*Single Nucleotide Polymorphism* ou Polimorfismo de Nucleotídeo Único). Neste marcador, as variações na sequência do DNA são detectadas quando um único nucleotídeo é alterado. Entre as vantagens atribuídas a utilização deste marcador destacam-se: o fato do mesmo apresentar baixos índices de mutação, possuir herança co-dominante, ser amplamente distribuído pelo genoma dos organismos e apresentar facilidades para a genotipagem em larga escala (Mammadov *et al.*, 2012).

Em muitas espécies vegetais, a utilização de marcadores moleculares tem proporcionado: a avaliação da variabilidade genética, o mapeamento gênico, a determinação de sistemas de cruzamento, a identificação de cultivares, o estudo da fidelidade genética de propágulos produzidos por cultura de tecidos, entre a realização de outras análises (Ahmed *et al.*, 2009; Upadhyay *et al.*, 2012; Witte *et al.*, 2012; Hamza *et al.*, 2013; Rambaud *et al.*, 2013; Jena *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2015).

Em dendezeiro, o uso destas ferramentas tem possibilitado a administração de bancos de germoplasma, a avaliação da distância genética entre indivíduos da espécie, a certificação da pureza gênica de clones regenerados via embriogênese somática, entre outros estudos (Rival *et al.*, 1998; Moretzsohn *et al.*, 2000; Barcelos *et al.*, 2002; Ting *et al.*, 2010; Thuzar *et al.*, 2012; Nordiana *et al.*, 2014; Bakoumé *et al.*, 2015).

2.5.1 Marcadores ISSR

Marcadores ISSR são marcadores moleculares baseados na amplificação por PCR de sequências de DNA localizadas entre regiões microssatélites, sem que haja a necessidade do sequenciamento do genoma em estudo. Regiões microssatélites são sequências repetitivas de DNA, com um a seis pares de bases, distribuídas lado a lado. Estas sequências, encontradas por todo o genoma dos seres vivos, representam regiões instáveis do DNA, que estão sob alterações mutacionais, geralmente adições ou deleções de um número integral de repetições, com taxas muito mais elevadas do que as observadas em sequências não repetitivas (Nordiana *et al.*, 2014).

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

A técnica tradicional dos marcadores ISSR consiste na amplificação de sequências do DNA genômico situadas entre duas regiões microssatélites idênticas, inversamente orientadas e que possuam distância suficientemente amplificáveis. Essa técnica é realizada a partir da utilização de um único *primer* constituído por sequências repetidas de dinucleotídeos ou trinucleotídeos complementares às regiões microssatélites, com a adição ou não de dois ou três nucleotídeos ancorados na extremidade 5' ou 3'. A ancoragem destes nucleotídeos tem a função de fixar o anelamento do *primer* em uma única posição da sequência microssatélite, tornando esse processo mais específico e reprodutível (Semagn *et al.*, 2006).

A análise dos marcadores ISSR é realizada a partir da separação e visualização dos fragmentos de diferentes tamanhos em gel de agarose ou

poliacrilamida. Nessa análise, as bandas de diferentes massas moleculares representam diferentes locos dentro do genoma em estudo. Com isso, o polimorfismo destes marcadores ocorre quando em um genoma estiver faltando uma sequência repetida ou quando nesse genoma ocorrer uma deleção ou inserção que modifique a distância entre os locos microssatélites (Sharma *et al.*, 2008).

Marcadores ISSR foram descritos pela primeira vez na literatura por Gupta *et al.* (1994) e Zietkiewicz *et al.* (1994). Desde então, os marcadores ISSR vêm sendo utilizados com sucesso em diversos estudos de plantas, tais como: mapeamento genético, biologia evolutiva, diversidade genética de populações, filogenia, além da estimativa dos índices de variantes somaclonais em mudas produzidas pela cultura de tecidos (Hamza *et al.*, 2013; Nordiana *et al.*, 2014; Sabir *et al.*, 2014; Dogan *et al.*, 2015; Soares *et al.*, 2016).

No estudo da integridade do DNA de propágulos oriundos da embriogênese somática de dendezeiro por meio da utilização de marcadores ISSR, Gantait *et al.* (2015) não verificaram a ocorrência de variações somaclonais em nenhum dos 45 locos analisados, sugerindo que a estabilidade genética dos cultivos foi mantida após o processo de propagação *in vitro* (Figura 7).

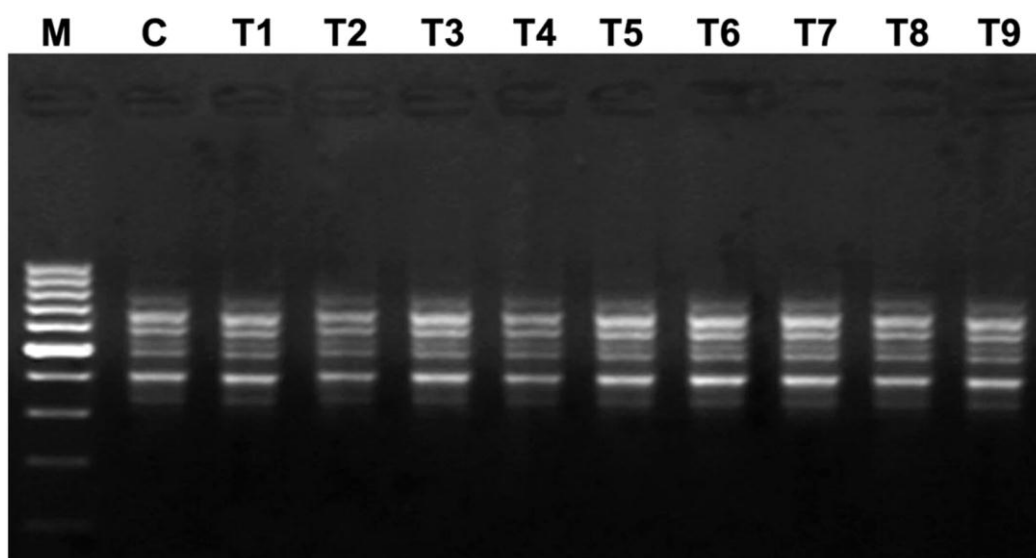


Figura 7. Marcador ISSR na análise da fidelidade genética de clones de dendezeiro micropropagados via embriogênese somática. M = ladder 100 pb; C = controle; T1-T9 = clones. Fonte: Gantait *et al.* (2015).

2.5.2 Marcadores AFLP

Marcadores AFLP são marcadores moleculares baseados na propriedade que certas enzimas possuem de deixar, após a clivagem do DNA, extremidades coesivas de sequências conhecidas. Estes marcadores, assim como os marcadores ISSR, também se destacam pela capacidade de revelar locos dispersos pelo genoma dos organismos sem a necessidade do conhecimento prévio das sequências alvo (Sharma *et al.*, 2008).

Outras vantagens atribuídas à utilização dos marcadores AFLP são: o fato de possibilitarem a detecção de um grande número de locos, gerar e resolver grandes quantidades de fragmentos em um único gel, possuírem alta especificidade e boa reprodutibilidade, além de terem um alto poder discriminatório. Ressalta-se ainda, o fato destes marcadores moleculares, por meio da utilização de enzimas sensíveis a metilação, possibilitarem também a distinção de sítios do DNA genômico submetidos ou não à metilação. Dessa maneira, esses marcadores além de permitirem a detecção de variações somaclonais genéticas possibilitam ainda a identificação de variantes somaclonais do tipo epigenéticas (Kumar *et al.*, 2009).

A técnica tradicional dos marcadores AFLP consiste essencialmente de quatro etapas distintas. Na primeira, o DNA genômico total do indivíduo é clivado com duas enzimas de restrição, uma de corte raro (6 a 8 pares de bases) e outra de corte frequente (4 pares de bases). Na segunda etapa, adaptadores específicos são ligados aos terminais dos fragmentos genômicos gerados pela clivagem. Na terceira, uma fração dos fragmentos gerados é amplificada eletivamente via PCR, utilizando *primers* marcados por radioisótopos ou fluorescência, acrescidos de 1 a 3 bases adicionais na extremidade 3', especificamente desenhados para reconhecer as sequências dos adaptadores. Por fim, os fragmentos amplificados são separados em gel de alta resolução ou em sequenciadores, onde são então visualizados os fragmentos de tamanho intermediário gerados pela clivagem rara/frequente (Arif *et al.*, 2010).

Nessa análise, infere-se que as bandas de diferentes pesos moleculares também representam diferentes locos dentro do genoma estudado. Dessa forma, o polimorfismo dos marcadores AFLP também é reconhecido pela presença de um fragmento amplificado em um dos genótipos em relação à ausência do mesmo fragmento no outro. Contudo, nesse marcador os polimorfismos podem resultar da perda ou ganho de um sítio de restrição, reconhecido pelas enzimas utilizadas no processo, ou pela alteração da sequência reconhecida pelos nucleotídeos arbitrários adicionados aos terminais 3' dos iniciadores que dirigem a PCR (Agarwal *et al.*, 2008).

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

Nessa adaptação do AFLP, ambas as enzimas de corte frequente clivam os sítios 5'-CCGG-3'. No entanto, nessa técnica a clivagem do DNA não ocorre pela enzima HpaII se a citocina do dinucleotídeo central CG estiver metilada, e

não ocorre pela enzima MspI quando a citosina externa desse loco apresentar essa alteração química. Assim, se a sequência de reconhecimento destas enzimas estiver submetilada, os fragmentos resultantes da clivagem por EcoRI/HpaII e EcoRI/MspI serão idênticos. Contudo, se as sequências alvo destas enzimas estiverem metiladas, fragmentos polimórficos entre as combinações EcoRI/HpaII e EcoRI/MspI serão gerados (Alonso *et al.*, 2016).

Nesses casos, se uma metilação plena da citosina interna (5'-CmCGG-3') estiver ocorrendo, apenas a enzima MspI poderá realizar a clivagem, o que resultará na formação de fragmentos mais curtos que os provenientes da combinação EcoRI/HpaII, que só poderá cortar esse loco quando reconhecer uma sequência não metilada localizada após esse sítio de restrição, o que resultará na formação de fragmentos mais longos. Por outro lado, se uma hemimetilação da citosina externa (5'-mCCGG-3') estiver ocorrendo nessa região, fragmentos longos serão formados na combinação EcoRI/MspI, devido a inatividade da enzima MspI em cortar esse tipo de sequência, e fragmentos curtos serão obtidos na combinação EcoRI/HpaII, que irão reconhecer e cortar tais sítios (Xu *et al.*, 2000).

Os marcadores AFLP e sua adaptação MSAP foram descritos pela primeira vez na literatura em 1995 e 1997, por Vos e colaboradores e Reyna-López e colaboradores, respectivamente. Desde então estes marcadores vêm sendo utilizados em estudos de mapeamento gênicos, análises de similaridade e diversidade genética, identificação de acessos de plantas, caracterização de cultivares, revisões taxonômicas, bem como, na detecção e caracterização de variantes somaclonais produzidas pelo cultivo *in vitro* (Purba *et al.*, 2000; Rambaud *et al.*, 2013; Shoostari *et al.*, 2013; Sabir *et al.*, 2014; Ajal *et al.*, 2015).

Em dendezeiro, ao analisar a variabilidade genética e epigenéticas de regenerantes derivados da cultura de tecidos por marcadores AFLP e MSAP, Matthes *et al.* (2001) verificaram que não foram encontrados polimorfismos quando a técnica tradicional dos marcadores AFLP foi utilizada, independentemente das dez combinações de iniciadores empregadas no processo. Em contraste, quando enzimas de restrição sensíveis à metilação

foram usadas (MSAP), observou-se nos regenerantes o aparecimento de algumas novas bandas, sugerindo que uma redução na metilação tinha ocorrido em decorrência da embriogênese somática (Figura 8). Nesse estudo, constatou-se ainda que o maior número de bandas polimórficas (0,3%) foi obtido quando a enzima HpaII foi empregada, indicando que a perda de metilação ocorreu mais frequentemente na citosina interna dos sítios de restrição. Entretanto, no mesmo, nenhum polimorfismo foi consistentemente diferente entre os clones normais e anormais amostrados.

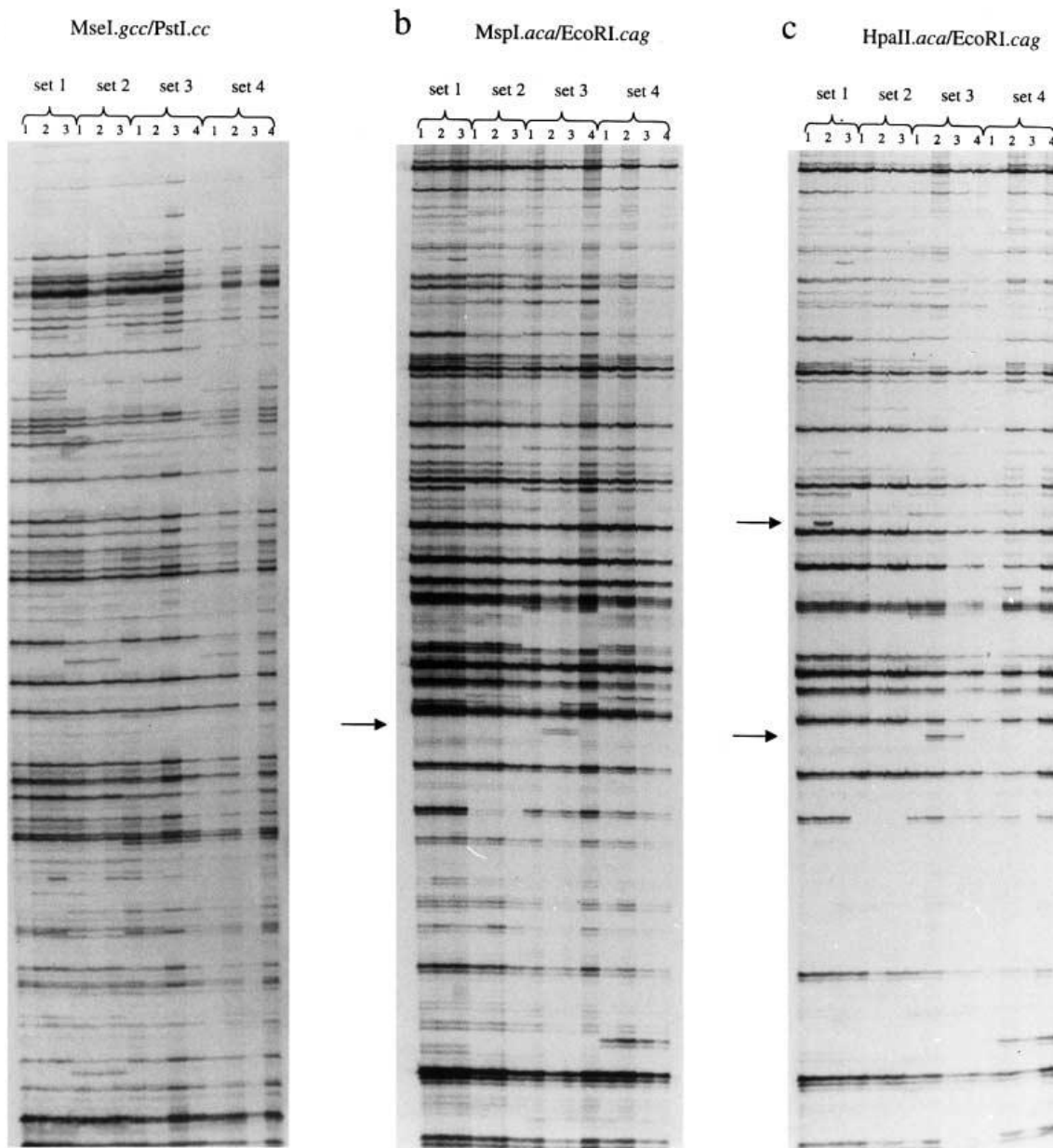


Figura 8. Marcadores AFLP (MSAP) na análise da fidelidade genômica de clones de dendezeiro micropropagados via embriogênese somática. Seta = polimorfismos; amostras 1 = plantas mãe; amostras 2 = regenerantes normais; amostras 3 = regenerantes anormais; amostras 4 = regenerantes anormais revertidos em normais. Fonte: Matthes *et al.* (2001).

2.6 Anatomia vegetal

A anatomia vegetal é o ramo da botânica que estuda as estruturas internas que compõem o corpo das plantas, permitindo uma descrição precisa

e detalhada de suas células, tecidos e órgãos. Em várias espécies vegetais, o emprego de técnicas histológicas tem proporcionado uma grande quantidade de informações a respeito da origem, da constituição e da função das diferentes estruturas que constituem estes indivíduos. Dessa forma, a anatomia vegetal vem auxiliando a compreender os diversos fenômenos relacionados ao crescimento, desenvolvimento e adaptação das plantas (Adam *et al.*, 2005; Ribeiro *et al.*, 2012; Thomas & Boura, 2015).

Entretanto, os caracteres anatômicos dos organismos vegetais, assim como seus caracteres morfológicos, estão diretamente relacionados com as condições ambientais em que as plantas se desenvolvem, embora a relação entre eles, em muitos casos, seja difícil de ser estabelecida. No cultivo *in vitro*, células, tecidos e órgãos vegetais podem expressar um potencial morfogênico que não expressariam nas condições naturais de desenvolvimento (Batagin-Piotto *et al.*, 2012).

Nesse caso, as técnicas da anatomia vegetal podem ser utilizadas para confirmar a formação e verificar o desenvolvimento de diversas estruturas vegetais, tais como: gemas, raízes adventícias, embriões somáticos, calos, entre outras. Além disso, essas técnicas ainda possibilitam a definição da origem destas estruturas, além da comprovação de seus padrões de desenvolvimento, indireto (com formação de calo) ou direto (sem formação do mesmo) (Ovecka *et al.*, 2000; Apezatto-da-Glória & Machado, 2004; Steinmacher *et al.*, 2007; Pádua *et al.*, 2013; Moyo *et al.*, 2015).

Dibax *et al.* (2010), estudando a origem de gemas de *Eucalyptus camaldulensis* obtidas a partir da organogênese de folhas cotiledonares, verificaram a partir de técnicas histológicas, que a indução do processo teve início nas células do parênquima paliçádico e que as gemas adventícias formaram-se a partir de calos, indicando um padrão de desenvolvimento indireto.

Na cultura de tecidos vegetais, a realização de estudos anatômicos também permite identificar nos cultivos a presença de características agrônômicas indesejáveis, como: a deficiência na produção de pigmentos e ceras, alterações na formação estomática, acúmulo de água no apoplasto,

redução da capacidade de sustentação, baixa vascularização, além de outros tipos de anomalias. A partir destas análises pode-se selecionar os tratamentos que minimizem ao máximo a ocorrência destas desordens (Dawayati *et al.*, 2012; Habib *et al.*, 2012; Barbosa *et al.*, 2013).

Na embriogênese somática, o estudo do desenvolvimento das células, tecidos e órgãos tem permitido a elucidação de uma série de fenômenos, entre eles, aqueles relacionados com a desdiferenciação das células, com a aquisição da competência embriogênica, com a ontogênese dos calos e dos embriões somáticos, e com diversos outros fatores envolvidos no processo (Schwendiman *et al.*, 1988; Silva *et al.*, 2014b).

Verdeil *et al.* (2001), analisando a indução da competência embriogênica em *Cocos nucifera* a partir de estudos anatômicos, observaram que durante a formação de proembriões ocorrem alterações peculiares na estrutura da parede celular dos explantes, como o fechamento dos plasmodesmas por meio da deposição de calose. Segundo os autores, essas alterações na parede celular são responsáveis por proporcionar aos proembriões o isolamento físico necessário para o início do desenvolvimento embriogênico.

Ademais, a realização de estudos anatômicos durante o decorrer da embriogênese somática também tem permitido analisar e compreender os diferentes estádios de desenvolvimento obtidos no processo, bem como, seus respectivos potenciais embriogênicos (Scherwinski-Pereira *et al.*, 2010; Moura *et al.*, 2010).

Silva *et al.* (2013), estudando a ontogênese da embriogênese somática de *Elaeis guineensis* a partir de embriões zigóticos de frutos maduros, desenvolveram uma série de marcadores do desenvolvimento embriogênico a partir da identificação e caracterização morfoanatômica de diversas fases do processo, entre elas: calo primário, calo embriogênico, calo com proembriões e embriões somáticos em estágio globular e torpedo (Figura 9). Esse estudo demonstrou ainda que as células meristemáticas que originam os embriões somáticos são derivadas de células perivasculares ou dos tecidos vasculares dos explantes iniciais.

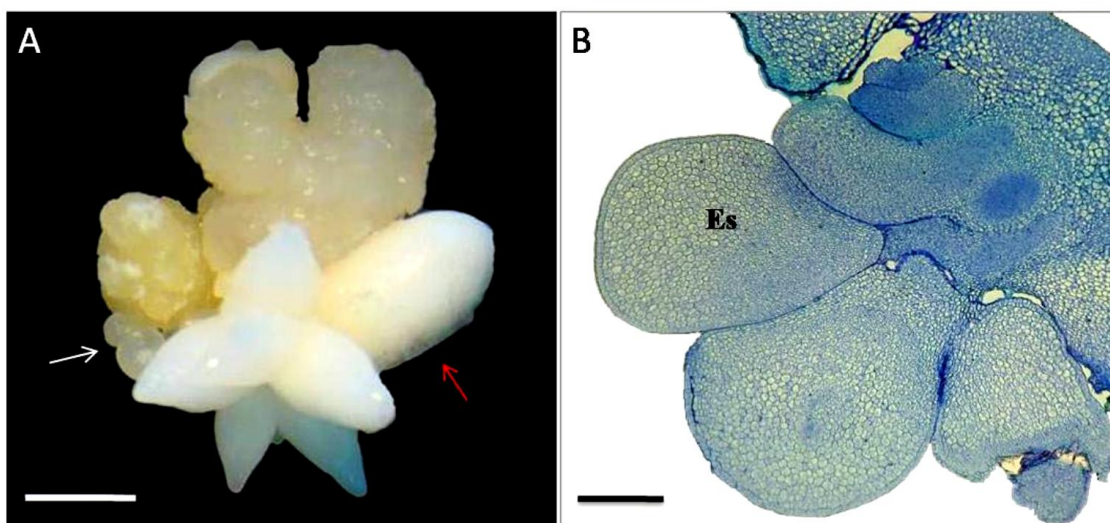


Figura 9. Análise morfoanatômica do processo de diferenciação e maturação de embriões somáticos de dendezeiro, obtidos por embriogênese somática de embriões zigóticos. **A)** Aspectos morfológicos; **B)** Aspectos anatômicos. Seta branca = embriões globulares; seta vermelha = embriões torpedos. Fonte: Silva *et al.* (2014b).

2.7 Bioquímica vegetal

Em todos os sistemas vegetais os processos de crescimento e desenvolvimento são o resultado de um complexo controle espacial e temporal, no qual os hormônios vegetais exercem um papel crucial. Esses reguladores de crescimento desempenham sua ação por meio do reconhecimento de vias de sinalização específicas presentes nas células vegetais, que traduzem os sinais hormonais em diversos eventos bioquímicos, como por exemplo, a biossíntese e o metabolismo de diversas substâncias. Entre essas substâncias, destacam-se: os carboidratos, lipídeos, aminoácidos e proteínas que, por sua vez, irão desencadear as respostas fisiológicas desejadas (Osborne, 1965; Mozer, 1980; Trewavas, 1983; Gómez-Cadenas *et al.*, 2000; Bari & Jones, 2009).

Os carboidratos constituem um importante grupo de compostos vegetais, que incluem desde açúcares simples até açúcares mais complexos,

constituídos por subunidades de açúcares simples. A principal função desses metabólitos é fornecer energia química aos processos do ciclo de vida das células vegetais. Outras funções atribuídas aos carboidratos são o transporte de substâncias, realizado pela regulação do potencial osmótico da planta; o acúmulo de reservas, realizado pelo armazenamento de grãos de amido, bem como, a defesa e sustentação da planta, realizada pela celulose e hemicelulose (Gibson, 2005; Moghaddam & Ende, 2012).

No desenvolvimento dos embriões, os carboidratos são fonte de energia metabólica para as células e carbono estrutural para diversas rotas biossintéticas. Nesse processo, esses compostos podem atuar também como agentes osmóticos e contribuir para a manutenção da integridade da membrana plasmática. Além disso, na embriogênese os carboidratos podem atuar ainda como compostos de reserva ou estarem associados com o processo de tolerância a dessecação (Koster & Leopold, 1988; Lipavská & Konrádová, 2004; Gibson, 2005; Pescador *et al.*, 2008; Kumar & Kumari, 2011; Gomes *et al.*, 2014).

Os lipídeos constituem outro importante grupo de compostos orgânicos vegetais. Estes compostos são moléculas grandes e complexas formadas por ácidos graxos e ácidos carboxílicos com cadeias hidrocarbonadas constituídas por 4 a 36 carbonos. Sua função principal é o armazenamento de formas bastante reduzidas de carbono. Ademais, os lipídeos ainda atuam na composição de membranas celulares e na ligação de substâncias oleaginosas com substâncias não oleaginosas (Benson, 1964; Harwood & Moore Jr, 1989; Somerville & Browse, 1991; Thelen & Ohlrogge, 2002; Chapman *et al.*, 2012).

Na embriogênese de espécies oleaginosas, como a mamona, o algodão e o dendezeiro, estudos demonstram que durante as fases de maturação e germinação, as reservas lipídicas armazenadas nos cotilédones e nas sementes são convertidas em glicose, sacarose e diversos outros metabólitos essenciais ao desenvolvimento inicial da planta. Contudo, no restante do processo embriogênico pouco se conhece a respeito da constituição e dos teores destes compostos (Pescador *et al.*, 2012; Theodoulou & Eastmond, 2012; Dussert *et al.*, 2013).

Os aminoácidos também constituem um importante grupo de compostos vegetais. Sua principal função é servir de constituinte básico à biossíntese de outras substâncias vegetais, como as proteínas, os ácidos nucleicos e as substâncias nitrogenadas do metabolismo secundário, como os fitorreguladores. Dessa forma, o metabolismo destes compostos é responsável direta e/ou indiretamente por praticamente todos os processos do crescimento e desenvolvimento da planta (Mifflin & Lea, 1977; Häusler *et al.*, 2014).

No processo embriogênico, os aminoácidos atuam como compostos básicos para a biossíntese de proteínas e como uma importante forma de transporte de nitrogênio. Além disso, esses metabólitos ainda são de grande importância na transição da planta da heterotrofia para a autotrofia, uma vez que, os aminoácidos armazenados durante o desenvolvimento dos embriões, poderão atuar como fonte de nutrientes no desenvolvimento inicial das plantas (King & Gifford, 1997; Müntz *et al.*, 2001; Booz *et al.*, 2009; Onomo *et al.*, 2010; Cangahuala-Inocente *et al.*, 2014).

Por fim, as proteínas constituem mais um importante grupo de compostos orgânicos vegetais. Estes, por sua vez, são moléculas grandes e complexas formadas por sequências específicas de aminoácidos. Portanto, cada proteína é formada por uma sequência única, que determina sua função dentro da célula vegetal. Dentre as diversas funções desempenhadas pelas proteínas, destacam-se: o transporte de substâncias para dentro e para fora das células, a resistência e a adaptação da planta a estresses abióticos, além da catálise de todas as reações celulares, exceto aquelas que são espontâneas ou catalisadas por RNAs (Staswick, 1994; Carvalho & Gomes, 2007; Kosová *et al.*, 2011).

No desenvolvimento embriogênico, o aumento do conteúdo de proteínas é comumente observado. Essa elevação se dá em função não só da síntese de proteínas de reserva, mas também do acúmulo de proteínas relacionadas ao estresse e a outras classes de proteínas, como aquelas envolvidas com a respiração (glicólise, ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa), à biossíntese de carboidratos e ao metabolismo de aminoácidos. Na embriogênese, o aumento da concentração de proteínas resulta também da síntese de proteínas LEA

(*Late embryogenesis abundant*), as quais irão atuar na proteção dos embriões contra a desidratação (Aberlenc-Bertossi *et al.*, 2008; Sghaier-Hammami *et al.*, 2009a; Sghaier-Hammami *et al.*, 2009b; Cangahuala-Inocente *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2014a).

No estudo do perfil bioquímico das fases de aquisição e desenvolvimento da embriogênese somática de dendezeiro, realizada a partir de embriões zigóticos de frutos maduros, Gomes *et al.*, (2014) analisaram os níveis de açúcares, amido, aminoácidos e proteínas dos diferentes estádios de desenvolvimento obtidos no processo. Nesse estudo, verificou-se que no início da etapa de indução os níveis de açúcares totais solúveis decaem pela metade, enquanto que, nos processos de maturação e regeneração as concentrações destes compostos aumentam gradativamente, atingindo os maiores valores nos dois últimos estádios do desenvolvimento. Em relação ao amido, observou-se que suas concentrações são inversamente proporcionais às dos açúcares totais solúveis em praticamente todo o processo. Quanto aos aminoácidos livres, constatou-se que a partir dos 30 dias de indução até a formação dos calos embriogênicos ocorre uma acentuada síntese destes metabólitos. Entretanto, após essa etapa, observou-se que os teores destes compostos estabilizam, permanecendo constantes até o final do cultivo. Resultados semelhantes aos constatados nas proteínas totais, que também apresentaram um aumento significativo no início da etapa de indução, sofrendo pequenas alterações no restante do cultivo.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral:

Avaliar a utilização de sistemas de imersão temporária na embriogênese somática de dendezeiros (*Elaeis guineensis* Jacq.) a partir de folhas imaturas de plantas adultas, caracterizar morfoanatômica e bioquimicamente os estádios embriogênicos obtidos no processo, além de realizar análises moleculares em clones regenerados.

3.2. Objetivos específicos:

- Avaliar a viabilidade e a eficiência do uso de biorreatores de imersão temporária na multiplicação e regeneração de linhagens embriogênicas de dendezeiros, obtidas pela embriogênese somática de folhas imaturas de plantas adultas;
- Caracterizar morfoanatomicamente os estádios embriogênicos da embriogênese somática de explantes foliares de *Elaeis guineensis*;
- Caracterizar o perfil dos açúcares, amido, lipídeos, aminoácidos e proteínas durante o desenvolvimento do embrião somático da espécie;
- Analisar a fidelidade genética dos regenerantes por meio da utilização de marcadores moleculares ISSR;
- Estimar a variabilidade epigenética destes propágulos pelo emprego de marcadores AFLP (MSAP);
- Estudar os mecanismos causadores das variações epigenéticas induzidas pelo processo de micropropagação (hipometilação e hipermetilação do DNA).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABERLENC-BERTOSSI, F.; CHABRILLANGE, N.; DUVAL, Y.; TREGGAR, J. Contrasting globulin and cysteine proteinase gene expression patterns reveal fundamental developmental differences between zygotic and somatic embryos of oil palm. **Tree Physiology**, v.28, p.1157-1167, 2008.
- ABRAPALMA. Associação Brasileira de Produtores de Óleo de Palma. **A palma no Brasil e no mundo**. Disponível em: < <http://www.abrapalma.org/pt/a-palma-no-brasil-e-no-mundo> >. Acesso em: 04 de agosto de 2016.
- ADAM, H.; COLLIN, M.; RICHAUD, F.; BEULE, T.; CROS, D.; OMORE, A.; NODICHAO, L.; NOUY, B.; TREGGAR, J. W. Environmental regulation of sex determination in oil palm: current knowledge and insights from other species. **Annals of Botany**, v.108, p.1529-1537, 2011.
- ADAM, H.; JOUANNIC, S.; ESCOUTE, J.; DUVAL, Y.; VERDEIL, J.; TREGGAR, J. W. Reproductive developmental complexity in the african oil palm (*Elaeis guineensis*, Arecaceae). **American Journal of Botany**, v.92, p.1836-1852, 2005.
- AGARWAL, M.; SHRIVASTAVA, N.; PADH, H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. **Plant Cell Reports**, v.27, p.617-631, 2008.
- AHMED, O.; CHOKRI, B.; NOUREDDINE, D.; MOHAMED, M.; MOKHTAR, T. Regeneration and molecular analysis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) plantlets using RAPD markers. **African Journal of Biotechnology**, v.8, p. 813-820, 2009.
- AITKEN-CRISTIE, J.; DAVIES, H. Development of a semiautomated micropropagation system. **Acta Horticulturae**, v.230, p.81-87, 1988.
- AJAL, E.A.; JBIR, R.; LEGUA, P.; MARTINEZ, J.J.; MARTINEZ, R.; HANNACHI, A.S.; HADDIOUI, A. Genetic diversity of Moroccan pomegranate (*Punica Granatum* L.) cultivars using AFLP markers. **Australian Journal of Crop Science**, v.9, p.22-29, 2015.
- ALONSO, C.; PÉREZ, R.; BAZAGA, P.; MEDRANO, M.; HERRERA, C. M. MSAP markers and global cytosine methylation in plants: a literature survey and comparative analysis for a wild-growing species. **Molecular ecology resources**, v.16, p.80-90, 2016.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; MACHADO, S. R. Ultrastructural analysis of *in vitro* direct and indirect organogenesis. **Revista Brasileira de Botânica**, v.27, p.429-437, 2004.
- ARIF, I. A.; BAKIR, M. A.; KHAN, H. A.; FARHAN, A. H. A.; HOMAIDAN, A. A. A.; BAHKALI, A. H.; SADOON, M. A.; SHOBRAK, M. A brief review of molecular techniques to assess plant diversity. **International Journal of Molecular Sciences**, v.11, p.2079-2096, 2010.

- BAIRU, M. W.; AREMU, A. Q.; STADEN, J. V. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. **Plant Growth Regulation**, v.63, p.147-173, 2011.
- BAKOUMÉ, C.; WICKNESWARI, R.; SIJU, S.; RAJANAIDU, N.; KUSHAIRI, A.; BILLOTTE, N. Genetic diversity of the world's largest oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) field genebank accessions using microsatellite markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.62, p.349-360, 2015.
- BALZON, T. A.; LUIZ, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. New approaches to improve the efficiency of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) from mature zygotic embryos. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v.49, p.41-50, 2013.
- BARÁNEK, M.; KRIZAN, B.; ONDRUSIKOVA, E.; PIDRA, M. DNA-methylation changes in grapevine somaclones following *in vitro* culture and thermotherapy. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.101, p.11-22, 2010.
- BARBOSA, L. M.; PAIVA NETO, V. B.; DIAS, L. L. C.; FESTUCCI-BUSELLI, R. A.; ALEXANDRE, R. S.; IAREMA, L.; FINGER, F. L.; OTONI, W. C. Biochemical and morpho-anatomical analyses of strawberry vitro plants hyperhydric tissues affected by BA and gelling agents. **Revista Ceres**, v.60, p.152-160, 2013.
- BARCELOS, E.; AMBLARD, P.; BERTHAUD, J.; SEGUIN, M. Genetic diversity and relationship in American and African oil palm as revealed by RFLP and AFLP molecular markers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, p.1105-1114, 2002.
- BARCELOS, E.; RIOS, S. A.; CUNHA, R. N. V.; LOPES, R.; MOTOIKE, S. Y.; BABIYCHUK, E.; SKIRYCZ, A.; KUSHNIR, S. Oil palm natural diversity and the potential for yield improvement. **Frontiers in Plant Science**, v.6, p.1-16, 2015.
- BARI, R.; JONES, J. D. G. Role of plant hormones in plant defence responses. **Plant Molecular Biology**, v.69, p.473-488, 2009.
- BASIRON, Y. Palm oil production through sustainable plantations. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.109, p.289-295, 2007.
- BATAGIN-PIOTTO, K. D.; ALMEIDA, C. V.; PIOTTO, F. A.; ALMEIDA, M. Anatomical analysis of peach palm (*Bactris gasipaes*) leaves cultivated *in vitro*, *ex vitro* and *in vivo*. **Brazilian Journal of Botany**, v.35, p.71-78, 2012.
- BENSON, A. A. Plant membrane lipids. **Annual Review of Plant Biology**, v.15, p.1-16, 1964.
- BESSE, I.; VERDEIL, J. L.; DUVAL, Y.; SOTTA, B.; MALDINEY, R.; MIGINIAC, E. Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) clonal fidelity: endogenous cytokinins and indoleacetic acid in embryogenic callus cultures. **Journal of Experimental Botany**, v.43, p.983-989, 1992.

- BEULÉ, T.; CAMPS, C.; DEBIESSE, S.; TRANCHANT, C.; DUSSERT, S.; SABAU, X.; JALIGOT, E.; ALWEE, S. S. R. S.; TREGGAR, J. W. Transcriptome analysis reveals differentially expressed genes associated with the mantled homeotic flowering abnormality in oil palm (*Elaeis guineensis*). **Tree Genetics and Genomes**, v.7, p.169-182, 2011.
- BOOZ, M. R.; KERBAUY, G. B.; GUERRA, M. P.; PESCADOR, R. The role of γ -aminobutyric acid (Gaba) in somatic embryogenesis of *Acca sellowiana* Berg. (Myrtaceae). **Brazilian Society of Plant Physiology**, v.21, p.271-280, 2009.
- BUTENKO, R. G.; SHEMINA, Z. B.; FROLOVA, L. V. Induced organogenesis and characteristics of plants produced in tobacco tissue culture. **Genetika**, v.3, p.29-39, 1967.
- CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; SILVEIRA, V.; CAPRESTANO, C. A.; FLOH, E. I.; GUERRA, M. P. Dynamics of physiological and biochemical changes during somatic embryogenesis of *Acca sellowiana*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v.50, p.166-175, 2014.
- CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; STEINER, N.; MALDONADO, S. B. GUERRA, M. P. Patterns of protein and carbohydrate accumulation during somatic embryogenesis of *Acca sellowiana*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, p.217-224, 2009.
- CARR, M. K. V. The water relations and irrigation requirements of oil palm (*Elaeis guineensis*): a review. **Experimental Agriculture**, v.47, p.629-652, 2011.
- CARVALHO, A. O.; GOMES, V. M. Role of plant lipid transfer proteins in plant cell physiology - A concise review. **Peptides**, v.28, p.1144-1153, 2007.
- CHANPRASERT, W.; MYINT, T.; SRIKUL, S.; WONGSRI, O. Effects of neonicotinoid and method of breaking dormancy on seed germination and seedling vigour of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Journal of Oil Palm Research**, v.24, p.1227-1234, 2012.
- CHAPMAN, K. D.; DYER, J. M.; MULLEN, R. T. Biogenesis and functions of lipid droplets in plants. **Journal of Lipid Research**, v.53, p.215-226, 2012.
- CHEHMALEE, S.; TE-CHATO, S. Induction of somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured zygotic embryo of oil palm. **Journal of Agricultural Technology**, v.4, p.137-146, 2008.
- CHOI, D. S.; ANDRADE, M. H. C.; WILLIS, L. B.; CHO, C. W.; SCHOENHEIT, J.; BOCCAZZI, P.; SAMBANTHANMURTHI, R.; SINSKEY, A. J.; RHA, C. K. Effect of agitation and aeration of yield optimization of oil palm suspension culture. **Journal of Palm Oil Research**, v.1, p.23-34, 2008.
- CLEMENT, C. R.; LLERAS PÉREZ, E.; VAN LEEUWEN, J. O potencial das palmeiras tropicais no Brasil: acertos e fracassos das ultimas décadas. **Agrociencias**, v.9, p.67-71, 2005.

- COCHARD, B.; ADON, B.; REKIMA, S.; BILLOTTE, N.; CHENON, R. D.; KOUTOU, A.; NOUY, B.; OMORÉ, A.; PURBA, A. R.; GLAZSMAN, J. C.; NOYER, J. L. Geographic and genetic structure of African oil palm diversity suggests new approaches to breeding. **Tree Genetics and Genomes**, v.5, p.493-504, 2009.
- CONSTANTIN, M.; NCHU, W. A.; GODSWILL, N. N.; WIENDI, N. M. A.; WACHJAR, A.; FRANK, N. E. G. Induction of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq. var. Tenera) callogenesis and somatic embryogenesis from young leaf explants. **Journal of Applied Biology and Biotechnology**, v.3, p.4-10, 2015.
- CORLEY, R. H. V.; LEE, C. H.; LAW, I. M.; WONG, C. Y. Abnormal flower development in oil palm clones. **Planter**, v.62, p.233-240, 1986.
- CORLEY, R. V. H.; BARRET, J. N.; JONES, L. H. Vegetative propagation of oil palm via tissue culture. **Oil Palm News**, v.22, p.2-7, 1977.
- DAWAYATI, M. M.; BAR, O. H. A.; ZAID, Z. E.; DIN, A. F. M. Z. *In vitro* morpho-histological studies of newly developed embryos from abnormal malformed embryos of date palm cv. Gundila under desiccation effect of polyethylene glycol treatments. **Annals of Agricultural Science**, v.57, p.117-128, 2012.
- DE TOUCHET, B.; DUVAL, Y.; PANNETIER, C. Plant regeneration from embryogenic suspension cultures of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Plant Cell Reports**, v.10, p.529-532, 1991.
- DEBNATH, S. C. Adventitious shoots regeneration in a bioreactor system and EST-PCR based clonal fidelity in lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium* Ait.). **Scientia Horticulturae**, v.128, p.457-464, 2011.
- DIBAX, R.; QUISEN, R. C.; BONA, C.; QUOIRIN, M. Plant regeneration from cotyledonary explants of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn and histological study of organogenesis *in vitro*. **Brazilian archives of biology and technology**, v.53, p.311-318, 2010.
- DODEMAN, V. L.; DUCREUX, G.; KREIS, M. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. **Journal of Experimental Botany**, v.48, p.1493-1509, 1997.
- DOGAN, B.; DURAN, A.; ŞEKER, M.; ÇETIN, Ö.; MARTIN, E. Study of phylogenetic relationship of Turkish species of *Klasea* (Asteraceae) based on ISSR amplification. **PhytoKeys**, v.56, p.29-40, 2015.
- DURAND-GASSELIN, T.; GUEN, V.; KONAN, K.; DUVAL, Y. Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) plantations in Ivory Coast obtained through *in vitro* culture. First results. **Oléagineux**, v.45, p.1-11, 1990.
- DUSSERT, S.; GUERIN, C.; ANDERSSON, M.; JOËT, T.; TRANBARGER, T. J.; PIZOT, M.; SARAH, G.; OMORE, A.; DURAND-GASSELIN, T.; MORCILLO, F. Comparative transcriptome analysis of three oil palm fruit and seed tissues that differ in oil content and fatty acid composition. **Plant Physiology**, v.162, p.1337-1358, 2013.

DUVAL, Y.; DURAND-GASSELIN, T.; KONAN, K. C. *In vitro* vegetative propagation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Oleagineux**, v.43, p.145-47, 1988.

DUVAL, Y.; ENGELMANN, F.; DURAND-GASSELIN, T. Somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq). In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.) **Biotechnology in Agriculture and Forestry: Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed**. Springer Berlin Heidelberg, p.335-352, 1995.

EEUWENS, C. J.; BLAKE, J. Mineral requirement for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera* L.) and culture *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, v.36, p.23-28, 1976.

ELMEER, K. E. S. Factors regulating somatic embryogenesis in plants. In: ASLAM, J.; SRIVASTAVA, P. S.; SHARMA, M. P. (Eds.) **Somatic embryogenesis and gene expression**. New Delhi: Narosa Publishing House, p.56-81, 2013.

ESCALONA, M.; LORENZO, J. C.; GONZÁLES, B.; DAQUINTA, M.; GONZÁLES, J. L.; DESJARDINS, Y.; BORROTO, C. G.; Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. **Plant Cell Reports**, v.18, p.743-748, 1999.

ESPINOSA, P.; LORENZO, J. C.; INGLESIAS, A.; YABOR, L.; MENÉNDEZ, E.; BORROTO, J.; HERMÁNDEZ, L.; ARENCIBIA, A. D. production of pineapple transgenic plants assisted by temporary immersion bioreactors. **Plant Cell Reports**, v.21, p.136-140, 2002.

ETIENNE, H.; BERTHOULY, M. Temporary immersion systems in plant micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.69, p.215-231, 2002.

ETIENNE, H.; DECHAMP, E.; BARRY-ETIENNE, D.; BERTRAND, B. Bioreactors in coffee micropropagation. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.18, p.45-54, 2006.

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

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T.; OTVOS, K.; MISKKOLCZI, P.; DUDITS, D. Induction of embryogenic competence in somatic plant cells: a review. **Section Botany**, v.57, p.5-12, 2002.

FERREIRA, C. B. B.; LOPES, M. T. G. LOPES, R.; CUNHA, R. N. V.; MOREIRA, D. A.; BARROS, W. S.; MATIELLO, R. R. Diversidade genética molecular de progênies de dendzeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.47, p.378-384, 2012.

GANTAIT, S.; SINNIHA, U. R.; SURANTHRAN, P.; PALANYANDY, S. R.; SUBRAMANIAM, S. Improved cryopreservation of oil palm (*Elaeis guineensis*

Jacq.) polyembryoids using droplet vitrification approach and assessment of genetic fidelity. **Protoplasma**, v.252, p.89-101, 2015.

GEORGIEV, V.; SCHUMANN, A.; PAVLOV, A.; BLEY, T. Review - Temporary immersion systems in plant biotechnology. **Engineering Life Sciences**, v.14, p.607-621, 2014.

GIBSON, S. I. Control of plant development and gene expression by sugar signaling. **Current Opinion in Plant Biology**, v.8, p.93-102, 2005.

GOGOI, G.; BORUA, P. K. Standardization parameters for critical problems encountered in plant *in vitro* culture technique. **International Journal of Current Research**, v.6, p.10964-10973, 2014.

GOMES, H. T. **Caracterização bioquímica da embriogênese somática de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.), regeneração de embriões somáticos em biorreatores de imersão temporária e análise da fidelidade genética dos regenerantes por marcadores RAPD**. Dissertação de mestrado, Universidade de Brasília, Programa de Pós-graduação em Botânica, 97p., 2012.

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

GOMES, H. T.; BARTOS, P. M. C.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Optimizing rooting and survival of oil palm (*Elaeis guineensis*) plantlets derived from somatic embryos. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v.51, p.111-117, 2015.

GOMES, H. T.; BARTOS, P. M. C.; SILVA, C. O.; AMARAL, L. I. V.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. Comparative biochemical profiling during the stages of acquisition and development of somatic embryogenesis in African oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Plant Growth Regulation**, v.74, p.199-208, 2014.

GÓMEZ-CADENAS, A.; MEHOUACHI, J.; TADEO, F. R.; PRIMO-MILLO, E.; TALON, M. Hormonal regulation of fruitlet abscission induced by carbohydrate shortage in citrus. **Planta**, v.210, p.636-643, 2000.

GONTIJO, T. S.; FERNANDES, E. A.; SARAIVA, M. B. Análise da volatilidade do retorno da *commodity* dendê: 1980-2008. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v.49, p.857-874, 2011.

GUERRA, M. P.; HANDRO, W. Somatic embryogenesis and plant regeneration in different organs of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae): control and structural features. **Journal of Plant Research**, v.111, p.65-71, 1998.

GUEYE, B.; MORCILLO, F.; COLLIN, M.; GARGANI, D.; OVERVOORDE, P.; ABERLENC-BERTOSSI, F.; TRANBARGER, T. J.; SANE, D.; TREGGAR, J. W.; BORGEL, A.; VERDEIL, J. Acquisition of callogenic capacity in date palm

leaf tissues in response to 2,4-D treatment. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.99, p.35-45, 2009.

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

HABIB, S. H.; SYED-ALWEE, S. S. R.; HO, C. L.; ONG-ABDULLAH, M.; SINNIAH, U. R.; NAMASIVAYAM, P. Morpho-histological characterization of truncated leaf syndrome seedlings: an oil palm (*E. guineensis* Jacq.) somaclonal variant. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.34, p.17-28, 2012.

HAMEED, H. B.; LAI, L. F.; CHIN, L. H. Production of biodiesel from palm oil (*Elaeis guineensis*) using heterogeneous catalyst: An optimized process. **Fuel Processing Technology**, v.90, p.606-610, 2009.

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

HANSEN, S.B.; PADFIELD, R.; SYAYUTI, K.; EVERS, S.; ZAKARIAH, Z.; MASTURA, S. Trends in global palm oil sustainability research. **Journal of Cleaner Production**, v.100, p.140-149, 2015.

HARWOOD, J.; MOORE JR., T. S. Lipid metabolism in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.8, p.1-43, 1989.

HÄUSLER, R. E.; LUDEWIG, F.; KRUEGER, S. Amino acids – A life between metabolism and signaling. **Plant Science**, v.229, p.225-237, 2014.

HAYATI, A.; WICKNESWARI, R.; MAIZURA, I.; RAJANAIDU, N. Genetic diversity of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) germplasm collections from Africa: implications for improvement and conservation of genetic resources. **Theoretical and Applied Genetics**, v.108, p.1274-1284, 2003.

HERINGER, A.S.; STEINMACHER, D.A.; FRAGA, H.P.F.; VIEIRA, L.N.; MONTAGNA, T.; QUINGA, L.A.P.; QUOIRIN, M.G.G.; JIMÉNEZ, V.M.; GUERRA, M.P. Improved high-efficiency protocol for somatic embryogenesis in Peach Palm (*Bactris gasipaes* Kunth) using RITA[®] temporary immersion system. **Scientia Horticulturae**, v.179, p.284-292, 2014.

JALANI, B. S.; CHEAH, S. C.; RAJANAIDU, N.; DARUS, A. Improvement of palm oil through breeding and biotechnology. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.74, p.1451-1455, 1997.

JALIGOT, E.; ADLER, S.; DEBLADIS, E.; BEULE, T.; RICHAUD, F.; ILBERT, P.; FINNEGAN, E. J.; RIVAL, A. Epigenetic imbalance and the floral developmental abnormality of the *in vitro*-regenerated oil palm *Elaeis guineensis*. **Annals of Botany**, v.108, p.1453-1462, 2011.

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

JAYANTHI, M.; MOHAN, N. M.; MANDAL, P. K. Direct somatic embryogenesis and plantlet regeneration in oil palm. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v.20, p.249-251, 2011.

JAYANTHI, M.; SUSANTHI, B.; MOHAN, N. M.; MANDAL, P. K. *In vitro* somatic embryogenesis and plantlet regeneration from immature male inflorescence of adult dura and tenera palms of *Elaeis guineensis* (Jacq.). **SpringerPlus**, v.4, p.256-262, 2015.

JENA, S.N.; VERMA, S.; NAIR, K.N.; SRIVASTAVA, A.K.; MISRA, S.; RANA, T.S. Genetic diversity and population structure of the mangrove lime (*Merope angulata*) in India revealed by AFLP and ISSR markers. **Aquatic Botany**, v.120, p.206-267, 2015.

JONES, H.L. Metabolism of cytokinins by tissue culture lines of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) producing normal and abnormal flowering palms. **Journal of Plant Growth Regulation**, v.17, p.205-214, 1998.

JOSHI, S. P.; RANJEKAR, P. K.; GUPTA, V. S. Molecular markers in plant genome analysis. **Current Science**, v.77, p.230-240, 1999.

JOUANNIC, S.; LARTAUD, M.; HERVÉ, J.; COLLIN, M.; ORIEUX, Y.; VERDEIL, J. L.; TREGGAR, J. W. The shoot apical meristem of oil palm (*Elaeis guineensis*; *Arecaceae*): developmental progression and dynamics. **Annals of Botany**, v.108, p.1477-1487, 2011.

JOURDAN, C.; REY, H. Architecture and development of the oil-palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) root system. **Plant and Soil**, v.189, p.33-48, 1997.

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

KARP, A. Somaclonal variation as a tool for crop improvement. **Euphytica**, v.85, p.295-302, 1995.

KHAW, C. H.; NG, S. K. Performance of commercial scale clonal oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) plantings in Malaysia. **Acta Horticulturae**, v.461, p.251-258, 1998.

KING, J. E.; GIFFORD, D. J. Amino acid utilization in seeds of Loblolly pine during germination and early seedling growth. **Plant Physiology**, v.113, p.1125-1135, 1997.

KONAN, K. E.; DURANT-GASSELIN, T.; KOUADIO, Y. J.; FLORI, A.; RIVAL, A.; DUVAL, Y.; PANNETIER, C. *In vitro* conservation of oil palm somatic embryo for 20 years on a hormone-free culture medium: characteristics of the

embryogenic cultures, derived plantlets and adult palms. **Plant Cell Reports**, v.29, p.1-13, 2010.

KOSOVÁ, K.; VÍTÁMVÁS, P.; PRÁŠIL, I. T.; RENAUT, J. Plant proteome changes under abiotic stress - Contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. **Journal of Proteomics**, v.74, p.1301-1322, 2011.

KOSTER, K. L.; LEOPOLD, A. C. Sugars and Desiccation Tolerance in Seeds. **Plant Physiology**, v.88, p.829-832, 1988.

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

KUMAR, S. P.; KUMARI, B. D. R. Factors affecting on somatic embryogenesis of safflower (*Carthamus tinctorius* L) at morphological and biochemical levels. **World Journal of Agricultural Sciences**, v.7, p.197-205, 2011.

LAKIN, P. J.; SCOWCROFT, W. R. Somaclonal variation – A novel source of variability from cell cultures for plant improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, v.60, p.197-214, 1981.

LANDRY, B. S.; KESSELI, R. V.; FARRARA, B.; MICHELMORE, R. W. A genetic map of lettuce (*Lactuca sativa* L.) with restriction fragment length polymorphism, isozyme, disease resistance and morphological markers. **Genetics**, v.116, 331-337, 1987.

LEE, M.; PHILLIPS, R. L. The chromosomal basis of somaclonal variation. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.39, p.413-437, 1988.

LEGROS, S.; MIALET-SERRA, I.; CALIMAN, J. P.; SIREGAR, F. A.; CLÉMENT-VIDAL, A.; DINGKUHN, M. Phenology and growth adjustments of oil palm (*Elaeis guineensis*) to photoperiod and climate variability. **Annals of Botany**, v.104, p.1171-1182, 2009.

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

LIPAVSKÁ, H.; KONRÁDOVÁ, H. Invited review: somatic embryogenesis in conifers: the role of carbohydrate metabolism. **In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v.40, p.23-30, 2004.

LITZ, R. E.; GRAY, D. J. Somatic embryogenesis for agricultural improvement. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.11, p.416-425, 1995.

LIU, W.; XIAO, Z.; BAO, X.; YANG, X.; FANG, J.; XIANG, X. Identifying litchi (*Litchi chinensis* sonn.) cultivars and their genetic relationships using single nucleotide polymorphism (SNP) markers. **Plos One**, v.10, p.1-15, 2015.

MAMMADOV, J.; AGGARWAL, R.; BUYYARAPU, R.; KUMPATLA, S. SNP markers and their impact on plant breeding. **International Journal of Plant Genomics**, v.2012, p.1-11, 2012.

MARBUN, C. L. M.; TORUAN-MATHIUSA, N.; REFLINIA; UTOMOA, C.; LIWANG, T. Micropropagation of embryogenic callus of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) using temporary immersion system. **Procedia Chemistry**, v.14, p.122-129, 2015.

MARTIN, Y. VERMETTE, P. Bioreactors for tissue mass culture: Design, characterization, and recent advances. **Biomaterials**, v.29, P.7481-7503, 2005.

MARTINE, B.M.; LAURENT, K.K.; PIERRE, B.J.; EUGÈNE, K.K.; HILAIRE, K.T.; JUSTIN, K.Y. Effect of storage and heat treatments on the germination of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) seed. **African Journal of Agricultural Research**, v.4, p.931-937, 2009.

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

MENÉNDEZ-YUFFÁ, A.; BARRY-ETIENNE, D.; BERTRAND, B.; GEORGET, F.; ETIENNE, H. A comparative analysis of the development and quality of nursery plants derived from somatic embryogenesis and from seedlings for large-scale propagation of coffee (*Coffea arabica* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.102, p.297-207, 2010.

MGBEZE, G.C.; ISERHIENRHIEN A. Somaclonal variation associated with oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) clonal propagation: A review. **African Journal of Biotechnology**, v.13, p.989-997, 2014.

MIFLIN, B. J.; LEA, P. J. Amino acid metabolism. **Annual Review of Plant Biology**, v.28, p.299-329, 1977.

MIGUEL, C.; MARUM, L. An epigenetic view of plant cells cultured *in vitro*: somaclonal variation and beyond. **Journal of Experimental Botany**, v.62, p.3713-3725, 2011.

MOGHADDAM, M. R. B.; ENDE, W. V. Sugars and plant innate immunity. **Journal of Experimental Botany**, v.63, p.3989-3998, 2012.

MORCILLO, F.; GAGNEUR, C.; ADAM, H.; RICHAUD, F.; SINGH, R.; CHEAH, S.; RIVAL, A.; DUVAL, Y. Somaclonal variation in micropropagated oil palm. Characterization of two novel genes with enhanced expression in epigenetically abnormal cell lines and in response to auxin. **Tree Physiology**, v.26, p.585-594, 2006.

MORETZSOHN, M. C.; NUNES, C. D. M.; FERREIRA, M. E.; GRATAPLAGLIA, D. RAPD linkage mapping of the shell thickness locus in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Theoretical and Applied Genetics**, v.100, p.63-70, 2000.

- MOURA, E. F.; VENTRELLA, M. C.; MOTOIKE, S. Y. Anatomy, histochemistry and ultrastructure of seed and somatic embryo of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). **Scientia Agricola**, v.67, p.399-407, 2010.
- MOYO, M.; AREMU, A. O.; VAN STADEN, J. Insights into the multifaceted application of microscopic techniques in plant tissue culture systems. **Planta**, v.242, p.773-790, 2015.
- MOZER, T. J. Control of protein synthesis in barley aleurone layers by the plant hormones gibberellic acid and abscisic acid. **Cell**, v.20, p.479-485, 1980.
- MUKHERJEE, I.; SOVACOO, B.K. Palm oil-based biofuels and sustainability in southeast Asia: A review of Indonesia, Malaysia, and Thailand. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.37, p.1-12, 2014.
- 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.
- MÜNTZ, K.; BELOZERSKY, M. A.; DUNAEVSKY, Y. E.; SCHLERETH, A.; TIEDEMANN, J. Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. **Journal of Experimental Botany**, v.52, p.1741-1752, 2001.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- MYINT, T.; CHANPRASERT, W.; SRIKUL, S. Germination of seed of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) as affected by different mechanical scarification methods. **Seed Science and Technology**, v.38, p.635-645, 2010.
- NIEMENAK, N.; SAARE-SURMINSKI, K.; ROHSIUS, C.; NDOUMOU, D. O.; LIEBEREI, R. Regeneration of somatic embryos in *Theobroma cacao* L. in temporary immersion bioreactor and analyses of free amino acids in different tissues. **Plant Cell Reports**, v.27, p.667-676, 2008.
- NISTOR, A.; CHIRU, N.; KARÁCSONYI, D. Variation of minitubers production from callus regenerated plants of different potato varieties. **Studia Universitatis**, v.19, p.303-307, 2009.
- NORDIANA, H. M. N.; NGOOT-CHIN, T.; SINGH, R.; CLYDE, M. M.; MADON, M. Evaluation of inter-simple sequence repeat (ISSR) markers for genetic mapping of an oil palm interspecific hybrid mapping population. **Journal of Oil Palm Research**, v.26, p.214-225, 2014.
- ONG-ABDULLAH, M.; ORDWAY, J. M.; JIANG, N.; OOI, S. E.; KOK, S. Y.; SARPAN, N.; ...; MARTIENSSEN, R. A. Loss of *Karma* transposon methylation underlies the mantled somaclonal variant of oil palm. **Nature**, v.525, p.533-537, 2015.

ONOMO, P. E.; NIEMENAK, N.; NDOUMOU, D. O.; LIEBEREI, R. Change in amino acids content during germination and seedling growth of *Cola* sp. **African Journal of Biotechnology**, v.9, p.5632-5642, 2010.

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

OSBORNE, D. J. Interactions of hormonal substances in the growth and development of plants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.16, p.1-13, 1965.

OVECKA, M.; BOBÁK, M.; SARNA, J. A comparative structural analysis of direct and indirect shoot regeneration of *Papaver somniferum* L. *in vitro*. **Journal of Plant Physiology**, v.157, p.281-289, 2000.

PÁDUA, M. S.; PAIVA, L. V.; LABORY, C. R. G.; ALVES, E.; STEIN, V. C. Induction and characterization of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) pro-embryogenic masses. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.85, p.1545-1556, 2013.

PAEK, K. Y.; CHAKRABARTY, D.; HAHN, E. J. Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.81, p.287-300, 2005.

PAEK, K. Y.; HAHN, E. J.; SON, S. Application of bioreactors for large-scale micropropagation systems of plants. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v.37, p.149-157, 2001.

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

PESCADOR, R.; KERBAUY, G. B.; KRAUS, J. E.; FERREIRA, W. M.; GUERRA, M. P.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. de C. Changes in soluble carbohydrates and starch amounts during somatic and zygotic embryogenesis of *Acca sellowiana* (Myrtaceae). **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v.44, p.289-299, 2008.

PESCADOR, R.; KERBAUY, G. B.; SANTOS, D. Y. A. C.; DAL VESCO, L. L.; FRAGA, H. P. F.; GUERRA, M. P. Comparative study of reserve lipid accumulation during somatic and zygotic *Acca sellowiana* (O. Berg.) Burret embryogenesis. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.34, p.771-778, 2012.

PONTIKIS, C. A.; LOUKAS, M.; KOUSOUNIS, G. The use of biochemical markers to distinguish olive cultivars. **Journal of Horticultural Science**, v.55, p.333-343, 1980.

PURBA, A. R.; NOYER, J. L.; BAUDOUIN, L.; HAMON, X. P. S.; LAGODA, P. J. L. A new aspect of genetic diversity of Indonesian oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) revealed by isoenzyme and AFLP markers and its consequences for breeding. **Theoretical and Applied Genetics**, v.101, p.956-961, 2000.

RABÉCHAULT, H.; MARTIN, J.P. Multiplication végétative du palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) à l'aide de cultures de tissus foliaires. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences**, v.285, p.1735-1737, 1976.

RAMBAUD, C.; ARNOULT, S.; BLUTEAU, A.; MANSARD, M.C.; BLASSIAU, C.; BRANCOURT-HULMEL, M. Shoot organogenesis in three *Miscanthus* species and evaluation for genetic uniformity using AFLP analysis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.113, p.437-448, 2013.

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

REINERT, J. Morphogenese und ihre kontrolle an geweberkulturen aus karotten. **Naturwissenschaften**, v.45, p.344-345, 1958.

REYNA-LOPEZ, G. E.; SIMPSON, J.; RUIZ-HERRERA, J. Differences in DNA methylation patterns are detectable during the dimorphic transition of fungi by amplification of restriction polymorphisms. **Molecular and General Genetics**, v.253, p.703-710, 1997.

REZENDE, J. C.; FERREIRA, E. A.; PASQUAL, M.; VILLA, F.; BOTELHO, C. E.; CARVALHO, S. P. Development of *Coffea arabica* L. seedlings obtained from direct somatic embryogenesis. **Coffea Science**, v.3, p.30-37, 2008.

RIBEIRO, L. M.; OLIVEIRA, D. M. T.; GARCIA, Q. S. Structural evaluations of zygotic embryos and seedlings of the macaw palm (*Acrocomia aculeata*, Arecaceae) during *in vitro* germination. **Trees**, v.26, p.851-863, 2012.

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

RIVAL, A.; ABERLENC, F.; MORCILLO, F.; TREGGAR, J.; VERDEIL, J. L.; DUVAL, Y. Scaling-up *in vitro* clonal propagation through somatic embryogenesis : the case of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, v.3, p.74-82, 1997a.

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

RIVAL, A.; BEULE, T.; BARRE, B.; HAMON, S.; DUVAL, Y.; NOIROT, M. Comparative flow cytometric estimation of nuclear DNA content in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) tissue cultures and seed-derived plants. **Plant Cell Reports**, v.16, p.884-887, 1997b.

RIZVI, M. Z.; KUKREJA, A. K. Micropropagation of an endangered medicinal herb *Chlorophytum borivillianum* Sant. et Fernand. in bioreactor. **African Journal of Biotechnology**, v.13, p.1772-1778, 2014.

ROELS, S.; ESCALONA, M.; CEJAS, I.; NOCEDA, C.; RODRIGUEZ, R.; CANAL, M. J.; SANDOVAL, J.; DEBERGH, P. Optimization of plantain (*Musa AAB*) micropropagation by immersion system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.82, p.57-66, 2005.

SABIR, J. S. M.; ABO-ABA, S.; BAFEEL, S.; ZARI, T. A.; EDRIS, S.; SHOKRY, A. M.; ATEF, A.; GADALLA, N. O.; RAMADAN, A. M.; AL-KORDY, M. A.; EL-DOMYATI, F. M.; JANSEN, R. K.; BAHIELDIN, A. Characterization of ten date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars from Saudi Arabia using AFLP and ISSR markers. **Comptes Rendus Biologies**, v.337, p.6-18, 2014.

SAXENA, S.; DHAWAN, V. Regeneration and large-scale propagation of bamboo (*Dendrocalamus strictus* Nees) through somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**, v.18, p.438-443, 1999.

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

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

SEMAGN, K.; BJØRNSTAD, A.; NDJIONDJOP, M. N. An overview of molecular marker methods for plants. **African Journal of Biotechnology**, v.5, p.2540-2568, 2006.

SGHAIER-HAMMAMI, B.; DRIRA, N.; JORRIN-NOVO, J. V. Comparative 2-DE proteomic analysis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) somatic and zygotic embryos. **Journal of Proteomics**, v.73, p.161-177, 2009a.

SGHAIER-HAMMAMI, B.; VALLEDOR, L.; DRIRA, N.; JORRIN-NOVO, J. V. Proteomic analysis of the development and germination of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) zygotic embryos. **Proteomics**, v.9, p.2543-2554, 2009b.

SHARMA, S.; NAMDEO, A. G.; MAHADIK, K. R. Molecular markers: New prospects in plant genome analysis. **Pharmacognosy Reviews**, v.2, p.23-34, 2008.

SHOOSHTARI, L.; OMIDI, M.; MAJIDI, E.; NAGHAVI, M.; GHORBANPOUR, M.; ETMINAN, A. Assessment of somaclonal variation of regenerated *Ducrosia anethifolia* plants using AFLP markers. **Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology**, v.17, p.99-106, 2013.

SILVA, R. C.; CARMO, L. S. C.; LUIS, Z. G. L.; SILVA, L. P.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; MEHTA, A. Proteomic identification of differentially expressed

proteins during the acquisition of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Journal of Proteomics**, v.104, p.112-127, 2014a.

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

SILVA, R. C.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. The histodifferentiation events involved during the acquisition and development of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Plant Growth Regulation**, v.72, p.67-80, 2014b.

SIMONTON, W.; ROBACKER, C.; KRUEGER, S. A. programable micropropagation apparatus using cycled liquid medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.27, p.211-218, 1991.

SKIRVIN, R. M.; MCPHEETERS, K. D.; NORTON, M. Sources and frequency of somaclonal variation. **Hortscience**, v.29, p.1232-1237, 1994.

SOARES, D. M. M.; SATTTLER, M. C.; SILVA FERREIRA, M. F.; &PRAÇA-FONTES, M. M. Assessment of genetic stability in three generations of *in vitro* propagated *Jatropha curcas* L. plantlets using ISSR markers. **Tropical Plant Biology**, DOI:10.1007/s12042-016-9171-6, 2016.

SOH, A. C.; WONG, G.; TAN, C. C.; CHEW, P. S.; CHONG, S. P.; 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.

SOMERVILLE, C.; BROWSE, J. Plant Lipids: Metabolism mutant and membranes. **Science**, v.252, p.80-87, 1991.

STARITSKY, G. Tissue culture of the oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) as a tool for its vegetative propagation. **Euphytica**, v.19, p.288-292, 1970.

STASWICK, P. E. Storage proteins of vegetative plant tissues. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.45, p.303-322, 1994.

STEINMACHER, D. A.; GUERRA, M. P.; SAARE-SURMINSKI, K.; LIEBEREI, R. A temporary immersion system improves *in vitro* regeneration of *Peach palm* through secondary somatic embryogenesis. **Annals of Botany**, v.108, p.1463-1475, 2011.

STEINMACHER, D. A.; KROHN, N. G.; DANTAS, A. C. M.; STEFENON, V. M.; CLEMENT, C. R.; GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis in peach palm using the thin cell layer technique: induction, morpho-histological aspects and AFLP analysis of somaclonal variation. **Annals of Botany**, v.100, p.1-11, 2007.

STEWART, F.C.; CAPLIN, S.M.; MILLAR, F.K. Investigations on growth and metabolism of plant cells. I. New techniques for the investigation of metabolism,

- nutrition and growth in undifferentiated cells. **Annals of Botany**, v.16, p.57-77, 1952.
- SUNDRAM, K.; SAMBANTHAMURTHI, R.; TAN, Y. Palm fruit chemistry and nutrition. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v.12, p.355-362, 2003.
- TAKAYAMA, S.; AKITA, M. The types of bioreactors used for shoots and embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.39, p.147-156, 1994.
- TAKAYAMA, S.; MISAWA, M. Mass propagation of *Begonia hiemalis* plantlets by shaken culture. **Plant Cell Physiology**, v.22, p.461-468, 1981.
- TARMIZI, A. H.; NORJIHAN, M. A.; ZAITON, R. Multiplication of oil palm suspension cultures in a bench-top (2 litre) bioreactor. **Journal of Oil Palm Research**, v.16, p.44-49, 2004.
- TARMIZI, A. H.; SAMSAUL, K. R.; ZAITON, R.; ROSLI, M. Y. Multiplication of oil palm liquid cultures in bioreactors. **Journal of Oil Palm Research Special Issue on Malaysia-MIT Biotechnology Partnership Programme**, v.1, p.44-50, 2008.
- TE-CHATO, S.; HILAE, A. High-frequency plant regeneration through secondary somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq. var. *tenera*). **Journal of Agricultural Technology**, v.3, p.345-357, 2007.
- TE-CHATO, S.; HILAE, A.; YEEDUM, I. Improve callus induction and embryogenic callus formation from cultured young leaves of oil palm seedling. **Thai Journal of Agricultural Science**, v.35, p.407-413, 2002.
- TEISSON, C.; ALVARD, D.; BERTHOULY, M.; COTE, F.; ESCALANT, J.V. & ETIENNE, H. *In vitro* culture by temporary immersion: a new device. **Plantations**, v.2, p.32-33, 1995.
- TEIXEIRA, J. B. Biorreatores. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.24, p.36-41, 2002.
- TEIXEIRA, J. B.; SÖNDAHL, M. R.; KIRBY, E. G. Somatic embryogenesis from immature inflorescences of oil palm. **Plant Cell Reports**, v.13, p.247-250, 1994.
- TEIXEIRA, J. B.; SOND AHL, M. R.; NAKAMURA, T.; KIRBY, E. G. Establishment of oil palm cell suspensions and plant regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.40, p.105-111, 1995.
- TEIXEIRA, J. B.; SOND AHL, M. R.; KIRB, E. G. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of oil palm. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.34, p.227-233, 1993.
- THELEN, J. J.; OHLROGGE, J. B. Metabolic engineering of fatty acid biosynthesis in plants. **Metabolic Engineering**, v.4, p.12-21, 2002.
- THEODOULOU, F. L.; EASTMOND, P. J. Seed storage oil catabolism: a story of give and take. **Current Opinion in Plant Biology**, v.15, p.322-328, 2012.

- THOMAS, R.; BOURA, A. Palm stem anatomy: phylogenetic or climatic signal? **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.178, p.467-488, 2015.
- THUZAR, M.; VANAVICHIT, A.; TRAGOONRUNG, S.; JANTASURIYARAT, C. Efficient and rapid plant regeneration of oil palm zygotic embryos cv. 'Tenera' through somatic embryogenesis. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.33, p.123-128, 2011.
- THUZAR, M.; VANAVICHIT, A.; TRAGOONRUNG, S.; JANTASURIYARAT, C. Recloning of regenerated plantlets from elite oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) cv. Tenera. **African Journal of Biotechnology**, v.11, p. 14761-14770, 2012.
- TING, N.; ZAKI, N. M.; ROSLI, R.; LOW, E. L.; ITHNIN, M.; CHEAH, S.; TAN, S.; SINGH, R. SSR mining in oil palm EST database: application in oil palm germplasm diversity studies. **Journal of Genetics**, v.89, p.135-145, 2010.
- TREGEAR, J. W.; RIVAL, A.; PINTAUD, J. C. A family portrait: unravelling the complexities of palms. **Annals of Botany**, v.108, p.1387-1389, 2011.
- TREWAVAS, A. J. Plant growth substances - metabolic flywheels for plant development. **Cell Biology International Reports**, v.7 p.569-575-1983.
- UPADHYAY, P.; NEERAJA, C. N.; KOLE, C.; SINGH, V. K. Population Structure and Genetic Diversity in Popular Rice Varieties of India as Evidenced from SSR Analysis. **Biochemical Genetics**, v.50, p.770-783, 2012.
- VERDEIL, J.P.; HOCHER, V.; HUET, C.; GROSDEMANGE, F.; ESCOUTE, J.; FERRIERE, N.; NICOLE, M. Ultrastructural changes in coconut calli associated with the acquisition of embryogenic competence. **Annals of Botany**, v.88, p.9-18, 2001.
- VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; van de LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v.23, p.4407-4414, 1995.
- WAHID, M. B.; ABDULLAH, S. N. A.; HENSON, I. E. Oil palm - Achievements and potential. **Plant Production Science**, v.8, p.288-297, 2005.
- WANG, Q. M.; WANG, L. An evolutionary view of plant tissue culture: somaclonal variation and selection. **Plant Cell Reports**, v.31, p.1535-1547, 2012.
- WILLIAMS, E. G.; MAHESWARAN, G. Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany**, v.57, p.443-462, 1986.
- WITTE, L. C.; ARMBRUSTER, G. F. J.; GIELLY, L.; TABERLET, P.; STÖCKLIN, J. AFLP markers reveal high clonal diversity and extreme longevity in four key arctic-alpine species. **Molecular Ecology**, v.21, p.1081-1097, 2012.
- XU, M.; LI, X.; KORBAN, S. S. AFLP-based detection of DNA methylation. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.18, p.361-368, 2000.

YOU, X. L.; TAN, X.; DAI, J. L.; LI, J. H.; CHOI, Y. E. Large-scale somatic embryogenesis and regeneration of *Panax notoginseng*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.108, p.333-338, 2012.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, v.20, p.176-183, 1994.

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

ZIV, M.; RAVIV, M. Proliferation of meristematic clusters in disposable presterilized plastic bioreactors for the large-scale micropropagation of plants. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v.34, p.152-158, 1998.

CAPÍTULO 1

Sistemas de imersão temporária na multiplicação de calos e regeneração de plantas de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) durante a embriogênese somática de folhas imaturas de plantas adultas

RESUMO

O objetivo do trabalho foi avaliar o uso de biorreatores de imersão temporária na multiplicação de calos e regeneração de plantas de dendezeiro obtidas por embriogênese somática de folhas imaturas. Para tanto, calos primários da variedade C2328 foram multiplicados por cinco subcultivos de 30 dias em diferentes sistemas de cultivo: semi-sólido, líquido sob agitação, R.I.T.A.[®] e BIT. Em seguida, o biorreator mais eficiente foi avaliado isoladamente na multiplicação de calos primários de outras três variedades de dendezeiro (B35-2932, B35-4323 e B35-1729). Posteriormente, a diferenciação dos embriões somáticos foi realizada em meio de MS suplementado com 12,3 µM de 2-iP e 0,54 µM de ANA. Já para a regeneração, calos contendo embriões somáticos em estágio de torpedo foram cultivados por mais cinco subcultivos de 30 dias em sistema semi-sólido, R.I.T.A.[®] e BIT. Ao final do cultivo, as plantas produzidas foram então aclimatizadas por 60 dias em casa de vegetação. Na etapa de multiplicação observou-se, que o uso de meio líquido sob agitação e sistema R.I.T.A.[®] proporcionou aos cultivos as maiores taxas de incremento de biomassa fresca (225,4%) e seca (106,2%). Quanto à multiplicação das variedades, verificou-se que B35-2932 apresentou os maiores índices de acúmulo de biomassa fresca, em média 293,3%, resultado significativamente superior ao constatado em B35-1729 e B35-4323, que apresentaram em média 173,3 e 182,1%, respectivamente. Em relação à fase de regeneração, observou-se que os melhores resultados para ganho de biomassa fresca, número de plantas regeneradas, plantas com altura entre 2,6 e 5,0 cm e número de embriões secundários neoformados foram obtidos quando os biorreatores R.I.T.A.[®] foram utilizados. Com a utilização deste sistema, verificaram-se taxas de sobrevivência de aproximadamente 75% dos cultivos após o processo de aclimatização de casa de vegetação.

Palavras-chave: Arecaceae; propagação clonal; biorreatores de imersão temporária; meio líquido.

CHAPTER 1

Temporary immersion systems in the calli multiplication and plant regeneration of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) during somatic embryogenesis from immature leaves of adult plants

ABSTRACT

This study aimed to assess the use of temporary immersion bioreactors during calli multiplication and plant regeneration of oil palm from somatic embryogenesis of immature leaves. Initially, primary calli from C2328 variety of oil palm were multiplied by up to five 30-days subcultures in four different culture systems: semi-solid, liquid under agitation, R.I.T.A.[®] (Recipient for Automated Temporary Immersion) bioreactors, and Twin Flask - TIS (Temporary Immersion System) bioreactors. Then, the most efficient system was evaluate individually for calli multiplication of another three oil palm varieties: B35-2932, B35-4323 e B35-1729. After multiplication, the calli were transferred to a MS medium with 12.3 μM 2-iP and 0.54 μM NAA in order to differentiate somatic embryos. Under these condition, the propagules were cultivated until most of the somatic embryos reached the torpedo stage, when they were transferred to R.I.T.A.[®] and TIS systems for additional five 30-days subcultures for plant growth. The plants produced were acclimatized for 60 days in a greenhouse. In the multiplication stage, it was observed that the use of liquid medium under agitation and R.I.T.A.[®] bioreactors provided the best results for fresh (225.4%) and dry (106.2%) biomass accumulation. Among the varieties, the B35-2932 showed the highest fresh biomass accumulation (293.3%), when compared to B35-1729 and B35-4323 (173.3% and 182.1%, respectively). In the regeneration phase, the best results for fresh biomass accumulation, number of regenerated plants, plants with height between 2.6 to 5.0 cm and number of secondary embryos were obtained when R.I.T.A.[®] bioreactors were used. With this system, there were survival rates of approximately 75% of the plants, after acclimatization.

Key words: Arecaceae; clonal propagation; temporary immersion bioreactors; liquid medium.

1. INTRODUÇÃO

O dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) é uma palmeira oleaginosa adaptada a regiões de clima tropical úmido. O cultivo dessa espécie representa uma das principais fontes de produção de óleo vegetal do mundo. Atualmente, a produção global dessa cultura já é de quase 60 milhões de toneladas ao ano, produtividade que corresponde a cerca de 35% da produção mundial de óleo vegetal (Hansen *et al.*, 2015).

Nessa espécie oleaginosa, a produção de mudas é realizada, de maneira geral, exclusivamente por sementes. Contudo, esse método de propagação depende da quebra da dormência, que muitas vezes é lenta e irregular, promovendo baixos índices de germinação. Além disso, a propagação via sementes exige ainda a remoção do pericarpo, pré-hidratação das amêndoas e condicionamento das mesmas entre 38 e 42°C por um período de 30 a 80 dias (Martine *et al.*, 2009; Myint *et al.*, 2010; Chanprasert *et al.*, 2012).

Adicionalmente, por se tratar de uma espécie alógama, a propagação por sementes também tem como inconveniente a formação de plantios heterogêneos, impossibilitando a formação de culturas uniformes em campo. Nesse sentido, a embriogênese somática surge como uma excelente alternativa para a multiplicação clonal de indivíduos elite da espécie, especialmente pelo fato da mesma não apresentar brotações laterais, o que inviabiliza sua multiplicação por estaquia (Staritsky, 1970; Durand-Gasselin *et al.*, 1990; Khaw & Ng, 1998; Jouannic *et al.*, 2011; Constantin *et al.*, 2015).

Entretanto, o método tradicional de embriogênese somática é altamente demandante de mão-de-obra especializada, o que promove a elevação dos custos das mudas produzidas nas biofábricas, que podem custar até 7 vezes mais que uma semente híbrida. Ademais, o grande envolvimento de mão de obra e a intensa manipulação dos cultivos podem acarretar ainda perdas por contaminação, bem como, prejuízos por misturas varietais (Teixeira, 2002; Martin & Vermette, 2005; Georgiev *et al.*, 2014).

Diante disso, o uso de sistemas de cultivo baseados em biorreatores de imersão temporária, capazes de promover a multiplicação de calos, o

desenvolvimento de embriões somáticos e o crescimento das plantas regeneradas, torna-se de fundamental importância para aumentar a viabilidade econômica desta técnica (Niemenak *et al.*, 2008; Gomes *et al.*, 2016).

Além disso, a partir da utilização destes sistemas, pode-se além de reduzir o preço final das mudas produzidas e a mão-de-obra necessária, otimizar algumas etapas do processo. Dessa forma, uma grande quantidade de mudas pode ser mais facilmente produzidas e colocadas à disposição dos agricultores (Heringuer *et al.*, 2014; Marbun *et al.*, 2015).

Diante desse contexto, o objetivo do trabalho foi avaliar a viabilidade e a eficiência do uso de biorreatores de imersão temporária na multiplicação e regeneração de linhagens embriogênicas de dendezeiros, obtidas pela embriogênese somática de folhas imaturas de plantas adultas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local de realização dos experimentos

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

2.2 Material vegetal

Para a indução da embriogênese somática foram utilizadas como material vegetal, folhas imaturas e ainda não expandidas (palmito), oriundas de plantas adultas de dendezeiros variedades C2328, B35-1729, B35-2932 e B35-4323, fornecidas pelo Programa de Melhoramento Genético de Dendezeiro da Embrapa Amazônia Ocidental, localizado na municipalidade de Rio Preto da Eva – AM, Brasil.

2.3 Obtenção dos explantes

Após coletado em campo, o material vegetal foi conduzido ao laboratório, onde as folhas mais externas foram removidas e o tamanho dos palmitos reduzidos para aproximadamente 30 cm de comprimento (direção base meristemática para ápice foliar do cilindro central).

Em seguida, folhas imaturas, ainda aclorofiladas, obtidas do cilindro central dos palmitos coletados foram desinfestadas por meio de uma lavagem em solução de água e detergente comercial, seguida pela imersão em álcool 70% por 3 minutos e imersão em hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2,5% de cloro ativo por 20 minutos. Posteriormente, três lavagens em água destilada, deionizada e autoclavada foram realizadas no material para remoção do excesso das soluções desinfetantes.

Por fim, segmentos foliares de aproximadamente 1 cm², provenientes das folhas desinfestadas, foram inoculados em placas de Petri (15 x 90 mm), contendo 25 mL de meio de cultura composto pela constituição salina e vitaminas de MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com 450 µM de

Picloram, 0,5 g.L⁻¹ de caseína hidrolisada, 0,5 g.L⁻¹ de glutamina, 2,5 g.L⁻¹ de carvão ativado e 30 g.L⁻¹ de sacarose (Balzon *et al.*, 2013). Nesse meio, o pH foi ajustado para 5,7 ± 0,1, seguido da adição de 2,5 g.L⁻¹ de Phytigel (Sigma[®]), antes da esterilização a 121°C e 1,3 atm por 20 minutos.

Os propágulos foram então cultivados por oito subcultivos de 30 dias cada, para a obtenção de calos. Nessa etapa, as culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2°C, sob condição de obscuridade.

2.4 Multiplicação de calos em biorreatores de imersão temporária

Para avaliar a viabilidade e a eficiência da multiplicação de calos de dendezeiro em biorreatores de imersão temporária, dois experimentos foram realizados. Inicialmente, 10 g.L⁻¹ de calos da variedade C2328, provenientes da fase de indução, foram inoculados em quatro diferentes sistemas de cultivos: semi-sólido, sistema onde frascos de Erlenmeyers de 125 mL de capacidade contendo 25 mL de meio nutritivo semi-sólido foram utilizados; meio líquido sob agitação, sistema onde frascos de Erlenmeyers de 125 mL de capacidade contendo 25 mL de meio de cultivo líquido sob agitação orbital a 100 rpm foram utilizados; sistema de imersão temporária automatizado (R.I.T.A.[®]), sistema onde biorreatores de imersão temporária de 1 L de capacidade contendo 200 mL de meio de cultura líquido foram utilizados e; sistema de biorreator tipo frascos gêmeos (BIT), sistema onde biorreatores de imersão temporária de 5 L de capacidade contendo 500 mL de meio líquido foram utilizados (Figura 1).

Em cada sistema de multiplicação, o meio nutritivo foi composto pelos sais e vitaminas de MS, suplementado com 4,5 µM de 2,4-D, 0,5 µM de ANA, 0,5 g.L⁻¹ de glutamina, 0,5 g.L⁻¹ de caseína hidrolisada, 0,1 g.L⁻¹ de cisteína, 0,1 g.L⁻¹ de asparagina, 30 g.L⁻¹ de sacarose e pH ajustado para 5,7 ± 0,1. No sistema semi-sólido, o meio de cultivo foi suplementado ainda com 2,5 g.L⁻¹ de Phytigel para sua solidificação.

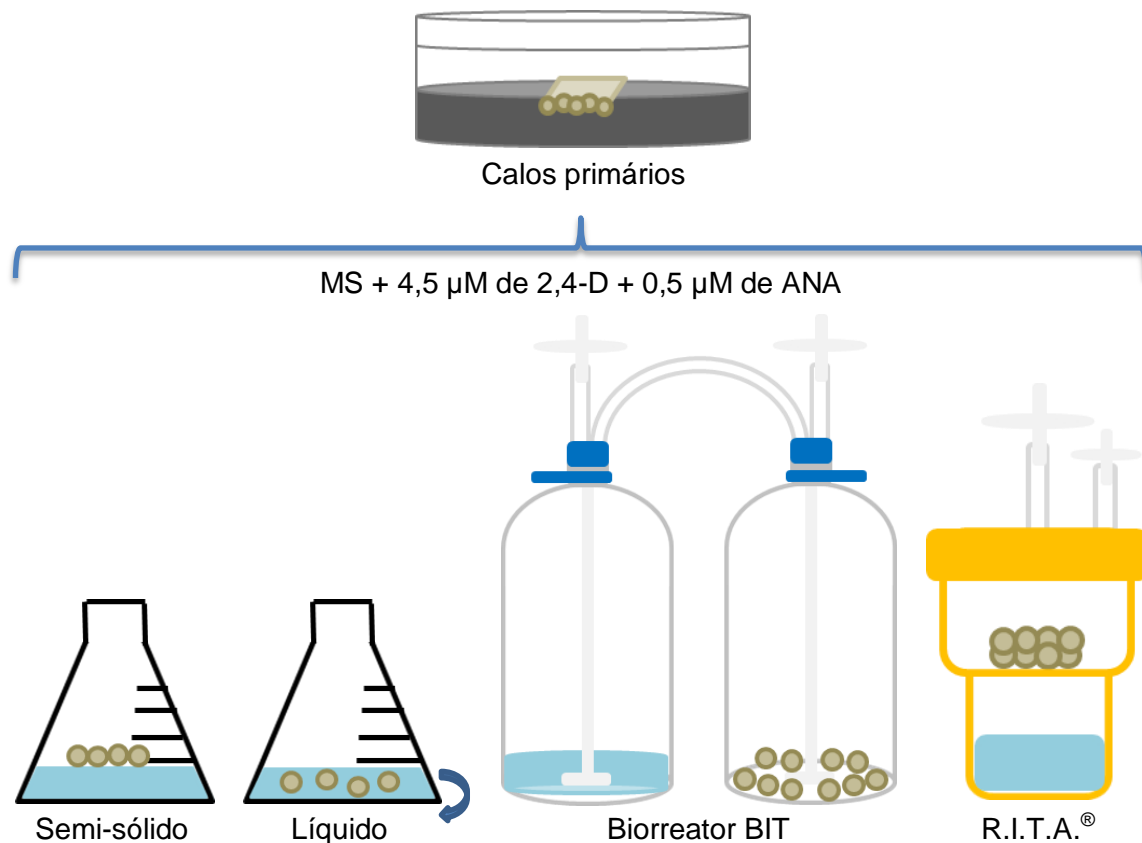


Figura 1. Esquema ilustrado do experimento de multiplicação de calos primários de dendezeiro em biorreatores de imersão temporária.

Posteriormente, o modelo de biorreator de imersão temporária mais eficiente da primeira etapa de multiplicação foi avaliado isoladamente na multiplicação de calos das outras três variedades estudadas: B35-2932, B35-4323 e B35-1729.

Em ambos os experimentos a multiplicação de calos foi realizada por cinco subcultivos sucessivos de 30 dias. Durante esse período, a cada 30 dias de cultivo o peso da massa fresca (PMF) dos propágulos foi avaliado. No primeiro experimento, além do PMF também foi avaliado o peso da matéria seca (PMS) dos cultivos. A avaliação do PMS foi realizada a fim de se obter uma melhor comparação dos diferentes sistemas de cultivo, visto que, a multiplicação dos propágulos nos sistemas baseados na utilização de meios líquidos pode ocorrer em função do acúmulo excessivo de água e não propriamente em decorrência do ganho de biomassa. Para obtenção do PMS,

os propágulos multiplicados foram secos em estufa de ventilação forçada com temperatura de 65°C até peso constante.

Nas duas fases da multiplicação, o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente ao acaso, sendo constituído por pelo menos 3 repetições por tratamento.

2.5 Diferenciação de embriões somáticos

A diferenciação dos embriões somáticos foi realizada a partir da inoculação dos calos provenientes da fase de multiplicação, em frascos de vidro de 250 mL de capacidade, contendo 40 mL de meio nutritivo de MS, suplementado com 12,3 μM de 2-iP (isopenteniladenina), 0,54 μM de ANA, 0,5 g.L^{-1} de glutamina, 0,5 g.L^{-1} de caseína hidrolisada, 0,1 g.L^{-1} de cisteína, 0,1 g.L^{-1} de asparagina, 30 g.L^{-1} de sacarose, 2,5 g.L^{-1} de Phytigel e pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$. Nessa etapa, os calos foram cultivados por até seis subcultivos de 30 dias para a obtenção de embriões somáticos.

2.6 Regeneração de embriões somáticos em biorreatores de imersão temporária

Para analisar a viabilidade e a eficiência da regeneração de embriões somáticos de dendezeiro em biorreatores de imersão temporária, entre 4 e 5 g.L^{-1} de calos da variedade C2328 contendo agrupamentos de embriões somáticos (ES) em estágio de torpedo, provenientes da fase de diferenciação, foram inoculados em três diferentes sistemas de cultivos (Figura 2): tradicional (frascos de vidro de 250 mL de capacidade contendo 40 mL de meio nutritivo semi-sólido), recipientes de imersão temporária automatizados (R.I.T.A.[®]) e biorreatores modelo frascos gêmeos (BIT).

Em cada condição de regeneração, o meio de cultura foi composto pelos sais e vitaminas de MS desprovido de reguladores de crescimento, suplementado de 30 g.L^{-1} de sacarose, 2,5 g.L^{-1} de carvão ativado e com o pH

ajustado para $5,7 \pm 0,1$. No sistema semi-sólido, o meio de cultivo foi suplementado ainda com $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ de Phytigel para sua solidificação.

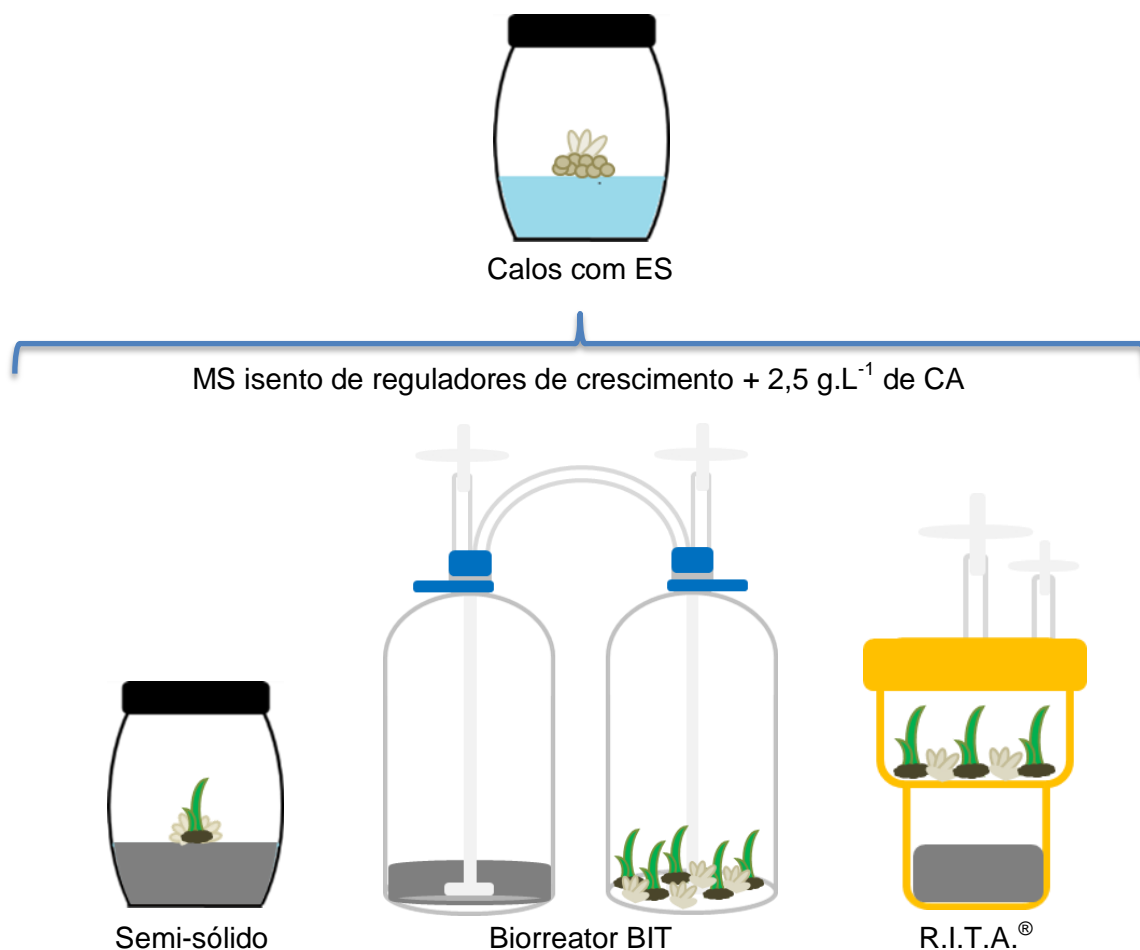


Figura 2. Esquema ilustrado do experimento de regeneração de embriões somáticos de dendezeiro em biorreatores de imersão temporária.

Nessa etapa, os explantes foram cultivados por cinco subcultivos de 30 dias. Após o cultivo, as variáveis produção de biomassa fresca, número de plantas regeneradas, altura das plantas determinada por classe (classe 1: $\leq 1,25$ cm, classe 2: $> 1,25$ e $\leq 2,5$ cm, classe 3: $> 2,5$ e $\leq 5,0$ cm e classe 4: $> 5,0$ cm), regeneração de plantas com raiz e formação de embriões secundários neoformados, foram comparadas entre os diferentes sistemas de cultivo utilizados.

Neste experimento, o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, sendo composto por pelo menos oito repetições por tratamento.

2.7 Descrição dos biorreatores de imersão temporária utilizados

Para as etapas de multiplicação e regeneração, dois diferentes modelos de biorreatores de imersão temporária foram utilizados: o R.I.T.A.[®] (Teisson *et al.*, 1995) e o biorreator frascos gêmeos – BIT (Teixeira, 2002). No modelo R.I.T.A.[®], foram utilizados frascos de 1 L de capacidade divididos em dois compartimentos: um contendo os explantes e o outro 200 mL de meio de cultura. Estes frascos foram conectados, por mangueiras de silicone, a um compressor de ar diretamente ligado a um temporizador eletrônico (Siemens 7LF4 111). Nesse sistema, a cada 6 horas o ar fornecido pelo compressor e esterilizado por uma membrana de 0,22 µm, entrava nos frascos e fazia com que o meio de cultura líquido fosse impulsionado para a parte superior, onde se localizavam os propágulos, os quais ficavam submersos durante um período de 1 minuto, até que o compressor de ar fosse desligado e o meio retrocedesse para a parte inferior.

No sistema de biorreator BIT, foram utilizados dois frascos com capacidade de 5 L cada, conectados entre si por mangueiras de silicone. Nesse modelo, um dos frascos continha os explantes e o outro 500 mL de meio nutritivo. Este biorreator é similar ao sistema de frascos gêmeos BIT, utilizado por Escalona *et al.* (1999). Nele, a cada 6 horas o ar fornecido por um compressor e esterilizado por uma membrana de 0,22 µm, entrava no frasco que continha o meio de cultura e fazia com que o líquido chegasse ao frasco que continha os explantes. Após 1 minuto de imersão, ocorria a reversão do processo e o meio nutritivo retornava para seu frasco de origem. Nesse modelo, a frequência e o tempo de imersão também foram controlados por temporizadores eletrônicos (Siemens 7LF4 111).

2.8 Enraizamento *in vitro*

Após a etapa de regeneração, as plantas desprovidas de raízes foram inicialmente individualizadas e, em seguida, enraizadas *in vitro* seguindo a metodologia descrita por Gomes *et al.* (2015b). Para tanto, as plantas incompletas foram cultivadas por 150 dias em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo, nos primeiros 30 dias de cultivo, 10 mL de meio de MS de consistência semi-sólida, suplementado de 53,7 μM de AIB (ácido indolbutírico), 30 g.L^{-1} de sacarose, 2,5 g.L^{-1} de Phytigel e com pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$. Decorridos 30 e 90 dias de cultivo, alíquotas de 3 mL de meio de consistência líquida, de mesma constituição do meio inicial, foram acrescentadas sobre o meio semi-sólido, constituindo assim, meios de consistência dupla-fase.

2.9 Condições de cultivo

Durante as etapas de multiplicação, diferenciação, regeneração e enraizamento, os propágulos foram cultivados em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e radiação luminosa de 52 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ fornecidas por lâmpadas LED (Philips® - Green Power 20W 60Hz).

2.10 Aclimatização das mudas

Após o enraizamento *in vitro*, as plantas clonadas foram retiradas dos seus respectivos frascos de cultivo e submetidas à lavagem de suas raízes em água corrente para eliminação do excesso de meio nutritivo. Em seguida, os cultivos foram transferidos para copos descartáveis brancos de 300 mL de capacidade preenchidos com substrato comercial Bioplant®. Após o plantio, as mudas foram pré-aclimatizadas por 60 dias em câmaras BOD com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 12 horas e radiação luminosa de 20 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Durante as duas primeiras semanas desse processo, os propágulos foram mantidos cobertos por sacos de polietileno transparente, com filtros para realização de trocas gasosas.

Depois da pré-aclimatização, os cultivos foram transplantados em sacos plásticos pretos (20 x 20 x 20 cm) contendo terra e adubo vegetal e em seguida aclimatizados por 60 dias em casa de vegetação com cobertura de filme de polietileno transparente (150 micras), umidade relativa de $75 \pm 5\%$, temperatura de $30 \pm 3^\circ\text{C}$, luminosidade de $450\text{--}500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo em torno de 12 horas (Figura 3). Em ambas as condições de cultivo as irrigações foram realizadas manualmente a cada 48 horas. Após a aclimatização, a percentagem de sobrevivência das plantas foi então avaliada.

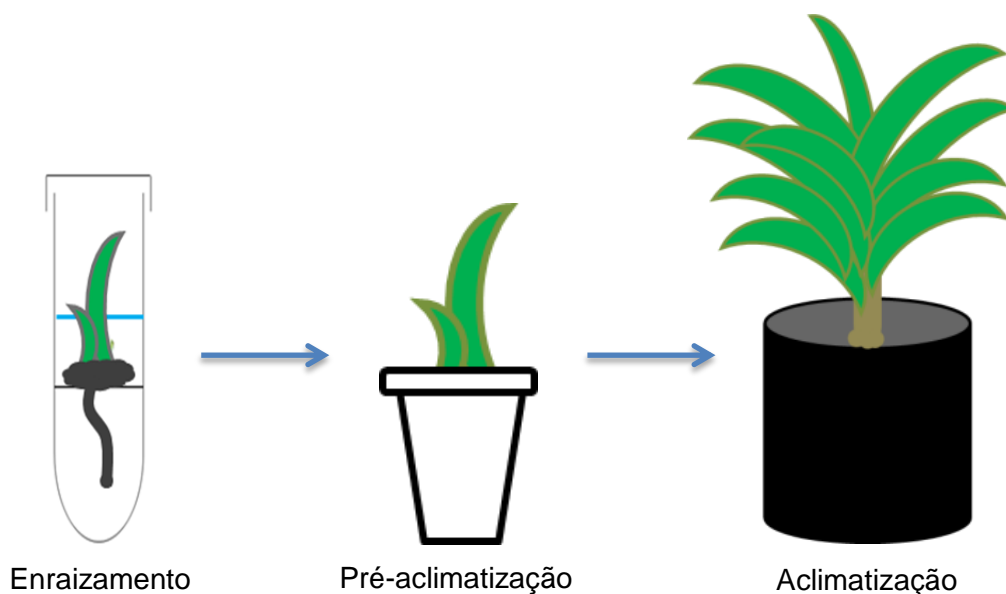


Figura 3. Esquema ilustrado do experimento de aclimatização das mudas de dendezeiro regeneradas em biorreatores de imersão temporária.

2.11 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), com as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Para as análises, utilizou-se o programa de análises estatísticas Sisvar 4.4 (Ferreira, 2011). Dados obtidos por contagem foram transformados segundo $(x + 1)^{0,5}$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Multiplicação de calos em biorreatores de imersão temporária

Os resultados referentes à multiplicação de calos de dendezeiro em biorreatores de imersão temporária, em razão do tempo de cultivo, são apresentados na Tabela 1. Observou-se que os sistemas de cultivo constituídos pelos meios líquidos sob agitação e pelos biorreatores de imersão temporária modelo R.I.T.A.[®] proporcionaram aos propágulos um incremento, tanto de biomassa fresca quanto de biomassa seca, significativamente superior ao verificado nos demais sistemas de cultivo, em média, 224,1 e 226,7% de acúmulo de biomassa fresca e 105,8 e 106,6% de ganho de biomassa seca, respectivamente (Figura 4).

Em relação ao tempo de cultivo, observou-se que o processo de multiplicação de calos de dendezeiro, independente do sistema utilizado, ocorreu já a partir do primeiro subcultivo. No entanto, ressalta-se que os melhores resultados para ambos os parâmetros avaliados, levando em consideração os melhores sistemas de multiplicação (meio líquido sob agitação e biorreator R.I.T.A.[®]), foram obtidos de modo geral, apenas a partir do quarto subcultivo. Nestes sistemas, verificou-se que os valores máximos de multiplicação foram alcançados aos 150 dias de cultivo, em média, 225,4% de ganho de biomassa fresca e 106,2% de incremento de biomassa seca.

Resultados semelhantes foram constatados por Heringer *et al.* (2014), que na multiplicação de propágulos embriogênicos de *Bactris gasipaes* também observaram que a utilização de meios líquidos sob agitação e biorreatores de imersão temporária modelo R.I.T.A.[®] proporcionaram resultados estatisticamente superiores aos verificados em meios de consistência semi-sólida e em biorreatores de imersão temporária do tipo frascos gêmeos.

Contudo, foi constatado por estes autores que o ganho de biomassa fresca observado nos propágulos multiplicados em meios líquidos sob agitação, se deu principalmente devido à hiperhidricidade, uma desordem fisiológica severa provocada pelo acúmulo de água no apoplasto, fato que pode comprometer o crescimento e o desenvolvimento do material vegetal em cultivo

(Hazarika, 2006). Na multiplicação de calos de dendezeiro, por outro lado, independentemente do sistema de cultivo utilizado, a ocorrência de hiperhidricidade nos explantes não foi constatada e o acúmulo de biomassa fresca dos propágulos se deu de forma proporcional ao seu incremento de biomassa seca.

Tabela 1. Influência dos sistemas de cultivo no ganho de biomassa fresca e seca (%), em função do tempo de cultivo, na multiplicação de calos de dendezeiro (C2328) obtidos via embriogênese somática de folhas imaturas.

Ganho de biomassa fresca (%)					
Sistema de cultivo	Tempo de cultivo				
	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias	150 dias
Semi-sólido	27,8±5,2 bA	33,6±7,2 bA	43,3±6,9 bA	61,4±3,0 cA	94,7±0,2 bA
Líquido sob agitação	88,4±5,4 aB	120,8±9,2 aB	155,4±13,3 aB	192,4±9,5 aA	224,1±26,9 aA
Biorreator BIT	44,5±7,4 bB	70,5±11,5 bB	94,0±21,9 aA	115,5±30,4 bA	136,5±36,4 bA
Biorreator R.I.T.A. [®]	96,9±11,0 aB	101,9±12,6 aB	113,1±15,0 aB	129,6±18,0 bB	226,7±40,0 aA
Ganho de biomassa seca (%)					
Semi-sólido	2,7±0,1 aB	10,2±3,3 aB	14,7±0,3 bB	39,3±14,5 bA	55,2±4,8 bA
Líquido sob agitação	29,8±5,5 aB	40,3±6,0 aB	62,3±8,5 aB	85,7±6,2 aA	105,8±17,2 aA
Biorreator BIT	1,0±0,0 aB	14,8±2,1 aB	35,5±6,5 bA	42,7±12,4 bA	57,3±13,9 bA
Biorreator R.I.T.A. [®]	24,8±6,7 aB	27,5±7,9 aB	30,6±9,4 bB	45,2±1,4 bB	106,6±24,4 aA

Os dados representam as médias seguidas dos erros padrões. Médias seguidas pela mesma letra (maiúscula para comparação horizontal e minúscula para vertical), não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

No processo de multiplicação de calos de *Elaeis guineensis*, Tarmizi *et al.* (2004), Choi *et al.* (2008) e Tarmizi *et al.* (2008) também verificaram que o uso de biorreatores proporcionou aos cultivos os maiores índices de proliferação. No entanto, diferentemente do observado no presente estudo, constataram-se nestes trabalhos que a utilização de meios líquidos sob agitação proporcionou aos propágulos um acúmulo de biomassa fresca significativamente inferior ao

verificado nos biorreatores, que em média, apresentaram taxas de multiplicação quatro vezes maiores que as observadas neste sistema de cultivo.

Gorret *et al.* (2004) também relataram resultados satisfatórios na proliferação de calos de dendezeiro com o uso de sistemas de cultivo baseados na utilização de biorreatores. De acordo com Marbun *et al.* (2015), durante a etapa de multiplicação, a biomassa fresca dos calos de *Elaeis guineensis* pode aumentar cerca de sete vezes com a utilização de biorreatores de imersão temporária modelo R.I.T.A.[®].

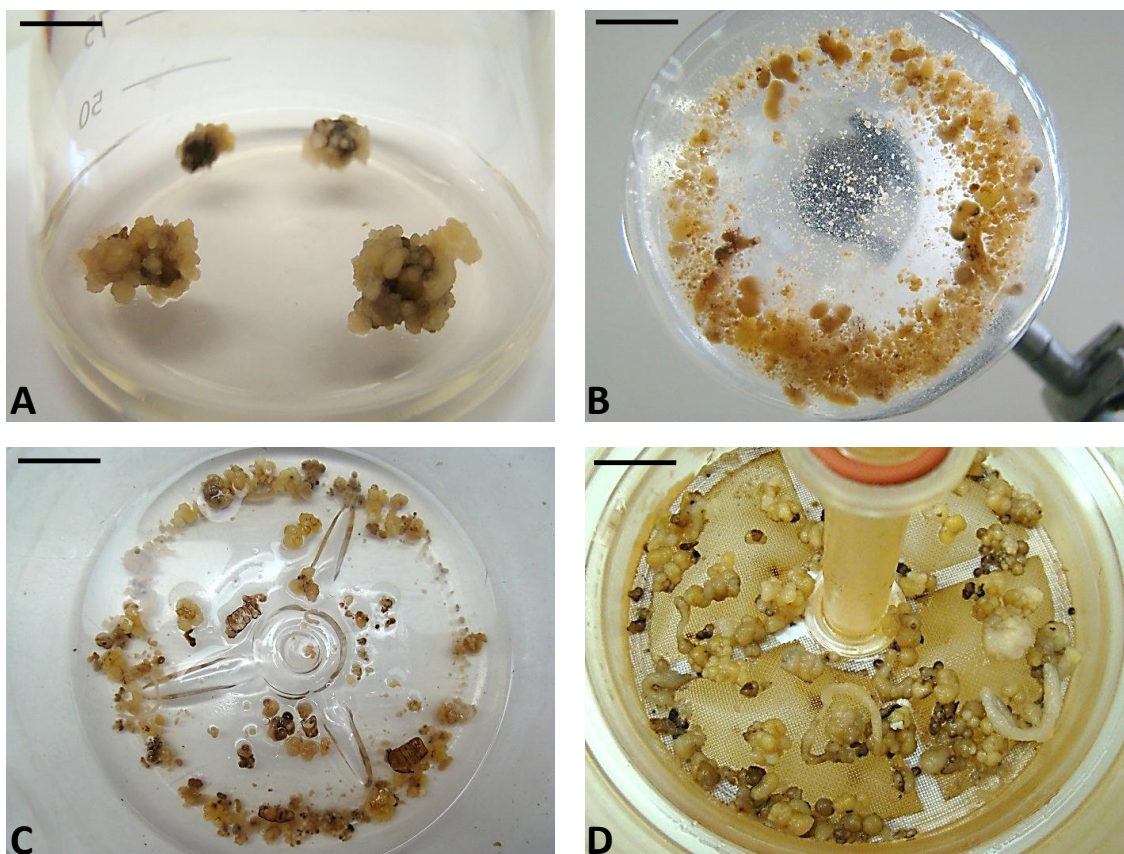


Figura 4. Multiplicação de calos de dendezeiro (C2328) obtidos via embriogênese somática de folhas imaturas. **A)** Multiplicação em meio semi-sólido; **B)** Multiplicação em meio líquido sob agitação; **C)** Multiplicação de biorreator BIT; **D)** Multiplicação em biorreator R.I.T.A.[®]. Barras: A = 0,7 cm; B = 0,9 cm; C = 2,0 cm; D = 1,0 cm.

Segundo Choi *et al.* (2008), na etapa de multiplicação de calos as melhorias proporcionadas pela utilização de biorreatores se devem em parte, a otimização do processo de aeração, que possibilita aumentar a disponibilidade de oxigênio no sistema, elevando o potencial dos cultivos para metabolizar a sacarose contida no meio de cultura, possibilitando assim, a otimização do seu acúmulo de biomassa.

Para Marbun *et al.* (2015), a otimização do incremento de biomassa dos massivos celulares, proporcionada pela utilização de biorreatores, se deve também ao uso de meios de consistência líquida, que possibilitam os calos serem capazes de adsorver os nutrientes e os reguladores de crescimento de forma mais eficiente. De acordo com estes autores, a utilização de meio líquido permite que toda a superfície dos cultivos fique exposta ao meio nutritivo, possibilitando que a adsorção de seus compostos ocorra em todas as partes dos explantes, promovendo um crescimento e desenvolvimento maior e mais uniforme.

Os resultados referentes à multiplicação de calos de diferentes variedades de dendezeiro, em biorreatores de imersão temporária modelo R.I.T.A.[®], em função do tempo de cultivo são apresentados na Tabela 2. Verificou-se que após 150 dias de cultivo a variedade B35-2932 apresentou as maiores taxas de incremento de biomassa fresca, em média 293,3%. Já as variedades B35-1729 e B35-4323 apresentaram ao final do cultivo um acúmulo de biomassa fresca significativamente inferior, aproximadamente 173,3 e 182,1%, respectivamente.

Resultados semelhantes foram observados por Tarmizi *et al.* (2008), que na multiplicação de calos de diferentes genótipos de *Elaeis guineensis* em biorreatores, obtiveram ao final do cultivo taxas de incremento de biomassa fresca variando de forma significativa, mais especificamente de 60 a 230%, dependendo da variedade analisada. Tarmizi *et al.* (2004) também verificaram na multiplicação de calos de dendezeiro, realizada em biorreatores, que os índices de acúmulo de biomassa fresca dos cultivos variaram estatisticamente em função do genótipo utilizado. Tais resultados corroboram Chehmalee & Te-chato (2008), Silva *et al.* (2012) e Jayanthi *et al.* (2015), que também

demonstraram na embriogênese somática da espécie que as diferentes etapas do processo podem ser fortemente influenciadas em função do genótipo em cultivo.

Tabela 2. Influência da variedade nas médias referentes ao ganho de biomassa fresca (%), em função do tempo de cultivo, durante a multiplicação de calos de dendezeiro, obtidos por embriogênese somática de folhas imaturas em biorreatores de imersão temporária modelo R.I.T.A.[®].

Variedade	Ganho de biomassa fresca (%)				
	Tempo de cultivo				
	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias	150 dias
B35-1729	61,4±13,1 aB	89,6±14,1 aB	119,3±19,7 bA	145,5±17,1 bA	173,3±17,7 bA
B35-2932	43,5±0,7 aE	121,6±17,0 aD	177,5±18,6 aC	223,0±21,7 aB	293,3±2,6 aA
B35-4323	49,3±0,8 aC	118,7±1,5 aB	135,9±11,5 bB	162,1±16,9 bA	182,1±16,1 bA

Os dados representam as médias seguidas dos erros padrões. Médias seguidas pela mesma letra (maiúscula para comparação horizontal e minúscula para vertical), não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Segundo Gomes *et al.* (2015a), na cultura de tecidos vegetais indivíduos de uma mesma espécie podem apresentar respostas significativamente diferentes mesmo quando cultivados nas mesmas condições. De acordo com estes autores, diferentes genótipos possuem diferentes potenciais de adsorção e metabolização dos compostos do meio nutritivo, apresentando assim, respostas distintas ao cultivo *in vitro*. Para Jiménez (2005), as diferenças genotípicas observadas no cultivo *in vitro* também estão associadas a variações no conteúdo de hormônios endógenos presentes nos diferentes genótipos, promovendo assim, respostas morfogênicas distintas.

3.2 Regeneração de embriões somáticos em biorreatores de imersão temporária

Os resultados referentes à regeneração de embriões somáticos de dendezeiro em biorreatores de imersão temporária são apresentados na Tabela 3. De modo geral, verificou-se que os melhores resultados para o ganho de biomassa fresca foram obtidos quando os embriões somáticos foram regenerados em biorreatores de imersão temporária, com médias variando entre 247,6 e 551,2% dependendo do modelo utilizado.

É provável que o maior acúmulo de biomassa fresca verificado nas brotações regeneradas em biorreatores de imersão temporária, também esteja relacionado em parte, com a consistência física dos meios nutritivos. Segundo Mehrotra *et al.* (2007), Steinmacher *et al.* (2011) e Scherwinski-Pereira *et al.* (2012), a utilização de meios de consistência líquida além de proporcionar o incremento da superfície de contato dos explantes com o meio de cultura, propicia também a diminuição da resistência física para a difusão de nutrientes, reguladores de crescimento e água para os explantes, bem como, a redução do contato dos propágulos com as partes do meio de cultivo onde os nutrientes já foram consumidos, possibilitando dessa forma, potencializar seu ganho de biomassa.

Além disso, a utilização de biorreatores de imersão temporária também propicia às culturas melhorias no aproveitamento do ambiente gasoso dentro dos frascos de cultivo, possibilitando além da remoção de gases com efeitos nocivos para as brotações, como o etileno, a renovação da atmosfera das culturas, reduzindo problemas de fermentação, incrementando os índices de O₂ e, conseqüentemente, o potencial das culturas para metabolizar a sacarose contida no meio nutritivo, aumentando ainda mais o potencial de ganho de biomassa dos cultivos (Etienne & Berthouly, 2002; Choi *et al.*, 2008; Tarmizi *et al.*, 2008; Georgiev *et al.*, 2014).

No entanto, assim como observado na etapa de multiplicação de calos, também foi constatado nessa fase do cultivo que o biorreator de imersão temporária modelo R.I.T.A.[®] proporcionou aos cultivos um ganho de biomassa fresca significativamente maior (551,2%) que o observado no modelo BIT

(247,6%). Para Heringer *et al.* (2014), estes resultados se devem provavelmente, ao fato desse modelo de biorreator de imersão temporária não promover a completa drenagem do meio de cultura líquido dos frascos de cultivo, submetendo os propágulos, em algumas situações, a um regime de imersão permanente, reduzindo assim a oxigenação dos cultivos e conseqüentemente seu potencial de acúmulo de biomassa.

Tabela 3. Influência dos sistemas de cultivo no ganho de biomassa (%), número de plantas regeneradas, percentagem de plantas com altura na classe 1 ($\leq 1,25$ cm), classe 2 ($> 1,25$ e $\leq 2,5$ cm), classe 3 ($> 2,5$ e $\leq 5,0$ cm) e classe 4 ($> 5,0$ cm), percentagem de plantas com raiz e no número de embriões secundários neoformados, por grama de material vegetal inoculado, durante a regeneração de embriões somáticos de dendezeiro (C2328) obtidos via embriogênese somática de folhas imaturas.

Regeneração de embriões somáticos				
Sistema de cultivo	Ganho de biomassa (%)	Número de plantas (total)	Plantas com raiz (%)	Embriões secundários (total)
Semi-sólido	102,7±27,7 b	3,3±0,8 b	4,1±2,7 a	17,7±5,0 a
Biorreator BIT	247,6±21,7 b	3,2±0,4 b	5,9±2,2 a	2,7±0,6 b
Biorreator R.I.T.A. [®]	551,2±89,4 a	14,1±1,9 a	5,1±2,2 a	20,8±3,1 a
Altura dos regenerantes				
Sistema de cultivo	Plantas classe 1 (%)	Plantas classe 2 (%)	Plantas classe 3 (%)	Plantas classe 4 (%)
Semi-sólido	79,8±8,7 a	9,5±5,3 b	10,7±5,4 b	0,0±0,0 b
Biorreator BIT	24,4±2,5 b	25,1±5,8 a	31,7±8,1 a	18,8±2,4 a
Biorreator R.I.T.A. [®]	26,4±3,8 b	28,6±2,9 a	40,9±6,4 a	4,1±2,0 b

Os dados representam as médias seguidas dos erros padrões. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Já para o número de plantas regeneradas não foram verificadas diferenças significativas quando se usou frascos de vidro ou biorreatores BIT.

Em média, ambos os sistemas de cultivo regeneraram aproximadamente 3,3 plantas por grama de calo contendo embriões somáticos inoculada, resultado estatisticamente inferior ao proporcionado pelo biorreator R.I.T.A.[®], que em média, induziu a regeneração de 14,1 plantas por grama de material vegetal inoculado (Figura 5-A).

Resultados semelhantes foram relatados por Heringer *et al.* (2014), que na conversão de embriões somáticos de *Bactris gasipaes* também observaram que o maior número de plantas regeneradas foi obtido com a utilização de biorreatores de imersão temporária modelo R.I.T.A.[®], aproximadamente 5 vezes mais que o verificado nos sistemas de cultivo constituídos por frascos de vidro e por biorreatores do tipo frascos gêmeos.

Em relação à altura dos propágulos, observou-se que em média 50% das plantas apresentaram altura superior a 2,5 cm quando regeneradas em biorreatores de imersão temporária (Figura 5-B), enquanto que apenas 10% dos cultivos apresentaram altura superior a 2,5 cm quando os frascos de vidro foram utilizados no processo.

Gomes *et al.* (2016) também verificaram na regeneração de embriões somáticos de *Elaeis guineensis* oriundos da embriogênese somática de embriões zigóticos que, de forma geral, a produção de plantas com altura superior a 2,5 cm também aumentou significativamente com o uso de sistemas de imersão temporária. Nesse estudo, foi constatado que a regeneração desse tipo de propágulo apresentou uma elevação de até 20% nestes sistemas de cultivo.

Por outro lado, na conversão de embriões somáticos de *Bactris gasipaes*, Heringer *et al.* (2014) verificaram que cerca de 16% dos propágulos apresentaram altura superior a 2,0 cm quando cultivados em biorreatores de imersão temporária, enquanto que aproximadamente 23% dos cultivos apresentaram alturas superiores a 2,0 cm quando os frascos de vidro foram utilizados.

Na regeneração de embriões somáticos de pupunheira, Steinmacher *et al.* (2011) também constataram que a utilização de biorreatores de imersão

temporária proporcionou às culturas um incremento no acúmulo de biomassa fresca, no número de plantas regeneradas e na altura das brotações, quando comparada ao uso do sistema tradicional de cultivo.

Quanto à formação de mudas com o sistema radicular desenvolvido, ou seja, mudas completas, não foram observadas diferenças estatísticas entre os diferentes sistemas de cultivo utilizados. Assim, em média apenas 5% das plantas estavam enraizadas ao final do processo (Figura 5-B).

A conversão de embriões somáticos em mudas incompletas, ou seja, com apenas a parte aérea desenvolvida, é comumente observada em espécies da família *Arecaceae*, como relatado nos trabalhos de Gallo-Meagher & Green (2002), Rajesh *et al.* (2003), Fki *et al.* (2003), Saénz *et al.* (2006), Konan *et al.* (2007) e Gomes *et al.* (2016).

Segundo estes autores, a regeneração desse tipo de planta é, provavelmente, o resultado da conversão dos embriões somáticos em meios de cultura isentos de reguladores de crescimento, sendo necessário nestes protocolos, a realização de uma posterior etapa de enraizamento *in vitro* das brotações regeneradas, na qual o ANA e o AIB são os reguladores mais comumente utilizados (Nizam & Te-Chato, 2009; Sumaryono & Riyadi, 2011; Gomes *et al.*, 2015b).

No processo de regeneração de embriões somáticos, além da determinação do número de brotos e raízes regeneradas, a determinação do número de embriões secundários neoformados também constitui um excelente indicador do potencial de produção de mudas dos diferentes sistemas de cultivo. A embriogênese somática secundária é o fenômeno em que uma nova embriogênese somática é iniciada a partir de outra já existente. Em geral, a embriogênese somática secundária apresenta diversas vantagens em relação à primária, entre elas destacam-se: o aumento na taxa de multiplicação dos propágulos, a independência de uma fonte de explante e a repetitividade do processo. Além disso, o potencial da embriogênese somática secundária ainda pode ser explorado por longos períodos de tempo (Inpuay & Te-chato, 2012).

No presente trabalho, independentemente do sistema de cultivo utilizado na regeneração dos embriões somáticos, verificou-se a ocorrência de embriogênese somática secundária, formando uma quantidade significativa de embriões secundários neoformados. Contudo, observou-se que em frascos de vidro e em biorreatores modelo R.I.T.A.[®], a produção desses propágulos (em média 38,5 por grama de calo contendo embriões somáticos inoculado) foi estatisticamente superior (Tabela 3).

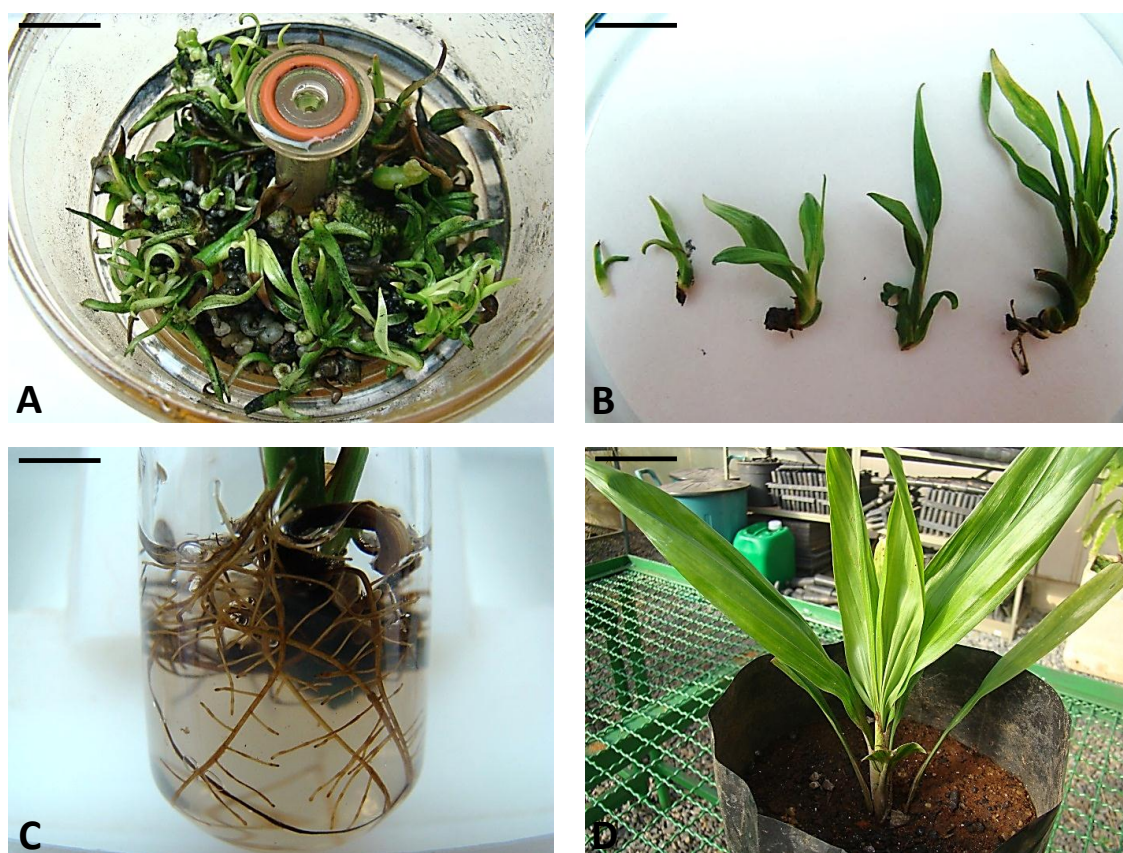


Figura 5. Regeneração, enraizamento e aclimatização de plantas de dendezeiro (C2328) produzidas via embriogênese somática de folhas imaturas. **A)** Regeneração em biorreator modelo R.I.T.A.[®]; **B)** Morfologia de plantas classes 1, 2, 3 e 4 e plantas com raiz, respectivamente; **C)** Aspecto de uma planta obtida por embriogênese somática enraizada *in vitro*; **D)** Planta de dendezeiro clonada aclimatizada. Barras: A = 1,8 cm; B = 1,5 cm; C = 0,7 cm; D = 4,8 cm.

Resultados semelhantes foram constatados por Te-chato & Hilae (2007), Steinmacher *et al.* (2011), Inpuay & Te-chato (2012) e Gomes *et al.* (2016) que durante a embriogênese somática de *Elaeis guineensis* e *Bactris gasipaes* também relataram uma expressiva formação de embriões somáticos secundários.

Em relação à fase de aclimatização das plantas de dendezeiro regeneradas em biorreatores de imersão temporária, verificou-se que após o processo de enraizamento *in vitro* das brotações (Figura 5-C), a taxa de sobrevivência das plantas foi de aproximadamente 75% após 60 dias de cultivo em casa de vegetação (Figura 5-D).

Tais resultados corroboram Gomes *et al.* (2015b), que durante a aclimatização de clones de *Elaeis guineensis* enraizados *in vitro*, também observaram índices de sobrevivência de até 85% das plantas ao final de 60 dias de cultivo. Ainda segundo estes autores, mudas de dendezeiro micropropagadas por embriogênese somática estão aptas à etapa de aclimatização em casa de vegetação quando apresentam pelo menos uma raiz e altura superior a 7,5 cm.

4. CONCLUSÕES

Na embriogênese somática de folhas imaturas de plantas adultas de dendezeiros, biorreatores de imersão temporária modelo R.I.T.A.[®], embora não proporcionem melhorias no acúmulo de biomassa dos propágulos, em relação ao cultivo *in vitro* em pequena escala, constituem um sistema de cultivo viável para a multiplicação de calos de diferentes genótipos. Já na etapa de regeneração de embriões somáticos, a utilização de biorreatores de imersão temporária modelo R.I.T.A.[®], além de ser uma alternativa viável, ainda propicia a otimização do processo, proporcionando melhorias no acúmulo de biomassa fresca, no número de plantas regeneradas e na formação de plantas com altura superior a 2,5 cm.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALZON, T. A.; LUIZ, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. New approaches to improve the efficiency of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) from mature zygotic embryos. ***In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant***, v.49, p.41-50, 2013.

CHANPRASERT, W.; MYINT, T.; SRIKUL, S.; WONGSRI, O. Effects of neonicotinoid and method of breaking dormancy on seed germination and seedling vigour of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). ***Journal of Oil Palm Research***, v.24, p.1227-1234, 2012.

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

CHOI, D. S.; ANDRADE, M. H. C.; WILLIS, L. B.; CHO, C. W.; SCHOENHEIT, J.; BOCCAZZI, P.; SAMBANTHANMURTHI, R.; SINSKEY, A. J.; RHA, C. K. Effect of agitation and aeration of yield optimization of oil palm suspension culture. ***Journal of Palm Oil Research***, v.1, p.23-34, 2008.

CONSTANTIN, M.; NCHU, W. A.; GODSWILL, N. N.; WIENDI, N. M. A.; WACHJAR, A.; FRANK, N. E. G. Induction of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq. var. Tenera) callogenesis and somatic embryogenesis from young leaf explants. ***Journal of Applied Biology and Biotechnology***, v.3, p.4-10, 2015.

DURAND-GASSELIN, T.; GUEN, V.; KONAN, K.; DUVAL, Y. Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) plantations in Ivory Coast obtained through *in vitro* culture. First results. ***Oléagineux***, v.45, p.1-11, 1990.

ESCALONA, M.; LORENZO, J. C.; GONZÁLES, B.; DAQUINTA, M.; GONZÁLES, J. L.; DESJARDINS, Y.; BORROTO, C. G.; Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. ***Plant Cell Reports***, v.18, p.743-748, 1999.

ETIENNE, H.; BERTHOULY, M. Temporary immersion systems in plant micropropagation. ***Plant Cell, Tissue and Organ Culture***, v.69, p.215-231, 2002.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. ***Ciência e Agrotecnologia***, v.35, p.1039-1042, 2011.

FKI, L.; MASMOUDI, R.; DRIRA, N.; RIVAL, A. An optimized protocol for plant regeneration from embryonic suspension cultures of date palm, *Phoenix dactylifera* L. cv. Degls et Nour. ***Plant Cell Reports***, v.21, p.517-524, 2003.

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

GEORGIEV, V.; SCHUMANN, A.; PAVLOV, A.; BLEY, T. Review - Temporary immersion systems in plant biotechnology. **Engineering Life Sciences**, v.14, p.607-621, 2014.

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

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

GOMES, H. T.; BARTOS, P. M. C.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Optimizing rooting and survival of oil palm (*Elaeis guineensis*) plantlets derived from somatic embryos. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v.51, p.111-117, 2015b.

GORRET, N.; SAMSUL-KAMAL, R.; OPPENHEIM, S. F.; WILLIS, L. B.; LESSARD, P. A.; CHOKYUN, R.; SINSKEY, A. J. Bioreactor culture of oil palm (*Elaeis guineensis*) and effects of nitrogen source, inoculum size and conditioned medium on biomass production. **Journal of Biotechnology**, v.108, p.253-263, 2004.

HANSEN, S.B.; PADFIELD, R.; SYAYUTI, K.; EVERS, S.; ZAKARIAH, Z.; MASTURA, S. Trends in global palm oil sustainability research. **Journal of Cleaner Production**, v.100, p.140-149, 2015.

HAZARIKA, B. N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae**, v.108, p.105-120, 2006.

HERINGER, A.S.; STEINMACHER, D.A.; FRAGA, H.P.F.; VIEIRA, L.N.; MONTAGNA, T.; QUINGA, L.A.P.; QUOIRIN, M.G.G.; JIMÉNEZ, V.M.; GUERRA, M.P. Improved high-efficiency protocol for somatic embryogenesis in Peach Palm (*Bactris gasipaes* Kunth) using RITA[®] temporary immersion system. **Scientia Horticulturae**, v.179, p.284-292, 2014.

INPUAY, K.; TE-CHATO, S. Primary and secondary somatic embryos as tool for the propagation and artificial seed production of oil palm. **Journal of Agricultural Technology**, v.8, p.597-609, 2012.

JAYANTHI, M.; SUSANTHI, B.; MOHAN, N. M.; MANDAL, P. K. *In vitro* somatic embryogenesis and plantlet regeneration from immature male inflorescence of adult dura and tenera palms of *Elaeis guineensis* (Jacq.). **SpringerPlus**, v.4, p.256-262, 2015.

JIMÉNEZ, V. M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. **Plant Growth Regulation**, v.47, p.91-110, 2005.

JOUANNIC, S.; LARTAUD, M.; HERVÉ, J.; COLLIN, M.; ORIEUX, Y.; VERDEIL, J. L.; TREGEAR, J. W. The shoot apical meristem of oil palm (*Elaeis guineensis*; Arecaceae): developmental progression and dynamics. **Annals of Botany**, v.108, p.1477-1487, 2011.

KHAW, C. H.; NG, S. K. Performance of commercial scale clonal oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) plantings in Malaysia. **Acta Horticulturae**, v.461, p.251-258, 1998.

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

MARBUN, C. L. M.; TORUAN-MATHIUSA, N.; REFLINIA; UTOMOA, C.; LIWANG, T. Micropropagation of embryogenic callus of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) using temporary immersion system. **Procedia Chemistry**, v.14, p.122-129, 2015.

MARTIN, Y. VERMETTE, P. Bioreactors for tissue mass culture: Design, characterization, and recent advances. **Biomaterials**, v.29, P.7481-7503, 2005.

MARTINE, B.M.; LAURENT, K.K.; PIERRE, B.J.; EUGÈNE, K.K.; HILAIRE, K.T.; JUSTIN, K.Y. Effect of storage and heat treatments on the germination of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) seed. **African Journal of Agricultural Research**, v.4, p.931-937, 2009.

MEHROTRA, S.; GOEL, M. K.; KUKREJA, A. K.; MISHRA, B. N. Efficiency of liquid culture systems over conventional micropropagation: A progress towards commercialization. **African Journal of Biotechnology**, v.6, p.1484-1492, 2007.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

MYINT, T.; CHANPRASERT, W.; SRIKUL, S. Germination of seed of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) as affected by different mechanical scarification methods. **Seed Science and Technology**, v.38, p.635-345, 2010.

NIEMENAK, N.; SAARE-SURMINSKI, K.; ROHSIUS, C.; NDOUMOU, D. O.; LIEBEREI, R. Regeneration of somatic embryos in *Theobroma cacao* L. in temporary immersion bioreactor and analyses of free amino acids in different tissues. **Plant Cell Reports**, v.27, p.667-676, 2008.

NIZAM, K.; TE-CHATO, S. Optimizing of root induction in oil palm plantlets for acclimatization by some potent plant growth regulators (PGRs). **Journal of Agricultural Technology**, v.5, p.371-383, 2009.

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

SAÉNZ, L.; AZPEITIA, A.; CHUC-ARMENDARIZ, B.; CHAN, J. L.; HOCHER, V.; OROPEZA C. Morphological and histological changes during somatic embryo formation from coconut plumule explants. ***In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant***, v.42, p.19-25, 2006.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; LIMA, E. C. A.; SILVA, T. L.; MESQUITA, A. G. G.; MACIEL, S. A.; COSTA, F. H. S. Double-phase culture system for large scale production of pineapple. ***Plant Cell, Tissue and Organ Culture***, v.109, p.263-269, 2012.

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

STARITSKY, G. Tissue culture of the oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) as a tool for its vegetative propagation. ***Euphytica***, v.19, p.288-292, 1970.

STEINMACHER, D. A.; GUERRA, M. P.; SAARE-SURMINSKI, K.; LIEBEREI, R. A temporary immersion system improves *in vitro* regeneration of *Peach palm* through secondary somatic embryogenesis. ***Annals of Botany***, v.108, p.1463-1475, 2011.

SUMARYONO, I.; RIYADI, I. *Ex vitro* rooting of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) plantlets derived from tissue culture. ***Indonesian Journal of Agricultural Science***, v.12, p.57-62, 2011.

TARMIZI, A. H.; NORJIHAN, M. A.; ZAITON, R. Multiplication of oil palm suspension cultures in a bench-top (2 litre) bioreactor. ***Journal of Oil Palm Research***, v.16, p.44-49, 2004.

TARMIZI, A. H.; SAMSAUL, K. R.; ZAITON, R.; ROSLI, M. Y. Multiplication of oil palm liquid cultures in bioreactors. ***Journal of Oil Palm Research Special Issue on Malaysia-MIT Biotechnology Partnership Programme***, v.1, p.44-50, 2008.

TE-CHATO, S.; HILAE, A. High-frequency plant regeneration through secondary somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq. var. tenera). ***Journal of Agricultural Technology***, v.3, p.345-357, 2007.

TEISSON, C.; ALVARD, D.; BERTHOULY, M.; COTE, F.; ESCALANT, J.V. & ETIENNE, H. *In vitro* culture by temporary immersion: a new device. ***Plantations***, v.2, p.32-33, 1995.

TEIXEIRA, J. B. Biorreatores. ***Biociência & Desenvolvimento***, v.24, p.36-41, 2002.

CAPÍTULO 2

Análise molecular de dendezeiros (*Elaeis guineensis* Jacq.) regenerados por embriogênese somática em sistema de imersão temporária (R.I.T.A.[®])

RESUMO

O objetivo do trabalho foi analisar a fidelidade genética de plantas regeneradas de dendezeiro, oriundas da embriogênese somática de folhas imaturas de plantas adultas, por meio do uso de marcadores ISSR e AFLP (MSAP). Para tanto, folhas jovens de indivíduos provenientes da multiplicação e regeneração em meio semi-sólido, líquido sob agitação e biorreatores R.I.T.A.[®], foram utilizadas como fontes doadoras de DNA genômico. Então, a fidelidade genética desses propágulos foi avaliada utilizando-se 28 *primers* ISSR aleatórios. Por fim, a fidelidade epigenética destas culturas foi analisada utilizando-se marcadores AFLP com o emprego de duas enzimas sensíveis a metilação: HpaII e MspI. Verificou-se que, independentemente do sistema de cultivo utilizado, não foi constatada a ocorrência de variações na sequência do DNA genômico dos propágulos produzidos. Porém, com o emprego de biorreatores de imersão temporária modelo R.I.T.A.[®], observou-se a redução dos índices de alteração do padrão de metilação do epigenoma dos indivíduos regenerados, além da diminuição das taxas de ocorrência de hipometilação do DNA das culturas propagadas. Conclui-se que, nas brotações oriundas do processo de multiplicação e regeneração em sistemas R.I.T.A.[®], são observadas as menores chances de desenvolvimento do fenótipo *mantled*.

Palavras-chave: Arecaceae; multiplicação *in vitro*; variação somaclonal; marcadores moleculares; ISSR; AFLP; MSAP.

CHAPTER 2

Molecular analysis of oil palm plants (*Elaeis guineensis* Jacq.) obtained via somatic embryogenesis in temporary immersion system (R.I.T.A.[®])

ABSTRACT

The aim of this study was to analyze the genetic fidelity of oil palm plantlets regenerated via somatic embryogenesis from immature leaves of adult plants, using ISSR and AFLP markers (MSAP). Immature leaves of regenerated plantlets from semi-solid medium, liquid under agitation and R.I.T.A.[®] bioreactors systems were used as donor sources of DNA. The genetic fidelity was evaluated using 28 ISSR random primers, and epigenetic analysis was performed using AFLP markers through two sensitive enzymes to methylation: HpaII and MspI. Regardless of the culture system, it was not observed the occurrence of genetic variations of oil palm plantlets using ISSR. However, with the use of R.I.T.A.[®] bioreactors, there were a reduction in the DNA methylation and decrease in DNA hypomethylation levels of the regenerants. We conclude that oil palm plantlets under multiplication and regeneration in R.I.T.A.[®] bioreactors have reduced chances of developing somaclonal variants.

Key words: *Arecaceae*; *in vitro* multiplication; somaclonal variation; molecular markers; ISSR; AFLP; MSAP.

1. INTRODUÇÃO

O dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) é uma monocotiledônea da família Arecaceae largamente cultivada na América Latina, na África e no Sudeste Asiático. Esta palmeira é uma espécie produtora de óleo, que vem se destacando economicamente devido a crescente demanda por óleo de dendê apresentada pela indústria alimentícia e farmacêutica. Ademais, a espécie ainda tem se destacado mundialmente pela capacidade que seu óleo possui para a produção de biocombustíveis (Mukherjee & Sovacool, 2014; Hansen *et al.*, 2015).

Contudo, um dos problemas encontrados para a expansão da cultura é disponibilidade em escala comercial de mudas com elevada qualidade genética. Dificuldade que, se deve ao fato do dendezeiro não possuir mecanismos naturais de propagação vegetativa, fazendo com suas variedades elite sejam multiplicadas exclusivamente por sementes (Jouannic *et al.*, 2011; Oosterveer, 2015).

Esse fato, devido à alta heterozigose do dendezeiro, tem impossibilitado que as características agronômicas desejáveis sejam perpetuadas nas mudas produzidas. Assim, a embriogênese somática apresenta-se como uma alternativa promissora para a multiplicação clonal em larga escala de indivíduos superiores da espécie (Wahid *et al.*, 2005; Wiendi *et al.*, 2015).

A embriogênese somática é o processo pelo qual embriões são originados assexuadamente, a partir da expressão diferencial de genes que regulam o desenvolvimento morfogênico das células vegetativas (somáticas) das plantas, conferindo-lhes a capacidade de manifestar o potencial embriogênico (Reinert, 1958; Williams & Maheswaran, 1986).

Atualmente, culturas embriogênicas oriundas de uma grande variedade de explantes iniciais já são utilizadas para a micropropagação de diversas espécies (Rezende *et al.*, 2008; Menéndez-Yuffá *et al.*, 2010; Soh *et al.*, 2011; You *et al.*, 2012). Porém, ainda hoje, a falta de domínio dessa metodologia é responsável por disponibilizar ao setor produtivo mudas com qualidade duvidosa, trazendo perdas aos produtores devido à ocorrência de elevadas

taxas de variações somaclonais (Bairu *et al.*, 2011; Mgbeze & Iserhienrhien, 2014).

Em dendezeiro, verifica-se que aproximadamente 5% dos clones derivados da embriogênese somática desenvolvem flores anormais em consequência da ocorrência de variantes somaclonais. Essas anomalias são caracterizadas pela feminização das partes masculinas das flores de ambos os sexos. Nesses indivíduos, nenhum pólen é produzido nas flores masculinas, enquanto que nas flores femininas, um anel de pseudocarpelos rodeia o gineceu, impedindo o amadurecimento dos frutos ou, nos casos mais graves, ocasionando o seu aborto (Corley *et al.*, 1986; Ong-Abdullah *et al.*, 2015).

Para a detecção de possíveis variações genômicas, diversos marcadores moleculares vêm sendo utilizados com sucesso (Lei *et al.*, 2006; Thawaro & Te-chato, 2009; Gantait *et al.*, 2015). Entre eles, os marcadores ISSR e AFLP vêm se destacando devido ao seu elevado grau de polimorfismo e reprodutibilidade. Além disso, esses marcadores não necessitam do desenvolvimento de *primers* específicos e nem do conhecimento prévio do genoma da espécie em estudo (Kumar *et al.*, 2009; Arif *et al.*, 2010).

Diante desse contexto, o objetivo do trabalho foi analisar a fidelidade genética e epigenética dos clones de dendezeiro, produzidos pela embriogênese somática de folhas imaturas de plantas adultas, por meio da utilização de marcadores ISSR e AFLP (MSAP).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local de realização dos experimentos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Genética Vegetal (LGV) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, situado em Brasília – DF, Brasil.

2.2 Material vegetal

Para a indução da embriogênese somática foram utilizadas como material vegetal, folhas imaturas e ainda não expandidas (palmito), oriundas de plantas adultas de dendzeiros variedade C2328, fornecidas pelo Programa de Melhoramento Genético de Dendzeiro da Embrapa Amazônia Ocidental, localizado na municipalidade de Rio Preto da Eva – AM, Brasil.

2.3 Obtenção dos explantes

Para a obtenção dos explantes, segmentos foliares estéreis de aproximadamente 1 cm² foram inoculados em placas de Petri (15 x 90 mm), contendo 25 mL de meio de cultura composto pela constituição salina e vitaminas de MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com 450 µM de Picloram (ácido aminotricloropicolínico), 0,5 g.L⁻¹ de caseína hidrolisada, 0,5 g.L⁻¹ de glutamina, 2,5 g.L⁻¹ de carvão ativado e 30 g.L⁻¹ de sacarose (Balzon *et al.*, 2013). Nesse meio, o pH foi ajustado para 5,7 ± 0,1, seguido da adição de 2,5 g.L⁻¹ de Phytigel, antes da esterilização a 121°C e 1,3 atm por 20 minutos. Então, o material vegetal foi cultivado por até oito subcultivos de 30 dias para a obtenção de calos, sob condição de obscuridade.

Em seguida, os calos obtidos na etapa de indução foram inoculados nos respectivos sistemas de cultivo: Erlenmeyers de 125 mL de capacidade contendo 25 mL de meio nutritivo semi-sólido, Erlenmeyers de 125 mL de capacidade contendo 25 mL de meio de cultivo líquido sob agitação orbital a 100 rpm e sistemas de imersão temporária automatizados (R.I.T.A.[®]) de 1 L de capacidade contendo 200 mL de meio de cultura líquido. Nessa fase, o meio foi

composto pelos sais e vitaminas de MS, acrescido de 4,5 μM de 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético), 0,5 μM de ANA (ácido naftalenoacético), 0,5 g.L^{-1} de glutamina, 0,5 g.L^{-1} de caseína hidrolisada, 0,1 g.L^{-1} de cisteína, 0,1 g.L^{-1} de asparagina, 30 g.L^{-1} de sacarose e pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$. No sistema semi-sólido, o meio nutritivo foi suplementado ainda com 2,5 g.L^{-1} de Phytigel para sua solidificação. Nessas condições, os propágulos foram cultivados por cinco subcultivos sucessivos de 30 dias cada para a proliferação dos massivos celulares.

Posteriormente, calos provenientes da fase de multiplicação foram inoculados em frascos de vidro de 250 mL de capacidade, contendo 40 mL de meio de cultivo de MS, suplementado com 12,3 μM de 2-iP (isopenteniladenina), 0,54 μM de ANA, 0,5 g.L^{-1} de glutamina, 0,5 g.L^{-1} de caseína hidrolisada, 0,1 g.L^{-1} de cisteína, 0,1 g.L^{-1} de asparagina, 30 g.L^{-1} de sacarose, 2,5 g.L^{-1} de Phytigel e pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$. Nessa etapa, os calos foram cultivados por até seis subcultivos de 30 dias para a diferenciação de embriões somáticos.

Por fim, os embriões somáticos provenientes da etapa de diferenciação foram inoculados em biorreatores R.I.T.A.[®] e sistemas tradicionais de cultivo (frascos de vidro de 250 mL de capacidade contendo 40 mL de meio de cultura semi-sólido). Nesse passo, utilizou-se o meio de MS isento de reguladores de crescimento, suplementado de 30 g.L^{-1} de sacarose, 2,5 g.L^{-1} de carvão ativado, 2,5 g.L^{-1} de Phytigel, no caso do sistema tradicional, e pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$. Os embriões somáticos foram então cultivados por mais cinco subcultivos de 30 dias para regenerar novas plantas.

Durante todo o desenvolvimento embriogênico, as culturas foram acondicionadas em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e radiação luminosa de $52 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas LED (Philips[®] - Green Power 20W 60Hz).

2.4 Análise da fidelidade genética e epigenéticas dos clones por marcadores ISSR e AFLP (MSAP)

Para a análise da fidelidade genética e epigenética dos clones de dendezeiro por marcadores ISSR e AFLP (MSAP), folhas jovens de 36 propágulos, oriundos do final da fase de regeneração, foram utilizadas como fontes doadoras de DNA genômico. Nessa amostragem, utilizaram-se 12 indivíduos provenientes da multiplicação e regeneração em frascos de vidro contendo meio semi-sólido (controle 1), 12 indivíduos oriundos da multiplicação em meio líquido sob agitação e posterior regeneração em frascos de vidro contendo meio semi-sólido (controle 2), além de 12 indivíduos provenientes da multiplicação e regeneração em biorreatores modelo R.I.T.A.[®] (sistema de imersão temporária mais eficiente para o desenvolvimento embriogênico do dendezeiro).

2.4.1 Extração do DNA genômico

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

Em seguida, esses microtubos foram incubados a -20°C por 1 hora sob agitação ocasional a cada 15 minutos. Após a incubação, o isopropanol foi descartado e o pellet de DNA lavado duas vezes com 500 µL de etanol 70% e uma vez em 500 µL de etanol 100%. Após as lavagens, o DNA foi seco em temperatura ambiente por 12 horas, ressuspendido em 100 µL de tampão TE

com RNase (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA e 10 mg ML21 RNase A), quantificado em gel de agarose 1%, diluído a 3 e a 20 ng.µL⁻¹ e então armazenado a -20°C até o momento da utilização.

2.4.2 Análise ISSR

Para a análise por marcadores ISSR foram inicialmente selecionados 28 *primers* aleatórios (Sigma-Aldrich®), tendo como critério de seleção a quantidade de bandas amplificadas e a qualidade dos fragmentos gerados (Tabela 1).

Tabela 1. Lista dos 28 *primers* utilizados na análise da fidelidade genética de clones de dendezeiro produzidos via embriogênese somática por marcadores ISSR e suas respectivas sequências.

<i>Primer</i>	Sequência 5' - 3'	<i>Primer</i>	Sequência 5' - 3'
2 zm	CACACACACACACACAGG*	52 zm	GGCACCACACACACACACACA
3 zm	CACACACACACACAAT	53 zm	CGCAACACACACACACACACA
4 zm	CACACACACACACAAC	54 zm	GGCTACACACACACACACACA
6 zm	CACACACACACACACAGC	55 zm	CCTCCACACACACACACACACA
7 zm	CACACACACACAATCT	56 zm	GCTACCACACACACACACACA
8 zm	CACACACACACAATCC	57 zm	CGTCCACACACACACACACACA
11 zm	TGTCACACACACACACAC	58 zm	CGAACCACACACACACACACA
12 zm	GGTCACACACACACACAC	59 zm	GGCCAGCTGCTGCTGCTGCTGCT
15 zm	GTGCACACACACACACAC	60 zm	GCCACGCTGCTGCTGCTGCTGCT
16 zm	CGGCACACACACACACAC	5 pv	ACTGACTGACTGRG
17 zm	CAGCTCTCTCTCTCTCTC	9 ps	ACACACACACACACACYA
18 zm	GTGCTCTCTCTCTCTCTC	10 ps	AGAGAGAGAGAGAGAGYT
39 zm	AGCAGCAGCAGCAC	11 ps	GTGTGTGTGTGTGTGYC
51 zm	GCACCCACACACACACACACA	12 ps	CACACACACACACA

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

As reações ISSR foram realizadas a partir de uma solução de 13 μL contendo: 2,84 μL de água ultra pura, 1,3 μL de tampão IB 10X, 1,3 μL de BSA (2,5 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), 1,3 μL de dNTPs (2,5 mM), 0,26 μL de Taq DNA polimerase (5 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), 3 μL de *primer* (1,2 mM) e 3 μL de DNA genômico (3 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$).

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

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

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

Para tanto, foi dividido o número de mutações observadas (fragmentos polimórficos) pelo número total de fragmentos amplificados. Para a determinação do número de mutações, utilizou-se o princípio de que um fragmento é considerado polimórfico se ele estiver ausente em pelo menos um dos clones e presente nos demais ou presente em pelo menos um clone e ausente nos demais.

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

2.4.3 Análise AFLP (MSAP)

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

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

Tabela 2. Sequências (5' - 3') dos adaptadores e *primers* utilizados na análise da fidelidade genética de clones de dendezeiro produzidos via embriogênese somática por marcadores AFLP (MSAP).

Nome	Enzima	Tipo	Sequência (5' - 3')
EcoA+	EcoRI	Adaptador (+)	CTCGTAGACTGCGTACC
EcoA-	EcoRI	Adaptador (-)	AATTGGTACGCAGTCTAC
Mse/HpaA+	Mspl/Hpall	Adaptador (+)	GACGATGAGTCTAGAA
Mse/HpaA-	Mspl/Hpall	Adaptador (-)	CGTTCTAGACTCATC
Eco+A	EcoRI	<i>Primer</i> +1	GACTGCGTACCAATTCA <u> </u>
MH+T	Mspl/Hpall	<i>Primer</i> +1	GATGAGTCTAGAACGGT <u> </u>
Eco+AAG	EcoRI	<i>Primer</i> +3	*GACTGCGTACCAATTCAAG
Eco+AGG	EcoRI	<i>Primer</i> +3	*GACTGCGTACCAATTCAGG
Eco+ACG	EcoRI	<i>Primer</i> +3	*GACTGCGTACCAATTCACG
MH+TAA	Mspl/Hpall	<i>Primer</i> +3	GATGAGTCTAGAACGGTAA
MH+TCC	Mspl/Hpall	<i>Primer</i> +3	GATGAGTCTAGAACGGTCC
MH+TAG	Mspl/Hpall	<i>Primer</i> +3	GATGAGTCTAGAACGGTAG
MH+TAC	Mspl/Hpall	<i>Primer</i> +3	GATGAGTCTAGAACGGTAC
MH+TGA	Mspl/Hpall	<i>Primer</i> +3	GATGAGTCTAGAACGGTGA
MH+TGG	Mspl/Hpall	<i>Primer</i> +3	GATGAGTCTAGAACGGTGG
MH+TTA	Mspl/Hpall	<i>Primer</i> +3	GATGAGTCTAGAACGGTTA

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

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

Em seguida, a amplificação seletiva foi realizada pelas seguintes combinações dos *primers* EcoRI/Hpall e EcoRI/Mspl: AAG-TAA, AAG-TCC, AAG-TAG, AAG-TAC, AAG-TGA, ACG-TGG e AGG-TTA. Para tanto, as reações foram realizadas a partir de uma solução de 10 µL, contendo 1 µL de

tampão IB 10X, 0,1 µL de Taq DNA polimerase (5 U.µL⁻¹), 0,3 µL de *primer* Eco+3 (5 µM), marcados com a utilização do fluorocromo VIC[®], 0,3 µL de *primer* MH+3 (5 µM), 0,8 µL de dNTPs (2,5 mM), 2 µL de DNA pré-amplificado diluído e 5,5 µL de H₂O ultra pura.

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

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

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

Finalmente, para a avaliação da distância epigenética dos clones obtidos pela embriogênese somática do dendezeiro, os dados obtidos pela utilização dos marcadores AFLP (MSAP) foram então submetidos à análise de coordenadas principais (PCoA) e análise de variância molecular – AMOVA (Excoffier *et al.*, 1992), empregando-se novamente o programa R 3.3.0 com o

pacote RawGeno AFLP scoring 2.0 (Pérez-Figueroa, 2013). Nessa análise, foi avaliada também a percentagem de locos susceptíveis ou não a metilação.

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

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise da fidelidade genética por marcadores ISSR

Os resultados referentes à análise da fidelidade genética dos clones de dendezeiro obtidos a partir da embriogênese somática de folhas imaturas, por meio da utilização de marcadores ISSR, são apresentados na Tabela 3. Observou-se nessa análise a amplificação de cerca de 130 regiões do genoma dos 36 indivíduos amostrados. Nessas amplificações, verificou-se que independentemente da região do DNA analisada e do sistema de cultivo utilizado para a multiplicação e regeneração dos propágulos, a ocorrência de variações somaclonais não foi constatada (Figura 1).

Na análise da fidelidade genética de embriões somáticos de *Elaeis guineensis*, avaliada por meio da utilização de marcadores ISSR, Gantait *et al.* (2015) também não verificaram em seus diferentes tratamentos a ocorrência de variantes somaclonais. Thawaro & Te-chato (2009) também não detectaram a presença de variações somaclonais, ao analisar a fidelidade genômica de plantas de dendezeiro obtidas via cultura de tecidos, a partir do uso de marcadores RAPD e SSR.

Tabela 3. Análise da fidelidade genética de clones de dendezeiro propagados via embriogênese somática de folhas imaturas por marcadores ISSR.

Análise ISSR			
Sistema de cultivo	Locos amplificados	Mutações observadas	Alteração genômica (%)
Semi-sólido	133	0	0,00
Líquido	133	0	0,00
R.I.T.A. [®]	133	0	0,00

Tais resultados corroboram Rival *et al.* (1998), que por meio da utilização de marcadores RAPD também não observaram a ocorrência de variações genéticas em clones de *Elaeis guineensis* obtidos por embriogênese somática, mesmo quando as variantes somaclonais foram claramente

identificadas em campo a partir da avaliação das características fenotípicas das culturas.

Para Kubis *et al.* (2003), Jaligot *et al.* (2011) e Sanputawong & Te-chato (2011), as variações somaclonais observadas em plantas de dendezeiro produzidas pelo cultivo *in vitro* não estão relacionadas com desarranjos na estrutura do DNA genômico dos cultivos. Segundo esses autores, as variantes somaclonais observadas nestes propágulos são causadas pela hipometilação do DNA. De acordo com os mesmos, esse mecanismo epigenético, ocasionado por um desequilíbrio hormonal, é o responsável por induzir o aparecimento de anomalias no desenvolvimento floral dos regenerantes da espécie conhecidas como *mantled* (Corley *et al.*, 1986).

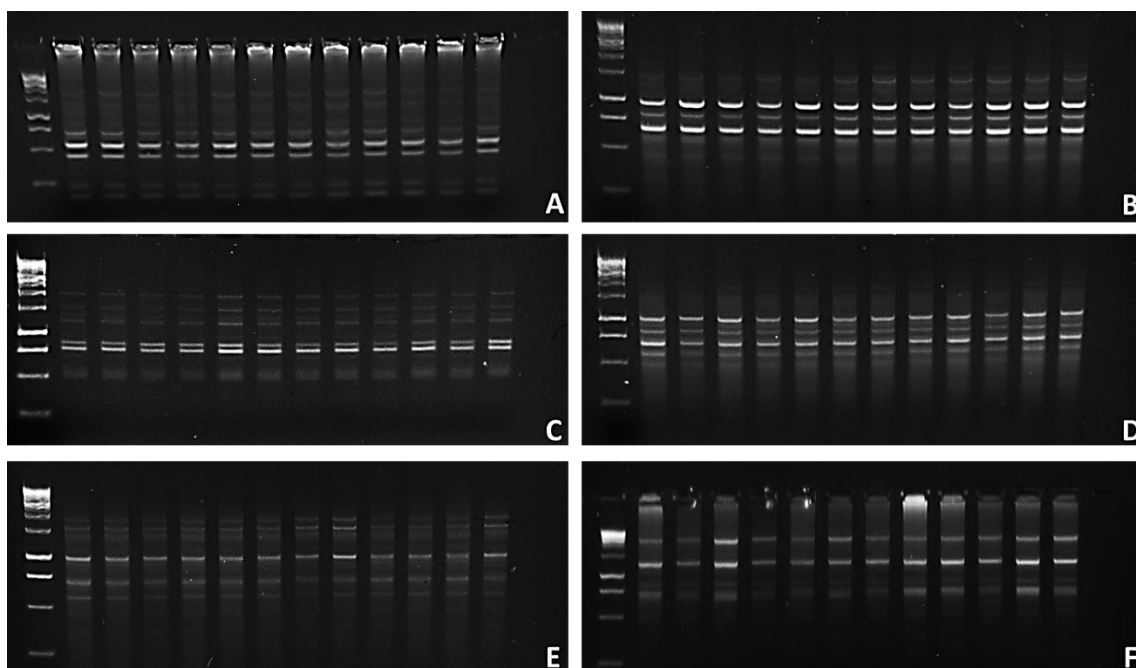


Figura 1. Análise da fidelidade genética de clones de dendezeiro micropropagados via embriogênese somática de folhas imaturas. **A-B)** *Primers* 2 e 12 zm na amplificação do DNA dos indivíduos provenientes da multiplicação e regeneração em meio semi-sólido, respectivamente; **C-D)** *Primers* 10 ps e 16 zm na amplificação do DNA das culturas oriundas da multiplicação e regeneração em R.I.T.A.[®], respectivamente; **E-F)** *Primers* 55 e 4 zm na amplificação do DNA dos propágulos provenientes da multiplicação em meio líquido e regeneração em meio semi-sólido, respectivamente.

3.2 Análise da fidelidade epigenética por marcadores AFLP (MSAP)

Os resultados referentes à análise da fidelidade epigenética das plantas de dendezeiro clonadas a partir da embriogênese somática de folhas imaturas, realizada pelo emprego dos marcadores AFLP (MSAP), são apresentados na Figura 2. Nessa análise, verificou-se ao todo a amplificação de aproximadamente 320 sítios do genoma dos 36 propágulos avaliados. Nessas amplificações, constatou-se que, no geral, cerca de 64% destas regiões revelaram-se sensíveis a metilação, enquanto que 36% não se mostraram susceptíveis a esta alteração química (Tabela 4).

Tabela 4. Análise da fidelidade epigenética de clones de dendezeiro propagados via embriogênese somática de folhas imaturas por marcadores AFLP (MSAP).

Análise AFLP (MSAP)			
Indivíduos avaliados	Locos amplificados	Locos com metilação	Locos sem metilação
36	317	203	114

Na representação da análise de coordenadas principais (PCoA) dos 114 locos não suscetíveis a metilação observou-se, assim como constatado nos marcadores ISSR, que de forma geral independentemente do sistema de cultivo utilizado para a multiplicação e regeneração, os indivíduos amostrados também não apresentaram em seus genomas o desenvolvimento de variações genéticas (Figura 2-B).

Em contrapartida, na representação da análise de coordenadas principais dos 203 locos sujeitos a metilação, observou-se que todos os indivíduos avaliados exibiram em seu epigenoma algum nível de alteração, fazendo com que os mesmos apresentassem entre si pequenos índices de dissimilaridade. Nessa análise, verificou-se também que as culturas provenientes da multiplicação e regeneração em biorreatores R.I.T.A.[®], quando comparadas aquelas submetidas à multiplicação e regeneração em meios semi-sólidos e líquidos, apresentaram entre si os menores índices de variação

(Figura 2-A). Ademais, com a análise de variância molecular (AMOVA) destes sítios, constatou-se ainda que 87,9% da variação epigenética total dos regenerantes esta localizada dentro dos grupos (tratamentos), enquanto que apenas 12,1% encontra-se entre os mesmos (Tabela 5).

Tabela 5. Análise de variância molecular (AMOVA) dos locos submetidos ou não ao processo de metilação.

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Componentes de variância	Porcentagem de variação
<i>NML</i> *				
Entre grupos	2	5,56	0.095	5,5
Dentro dos grupos	33	54,00	1.636	94,5
Total	35	59,56	1,731	
<i>MSL</i> **				
Entre grupos	2	94,11	2.436	12,1
Dentro dos grupos	33	558,20	17.82	87,9
Total	35	682,30	20,256	

*Locos não metilados (P= 0.0038); **Locos submetidos à metilação (P<0.0001).

Estudando a embriogênese somática de *Bactris gasipaes* por meio da técnica de TCL, Steinmacher *et al.* (2007) também verificaram ao analisar a fidelidade genômica dos regenerantes por marcadores AFLP, que todos os clones avaliados, independentemente do tratamento empregado, também apresentaram em sua estrutura genética algum grau de alteração. Na espécie, observou-se ainda que embora os indivíduos examinados tenham apresentado uma taxa de similaridade média de aproximadamente 95%, quando comparados à suas respectivas plantas-mãe, os mesmos não apresentaram anomalias morfológicas durante seu crescimento e desenvolvimento. Para os autores, tais resultados indicam que a maior parte das modificações genômicas ocasionadas pela micropropagação dessa palmeira ocorrem em regiões não codificantes do DNA e/ou em sítios com pouco efeito na expressão gênica.

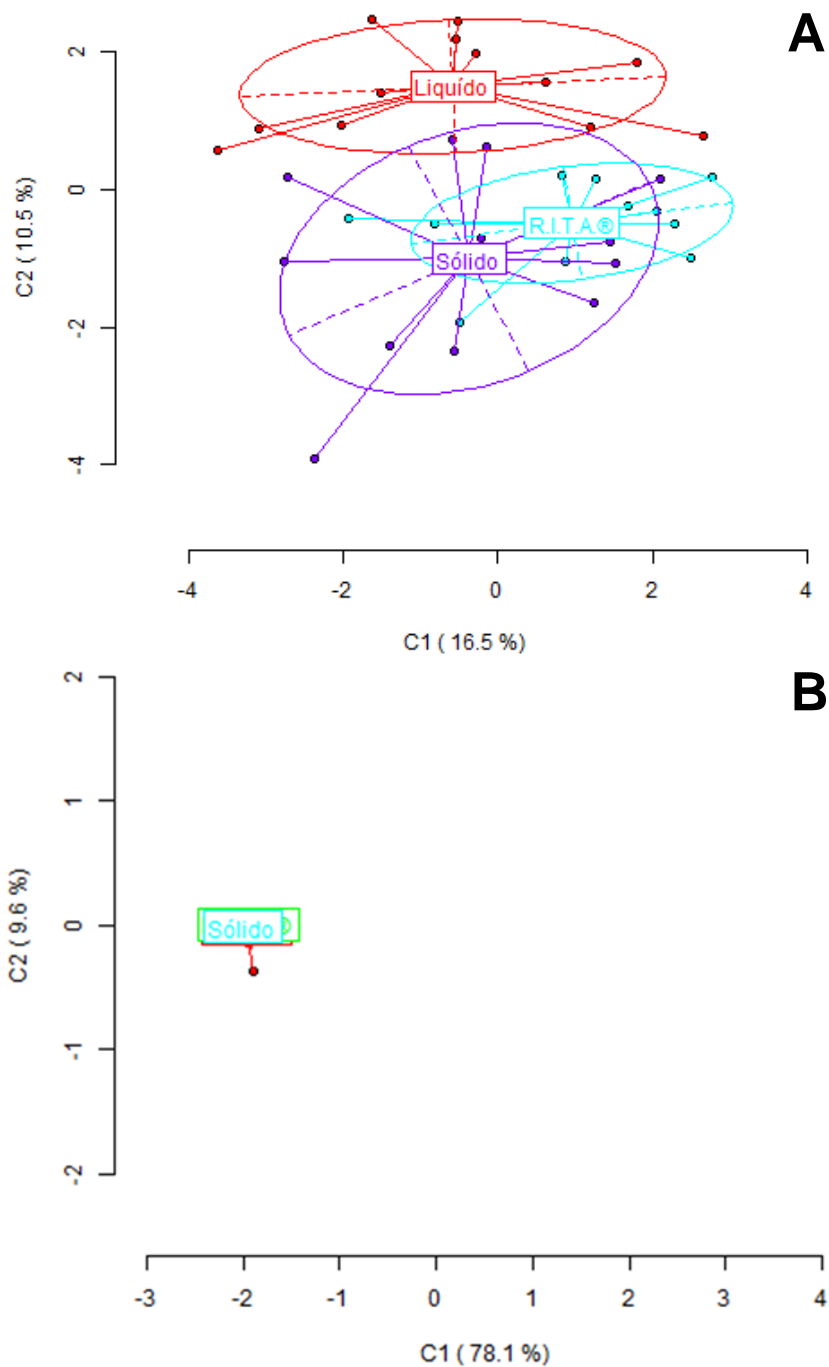


Figura 2. Análise de coordenadas principais (PCoA) dos locos sujeitos (A) ou não (B) a metilação para a diferenciação epigenética dos clones de dendezeiros produzidos pela embriogênese somática. As coordenadas C1 e C2 são mostradas com a percentagem de variância explicada entre eles. Pontos diferentes representam indivíduos diferentes. Nome do grupo mostra o centro da sua nuvem de pontos. Elipse representa a dispersão média dos pontos ao redor de seu centro. O eixo mais comprido da elipse mostra a direção de dispersão máxima e, o eixo menor a direção de dispersão mínima.

Matthes *et al.* (2001) também constataram ao analisar a variabilidade genética de regenerantes de *Elaeis guineensis* derivados da cultura de tecidos vegetais, por meio da utilização de marcadores AFLP (MSAP), a ocorrência de índices significativos de variações somaclonais. Nesse estudo, foi observado que os indivíduos produzidos por esta metodologia apresentavam, em alguns casos, a amplificação de bandas não constatadas no genoma de suas respectivas matrizes, sugerindo assim, que uma redução na metilação do DNA destes propágulos tinha ocorrido em decorrência da embriogênese somática. Ademais, verificou-se ainda nesse trabalho que o maior número de bandas polimórficas foi obtido quando a enzima HpaII foi empregada na clivagem do DNA genômico, indicando que essa perda de metilação ocorreu mais frequentemente na citosina interna do sítio de restrição desta enzima (5'-CCGG-3').

Tais resultados corroboram os obtidos no presente trabalho, onde se constatou que, no geral, cerca de 60% das alterações epigenéticas averiguadas nos clones de dendezeiro obtidos pela embriogênese somática de folhas imaturas foram ocasionadas pelo ganho de fragmentos (Figura 3), ou seja, pela hipometilação do DNA genômico. Contudo, no atual experimento foi observado que tanto na combinação EcoRI/HpaII quanto na combinação EcoRI/MspI (Figura 4), as taxas de surgimento de bandas adicionais giraram em torno dos 30%, demonstrando que nesses protocolos de micropropagação a perda de metilação ocorreu com frequência semelhante em ambas as citosinas reconhecidas por estas enzimas de corte frequente.

Resultados semelhantes aos relatados por Jaligot *et al.* (2004), ao utilizar a amplificação de polimorfismos sensíveis a metilação (MSAP) para a comparação do perfil epigenético de clones de *Elaeis guineensis* com fenótipos normais e envolvidos (*mantleds*), onde foi averiguado que 87% da variação constatada nos indivíduos variantes estava relacionada com a amplificação de bandas HpaII e/ou MspI adicionais. Entretanto, constatou-se nesse estudo que estas alterações genéticas, que refletem a perda de metilação em uma ou ambas as citosinas das sequências 5'-CCGG-3', não estavam exclusivamente relacionadas com os genótipos dos indivíduos anômalos.

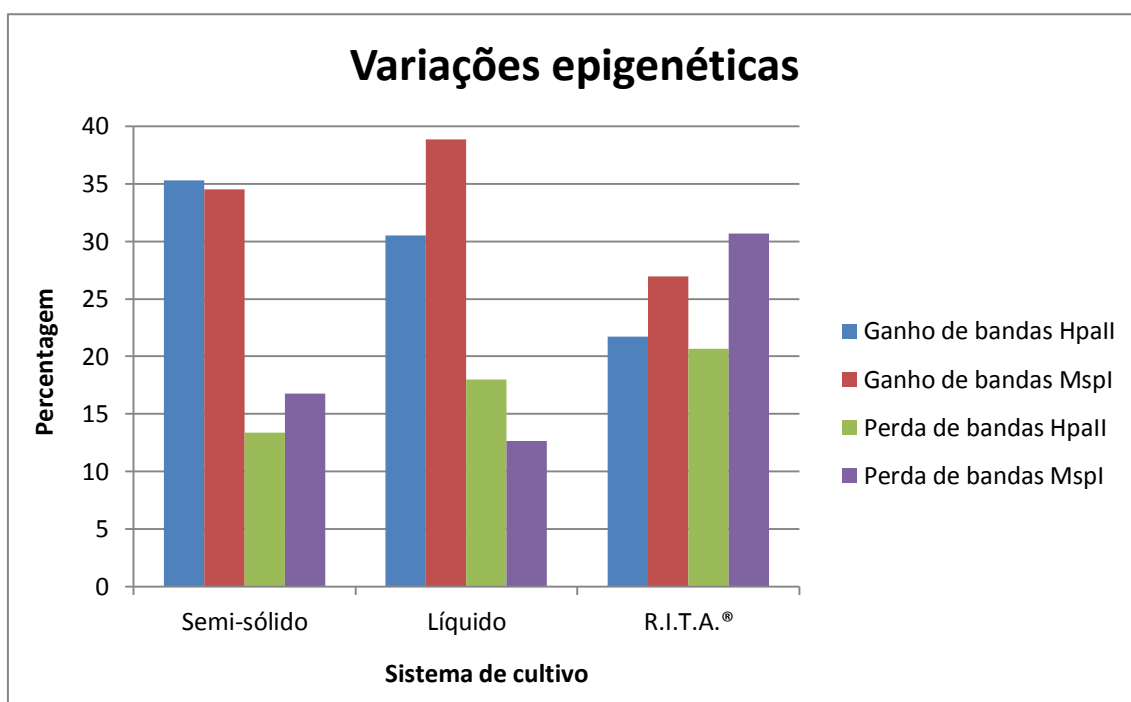


Figura 3. Variações epigenéticas observadas nos clones de dendezeiro obtidos pela embriogênese somática de folhas imaturas.

Na embriogênese somática do dendezeiro, ao utilizar a técnica dos marcadores AFLP associada ao uso de enzimas sensíveis a metilação, Lei *et al.* (2006) também verificaram que as variações epigenéticas decorrentes do cultivo *in vitro* foram causadas, de forma geral, pela perda de metilação, ganho de metilação e/ou pela alteração dos locais de metilação dentro das sequências de reconhecimento 5'-CCGG-3'. Nessa pesquisa, assim como relatado por Matthes *et al.* (2001), também foi constatado que o número de bandas polimórficas aumentou significativamente quando o produto gerado pela digestão EcoRI/HpaII foi utilizado para as ampliações. Mas, diferentemente do relatado até então, averiguou-se nesse protocolo de propagação *in vitro* de *Elaeis guineensis*, que aproximadamente 62% das alterações observadas nos indivíduos regenerantes se deram em função da hipermetilação do DNA, ou seja, pela ausência de fragmentos amplificados.

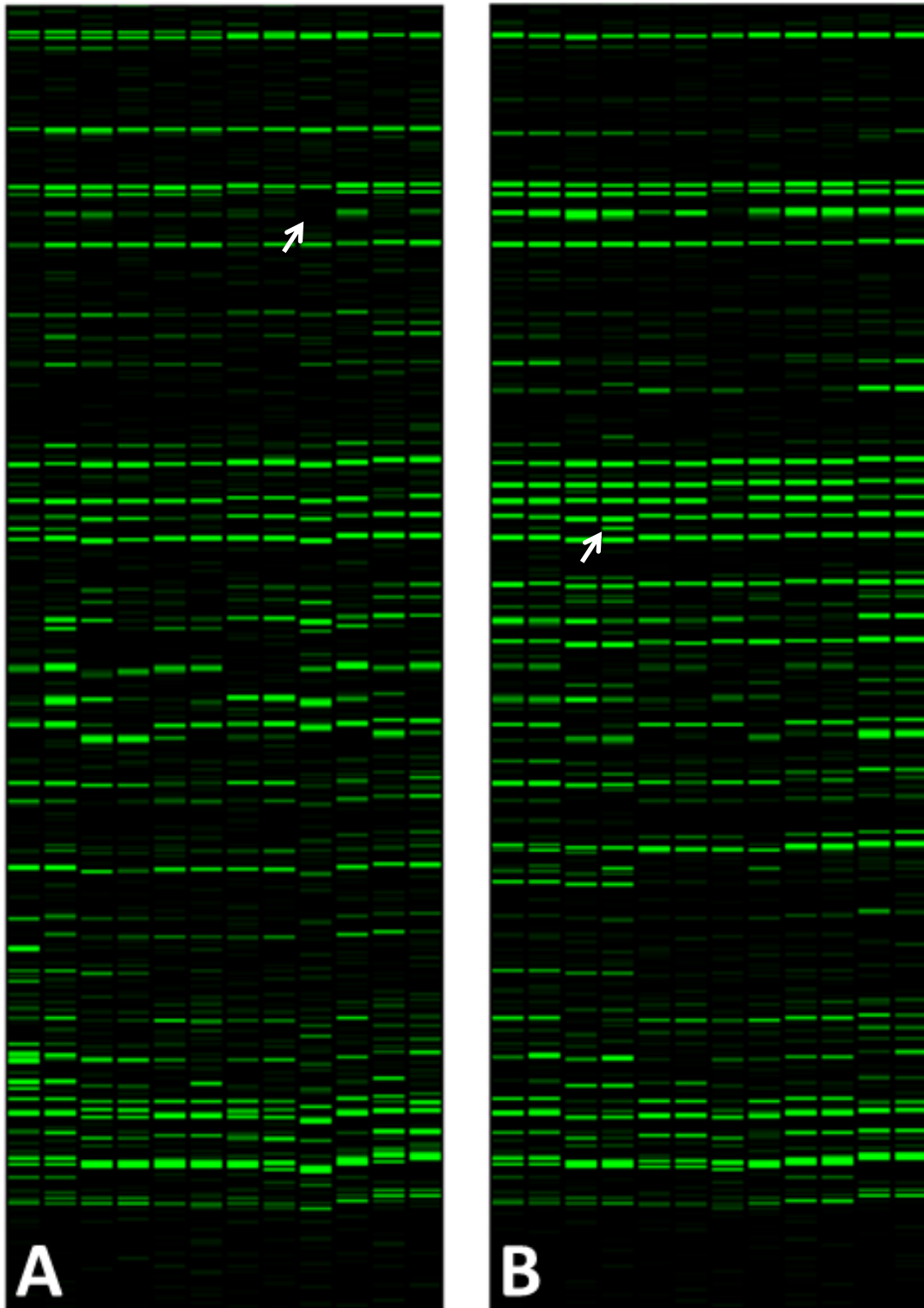


Figura 4. Análise da fidelidade epigenética de clones de dendezeiro micropropagados via embriogênese somática de folhas imaturas. **A-B)** *Primers* Eco-AGG/Hpa-TTA e Eco-AGG/Msp-TTA na amplificação do DNA dos indivíduos oriundos da multiplicação e regeneração em biorreatores R.I.T.A.[®], respectivamente (bandas entre 50 e 550 pb). Setas = perda e ganho de banda.

Porém, no trabalho de Lei *et al.* (2006) verificou-se novamente que nenhum dos polimorfismos promovidos pela cultura de tecidos do dendezeiro foi consistentemente diferente quando se comparou clones normais com clones anormais. Para os autores, estes resultados revelam que embora o processo de embriogênese somática da espécie induza diversas mudanças na metilação do DNA dos propágulos, nem todas elas estão associadas com o desenvolvimento do fenótipo envolvido (*mantled*). Segundo os mesmos, a formação deste tipo de indivíduo está provavelmente associada com alterações na metilação de locos específicos do genoma destes cultivos.

Tais resultados encontram-se de acordo com Ong-Abdullah *et al.* (2015), que ao analisar dezenas de milhares de regiões do amplo epigenoma de *Elaeis guineensis*, constataram apenas um único micro arranjo com metilação diferencial entre os clones normais e *mantleds* em todas populações amostradas. Segundo os autores, essa região encontra-se dentro do intron 5 do gene *EgDEF1*, localizado no cromossomo 12. Nessa região do genoma da espécie, verificou-se que quando ocorreu um denso processo de metilação, denominado também de bom karma, os indivíduos propagados apresentaram o desenvolvimento de flores normais. Em contrapartida, quando um processo de hipometilação foi observado em dos retrotransposons desse sítio (mau karma), constatou-se nestes indivíduos o aparecimento de flores envolvidas (*mantleds*).

Verifica-se então com os dados obtidos no presente estudo que além de terem proporcionado as culturas com os menores índices de variação epigenética, o processo de multiplicação e regeneração em biorreatores R.I.T.A.[®] também foi responsável por produzir os propágulos que apresentaram os percentuais de hipometilação mais reduzidos, 48% da alteração epigenética total (Figura 3), fazendo com que o epigenoma destes indivíduos apresentasse uma percentagem ligeiramente maior de metilação (Tabela 6). Assim, demonstra-se ainda mais que o recipiente de imersão temporária automatizado (R.I.T.A.[®]) foi o sistema de cultivo que proporcionou na embriogênese somática de folhas imaturas de dendezeiro, os regenerantes com as menores chances de desenvolvimento do fenótipo *mantled*.

Tabela 6. Frequência (%) dos diferentes estados de metilação nos 203 locos sujeitos a esta alteração química nos indivíduos provenientes dos diferentes sistemas de cultivo.

Estado de metilação (padrão de bandas)	Sistema de cultivo		
	Sólido	Líquido	R.I.T.A. [®]
Não metilado (Hpa+/Msp+)	18,9	18,1	14,1
Hemimetilado (Hpa+/Msp-)	35,8	35,8	36,4
Metilado na citosina interna (Hpa-/Msp+)	21,9	25,9	22,7
Completamente metilado (Hpa-/Msp-)	23,4	20,2	26,8

Para Smulders & de Klerk (2011), estes resultados se devem provavelmente ao fato dos sistemas de cultivo baseados na utilização dos meios semi-sólidos e líquidos, por promoverem um contato permanente do meio nutritivo com os explante, além de terem acarretado uma maior perturbação no balanço hídrico dos cultivos, ocasionaram também um contato mais prolongado dos explantes com a auxina utilizada na etapa de multiplicação (2,4-D). Com isso, segundo os autores, estes tecidos foram submetidos a condições de estresse mais elevadas, o que consequentemente favoreceu o desenvolvimento dessas alterações em seus epigenomas.

Agora, para a complementação deste protocolo de embriogênese somática de folhas imaturas de *Elaeis guineensis* em biorreatores R.I.T.A.[®], sugere-se que as plantas obtidas por este sistema de cultivo, sejam avaliadas ainda quanto ao seu desenvolvimento vegetativo e reprodutivo, para confirmar se tais variações epigenéticas serão expressas em seus fenótipos. Caso sejam, recomenda-se também analisar se tais modificações genômicas irão afetar suas características de interesse agronômicas, principalmente aquelas relacionadas com a produtividade de óleo, além de verificar se as mesmas poderão ser de alguma forma, aproveitadas em programas de melhoramento genético da espécie. Ademais, aconselha-se que estas culturas sejam analisadas ainda quanto aos níveis de metilação de seus genes *EgDEF1*, o que possibilitará prever de forma mais precisa se as mesmas poderão apresentar na maturidade o desenvolvimento de flores envolvidas.

4. CONCLUSÕES

Na embriogênese somática de folhas imaturas de plantas adultas de dendezeiros, não foi constatada a ocorrência de variações na sequência do DNA genômico dos propágulos produzidos, independentemente do sistema de cultivo utilizado. Porém, com o emprego de biorreatores de imersão temporária modelo R.I.T.A.[®], observa-se a redução dos índices de alteração do padrão de metilação do epigenoma dos indivíduos regenerados, além da diminuição das taxas de ocorrência de hipometilação do DNA das culturas propagadas. Com isso, verificam-se nas brotações oriundas do processo de multiplicação e regeneração em sistemas de imersão temporária automatizados (R.I.T.A.[®]), as menores chances de desenvolvimento do fenótipo *mantled*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARIF, I. A.; BAKIR, M. A.; KHAN, H. A.; FARHAN, A. H. A.; HOMAIDAN, A. A. A.; BAHKALI, A. H.; SADOON, M. A.; SHOBRAK, M. A brief review of molecular techniques to assess plant diversity. **International Journal of Molecular Sciences**, v.11, p.2079-2096, 2010.

BAIRU, M. W.; AREMU, A. Q.; STADEN, J. V. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. **Plant Growth Regulation**, v.63, p.147-173, 2011.

BALZON, T. A.; LUIZ, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. New approaches to improve the efficiency of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) from mature zygotic embryos. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v.49, p.41-50, 2013.

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

DOYLE, J.; DOYLE, J. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.

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

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

HANSEN, S.B.; PADFIELD, R.; SYAYUTI, K.; EVERS, S.; ZAKARIAH, Z.; MASTURA, S. Trends in global palm oil sustainability research. **Journal of Cleaner Production**, v.100, p.140-149, 2015.

JALIGOT, E.; ADLER, S.; DEBLADIS, E.; BEULE, T.; RICHAUD, F.; ILBERT, P.; FINNEGAN, E. J.; RIVAL, A. Epigenetic imbalance and the floral developmental abnormality of the *in vitro*-regenerated oil palm *Elaeis guineensis*. **Annals of Botany**, v.108, p.1453-1462, 2011.

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

JOUANNIC, S.; LARTAUD, M.; HERVÉ, J.; COLLIN, M.; ORIEUX, Y.; VERDEIL, J. L.; TREGAR, J. W. The shoot apical meristem of oil palm (*Elaeis guineensis*; *Arecaceae*): developmental progression and dynamics. **Annals of Botany**, v.108, p.1477-1487, 2011.

KUBIS, S. E.; CASTILHO, A. M. M. F.; VERSHININ, A. V.; HESLOP-HARRISON, J. S. Retroelements, transposons and methylation status in the

genome of oil palm (*Elaeis guineensis*) and the relationship to somaclonal variation. **Plant Molecular Biology**, v, 52, p.69-79, 2003.

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

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

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

MENÉNDEZ-YUFFÁ, A.; BARRY-ETIENNE, D.; BERTRAND, B.; GEORGET, F.; ETIENNE, H. A comparative analysis of the development and quality of nursery plants derived from somatic embryogenesis and from seedlings for large-scale propagation of coffee (*Coffea arabica* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.102, p.297-207, 2010.

MGBEZE, G.C.; ISERHIENRHIEN A. Somaclonal variation associated with oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) clonal propagation: A review. **African Journal of Biotechnology**, v.13, p.989-997, 2014.

MUKHERJEE, I.; SOVACOO, B.K. Palm oil-based biofuels and sustainability in southeast Asia: A review of Indonesia, Malaysia, and Thailand. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.37, p.1-12, 2014.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

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

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

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

REINERT, J. Morphogenese und ihre kontrolle an geweberkulturen aus karotten. **Naturwissenschaften**, v.45, p.344-345, 1958.

REZENDE, J. C.; FERREIRA, E. A.; PASQUAL, M.; VILLA, F.; BOTELHO, C. E.; CARVALHO, S. P. Development of *Coffea arabica* L. seedlings

obtained from direct somatic embryogenesis. **Coffea Science**, v.3, p.30-37, 2008.

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

SANPUTAWONG, S.; TE-CHATO, S. Analysis of somaclonal variation of callus, somatic embryo and plant regeneration of *in vitro* oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Journal of Agricultural Technology**, v.7, p.531-545, 2011.

SMULDERS, M. J. M.; De KLERK, G. J. Epigenetics in plant tissue culture. **Plant growth regulation**, v.63, p.137-146, 2011.

SOH, A. C.; WONG, G.; TAN, C. C.; CHEW, P. S.; CHONG, S. P.; 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.; KROHN, N. G.; DANTAS, A. C. M.; STEFENON, V. M.; CLEMENT, C. R.; GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis in peach palm using the thin cell layer technique: induction, morpho-histological aspects and AFLP analysis of somaclonal variation. **Annals of Botany**, v.100, p.1-11, 2007.

THAWARO, S.; TE-CHATO, S. Application of molecular markers in the hybrid verification and assessment of somaclonal variation from oil palm propagated *in vitro*. **ScienceAsia**, v.35, p.142-149, 2009.

WAHID, M. B.; ABDULLAH, S. N. A.; HENSON, I. E. Oil palm - Achievements and potential. **Plant Production Science**, v.8, p.288-297, 2005.

WIENDI, N. M. A.; CONSTANTIN, M.; WACHYAR, A. Study of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq) *in vitro* embryogenesis using young leaves explants. **Journal of Tropical Crop Science**, v.2, p.5-9, 2015.

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

YOU, X. L.; TAN, X.; DAI, J. L.; LI, J. H.; CHOI, Y. E. Large-scale somatic embryogenesis and regeneration of *Panax notoginseng*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.108, p.333-338, 2012.

CAPÍTULO 3

Análise dos eventos morfoanatômicos envolvidos durante a embriogênese somática do dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) em sistema de imersão temporária (R.I.T.A.[®])

RESUMO

O objetivo do trabalho foi caracterizar morfoanatomicamente as etapas de multiplicação e regeneração, durante a embriogênese somática de folhas imaturas de dendezeiro, realizada em biorreatores de imersão temporária modelo R.I.T.A.[®]. Para tanto, foram analisados e caracterizados calos primários, embriogênicos e pró-embriogênicos, calos contendo embriões somáticos diferenciados, embriões somáticos globulares e torpedos, além de embriões zigóticos de frutos maduros. Verificou-se que calos primários são constituídos por células meristemáticas apenas em sua região mais interna, enquanto que calos embriogênicos são compostos inteiramente por este padrão celular. A partir do desenvolvimento destes cultivos foi verificada a formação de embriões sem conexão com os tecidos de origem, constituídos inicialmente pela protoderme e pelo meristema fundamental (estádio globular). Com a maturação destes propágulos (estádio torpedo), observou-se também a presença de regiões procambiais dispersas pelo meristema fundamental, característica anatômica também constatada em embriões zigóticos de frutos maduros. Tais resultados demonstram que o sistema de cultivo empregado proporciona a obtenção de embriões somáticos aptos para a regeneração de plantas.

Palavras-chave: Arecaceae; micropropagação; morfogênese; ontogênese; histologia.

CHAPTER 3

Analysis of the morphoanatomical events involved during somatic embryogenesis of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in temporary immersion system (R.I.T.A.[®])

ABSTRACT

The aim of this study was to characterize morpho-anatomically the stages of multiplication and regeneration involved during somatic embryogenesis of oil palm from immature leaves of adult plants, carried out in R.I.T.A.[®] bioreactors. It were analyzed and characterized primary calli, embryogenic and pro-embryogenic calli, calli with differentiated somatic embryos, globular and torpedo somatic embryos, as well as zygotic embryos. It was found that primary calli are composed of meristematic cells only in its most inner region, while embryogenic calli are composed entirely by this pattern of cell. From the development of these structures, the formation of somatic embryos without vascular connection with the original tissue, consisting initially by protoderm and fundamental meristem (globular stage) was observed. With the progression from globular to torpedo stage, the embryos presented procambial regions dispersed throughout the fundamental meristem, an anatomical feature also found in zygotic embryos. These results demonstrate that the culture system employed provides somatic embryos suitable for plant regeneration.

Key words: Arecaceae; micropropagation; morphogenesis; ontogenesis; histology.

1. INTRODUÇÃO

O dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) é uma planta de origem africana (Guiné-Bissau) que se destaca no cenário mundial por possuir elevada produção de óleo vegetal por unidade de área, com rendimento que pode atingir até 7 toneladas por hectare/ano. Além disso, por ser uma espécie perene e de cultivo exclusivamente manual, o dendezeiro ainda se destaca por contribuir com o desenvolvimento social, gerando empregos fixos durante o ano todo (Hansen *et al.*, 2015).

No entanto, por se tratar de uma cultura alógama propagada exclusivamente via sementes, a dendeicultura tem como inconveniente a formação de plantios heterogêneos, causando desuniformidades na produção, limitações na distribuição de genótipos superiores, além de promover dificuldades na realização de práticas de manejo (Wahid *et al.*, 2005).

Assim, a possibilidade de produzir plantas geneticamente idênticas, a partir de indivíduos elite já fenotipados em campo, poderia aumentar significativamente a rentabilidade da cultura. Mas, em função da natureza morfoanatômica e fisiológica do dendezeiro, sua propagação clonal em escala só é possível por meio da embriogênese somática (Jouannic *et al.*, 2011; Soh *et al.*, 2011).

A embriogênese somática é o meio pelo qual células haploides ou somáticas se desenvolvem a partir de uma série ordenada de estádios embriogênicos característicos, sem que ocorra a fusão de gametas. A partir desse processo, são formadas estruturas bipolares sem conexão vascular com os tecidos parentais, que se assemelham muito a embriões zigóticos (Reinert, 1958; Williams & Maheswaran, 1986).

Em função das vantagens oferecidas pela utilização de clones superiores, diversos protocolos de embriogênese somática de dendezeiro foram desenvolvidos (Rabéchault & Martin, 1976; Corley *et al.*, 1977; Pannetier *et al.*, 1981; Duval *et al.*, 1988; Teixeira *et al.*, 1995; Rival *et al.*, 1997; Choi *et al.*, 2008; Scherwinski-Pereira *et al.*, 2010; Balzon *et al.*, 2013; Constantin *et al.*, 2015; Jayanthi *et al.*, 2015; Wiendi *et al.*, 2015).

No entanto, o domínio e o entendimento da embriogênese somática da espécie ainda não é uma realidade. Até o momento, os protocolos desenvolvidos para esta cultura ainda apresentam uma série de limitações, como por exemplo, a formação de calos com baixo potencial morfogênico, a falta de sincronização do desenvolvimento embriogênico, o baixo índice de conversão dos embriões somáticos e a regeneração de plantas incompletas (Soh *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2012; Thuzar *et al.*, 2012; Pádua *et al.*, 2013; Gomes *et al.*, 2015).

Além disso, na embriogênese somática do dendezeiro a ocorrência de algumas anomalias morfoanatômicas, tais como, a fusão dos embriões, o subdesenvolvimento dos meristemas apicais e a perda da bipolaridade dos propágulos, também vem dificultando o estabelecimento de metodologias eficazes para a propagação clonal de indivíduos elite da espécie (Habib *et al.*, 2012).

Dessa forma, o acompanhamento morfológico e anatômico da embriogênese somática do dendezeiro torna-se essencial para melhorar a compreensão do processo, selecionar tratamentos que minimizem ao máximo a ocorrência de anomalias morfoanatômicas e, conseqüentemente, potencializar os protocolos desenvolvidos (Schwendiman *et al.*, 1990; Silva *et al.*, 2014; Moyo *et al.*, 2015).

Diante desse contexto, o objetivo do trabalho foi caracterizar morfoanatomicamente os diferentes estádios de desenvolvimento obtidos entre as etapas de multiplicação e regeneração durante a embriogênese somática de folhas imaturas de dendezeiro, realizada em biorreatores de imersão temporária modelo R.I.T.A.[®].

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local de realização do experimento

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCT-II) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, situado em Brasília – DF, Brasil.

2.2 Material vegetal

Para a indução da embriogênese somática foram utilizadas como material vegetal, folhas imaturas e ainda não expandidas (palmito), oriundas de plantas adultas de dendzeiros variedade B35-1733, fornecidas pelo Programa de Melhoramento Genético de Dendzeiro da Embrapa Amazônia Ocidental, localizado na municipalidade de Rio Preto da Eva – AM, Brasil.

2.3 Obtenção dos explantes

Para a obtenção dos explantes, segmentos foliares estéreis de aproximadamente 1 cm² foram inoculados em placas de Petri (15 x 90 mm), contendo 25 mL de meio de cultura composto pela constituição salina e vitaminas de MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com 450 µM de Picloram (ácido aminotricloropicolínico), 0,5 g.L⁻¹ de caseína hidrolisada, 0,5 g.L⁻¹ de glutamina, 2,5 g.L⁻¹ de carvão ativado e 30 g.L⁻¹ de sacarose (Balzon *et al.*, 2013). Nesse meio, o pH foi ajustado para 5,7 ± 0,1, seguido da adição de 2,5 g.L⁻¹ de Phytigel, antes da esterilização a 121°C e 1,3 atm por 20 minutos. Então, o material vegetal foi cultivado por até oito subcultivos de 30 dias para a obtenção de calos, sob condição de obscuridade.

Em seguida, os calos obtidos na etapa de indução foram inoculados em sistemas de imersão temporária automatizados (R.I.T.A.[®]) contendo 200 mL de meio de cultivo líquido. Nessa etapa, o meio nutritivo foi composto pelos sais e vitaminas de MS, acrescido de 4,5 µM de 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético), 0,5 µM de ANA (ácido naftalenoacético), 0,5 g.L⁻¹ de glutamina, 0,5 g.L⁻¹ de caseína hidrolisada, 0,1 g.L⁻¹ de cisteína, 0,1 g.L⁻¹ de asparagina, 30 g.L⁻¹ de

sacarose e pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$. Nessas condições, os propágulos foram cultivados por cinco subcultivos sucessivos de 30 dias cada para a proliferação dos massivos celulares.

Posteriormente, calos provenientes da fase de multiplicação foram inoculados em frascos de vidro de 250 mL de capacidade, contendo 40 mL de meio nutritivo de MS, suplementado com $12,3 \mu\text{M}$ de 2-iP (isopenteniladenina), $0,54 \mu\text{M}$ de ANA, $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de glutamina, $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de caseína hidrolisada, $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ de cisteína, $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ de asparagina, 30 g.L^{-1} de sacarose, $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ de Phytigel e pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$. Nessa etapa, os calos foram cultivados por até seis subcultivos de 30 dias para a diferenciação de embriões somáticos.

Por fim, os embriões somáticos provenientes da etapa de diferenciação foram inoculados em biorreatores R.I.T.A.[®], contendo 200 mL de meio nutritivo de MS isento de reguladores de crescimento, suplementado de 30 g.L^{-1} de sacarose, $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ de carvão ativado e pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$. Os embriões somáticos foram então cultivados por mais cinco subcultivos de 30 dias para completar seu desenvolvimento e regenerar novas plantas.

Durante todo o desenvolvimento embriogênico, as culturas foram acondicionadas em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e radiação luminosa de $52 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas LED (Philips[®] - Green Power 20W 60Hz).

2.4 Caracterização morfoanatômica dos estádios de desenvolvimento

Para caracterização morfoanatômica dos estádios de desenvolvimento obtidos entre as etapas de multiplicação e regeneração, calos primários, calos embriogênicos, calos pró-embriogênicos, calos contendo embriões somáticos diferenciados, além de embriões somáticos em estágio globular e torpedo, foram analisados morfoanatomicamente segundo Silva *et al.* (2014). Nesse estudo, foram analisados também embriões zigóticos de frutos maduros, para comparação de seu perfil morfoanatômico com dos embriões somáticos obtidos.

Para tanto, cinco amostras de cada estágio de desenvolvimento foram inicialmente visualizadas e analisadas sob lupa estereomicroscópica com sistema de captura de imagens (Leica[®] EZ4 HD), onde seu formato, aspecto, consistência e coloração foram avaliados.

Em seguida, as amostras foram inoculadas em microtubos de 2 mL de capacidade e submetidas à fixação em FAA 50% (formaldeído 37-40%, ácido acético glacial e álcool etílico 50% 1:1:18, v/v) por 48 horas. Após a fixação, as amostras foram desidratadas em série alcoólica crescente (50-100%) e então infiltradas e incluídas em historresina (Leica[®]). Posteriormente, cortes seriados transversais e longitudinais de até 10 µm de espessura foram obtidos em micrótomo rotatório manual. Os cortes obtidos foram então distendidos e aderidos a lâminas microscópicas com o auxílio de uma placa aquecida a 40°C. Por fim, os cortes anatômicos foram corados com azul de Toluidina (O'Brien *et al.*, 1964) e então visualizados e analisados sob fotomicroscópio óptico com sistema de captura de imagens (Leica[®] DM750).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na etapa de multiplicação foram utilizados inicialmente calos primários obtidos a partir de segmentos foliares cultivados por aproximadamente 240 dias em meio de indução. Morfologicamente, os calos primários utilizados nessa fase do cultivo foram caracterizados por apresentarem preferencialmente formato alongado, aspecto compacto, consistência ligeiramente aquosa e coloração bege amarronzada (Figura 1-A).

As análises anatômicas evidenciaram nestes propágulos a presença de três diferentes regiões celulares. Na região periférica do calo foram observadas células de revestimento com formato alongado, com amplos espaços intercelulares e vacúolos bem desenvolvidos. Na região mediana foram verificados setores com células parenquimáticas relativamente grandes e vacuoladas. Por fim, na região interna destas formações constatou-se a presença de uma zona meristemática, caracterizada por apresentar células pequenas, isodiamétricas, com citoplasma denso, parede celular mais estreita e alta razão núcleo citoplasma (Figura 1-B-C-D).

Na embriogênese somática de *Elaeis guineensis* realizada por meio de embriões zigóticos de frutos maduros, Balzon *et al.* (2013) também evidenciaram, a partir de secções histológicas, a proliferação de uma zona meristemática na parte mais interna dos calos primários, região também constituída por células pequenas, com formato isodiamétrico, citoplasma denso e núcleo volumoso.

Resultados semelhantes também foram relatados por Scherwinski-Pereira *et al.* (2010) e Thuzar *et al.* (2012), que na embriogênese somática de dendezeiro via TCL (*thin cell layer*), também evidenciaram, a partir de cortes anatômicos de calos primários, a existência de uma zona meristemática constituída por células com núcleo em destaque e citoplasma denso, bem como, a presença de células parenquimáticas e células de revestimento do calo.

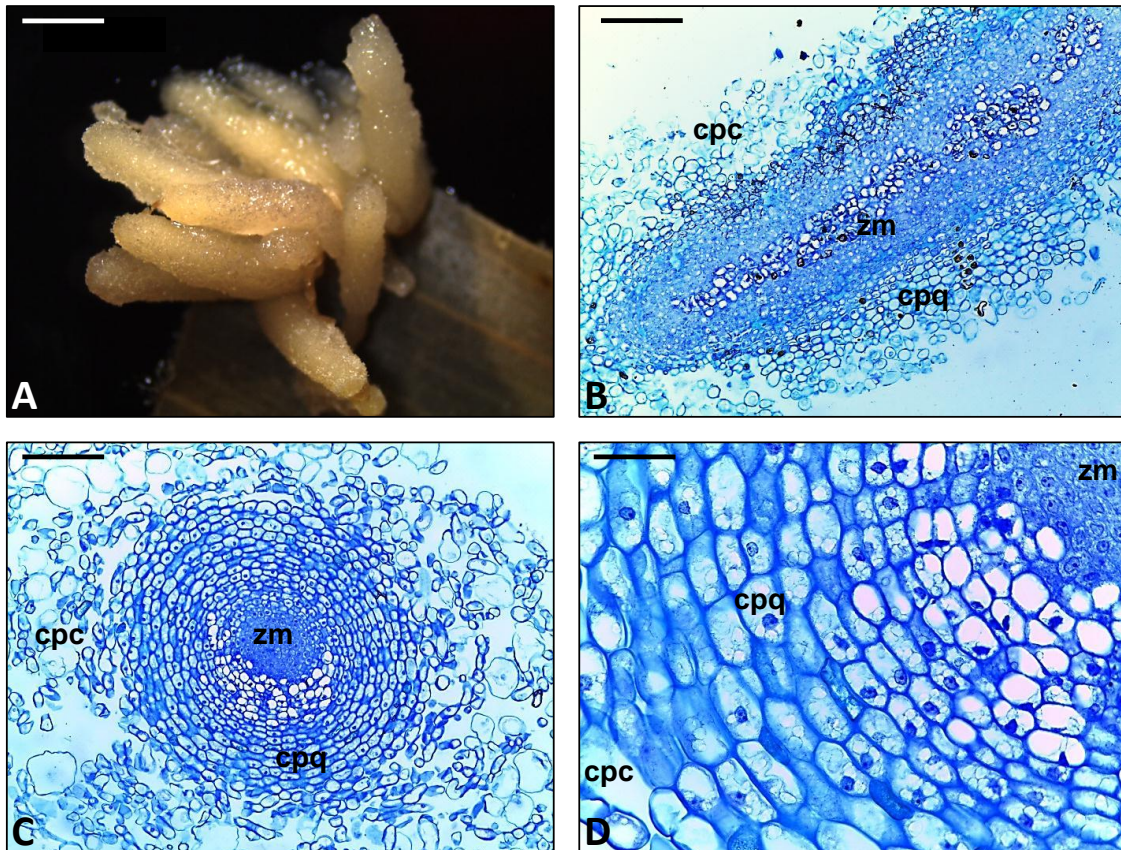


Figura 1. Aspectos morfológicos e anatômicos de calos primários de dendezeiro, obtidos de folhas imaturas de plantas adultas, utilizados no início da etapa de multiplicação. **A)** Morfologia externa; **B-C-D)** Secções anatômicas. Abreviações: cpc = células periféricas do calo; cpq = células parenquimáticas; zm = zona meristemática. Barras: A = 2 mm; B-C = 0,2 mm; D = 0,05 mm.

Ainda na etapa de multiplicação, embora com menor frequência, também foram observados calos com características morfológicas diferentes das observadas nos calos primários. Estes calos, denominados de calos embriogênicos, também obtidos a partir de segmentos foliares cultivados por aproximadamente 240 dias em meio de indução, foram caracterizados morfológicamente por apresentar aspecto friável, consistência menos aquosa e coloração amarelada (Figura 2-A).

Com as secções anatômicas foi possível evidenciar que este tipo de calo, diferentemente do calo primário, é constituído inteiramente por células pequenas, isodiamétricas, com citoplasma denso, parede celular mais estreita

e núcleo evidente, ou seja, por células meristemáticas. A análise estrutural destes propágulos evidenciou ainda que algumas das células localizadas em sua borda apresentam dois nucléolos em um mesmo núcleo, evidenciando assim, a citocinese ainda não concluída no processo de divisão celular (Figura 2-B-C-D).

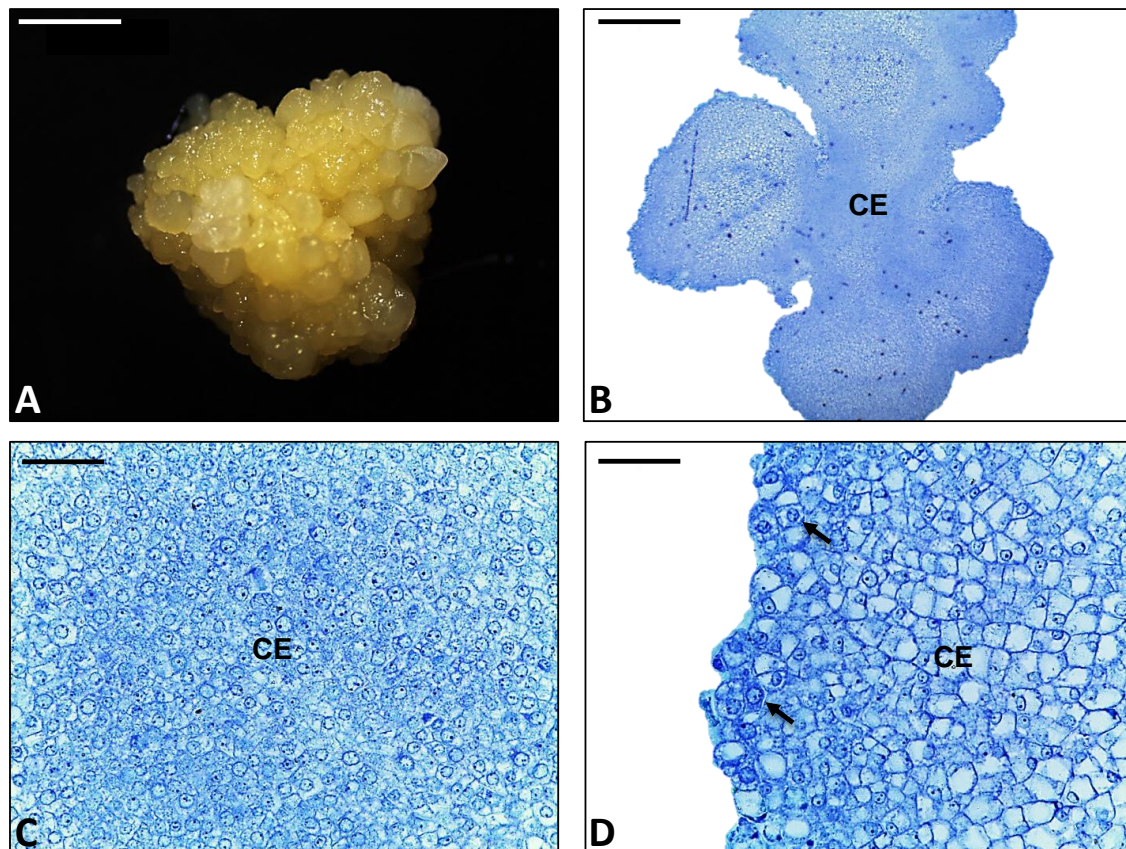


Figura 2. Aspectos morfológicos e anatômicos de calos embriogênicos de dendezeiro utilizados no início da etapa de multiplicação. **A)** Morfologia externa; **B-C-D)** Secções anatômicas. Abreviações: CE = calo embriogênico; setas = células em processo de divisão. Barras: A = 2 mm; B = 0,5 mm; C-D = 0,05 mm.

No estudo histológico da embriogênese somática de *Elaeis guineensis* Schwendiman *et al.* (1988) também evidenciaram que calos embriogênicos, assim como verificado no presente trabalho, são compostos basicamente por células com características meristemáticas, ou seja, células pequenas,

isodiamétricas, com citoplasma denso, núcleo evidente e parede celular mais estreita.

Durante a caracterização morfoanatômica de massas pró-embriogênicas de dendezeiro, induzidas a partir da embriogênese somática de explantes foliares, Pádua *et al.* (2013) também relataram a existência de diferentes tipos de calo. Nesse estudo, as secções histológicas realizadas nos calos com maior potencial embriogênico, também evidenciaram que esses massivos celulares são constituídos, em sua maioria, por células pequenas, isodiamétricas, com citoplasma denso, nucléolo proeminente, com pouco espaçamento intercelular e alta razão núcleo citoplasma, padrão celular característico de aglomerados meristemáticos.

Na embriogênese somática de *Elaeis guineensis*, Besse *et al.* (1992) também verificaram a formação de um calo primário caracteristicamente compacto, organizado e nodular, além de um calo tipicamente embriogênico, caracterizado por apresentar aspecto friável, coloração esbranquiçada e rápido crescimento. No entanto, diferentemente do observado no presente trabalho, verificou-se na análise anatômica desse último propágulo que os mesmos eram constituídos por pequenos agrupamentos de células meristemáticas, associados a um número mais elevado de células alargadas e vacuoladas. Além disso, verificou-se também nesse estudo que esses calos de crescimento rápido, por manterem-se em multiplicação intensa por longos períodos de tempo, estiveram diretamente envolvidos na formação de indivíduos *mantled*. Assim, para se evitar o aparecimento de tais anomalias foi sugerido por estes autores que estes calos, assim como realizado no presente protocolo, não sejam multiplicados por muitos subcultivos.

Após a etapa de multiplicação, os calos primários propagados foram então cultivados por até 180 dias em meio de diferenciação. Ao final desse processo, constatou-se a presença de uma pequena quantidade de calos primários com formação de embriões somáticos. Os embriões somáticos originados a partir destes propágulos foram caracterizados morfológicamente por apresentar aspecto opaco, coloração esbranquiçada, consistência pouco aquosa e formato arredondado (Figura 3-A).

Os cortes anatômicos evidenciaram nestes cultivos a diferenciação de embriões somáticos em estágio inicial de desenvolvimento (globular), constituídos por células meristemáticas, não conectadas às células do explante de origem, completamente delimitadas por uma protoderme característica (Figura 3-B-C-D).

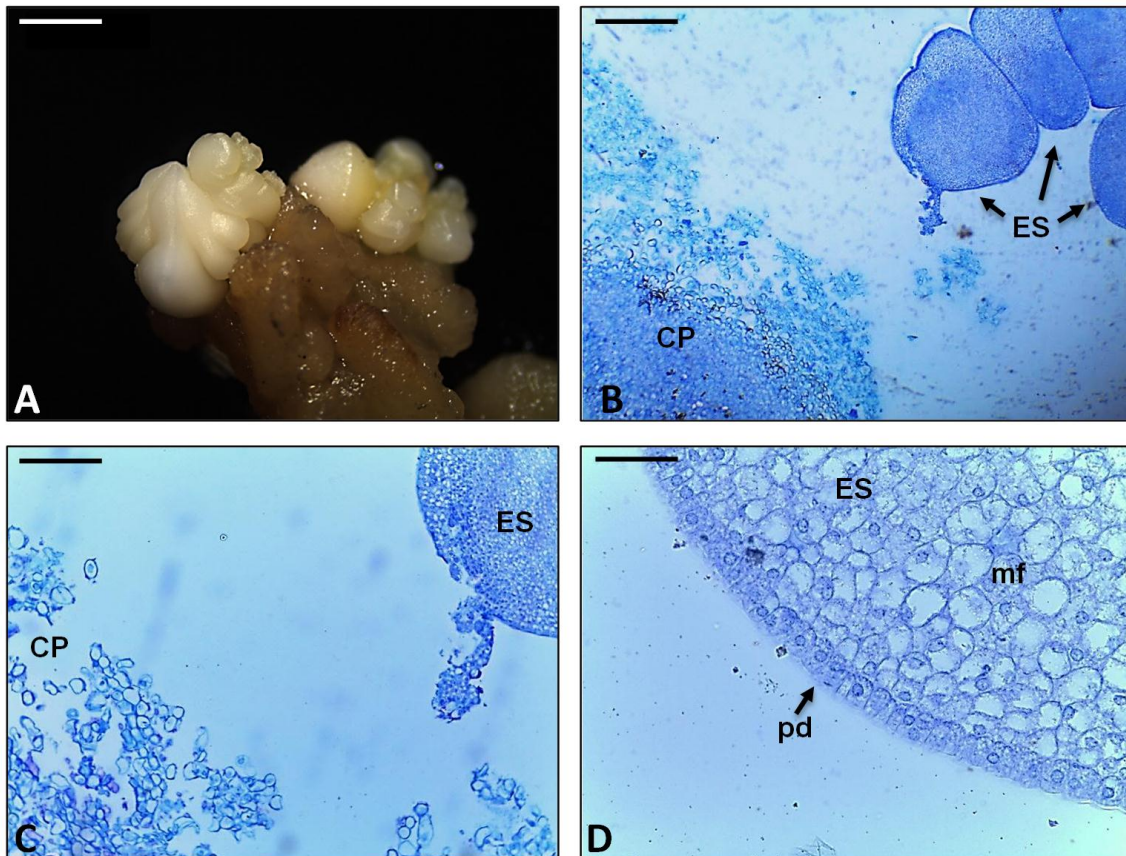


Figura 3. Aspectos morfológicos e anatômicos de calos de dendezeiro com formação de embriões somáticos obtidos após 180 dias de cultivo em meio de diferenciação. **A)** Morfologia externa; **B-C-D)** Secções anatômicas. Abreviações: CP = calo primário; ES = embrião somático; mf = meristema fundamental; pd = protoderme. Barras: A = 2 mm; B = 0,5 mm; C = 0,2 mm; D = 0,05 mm.

No estudo da origem e desenvolvimento de embriões de *Elaeis guineensis*, obtidos pela embriogênese somática de embriões zigóticos, Kanchanapoom & Domuoas (1999) também observaram a partir do cultivo de

calos primários em meio de diferenciação, a formação de embriões somáticos sem conexão com os tecidos maternos. Para estes autores, o isolamento físico dos embriões somáticos, demonstrado por sua interdependência com os tecidos parentais, evidencia uma formação unicelular, ou seja, esses propágulos originam-se a partir de divisões assimétricas de uma única célula meristemática.

Resultados semelhantes aos obtidos por Silva *et al.* (2014), no estudo dos eventos de histodiferenciação envolvidos na aquisição e desenvolvimento da embriogênese somática de dendezeiro realizada via embriões zigóticos de frutos maduros, no qual também foi constatado que a formação dos embriões somáticos teve origem unicelular, fato demonstrado também pelo isolamento físico destes cultivos.

Por outro lado, na embriogênese somática de embriões zigóticos de *Euterpe oleracea*, Scherwinski-Pereira *et al.* (2012) observaram que a formação dos embriões somáticos se deu pela via multicelular. Nessa espécie a formação dos embriões somáticos iniciou-se com a proliferação das células meristemáticas da região periférica dos cultivos, seguida pela diferenciação e invaginação da protoderme. Ao final desse processo, células semelhantes ao suspensor ligavam os embriões somáticos aos tecidos do explante de origem.

Já na embriogênese somática de *Bactris gasipaes* via embriões zigóticos, Steinmacher *et al.* (2011) não constataram a presença de um tecido semelhante ao suspensor ligando os embriões somáticos aos seus tecidos maternos. No entanto, foi verificado por estes autores que os embriões somáticos apresentavam uma ampla área basal fundida com o tecido parental, demonstrando assim, que a formação destes propágulos também se deu pela via multicelular.

Durante esse período do cultivo, também foi observado no bordo dos calos embriogênicos o aparecimento de regiões levemente esbranquiçadas, com aspecto ligeiramente translúcido, constituídas por aglomerados de estruturas arredondadas (Figura 4-A).

As secções anatômicas evidenciaram nessa fase da micropropagação o surgimento de pequenos agrupamentos celulares em meio às células meristemáticas da periferia dos calos embriogênicos, indicando assim, o início da formação de proembriões somáticos. Nessa análise, verificou-se que os proembriões somáticos apresentavam-se individualizados por meio de um aparente espessamento da parede celular, ocasionado provavelmente em decorrência da dissolução da lamela média (Figura 4-B-C-D).

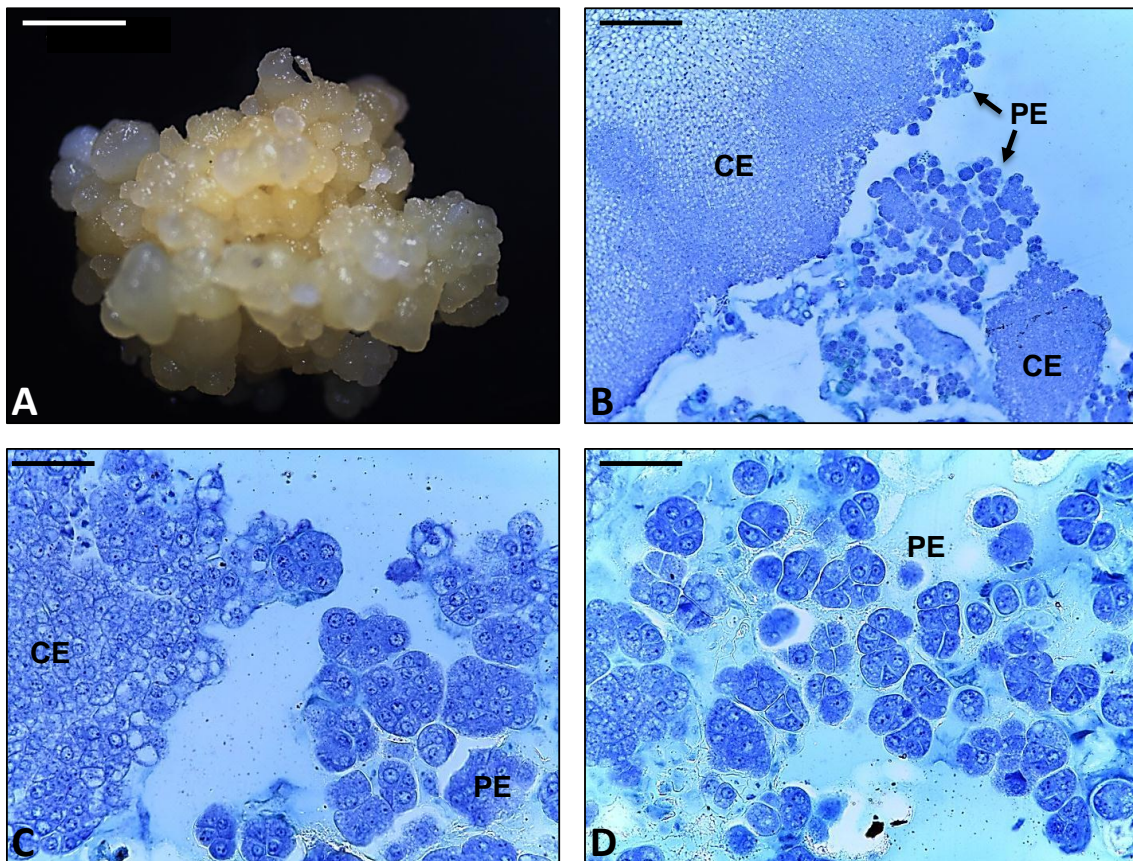


Figura 4. Aspectos morfológicos e anatômicos de calos embriogênicos de dendzeiro com formação de proembriões obtidos após cerca de 90 dias de cultivo em meio de diferenciação. **A)** Morfologia externa; **B-C-D)** Secções anatômicas. Abreviações: CE = calo primário; PE = proembriões. Barras: A = 2 mm; B = 0,2 mm; C-D = 0,05 mm.

Tais resultados corroboram Schwendiman *et al.* (1988), Thuzar *et al.* (2012) e Angelo *et al.* (2013), que no estudo histológico da embriogênese

somática de *Elaeis guineensis*, também observaram a formação de proembriões somáticos a partir do isolamento físico de células meristemáticas oriundas das massas embriogênicas em processo de diferenciação. Em *Phoenix dactylifera*, Davoodi *et al.* (2002) também verificaram no estudo dos aspectos morfológicos e anatômicos envolvidos no desenvolvimento da embriogênese somática, que a formação de proembriões somáticos ocorreu a partir do isolamento físico de células meristemáticas presentes no corpo dos propágulos em diferenciação.

Segundo Verdeil *et al.* (2001), o isolamento físico das células meristemáticas para a formação de proembriões somáticos pode ocorrer de diferentes maneiras, tais como, pelo espessamento da parede celular em função da dissolução da lamela média, pelo fechamento dos plasmodesmas por meio da deposição de calose, pelo acúmulo de substâncias fenólicas e lipofílicas nas paredes celulares, bem como, pelo desenvolvimento de células de barreira que separam os proembriões somáticos dos tecidos parentais.

De acordo com Moura *et al.* (2008), esse isolamento físico que os proembriões somáticos adquirem durante o decorrer do processo de diferenciação é o responsável por proporcionar às células meristemáticas o isolamento necessário para promover sua reprogramação morfogênica e induzir o início de seu desenvolvimento embriogênico.

Como consequência desse processo, verificou-se ao final dos 180 dias de cultivo em meio de diferenciação, o desenvolvimento dos proembriões somáticos em embriões somáticos em praticamente todos os calos embriogênicos cultivados. Os embriões somáticos originados a partir dos calos embriogênicos também foram caracterizados morfológicamente por apresentar aspecto opaco, coloração esbranquiçada e consistência pouco aquosa. No entanto, verificou-se que quando os embriões somáticos originaram-se a partir de calos embriogênicos os mesmos apresentaram, na maior parte dos casos, formato levemente alongado (Figura 5-A).

Os cortes histológicos evidenciaram nessa fase da embriogênese somática do dendezeiro o início da diferenciação de embriões somáticos globulares em estágio avançado de desenvolvimento, caracterizados por

apresentar células meristemáticas completamente delimitadas por uma protoderme característica, no entanto, ainda sem a diferenciação do procâmbio (Figura 5-B-C-D).

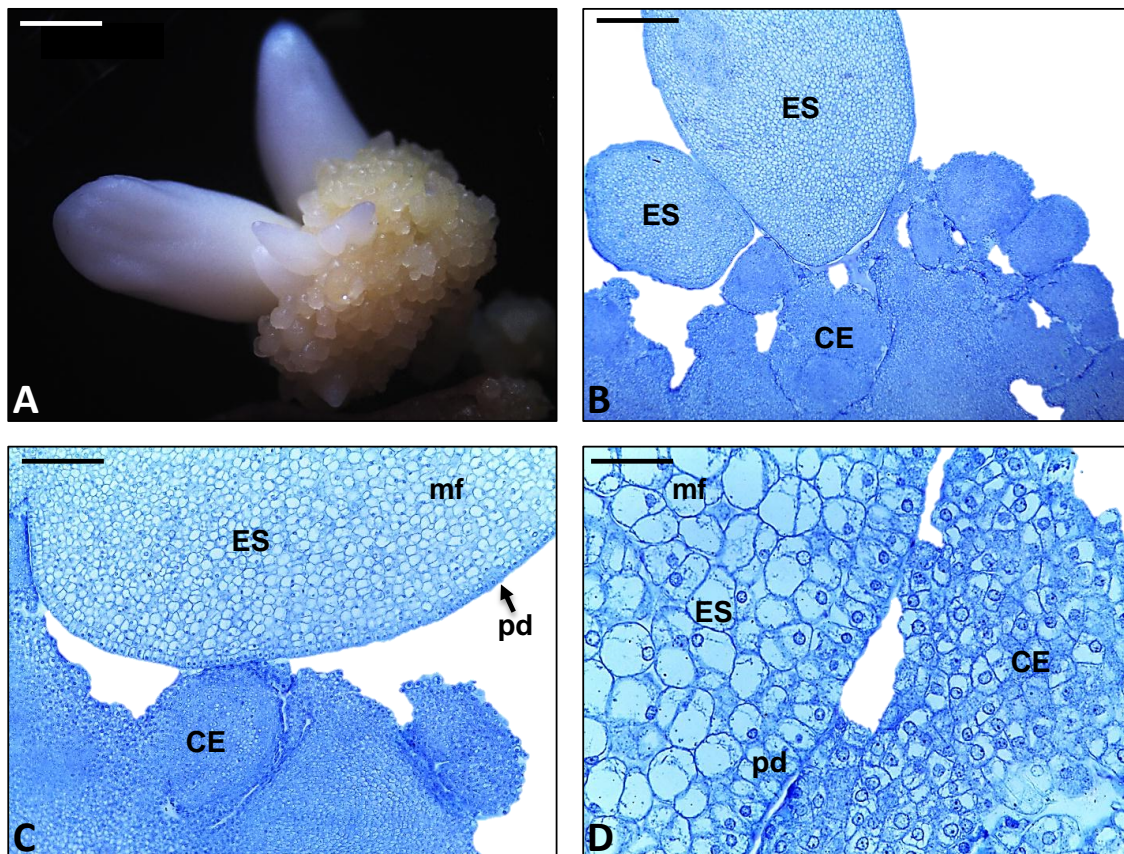


Figura 5. Aspectos morfológicos e anatômicos de calos embriogênicos de dendezeiro com formação de embriões somáticos, após 180 dias de cultivo em meio de diferenciação. **A)** Morfologia externa; **B-C-D)** Secções anatômicas. Abreviações: CE = calo embriogênico; ES = embrião somático; mf = meristema fundamental; pd = protoderme. Barras: A = 2 mm; B = 0,5 mm; C = 0,2 mm; D = 0,05 mm.

Resultados semelhantes aos constatados por Balzon *et al.* (2013), que no estudo da embriogênese somática de embriões zigóticos de *Elaeis guineensis*, também verificaram que a camada externa de células meristemáticas que constituíam os proembriões somáticos diferenciaram-se em

protoderme, proporcionando dessa maneira, a formação de embriões somáticos.

Na análise anatômica da calogênese e da embriogênese somática de híbridos interespecíficos de *Elaeis guineensis* x *Elaeis oleifera* via embriões zigóticos de frutos maduros, Angelo *et al.* (2013) também relataram uma significativa formação de embriões somáticos a partir do desenvolvimento das células meristemáticas que compunham os proembriões somáticos.

Após 180 dias de cultivo em meio de diferenciação, os embriões somáticos obtidos foram então transferidos para meio de MS isento de reguladores de crescimento para completar seu desenvolvimento. Os embriões somáticos inoculados nessa etapa do processo apresentavam, de forma geral, aspecto opaco, coloração esbranquiçada, consistência pouco aquosa e formato arredondado a levemente alongado (Figura 6-A).

As secções histológicas realizadas neste estágio de desenvolvimento do embrião somático de dendezeiro (globular) evidenciaram a presença de uma protoderme bem delimitada, composta por uma camada unisseriada de células com formato tabular, fortemente unidas e com núcleo evidente. Circundado por esta camada de células, verificou-se o meristema fundamental, região composta por um aglomerado de células meristemáticas, algumas das quais com a presença de dois núcleos, evidenciando assim, seu processo de divisão celular (Figura 6-B-C-D).

Moura *et al.* (2009) também evidenciaram em cortes anatômicos de embriões globulares de *Acrocomia aculeata*, oriundos da embriogênese somática de embriões zigóticos, a presença de uma protoderme típica revestindo a massa de células embriogênicas que constituíam o meristema fundamental, ainda sem o desenvolvimento de cordões procambiais.

Tais resultados corroboram Steinmacher *et al.* (2007), no estudo dos aspectos morfo-histológicos relacionados com a embriogênese somática de *Bactris gasipaes* via técnica de TCL, onde também foi evidenciado nessa fase de desenvolvimento do embrião somático a existência de uma protoderme característica delimitando as células do meristema fundamental. No entanto, ao

contrário do observado no presente trabalho, em embriões globulares dessa espécie a presença de cordões procambiais dispersos no meristema fundamental já foi constatada.

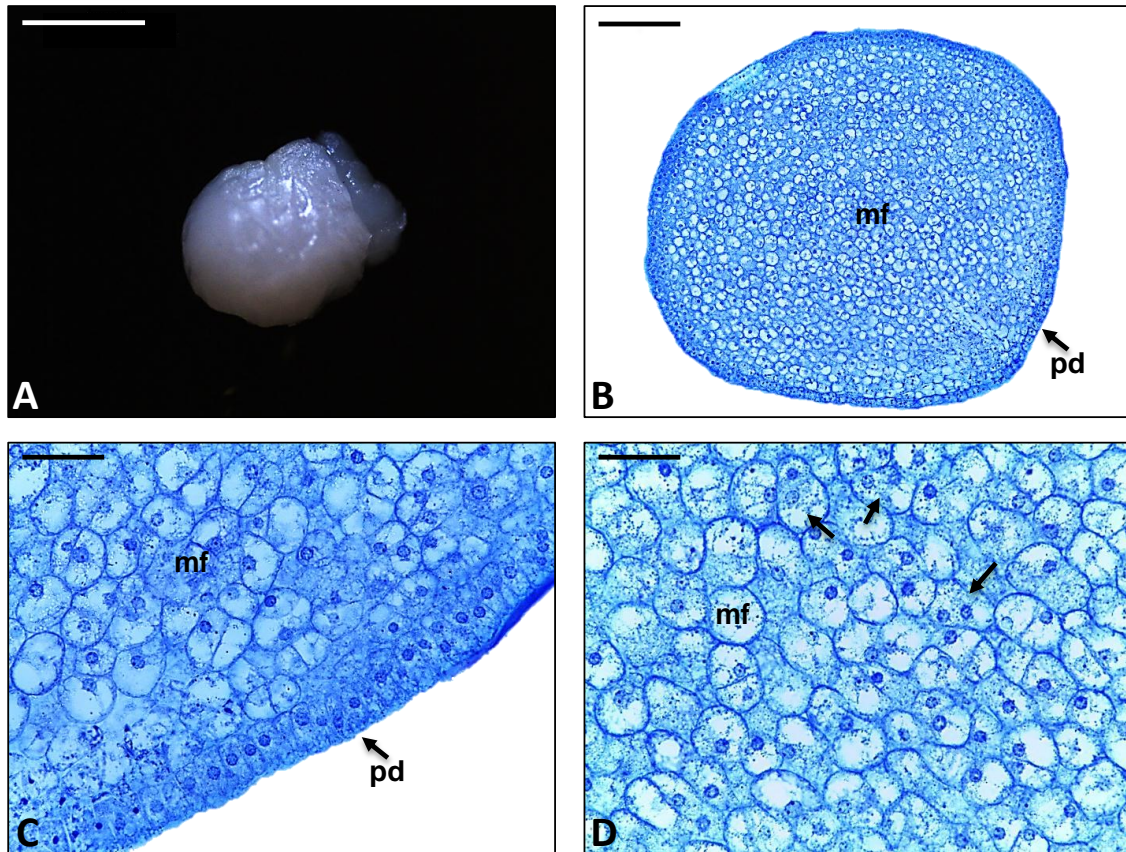


Figura 6. Aspectos morfológicos e anatômicos de embriões somáticos de dendezeiro em estágio globular inoculados em meio de MS isento de reguladores de crescimento. **A)** Morfologia externa; **B-C-D)** Secções anatômicas. Abreviações: mf = meristema fundamental; pd = protoderme; seta = células em divisão celular. Barras: A = 2 mm; B = 0,5 mm; C-D = 0,05 mm.

Após aproximadamente 90 dias de cultivo em meio de MS isento de reguladores de crescimento, observou-se a obtenção de uma quantidade significativa de embriões somáticos do tipo torpedo. Os embriões somáticos em estágio de torpedo, obtidos ao final da embriogênese somática de folhas imaturas de dendezeiro, foram caracterizados morfológicamente por apresentar

aspecto opaco, coloração esbranquiçada, consistência pouco aquosa e formato cônico (Figura 7-A).

As secções longitudinais realizadas nessa fase de maturação do embrião somático evidenciaram a existência de uma protoderme semelhante à observada nos embriões somáticos globular, sendo constituídas também por células externas, justapostas, com formato tabular e núcleo proeminente. Delimitado por esta estrutura de revestimento, evidenciou-se também o meristema fundamental, região composta neste estágio de desenvolvimento, por camadas de células com diferentes tamanhos, maiores no centro e menores próximo da periferia. Ademais, dispersas no meristema fundamental, observou-se ainda o início da diferenciação de cordões procambiais, constituídos por células estreitas, com formato alongado e núcleo evidente (Figura 7-B-C-D).

Resultados semelhantes aos obtidos por Scherwinski-Pereira *et al.* (2010), na análise morfo-histológica de embriões torpedo de *Elaeis guineensis* oriundos do final da embriogênese somática via TCL, no qual a presença de regiões procambiais, constituídas por células alongadas, com citoplasma denso e núcleo proeminente, também foi relatada como uma das principais características anatômicas dessa fase do embrião somático da espécie.

Na análise histológica da embriogênese somática de *Phoenix dactylifera*, Sané *et al.* (2006) também evidenciaram em secções longitudinais obtidas a partir de embriões somáticos em estágio de torpedo, um sistema vascular bem desenvolvido distribuído ao longo do meristema fundamental. Nesse estágio de desenvolvimento do embrião somático de tamareira evidenciou-se ainda, diferentemente do verificado no presente estudo, a existência de regiões apicais relativamente bem organizadas, sendo o meristema apical do caule constituído por uma região meristemática rodeada por um primórdio foliar e o meristema apical da raiz composto por uma área difusa um pouco menos organizada.

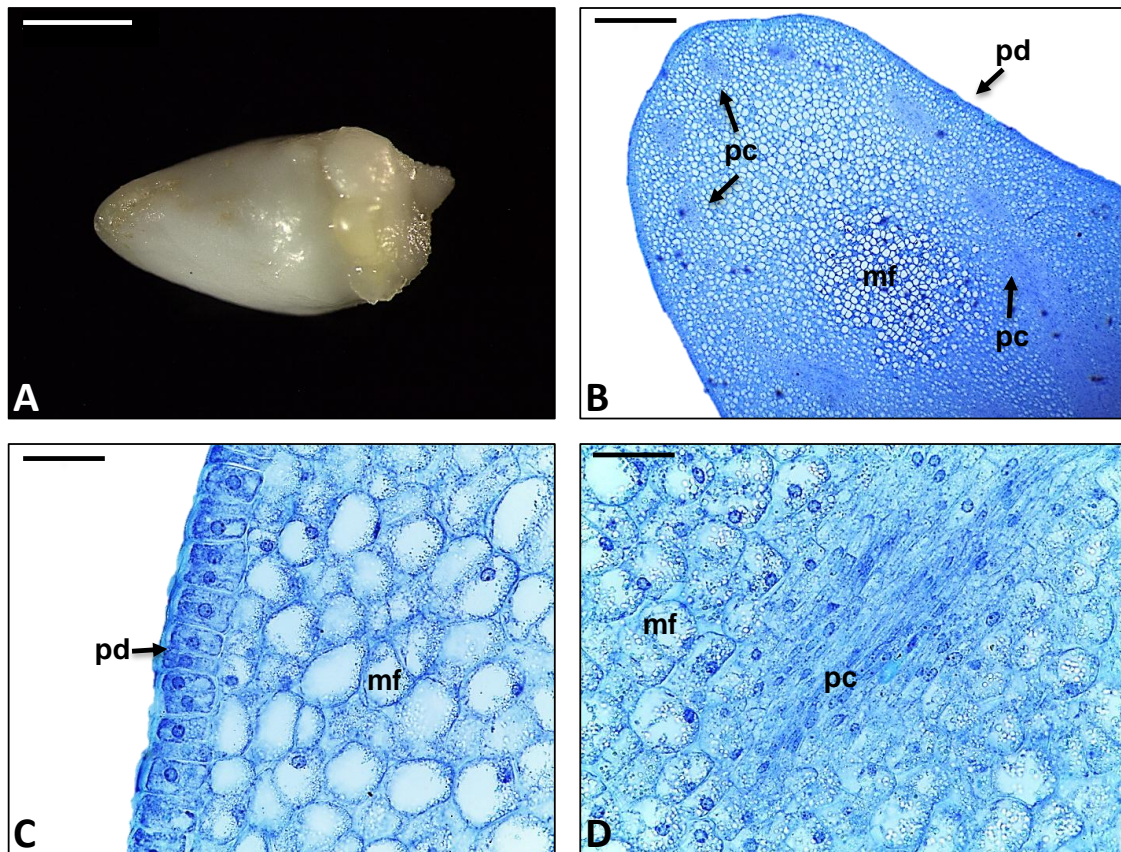


Figura 7. Aspectos morfológicos e anatômicos de embriões somáticos de dendezeiro em estágio torpedo obtidos após 90 dias de cultivo em meio de MS isento de reguladores de crescimento. **A)** Morfologia externa; **B-C-D)** Secções longitudinais. Abreviações: mf = meristema fundamental; pc = procâmbio; pd = protoderme. Barras: A = 2 mm; B = 0,5 mm; C-D = 0,05 mm.

Por fim, para promover uma melhor elucidação da qualidade da embriogênese somática de dendezeiro, realizada a partir de explantes foliares, o perfil morfoanatômico dos embriões somáticos em estágio de torpedo foi então comparado com o perfil morfoanatômico de embriões zigóticos extraídos de frutos maduros. Morfologicamente os embriões zigóticos oriundos de frutos maduros foram caracterizados por apresentar formato alongado, coloração amarelada na parte apical e esbranquiçada na parte basal e aspecto ligeiramente translúcido (Figura 8-A).

As secções longitudinais realizadas nos embriões zigóticos maduros, assim como observado nos embriões somáticos torpedo, também evidenciaram

a existência de uma protoderme constituída por células externas, justapostas, com formato tabular e núcleo proeminente, delimitando o meristema fundamental, constituído por várias camadas de células com núcleo evidente e diâmetro superior. Dispersas no meristema fundamental destes embriões, foi constatado também a presença de cordões procambiais, compostos por células estreitas, com formato alongado e núcleo evidente (Figura 8-B-C-D).

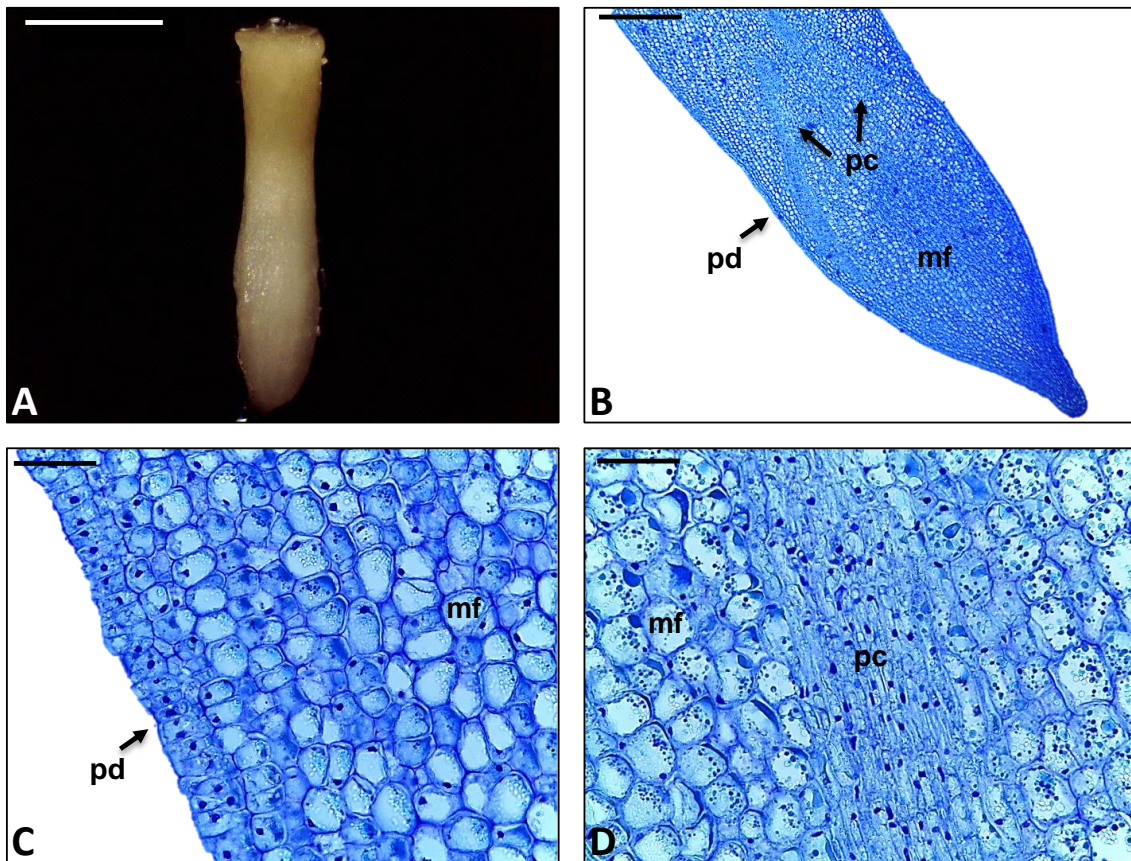


Figura 8. Aspectos morfológicos e anatômicos do embrião zigótico de dendezeiro em estágio de torpedo obtido a partir de frutos maduros. **A)** Morfologia externa; **B-C-D)** Secções longitudinais. Abreviações: mf = meristema fundamental; pc = procâmbio; pd = protoderme. Barras: A = 2 mm; B = 0,5 mm; C-D = 0,05 mm.

Kanchanapoom & Domuoas (1999) também verificaram a partir de secções anatômicas de embriões zigóticos de *Elaeis guineensis* extraídos de frutos maduros, que nesse estágio de desenvolvimento os embriões zigóticos

de dendezeiro são constituídos por três tecidos meristemáticos: o meristema fundamental, meristema precursor do parênquima, colênquima e esclerênquima; o procâmbio, meristema precursor dos tecidos vasculares (xilema e floema); e a protoderme, meristema precursor da epiderme.

Resultados semelhantes aos relatados por Silva *et al.* (2014), que em secções histológicas de embriões zigóticos de frutos maduros de *Elaeis guineensis*, também evidenciaram a presença de três diferentes tipos de células: as do meristema fundamental, as do procâmbio e as da protoderme. Estes resultados demonstram a grande similaridade morfoanatômica que os embriões somáticos em estágio de torpedo, oriundos da embriogênese somática de folhas imaturas, possuem com os embriões zigóticos de frutos maduros da espécie.

Na análise anatômica e histoquímica da embriogênese somática e zigótica de *Acrocomia aculeata*, Moura *et al.* (2010) também relatam a existência de semelhanças entre os embriões somáticos em estágio de torpedo e os embriões zigóticos maduros, embora os mesmos apresentem um maior número de células vacuoladas, um menor grau de diferenciação dos tecidos e dos ápices meristemáticos e possuam escassez de amiloplastos e ausência de proteínas e lipídeos como compostos de reserva.

Tais resultados corroboram Sané *et al.* (2006), que relatam que em espécies da família Arecaceae, os embriões somáticos diferem dos embriões zigóticos, de forma geral, apenas pelo fato de os mesmos não apresentarem o acúmulo de proteínas e lipídeos como compostos de reserva. Assim, demonstrou-se que a utilização de biorreatores de imersão temporária modelo R.I.T.A.[®], nas etapas de multiplicação e regeneração da embriogênese somática de dendezeiro, realizada a partir de folhas imaturas de plantas adultas, também não ocasionou nos cultivos propagados o aparecimento de anomalias morfoanatômicas.

4. CONCLUSÕES

Calos primários são constituídos por células meristemáticas apenas em sua região mais interna, enquanto que calos embriogênicos são compostos inteiramente por este padrão celular. A partir do desenvolvimento destas culturas é verificada a formação de embriões somáticos sem conexão com os tecidos de origem, constituídos inicialmente (estádio globular) pela protoderme e pelo meristema fundamental. Com a maturação destes propágulos (estádio torpedo), observa-se também a presença de regiões procambiais dispersas pelo meristema fundamental, característica estrutural também constatada em embriões zigóticos de frutos maduros.

Tais resultados possibilitam aumentar o domínio e o entendimento da embriogênese somática de folhas imaturas de dendezeiro, além de demonstrar que o sistema de cultivo empregado proporciona a obtenção de um grande número de embriões somáticos maduros aptos para a regeneração de plantas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGELO, P. C. S.; STEINMACHER, D. A.; LOPES, R.; DA CUNHA, R. N. V.; GUERRA, M. P. Histological analysis and transcription profiles on somatic embryogenesis in interspecific hybrids of *Elaeis guineensis* × *E. oleifera*. **Agricultural Sciences**, v.4, p.1-11, 2013.

BALZON, T. A.; LUIZ, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. New approaches to improve the efficiency of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) from mature zygotic embryos. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v.49, p.41-50, 2013.

BESSE, I.; VERDEIL, J. L.; DUVAL, Y.; SOTTA, B.; MALDINEY, R.; MIGINIAC, E. Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) clonal fidelity: endogenous cytokinins and indoleacetic acid in embryogenic callus cultures. **Journal of Experimental Botany**, v.43, p.983-989, 1992.

CHOI, D. S.; ANDRADE, M. H. C.; WILLIS, L. B.; CHO, C. W.; SCHOENHEIT, J.; BOCCAZZI, P.; SAMBANTHANMURTHI, R.; SINSKEY, A. J.; RHA, C. K. Effect of agitation and aeration of yield optimization of oil palm suspension culture. **Journal of Palm Oil Research**, v.1, p.23-34, 2008.

CONSTANTIN, M.; NCHU, W. A.; GODSWILL, N. N.; WIENDI, N. M. A.; WACHJAR, A.; FRANK, N. E. G. Induction of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq. var. Tenera) callogenesis and somatic embryogenesis from young leaf explants. **Journal of Applied Biology and Biotechnology**, v.3, p.4-10, 2015.

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

DAVOODI, D.; MAJIDI, E.; KHOSHKAM, S. Some morphological and anatomical aspects of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) somatic embryogenesis in tissue culture. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v.4, p.63-71, 2002.

DUVAL, Y.; DURAND-GASSELIN, T.; KONAN, K. C. *In vitro* vegetative propagation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Oleagineux**, v.43, p.145-47, 1988.

GOMES, H. T.; BARTOS, P. M. C.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Optimizing rooting and survival of oil palm (*Elaeis guineensis*) plantlets derived from somatic embryos. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v.51, p.111-117, 2015.

HABIB, S. H.; SYED-ALWEE, S. S. R.; HO, C. L.; ONG-ABDULLAH, M.; SINNIH, U. R.; NAMASIVAYAM, P. Morpho-histological characterization of truncated leaf syndrome seedlings: an oil palm (*E. guineensis* Jacq.) somaclonal variant. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.34, p.17-28, 2012.

HANSEN, S.B.; PADFIELD, R.; SYAYUTI, K.; EVERS, S.; ZAKARIAH, Z.; MASTURA, S. Trends in global palm oil sustainability research. **Journal of Cleaner Production**, v.100, p.140-149, 2015.

JAYANTHI, M.; SUSANTHI, B.; MOHAN, N. M.; MANDAL, P. K. *In vitro* somatic embryogenesis and plantlet regeneration from immature male inflorescence of adult dura and tenera palms of *Elaeis guineensis* (Jacq.). **SpringerPlus**, v.4, p.256-262, 2015.

JOUANNIC, S.; LARTAUD, M.; HERVÉ, J.; COLLIN, M.; ORIEUX, Y.; VERDEIL, J. L.; TREGEAR, J. W. The shoot apical meristem of oil palm (*Elaeis guineensis*; Arecaceae): developmental progression and dynamics. **Annals of Botany**, v.108, p.1477-1487, 2011.

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

MOURA, E. F.; MOTOIKE, S. Y.; VENTRELLA, M. C.; DE SÁ JÚNIOR, A. Q.; CARVALHO, M. Somatic embryogenesis in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from zygotic embryos. **Scientia Horticulturae**, v.119, p.447-454, 2009.

MOURA, E. F.; VENTRELLA, M. C.; MOTOIKE, S. Y. Anatomy, histochemistry and ultrastructure of seed and somatic embryo of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). **Scientia Agricola**, v.67, p.399-407, 2010.

MOURA, E. F.; VENTRELLA, M. C.; MOTOIKE, S. Y.; DE SÁ JÚNIOR, A. Q.; CARVALHO, M.; MANFIO, C. E. Histological study of somatic embryogenesis induction on zygotic embryos of macaw palm (*Acrocomia aculeate* (Jacq.) Lodd. ex Martius). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.95, p.175-184, 2008.

MOYO, M.; AREMU, A. O.; VAN STADEN, J. Insights into the multifaceted application of microscopic techniques in plant tissue culture systems. **Planta**, v.242, p.773-790, 2015.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

O'BRIEN, T.P., FEDER, N., MCCULLY, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v.59, p.368-373, 1964.

PÁDUA, M. S.; PAIVA, L. V.; LABORY, C. R. G.; ALVES, E.; STEIN, V. C. Induction and characterization of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) pro-embryogenic masses. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.85, p.1545-1556, 2013.

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

RABÉCHAULT, H.; MARTIN, J.P. Multiplication végétative du palmier a huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) a l'aide de cultures de tissus foliaires. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Academie des Sciences**, v.285, p.1735-1737, 1976.

REINERT, J. Morphogenese und ihre kontrolle an geweberkulturen aus karotten. **Naturwissenschaften**, v.45, p.344-345, 1958.

RIVAL, A.; ABERLENC, F.; MORCILLO, F.; TREGEAR, J.; VERDEIL, J. L.; DUVAL, Y. Scaling-up *in vitro* clonal propagation through somatic embryogenesis : the case of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, v.3, p.74-82, 1997.

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

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

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

SCHWENDIMAN, J.; PANNETIER, C.; MICHAUX-FERRIERE, N. Histology of embryogenic formations during *in vitro* culture of oil palm *Elaeis guineensis* Jacq. **Oléagineux**, v.45, p.409-418, 1990.

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

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

SILVA, R. C.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. The histodifferentiation events involved during the acquisition and development of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Plant Growth Regulation**, v.72, p.67-80, 2014.

SOH, A. C.; WONG, G.; TAN, C. C.; CHEW, P. S.; CHONG, S. P.; 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.; GUERRA, M. P.; SAARE-SURMINSKI, K.; LIEBEREI, R. A temporary immersion system improves *in vitro* regeneration of *Peach palm* through secondary somatic embryogenesis. **Annals of Botany**, v.108, p.1463-1475, 2011.

- STEINMACHER, D. A.; KROHN, N. G.; DANTAS, A. C. M.; STEFENON, V. M.; CLEMENT, C. R.; GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis in peach palm using the thin cell layer technique: induction, morpho-histological aspects and AFLP analysis of somaclonal variation. **Annals of Botany**, v.100, p.1-11, 2007.
- TEIXEIRA, J. B.; SONDAHL, M. R.; NAKAMURA, T.; KIRBY, E. G. Establishment of oil palm cell suspensions and plant regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.40, p.105-111, 1995.
- THUZAR, M.; VANAVICHIT, A.; TRAGOONRUNG, S.; JANTASURIYARAT, C. Recloning of regenerated plantlets from elite oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) cv. Tenera. **African Journal of Biotechnology**, v.11, p. 14761-14770, 2012.
- VERDEIL, J.P.; HOCHER, V.; HUET, C.; GROSDEMANGE, F.; ESCOUTE, J.; FERRIERE, N.; NICOLE, M. Ultrastructural changes in coconut calli associated with the acquisition of embryogenic competence. **Annals of Botany**, v.88, p.9-18, 2001.
- WAHID, M. B.; ABDULLAH, S. N. A.; HENSON, I. E. Oil palm - Achievements and potential. **Plant Production Science**, v.8, p.288-297, 2005.
- WIENDI, N. M. A.; CONSTANTIN, M.; WACHYAR, A. Study of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq) *in vitro* embryogenesis using young leaves explants. **Journal of Tropical Crop Science**, v.2, p.5-9, 2015.
- WILLIAMS, E. G.; MAHESWARAN, G. Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany**, v.57, p.443-462, 1986.

CAPÍTULO 4

Análise bioquímica dos eventos associados com a embriogênese somática do dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) em sistema de imersão temporária (R.I.T.A.[®])

RESUMO

O objetivo do trabalho foi caracterizar bioquimicamente os estádios de desenvolvimento obtidos entre as etapas de multiplicação e regeneração da embriogênese somática de folhas imaturas de dendezeiro, realizada em biorreatores R.I.T.A.[®]. Para tanto, foram extraídos e quantificados os açúcares, amido, ácidos graxos, aminoácidos e proteínas contidos em calos primários, calos embriogênicos, calos embriogênicos com embriões somáticos diferenciados, embriões somáticos em estágio torpedo, embriões somáticos em regeneração e plantas regeneradas. Verificou-se que no início da multiplicação, os calos primários foram os propágulos que apresentaram as maiores concentrações de açúcares solúveis totais. Por outro lado, entre a diferenciação e o início da regeneração não foi constatada a ocorrência de variações expressivas nos índices destes compostos, que após esse período apresentaram significativa redução. Nessa análise, verificou-se ainda que até o início da regeneração dos embriões somáticos os açúcares solúveis totais existentes nos explantes foram constituídos em sua maioria por sacarose. Em contrapartida, após esse processo a glicose e a frutose foram os açúcares solúveis de maior relevância na composição dos açúcares solúveis totais. No início da multiplicação, os calos primários também foram os cultivos que apresentaram os maiores níveis de amido. Entretanto, verificou-se para esse composto que durante a etapa de diferenciação de embriões somáticos seus teores apresentaram uma diminuição significativa. Já na regeneração dos embriões constatou-se a ocorrência de acúmulo gradativo de amido, que ao final desse processo foi então mobilizado. Em relação aos ácidos graxos totais, observou-se que no início da multiplicação os calos embriogênicos foram os explantes que apresentaram as maiores concentrações desses compostos. Após essa fase, verificou-se que estes metabólitos continuaram com níveis

relativamente elevados, apresentando ao final da etapa de diferenciação, de forma geral, uma redução progressiva. Tais compostos, independentemente da etapa analisada, foram constituídos em sua maior parte por ácido palmítico e ácido linoléico. Quanto aos aminoácidos totais livres, verificou-se que no geral entre a multiplicação e diferenciação foram observadas as maiores concentrações. Após esse período, constatou-se que os índices destes compostos caíram até o início da etapa de regeneração. Em seguida, os aminoácidos totais livres foram acumulados nos regenerantes e então mobilizados no crescimento inicial da planta. Por fim, na análise das proteínas totais verificou-se que no início da multiplicação os calos embriogênicos foram os propágulos que apresentaram as maiores concentrações. Em contrapartida, entre a diferenciação e o início da regeneração não foram constatadas diferenças estatísticas nos índices destes compostos, que após esse processo reduziram de forma progressiva. Tais resultados podem ajudar a elucidar as alterações bioquímicas e fisiológicas que ocorrem durante o desenvolvimento embriogênico do dendezeiro, além de auxiliar a compreensão e otimização dos protocolos de embriogênese somática da espécie.

Palavras-chave: Arecaceae; cultivo *in vitro*; morfogênese; metabolismo; fisiologia.

CHAPTER 4

Biochemical analysis of events associated with the somatic embryogenesis of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in temporary immersion bioreactor (R.I.T.A.[®])

ABSTRACT

The objective of this work was to characterize biochemically the stages of multiplication and regeneration during somatic embryogenesis of oil palm from immature leaves in R.I.T.A.[®] bioreactors. The sugars, starch, fatty acids, amino acids and proteins were extracted, identified and quantified at various stages: primary calli, embryogenic calli, embryogenic calli with differentiated somatic embryos, torpedo-stage somatic embryos, somatic embryos in regeneration, and regenerated plants. It was found that at the onset of the multiplication, the primary calli were the propagules with the highest concentrations of total soluble sugars. Between differentiation and the onset of regeneration, no significant changes in levels of soluble sugar were observed, which after this period showed a significant decrease. At the regeneration stage, the most abundant sugars present in the culture consisted mainly of sucrose and, after this process, glucose and fructose. At the onset of multiplication, the primary calli were also the ones with the highest levels of starch. However, during the differentiation this compound showed a significant decrease. In the regeneration of the somatic embryos, it was found a gradual buildup of starch, which at the end of the process was mobilized. For fatty acids was at the onset of multiplication of embryogenic calli where the highest concentrations was observed. After this phase, starch continued at relatively high levels, presenting at the end of the differentiation stage, a progressive reduction. Such compounds, regardless of the analyzed stage, were constituted mostly by palmitic and linoleic acids. As for the free amino acids, it was between the multiplication and differentiation stages where the higher concentrations were observed. After this period, the levels of these compounds decreased until the beginning of the regeneration stage. Then, the free amino acids were accumulated and mobilized during plant growth. For total protein, at the onset of

multiplication, the embryogenic calli were the propagules with the highest concentrations. In contrast, between differentiation and the initial regeneration, statistical differences were observed in the levels of these compounds, which progressively were reduced after. These results may help to elucidate the biochemical and physiological changes that occur during somatic embryogenesis of oil palm, and may assist in the optimization of somatic embryogenesis protocols of the species.

Key words: Arecaceae; *in vitro* culture; morphogenesis; metabolism; plant physiology.

1. INTRODUÇÃO

O dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) é uma espécie oleaginosa com exploração econômica que pode ser superior a 25 anos. O principal produto da espécie é o óleo extraído da polpa do fruto, conhecido como óleo de dendê. A variada gama de utilizações que o óleo de dendê e seus co-produtos possuem, combinada com preços de mercado inferiores aos de seus concorrentes, vem tornando o cultivo dessa palmeira cada vez mais atrativo (Sundram *et al.*, 2003; Wahid *et al.*, 2005; Hameed *et al.*, 2009; Mukherjee & Sovacool, 2014; Oosterveer, 2015).

Com isso, o número de plantios comerciais de dendezeiro vem crescendo rapidamente no cenário mundial, principalmente no Sudeste Asiático, na África Ocidental e na América Latina (Hansen *et al.*, 2015). No entanto, uma das principais dificuldades encontradas para a expansão da dendeicultura é a produção de mudas de qualidade para suprir essa crescente demanda (Soh *et al.*, 2011).

Embora grande parte desse problema esteja relacionado à baixa quantidade de sementes superiores produzidas, parte dele é devido também às perdas decorrentes do processo de germinação, que ocorrem principalmente em função da dormência que as sementes da espécie apresentam após alcançarem a maturação fisiológica. Além disso, em espécies de polinização cruzada como o dendezeiro, progênies obtidas a partir de sementes apresentam-se heterogêneas (Martine *et al.*, 2009; Myint *et al.*, 2010; Chanprasert *et al.*, 2012).

Porém, por ser uma palmeira monocotiledônea típica, o dendezeiro possui apenas um único ápice crescente, sem perfilhamento, fato que impede que a produção de indivíduos elite da espécie seja realizada também por meio de reprodução vegetativa (Jouannic *et al.*, 2011). Assim, a embriogênese somática surge como uma excelente alternativa para aumentar a produção de mudas superiores dessa cultura (Staritsky, 1970; Pannetier *et al.*, 1981).

A embriogênese somática é um processo biológico análogo a embriogênese zigótica, no qual células haploides ou somáticas sofrem uma

série de alterações morfoanatômicas e bioquímicas que resultam na formação de embriões, sem que ocorra a fusão gamética. Uma vez adaptada à cultura, esta técnica permite a produção de quantidades apreciáveis de mudas a partir de pequenas quantidades de tecidos somáticos provenientes de plantas matrizes doadoras de explante (Reinert, 1958; Williams & Maheswaran, 1986; Gomes *et al.*, 2016).

Ademais, a embriogênese somática além de ser importante para incrementar a produção de genótipos superiores de dendezeiro, também constitui uma excelente forma para a obtenção de sistemas biológicos modelos para a realização de estudos fisiológicos relacionados ao desenvolvimento embrionário da cultura (Zimmerman, 1993).

Mas, apesar de diversos protocolos de embriogênese somática de dendezeiro já terem sido publicados (Rabéchault & Martin, 1976; Corley *et al.*, 1977; Duval *et al.*, 1988; Teixeira *et al.*, 1995; Rival *et al.*, 1997; Choi *et al.*, 2008; Balzon *et al.*, 2013; Constantin *et al.*, 2015; Jayanthi *et al.*, 2015, Wiendi *et al.*, 2015), a literatura ainda carece de estudos básicos a respeito do metabolismo celular dos cultivos durante as diferentes etapas que compõem esse processo.

Segundo Silva *et al.* (2014a), o conhecimento dos eventos bioquímicos envolvidos nas diferentes fases da embriogênese somática de *Elaeis guineensis* é fundamental para elucidar os pontos chaves que regulam essa complexa rota de desenvolvimento morfogênico, possibilitando, além de aumentar o entendimento do desenvolvimento embrionário da espécie, otimizar os protocolos de embriogênese somática desenvolvidos para a mesma e, conseqüentemente, potencializar a produção de mudas elite da cultura.

Diante desse contexto, o objetivo do trabalho foi caracterizar bioquimicamente os diferentes estádios de desenvolvimento obtidos entre as etapas de multiplicação e regeneração da embriogênese somática de folhas imaturas de dendezeiro, realizada em biorreatores de imersão temporária modelo R.I.T.A.[®].

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local de realização dos experimentos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Bioquímica Vegetal (LBV) do Departamento de Botânica da Universidade de Brasília, situado em Brasília – DF, Brasil.

2.2 Material vegetal

Para a indução da embriogênese somática foram utilizadas como material vegetal, folhas imaturas e ainda não expandidas (palmito), oriundas de plantas adultas de dendzeiros variedade B35-1733, fornecidas pelo Programa de Melhoramento Genético de Dendzeiro da Embrapa Amazônia Ocidental, localizado na municipalidade de Rio Preto da Eva – AM, Brasil.

2.3 Obtenção dos explantes

Para a obtenção dos explantes, segmentos foliares estéreis de aproximadamente 1 cm² foram inoculados em placas de Petri (15 x 90 mm), contendo 25 mL de meio de cultura composto pela constituição salina e vitaminas de MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com 450 µM de Picloram (ácido aminotricloropicolínico), 0,5 g.L⁻¹ de caseína hidrolisada, 0,5 g.L⁻¹ de glutamina, 2,5 g.L⁻¹ de carvão ativado e 30 g.L⁻¹ de sacarose (Balzon *et al.*, 2013). Nesse meio, o pH foi ajustado para 5,7 ± 0,1, seguido da adição de 2,5 g.L⁻¹ de Phytigel, antes da esterilização a 121°C e 1,3 atm por 20 minutos. O material vegetal foi então cultivado por oito subcultivos de 30 dias, sob condição de obscuridade, para a obtenção de calos primários e calos embriogênicos.

Em seguida, os calos obtidos na etapa de indução foram inoculados em sistemas de imersão temporária automatizados (R.I.T.A.[®]) contendo 200 mL de meio de cultivo líquido. Nessa etapa, o meio nutritivo foi composto pelos sais e vitaminas de MS, acrescido de 4,5 µM de 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético), 0,5 µM de ANA (ácido naftalenoacético), 0,5 g.L⁻¹ de glutamina, 0,5 g.L⁻¹ de

caseína hidrolisada, 0,1 g.L⁻¹ de cisteína, 0,1 g.L⁻¹ de asparagina, 30 g.L⁻¹ de sacarose e pH ajustado para 5,7 ± 0,1. Nessas condições, os explantes foram cultivados por até cinco subcultivos sucessivos de 30 dias cada para a proliferação dos massivos celulares.

Posteriormente, calos provenientes da fase de multiplicação foram inoculados em frascos de vidro de 250 mL de capacidade, contendo 40 mL de meio nutritivo de MS, suplementado com 12,3 µM de 2iP (isopenteniladenina), 0,54 µM de ANA, 0,5 g.L⁻¹ de glutamina, 0,5 g.L⁻¹ de caseína hidrolisada, 0,1 g.L⁻¹ de cisteína, 0,1 g.L⁻¹ de asparagina, 30 g.L⁻¹ de sacarose, 2,5 g.L⁻¹ de Phytigel e pH ajustado para 5,7 ± 0,1. Nessa etapa, os propágulos foram cultivados por seis subcultivos de 30 dias para a obtenção de calos com embriões somáticos diferenciados.

Por fim, os embriões somáticos provenientes da etapa de diferenciação foram inoculados em biorreatores R.I.T.A.[®], contendo 200 mL de meio nutritivo de MS isento de reguladores de crescimento, suplementado de 30 g.L⁻¹ de sacarose, 2,5 g.L⁻¹ de carvão ativado e pH ajustado para 5,7 ± 0,1. Os embriões somáticos foram então cultivados por mais cinco subcultivos de 30 dias para a obtenção de embriões somáticos em estágio torpedo (90 dias), embriões somáticos em regeneração (120 dias) e plantas em crescimento (150 dias).

Durante todo o desenvolvimento embriogênico, as culturas foram acondicionadas em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2°C, fotoperíodo de 16 horas e radiação luminosa de 52 µmol.m⁻².s⁻¹, fornecida por lâmpadas LED (Philips[®] - Green Power 20W 60Hz).

2.4 Caracterização bioquímica dos estádios de desenvolvimento

Para caracterização bioquímica dos estádios de desenvolvimento obtidos entre as etapas de multiplicação e regeneração da embriogênese somática de folhas imaturas de dendezeiro, foram extraídos e quantificados os açúcares, amido, ácidos graxos, aminoácidos e proteínas contidos nos respectivos propágulos: calos primários (CP), calos embriogênicos (CE), calos

embriogênicos com embriões somáticos diferenciados (CEE), embriões somáticos em estágio torpedo (ET), embriões somáticos em regeneração (REG) e plantas em crescimento (CR) (Figura 1).

Para tanto, os cultivos coletados foram imediatamente lavados em água ultra pura para remoção de compostos do meio nutritivo, congelados em nitrogênio líquido e liofilizados por 48 horas. Em seguida, os mesmos foram macerados em cadinhos de porcelana e então armazenados a 25°C em recipientes contendo sílica gel (8 mm) até o momento da utilização.

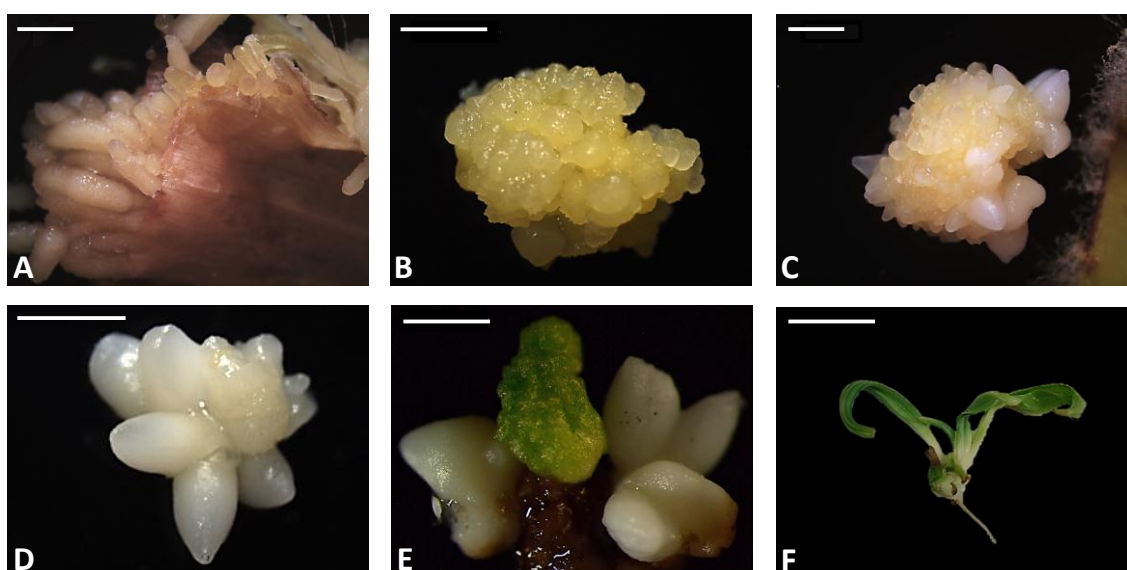


Figura 1. Aspecto morfológico dos cultivos utilizados na caracterização bioquímica dos estádios entre a multiplicação e regeneração da embriogênese somática de folhas imaturas de dendezeiro. **A)** Calo primário; **B)** Calo embriogênico; **C)** Calo embriogênico com embriões somáticos diferenciados; **D)** Embriões somáticos em estágio torpedo; **E)** Embrião somático em regeneração; **F)** Planta em crescimento. Barras: 2 mm.

2.4.1 Açúcares solúveis

A extração dos açúcares solúveis foi realizada segundo Gomes *et al.* (2014). Para tanto, 10 mg de massa seca das amostras foram inoculadas em microtubos de 2 mL de capacidade e submetidas à quatro extrações em 0,5 mL de etanol 80% a 80°C por 20 minutos. Após cada extração, as amostras foram

centrifugadas a 13.000 rpm por 10 minutos e os sobrenadantes coletados em novos microtubos.

Em seguida, os sobrenadantes foram submetidos à secagem em *speed vac* a 40°C e o produto da secagem ressuspendido em 750 µL de água ultra pura. Posteriormente, esse extrato foi purificado em coluna de troca iônica, utilizando-se a resina catiônica Dowex 50x8 (100-200 mesh) para remoção dos aminoácidos e outros cátions. Após esse processo, as amostras foram congeladas, liofilizadas por 48 horas e ressuspendidas em 1 mL de água ultra pura.

Então, os açúcares totais solúveis foram quantificados utilizando-se o método fenol-sulfúrico, descrito por Dubois (1956). Para isso, foram pipetados 33 µL das amostras em tubos de ensaio (25 x 150 mm), onde foram adicionados 0,467 mL de água ultra pura, 0,5 mL de solução de fenol 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Após 5 minutos de repouso em temperatura ambiente, foi realizada a leitura das absorbâncias das amostras em espectrofotômetro a 490 nm. Nessa etapa, todas as análises foram realizadas em triplicata e com base na curva padrão de glucose, com quantidades crescentes de 0,0; 5,0; 10; 20; 40 e 80 µg.

Por fim, a composição dos açúcares totais solúveis foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência, com detector de pulso amperométrico ICS 3000 (Dionex) e coluna CarboPac™ PA10 (2 X 250 mm) (Dionex), utilizando-se eluição isocrática de 200 mM de NaOH (24%) em água ultra pura (76%), no fluxo de 0,2 mL por minuto, durante um período de 35 minutos. Nessa fase, as respostas das amostras foram comparadas com padrões de glucose, frutose e sacarose contendo 0,0; 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10, 20 e 40 µg.

2.4.2 Amido

A extração e quantificação do amido foi realizada de acordo com o método proposto por Amaral *et al.* (2007). Para tanto, 10 mg de massa seca das amostras foram inoculadas em microtubos de 2 mL de capacidade e

submetidas à remoção dos açúcares solúveis em 0,5 mL de etanol 80% a 80°C por 20 minutos. Após esse processo, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 10 minutos e os sobrenadantes resultantes descartados. Em seguida, os resíduos foram submetidos à remoção dos açúcares solúveis por mais três vezes e então submetidos à secagem em *speed vac* a 40°C para completa remoção do etanol.

Às amostras secas, foi adicionado 1 mL (120 U.mL⁻¹) de alfa-amilase termoestável de *Bacillus licheniformis* (Megazyme[®]) diluída em tampão fosfato de sódio 100 mM com pH ajustado em 6,5. Em seguida, as amostras foram incubadas em banho-maria a 75°C por uma hora. Posteriormente, as amostras foram resfriadas até 50°C, sendo então acrescentadas a elas uma solução contendo 1 mL (30 U.mL⁻¹) de amiloglucosidase de *Aspergillus niger* (Megazyme[®]) diluída em tampão acetato de sódio 100 mM com pH ajustado em 4,5. Em seguida, as amostras foram incubadas em banho-maria a 50°C por uma hora.

Após essa incubação, foram acrescentados às amostras 100 µL de ácido perclórico 0,8 M para interromper a reação e auxiliar na precipitação das proteínas. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 2 minutos. Então, alíquotas de 20 µL das amostras foram pipetadas em microplacas e incubadas por 15 minutos a 37°C com 300 µL de solução de GODPOD (Glucose PAP Liquiform/Centerlab[®]). Por fim, o teor de amido foi determinado em leitor de microplacas Elisa a 510 nm. Nesse processo, todas as análises foram realizadas em triplicata e com base na curva padrão de glucose, com quantidades crescentes de 0,0; 0,625; 1,25; 2,5; 5,0 e 10 µg.

2.4.3 Ácidos graxos (ésteres metílicos de ácidos graxos)

A derivatização e quantificação dos ácidos graxos foi realizada seguindo a metodologia descrita por Laurens *et al.* (2012). Para tanto, 5 mg de massa seca das amostras foram inoculadas em vials de vidro, onde foram adicionados 200 µL de metanol/clorofórmio (1:2 v/v) e 300 µL de HCl 5% em metanol. Após 1 hora de incubação em banho seco a 85°C, 1 mL de hexano foi então

acrescido às amostras. Em seguida, o extrato foi agitado levemente por 1 hora e a fase superior resultante transferida cuidadosamente para novos vials de vidro.

Posteriormente, as amostras foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (Agilent®, 7890-5975), utilizando-se uma coluna de 30 metros do tipo INNOWAX. Em seguida, os ácidos graxos presentes nas amostras foram identificados com o auxílio da biblioteca NIST. Por fim, os ácidos graxos existentes nos cultivos foram então quantificados comparando-se suas respostas com o padrão Grain Fatty Acid Methyl Ester Mix da Supelco Analytical®.

2.4.4 Aminoácidos livres

A extração e quantificação dos aminoácidos livres se deu de acordo com o protocolo de Yemm & Cocking (1955) com modificações. Para tanto, 10 mg de massa seca das amostras foram inoculadas em microtubos de 2 mL de capacidade e submetidas à quatro extrações em 0,5 mL de etanol 80% a 80°C por 20 minutos. Após cada extração, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 10 minutos e os sobrenadantes coletados em novos microtubos.

Em seguida, os sobrenadantes foram submetidos à secagem em *speed vac* a 40°C e o produto da secagem ressuscitado em 750 µL de água ultra pura. Posteriormente, os extratos foram purificados em coluna de troca iônica, utilizando-se a resina catiônica Dowex 50x8 (100-200 mesh) para separação dos aminoácidos dos açúcares solúveis. Após esse processo, as amostras foram congeladas, liofilizadas por 48 horas e ressuscitadas em 0,5 mL de etanol 80%.

Então, para quantificação dos aminoácidos totais livres, em 10 µL de amostra foram adicionados 40 µL de etanol 80%, 100 µL de ninidrina 1% e 50 µL de tampão citrato 0,02 M (pH 5,2) contendo 0,2% de ácido ascórbico (p/v). Em seguida, essas soluções foram inoculadas em microplacas, que foram então vedadas e incubadas em banho seco a temperatura de 80°C durante um período de 30 minutos. Após a reação colorimétrica, foi realizada a leitura da

absorbância das amostras em leitor de microplacas Elisa a 570 nm. Nessa etapa, todas as análises foram realizadas em triplicata e com base na curva padrão de leucina, com quantidades crescentes de 0; 5; 10; 20; 30; 40 e 50 μmol .

Por fim, para a dosagem de prolina, em 50 μL de amostra foram acrescidos 100 μL de um mix composto por 0,4 g de ninidrina, 16 mL de etanol 50% e 24 mL de ácido acético glacial. Posteriormente, essas soluções foram inoculadas em microplacas, que foram então vedadas e incubadas em banho seco a temperatura de 80°C durante um período de 30 minutos. Após a reação colorimétrica, foi realizada a leitura da absorbância das amostras em leitor de microplacas Elisa a 520 nm. Nessa fase, as respostas das triplicatas das amostras foram comparadas com padrões de prolina contendo 0; 2; 5; 10; 20; 30; 40 e 50 μmol .

2.4.5 Proteínas totais

A extração das proteínas totais foi realizada segundo Gomes *et al.* (2014). Para tanto, 10 mg de massa seca das amostras foram inoculadas em microtubos de 2 mL de capacidade, onde foram submetidas a imersão em 0,5 mL de NaOH 0,1 N e incubação a 4°C por 12 horas. Em seguida, foram adicionadas às amostras mais duas alíquotas de 0,25 mL de NaOH 0,1 N, seguidas de mais uma hora de incubação a 4°C cada.

Após esse processo, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 10 minutos e os sobrenadantes transferidos para novos microtubos. Posteriormente, 1 mL de ácido tricloroacético 20% foi adicionado as amostras, que foram então, centrifugadas a 13.000 rpm por 10 minutos para precipitação das proteínas. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o extrato ressuspenso em 1 mL de NaOH 0,1 N.

Por fim, a quantificação das proteínas totais foi realizada de acordo com o método proposto por Bradford (1976). Para isso, 2 μL das amostras foram pipetados em microplacas, onde foram adicionados 300 μL de reagente Bradford 50%. Após 5 minutos de repouso no escuro, foi realizada a leitura das

absorbâncias das amostras em leitor de microplacas Elisa a 595 nm. Nessa etapa, todas as análises foram realizadas em triplicata e com base na curva padrão de albumina de soro bovina (BSA), com quantidades crescentes de 0,0; 0,2; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2,0 e 2,4 µg.

2.5 Análises estatísticas

Para as análises estatísticas utilizou-se o método da análise de variância (ANOVA) e o teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância para a comparação das médias, calculadas com o auxílio do programa Sisvar 4.4 (Ferreira, 2011). Nessas análises foram avaliadas três repetições técnicas por estágio de desenvolvimento embriogênico, visto que a utilização de repetições biológicas não foi possível devido aos baixos valores de massa seca dos propágulos avaliados. Sendo assim, cada repetição constituiu-se de um pequeno mix composto pela mistura de diferentes explantes de um mesmo estágio de desenvolvimento.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Açúcares solúveis

Os resultados referentes aos teores de açúcares solúveis totais em razão do estágio de desenvolvimento embriogênico são apresentados na Figura 2. Verificou-se que no início da etapa de multiplicação os calos primários são os cultivos que apresentam as maiores concentrações de açúcares solúveis totais, em média cerca de 210 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de massa seca, valor significativamente superior ao constatado nos calos embriogênicos, que apresentam em média apenas 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de massa seca.

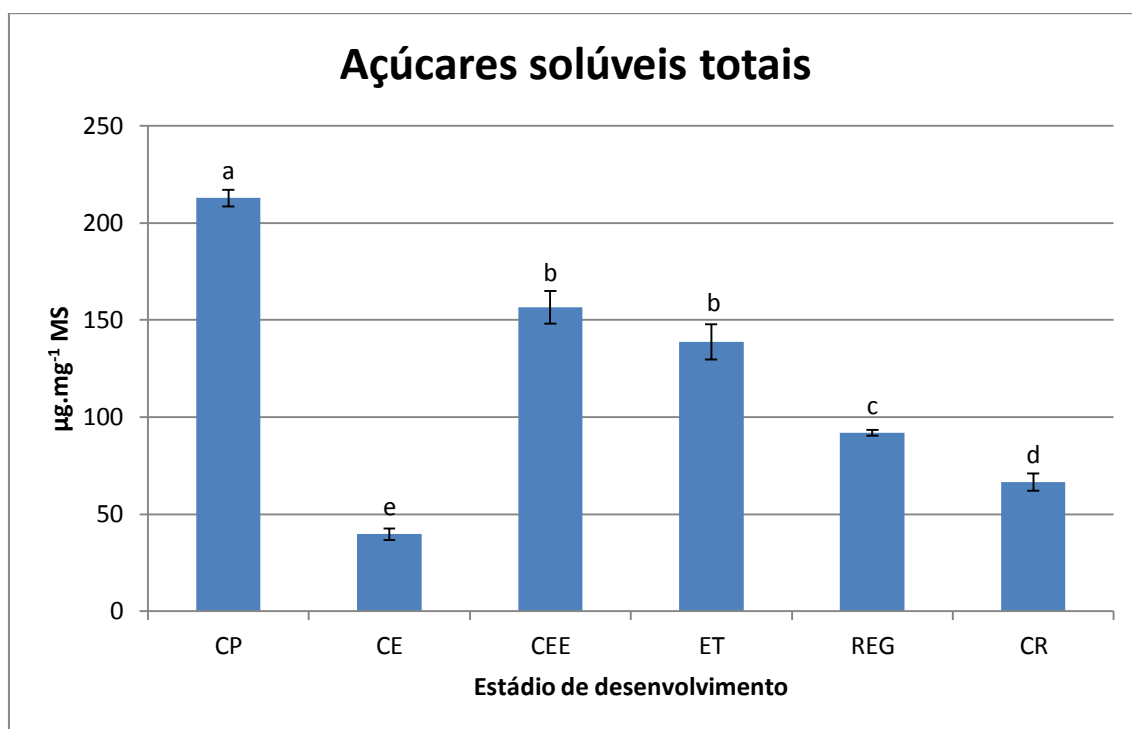


Figura 2. Teores de açúcares solúveis totais entre as etapas de multiplicação e regeneração da embriogênese somática de folhas imaturas de dendezeiro. Abreviações: CP = calo primário; CE = calo embriogênico; CEE = calo embriogênico com embriões somáticos; ET = embrião torpedo; REG = regeneração; CR = planta em crescimento. Os dados representam as médias seguidas dos erros padrões. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Resultados distintos aos relatados por Gomes *et al.* (2014), no estudo bioquímico dos estádios de aquisição e desenvolvimento da embriogênese somática de embriões zigóticos de *Elaeis guineensis*, onde nos mesmos estádios de desenvolvimento embriogênico não foram constatadas diferenças estatísticas entre os níveis de açúcares solúveis totais, que no geral apresentaram valores variando entre 130 e 140 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de massa seca.

Na caracterização bioquímica da embriogênese somática de folhas imaturas de *Cordyline australis*, Warchoř *et al.* (2015) também não observaram a existência de grandes diferenças nos índices de açúcares solúveis totais nestes diferentes tipos de calos.

Por outro lado, na fase de diferenciação e no início da etapa de regeneração, mais especificamente nos estádios de calo embriogênico contendo embriões somáticos diferenciados e de embriões somáticos em fase de torpedo, a ocorrência de variações nos índices dos açúcares solúveis totais praticamente não foi constatada. Nestas fases do cultivo *in vitro*, verificou-se que no geral os propágulos apresentam em média cerca de 150 μg de açúcares solúveis totais por mg de massa seca.

Tais resultados corroboram Pescador *et al.* (2008), que ao estudar a dinâmica dos níveis de carboidratos durante a embriogênese somática de embriões zigóticos de *Acca sellowiana*, também não constataram alterações significativas nos teores dos açúcares solúveis totais durante o transcorrer do processo de maturação.

Na análise das alterações bioquímicas e fisiológicas que ocorrem no decorrer da embriogênese zigótica de goiabeira-serrana, Cangahuala-Inocente *et al.* (2009) também relataram que as concentrações dos açúcares solúveis totais permanecem bastante estáveis durante os diferentes estádios de maturidade dos embriões.

Segundo Hoekstra & Golovina (1999), nessa fase do desenvolvimento embriogênico a retenção de açúcares solúveis nos cultivos é fundamental para promover a proteção de suas células contra o processo de desidratação. De acordo com os autores, nessa etapa da embriogênese os açúcares solúveis

são responsáveis por formar pontes de hidrogênio que substituem a água na manutenção de estruturas celulares hidrofílicas, proporcionando assim, a conservação da integridade física das células no decorrer do processo de dessecação do embrião.

Por fim, nos dois últimos estádios da embriogênese somática a partir de folhas imaturas de *Elaeis guineensis*, ou seja, nos processos de regeneração e crescimento das plantas, observou-se a ocorrência de uma significativa mobilização dos açúcares solúveis totais presente nos tecidos dos cultivos em desenvolvimento, que ao final destes processos passaram a apresentar índices próximos a $70 \mu\text{g.mg}^{-1}$ de massa seca.

Estudando as alterações bioquímicas relacionadas com a embriogênese somática de hipocótilos de *Carthamus tinctorius*, Kumar & Kumari (2011) também relataram que durante a fase de regeneração dos embriões somáticos ocorre uma expressiva redução nos índices de açúcares solúveis totais.

Para Baud *et al.* (2002), em tecidos embriogênicos em intenso crescimento e desenvolvimento, como aqueles em processo de regeneração e crescimento, a mobilização dos açúcares solúveis totais é de grande importância, sendo responsável por fornecer energia metabólica e esqueletos carbônicos aos cultivos, além de atuar como sinalizadores do processo.

Mas embora a quantificação dos índices de açúcares solúveis totais dos propágulos seja essencial para melhorar o entendimento do desenvolvimento embrionário do dendezeiro, em algumas etapas do processo, o tipo de açúcar solúvel presente nos tecidos dos explantes pode ser de forma geral mais determinante que os próprios teores de açúcares solúveis totais (Sauter & Van Cleeve, 1991; Weber *et al.*, 1997).

De acordo com Delrot (2000), a sensibilidade das células vegetais aos diferentes açúcares solúveis, bem como sua concentração e transporte, podem atuar diretamente na regulação da morfogênese das culturas por meio do controle de seus processos de divisão e diferenciação celular. Dessa forma, o conhecimento do metabolismo dos carboidratos que compõem os açúcares solúveis totais também se torna fundamental para ajudar a elucidar as

alterações bioquímicas e fisiológicas que ocorrem durante a formação dos embriões.

Os resultados referentes aos teores de glicose, frutose e sacarose em razão do estágio de desenvolvimento embriogênico são apresentados na Figura 3. Verificou-se que até o início da etapa de regeneração dos embriões somáticos os açúcares solúveis totais presentes no corpo dos cultivos são constituídos em sua maioria pelo dissacarídeo sacarose, que nessas fases da embriogênese apresentam uma abundância relativa média girando em torno de 80% (Figura 4).

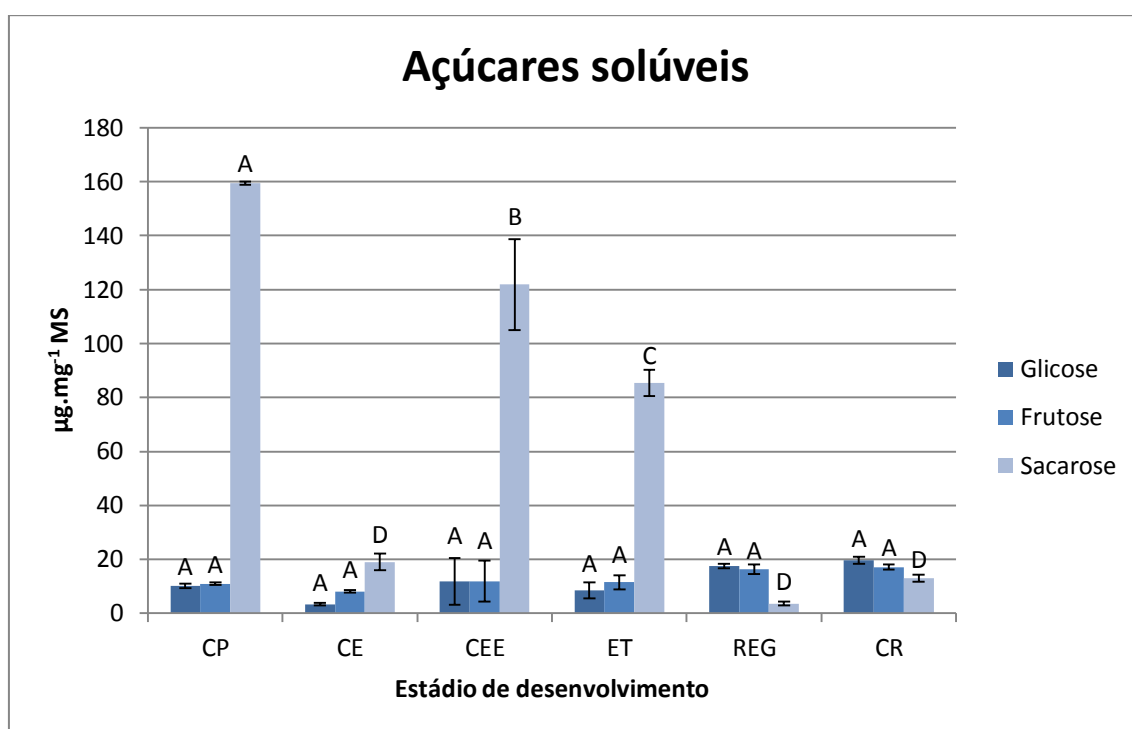


Figura 3. Teores de glicose, frutose e sacarose entre as etapas de multiplicação e regeneração da embriogênese somática de folhas imaturas de dendezeiro. Abreviações: CP = calo primário; CE = calo embriogênico; CEE = calo embriogênico com embriões somáticos; ET = embrião torpedo; REG = regeneração; CR = planta em crescimento. Os dados representam as médias seguidas dos erros padrões. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade na comparação dos índices de cada açúcar entre os diferentes estádios embriogênicos.

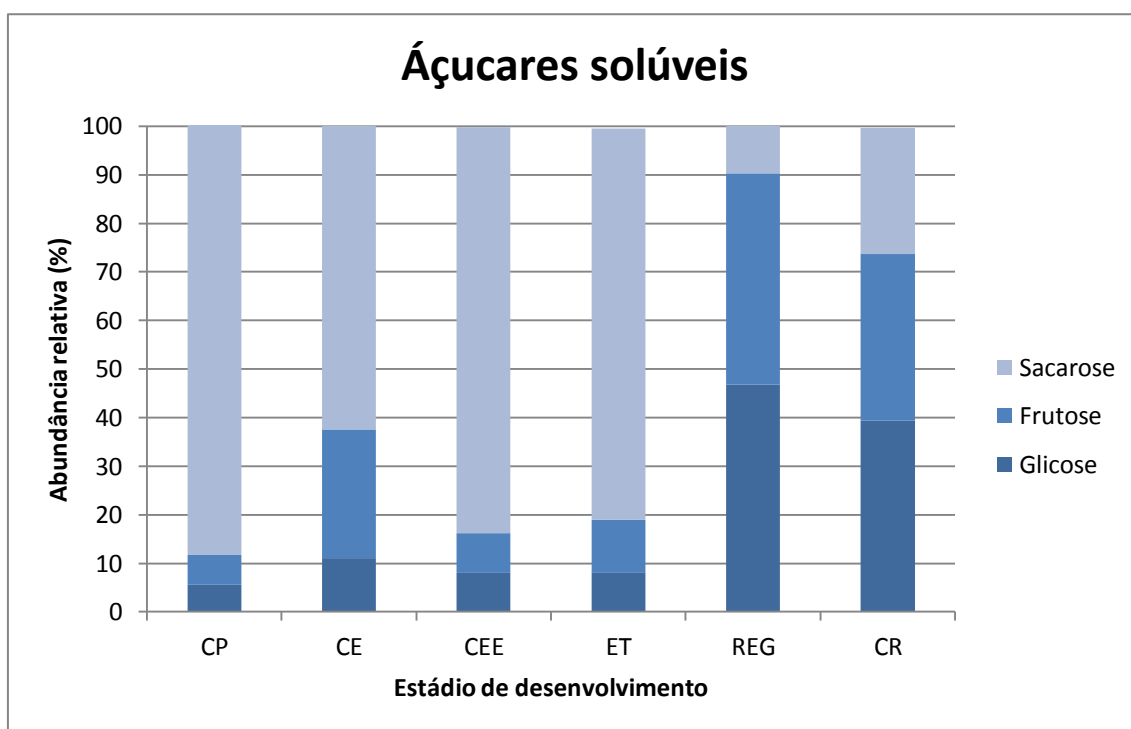


Figura 4. Abundâncias relativas de glicose, frutose e sacarose entre as etapas de multiplicação e regeneração da embriogênese somática de folhas imaturas de dendezeiro. Abreviações: CP = calo primário; CE = calo embriogênico; CEE = calo embriogênico com embriões somáticos; ET = embrião torpedo; REG = regeneração; CR = planta em crescimento.

Resultados semelhantes aos obtidos por Gomes *et al.* (2014) e Pescador *et al.* (2008), que na embriogênese somática de *Elaeis guineensis* e *Acca sellowiana*, respectivamente, ambos realizados a partir de embriões zigóticos de frutos maduros, também evidenciaram que no geral entre os estádios de calo primário e embrião torpedo, os açúcares solúveis totais são compostos em sua maior parte por sacarose. Para esses autores, tais resultados podem ser explicados em parte pela presença de quantidades significativas de sacarose nos meios de cultura.

Por outro lado, nos dois últimos estádios da etapa de regeneração da embriogênese somática de folhas imaturas de dendezeiro, observou-se que os açúcares solúveis totais, diferentemente do constatado até então, são constituídos principalmente pelos monossacarídeos glicose e frutose, que

nessas fases do cultivo apresentam juntos uma abundância relativa média variando entre 75 e 90%. Contudo, averiguou-se nessa etapa do cultivo que tais resultados se deram principalmente devido à redução significativa dos níveis de sacarose, uma vez que os valores de glicose e frutose nos cultivos basicamente não mudaram.

Tais resultados corroboram Iraqui & Tremblay (2001), que afirmam que no desenvolvimento embriogênico os monossacarídeos frutose e glicose e o dissacarídeo sacarose estão, geralmente, associados à regulação do desenvolvimento de estádios distintos. Para Weber *et al.* (1997), a frutose e a glicose são os açúcares solúveis responsáveis pelo controle do crescimento e do metabolismo celular, enquanto que a sacarose é o açúcar solúvel responsável pela regulação da diferenciação celular e do armazenamento de substâncias de reserva, além de constituir a principal fonte de esqueletos carbônicos e energia metabólica para as células durante o crescimento e desenvolvimento dos propágulos.

3.2 Amido

Os resultados referentes aos teores de amido em razão do estágio de desenvolvimento embriogênico são apresentados na Figura 5. Verificou-se que no início da etapa de multiplicação, os calos primários também foram os cultivos que apresentam as maiores concentrações de amido, em média cerca de $20 \mu\text{g.mg}^{-1}$ de massa seca, resultado estatisticamente superior ao constatado nos calos embriogênicos, que apresentam, em média, aproximadamente $13 \mu\text{g.mg}^{-1}$ de massa seca.

Silva *et al.* (2014b) também relataram na análise dos eventos de histodiferenciação envolvidos na aquisição e desenvolvimento da embriogênese somática de embriões zigóticos de dendezeiro, a ocorrência de um acúmulo significativo de grãos de amido nos tecidos que constituíam os calos primários. Nestes explantes, observou-se que a deposição de grãos de amido foi realizada no tecido parenquimático, principalmente nas células localizadas próximas aos centros meristemáticos.

Para os autores, a baixa atividade mitótica das células parenquimáticas, que constituem boa parte da estrutura dos calos primários, favorece o armazenamento de amido nestes explantes, visto que, no geral, em células em intenso processo de divisão, como as células meristemáticas que compõem praticamente todo o calo embriogênico, o acúmulo de grãos de amido geralmente é menos evidenciado.

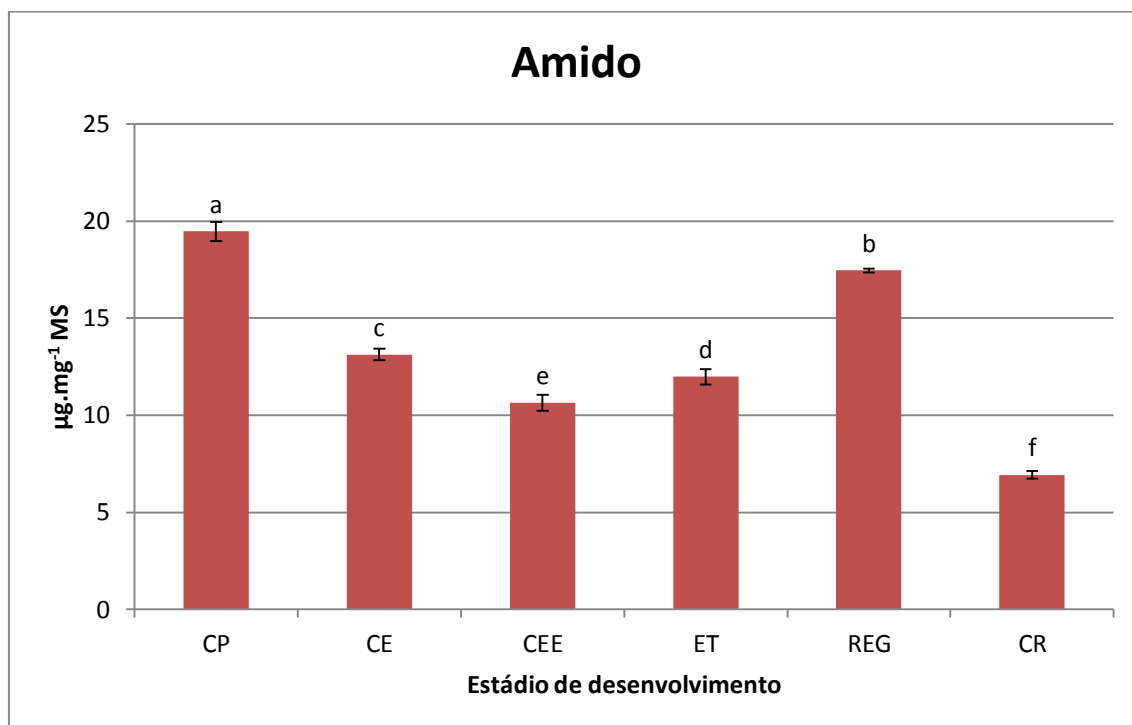


Figura 5. Teores de amido entre as etapas de multiplicação e regeneração da embriogênese somática de folhas imaturas de dendezeiro. Abreviações: CP = calo primário; CE = calo embriogênico; CEE = calo embriogênico com embriões somáticos; ET = embrião torpedo; REG = regeneração; CR = planta em crescimento. Os dados representam as médias seguidas dos erros padrões. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Em relação à etapa de diferenciação, ou seja, no estágio de calo embriogênico contendo embriões somáticos diferenciados, verificou-se uma significativa redução nos índices de amido presentes nos tecidos dos explantes

em desenvolvimento, que caíram nessa fase do cultivo de cerca de $13 \mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ de massa seca para aproximadamente $10 \mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ de massa seca.

Na embriogênese somática de *Elaeis guineensis* via embriões zigóticos de frutos maduros, Gomes *et al.* (2014) também constataram durante o processo de diferenciação dos embriões somáticos a ocorrência de uma diminuição expressiva dos teores de amido.

Tais resultados corroboram Martin *et al.* (2000), que afirmam que a diferenciação celular de tecidos embriogênicos é um processo que demanda altos níveis de energia metabólica, que no geral, são supridos por meio da hidrólise do amido, na qual são formados intermediários glicolíticos, que podem então ser utilizados para a produção de grandes quantidades de ATP (trifosfato de adenosina).

Em contrapartida, nos dois primeiros estádios da etapa de regeneração da embriogênese somática de folhas imaturas de dendezeiro, constatou-se a ocorrência de um acúmulo gradativo de amido no corpo dos propágulos, que ao final desse processo apresentavam uma concentração de cerca de $17 \mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ de massa seca.

Resultados semelhantes aos obtidos por Pescador *et al.* (2008), no estudo bioquímico da embriogênese somática de embriões zigóticos de *Acca sellowiana*, onde também foi constatado que a quantidade de amido aumentou gradualmente com o decorrer do processo de maturação dos embriões somáticos.

Já Cangahuala-Inocente *et al.* (2014) verificaram no estudo das mudanças fisiológicas e bioquímicas que ocorrem durante a embriogênese somática de goiabeira-serrana, também realizada a partir de embriões zigóticos, que no processo de maturação o teor de amido atinge o pico máximo na fase globular, diminuindo progressivamente com o transcorrer do processo.

Por fim, no último estágio da fase de regeneração, ou seja, durante o crescimento dos cultivos regenerados, constatou-se a ocorrência de um novo processo de mobilização do amido armazenado, que alcançou nessa etapa da

embriogênese somática seus menores níveis, aproximadamente $7 \mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ de massa seca.

Segundo Merkle *et al.* (1995), no final do desenvolvimento embriogênico o catabolismo do amido é comumente observado, sendo encarregado nessa fase do processo, por fornecer à planta energia metabólica para ser consumida durante seu crescimento inicial, mais precisamente na transição da heterotrofia para a autotrofia.

3.3 Ácidos graxos (ésteres metílicos de ácidos graxos)

Os resultados referentes aos teores de ácidos graxos totais em razão do estágio de desenvolvimento embriogênico são apresentados na Figura 6. Verificou-se que no início da etapa de multiplicação, diferentemente do constatado na análise dos açúcares solúveis totais e do amido, os calos embriogênicos foram os cultivos que apresentam as maiores concentrações de ácidos graxos totais, em média cerca de $300 \mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ de massa seca, resultado estatisticamente superior ao constatado nos calos primários, que em média apresentam apenas $75 \mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ de massa seca.

Cunha & Fernandes-Ferreira (2003), analisando as variações dos índices de lipídeos durante a embriogênese somática de hipocótilos de *Linum usitatissimum*, também observaram que em calos embriogênicos os percentuais de ácidos graxos totais são significativamente superiores àqueles observados em calos com características não embriogênicas, como os calos primários.

Tais resultados corroboram Turnham & Northcote (1984), no estudo do armazenamento de compostos lipídicos durante a embriogênese *in vitro* de *Elaeis guineensis*, onde também foi demonstrado que o acúmulo de ácidos graxos como metabólitos de reserva estava diretamente relacionado com a aquisição da competência embriogênica dos massivos celulares.

Da mesma forma, durante a etapa de diferenciação, ou seja, no estágio de calo embriogênico contendo embriões somáticos diferenciados, também foi constatado que os ácidos graxos totais presentes nos propágulos

embriogênicos continuaram apresentando níveis significativamente elevados, aumentando nessa fase do cultivo de aproximadamente 300 $\mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ de massa seca para cerca de 310 $\mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ de massa seca.

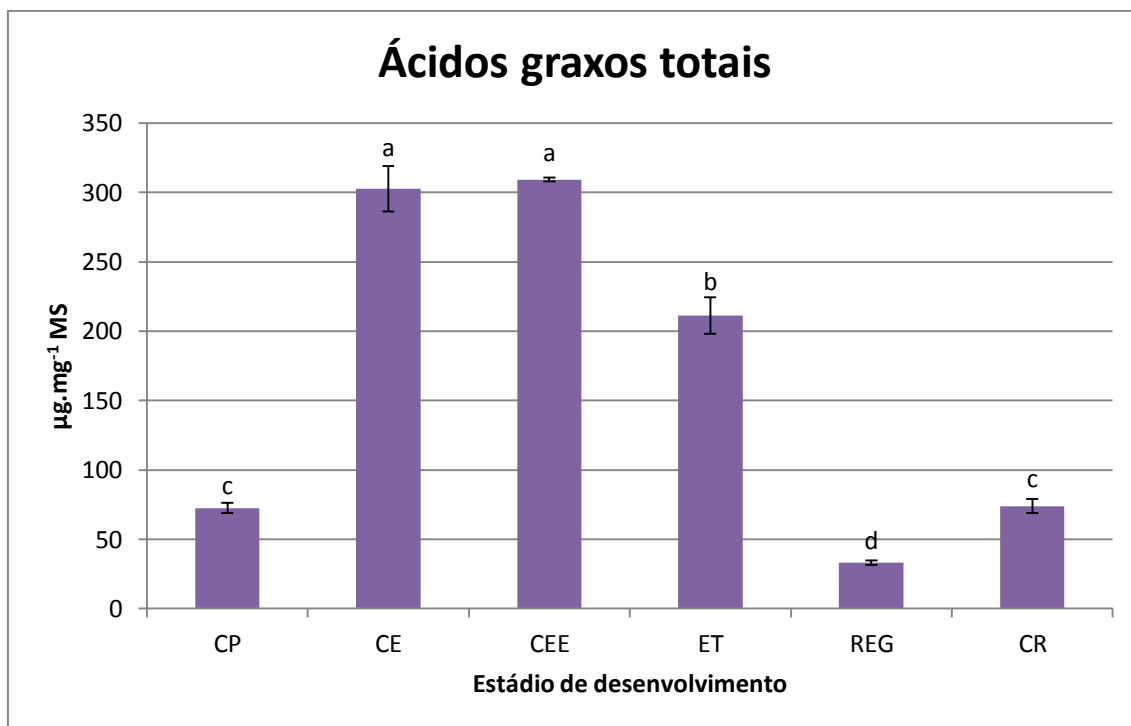


Figura 6. Teores de ácidos graxos totais entre as etapas de multiplicação e regeneração da embriogênese somática de folhas imaturas de dendezeiro. Abreviações: CP = calo primário; CE = calo embriogênico; CEE = calo embriogênico com embriões somáticos; ET = embrião torpedo; REG = regeneração; CR = planta em crescimento. Os dados representam as médias seguidas dos erros padrões. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Resultados semelhantes aos obtidos por Schwendiman *et al.* (1988), que na análise histoquímica da embriogênese somática de folhas imaturas de dendezeiro, também relataram que a síntese de lipídeos de armazenamento ocorre concomitantemente ao processo de histodiferenciação dos embriões somáticos. De acordo com esses autores, nessa fase da embriogênese somática da espécie o acúmulo de corpos lipídicos ocorre muito cedo,

iniciando-se com a formação de pequenas gotículas de óleo, que em seguida combinam-se para formar uma ou duas grandes gotas em cada célula.

Estudando a dinâmica dos teores de lipídios de reserva no decorrer da embriogênese somática de *Picea abies*, Grigová *et al.* (2007) também observaram que durante o processo de formação dos embriões somáticos ocorre um aumento nas concentrações de ácidos graxos totais no corpo dos propágulos em cultivo.

Quanto aos dois primeiros estádios da regeneração, verificou-se a ocorrência de uma significativa redução nos índices de ácidos graxos totais contidos nos tecidos dos explantes em desenvolvimento, caindo de cerca de 310 $\mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ de massa seca para 210 $\mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ de massa seca e posteriormente para apenas 33 $\mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ de massa seca.

Por outro lado, na embriogênese somática direta e na embriogênese somática indireta de *Acca sellowiana*, Pescador *et al.* (2012) relataram que as concentrações de ácidos graxos totais dos cultivos aumentam gradativamente com o decorrer dos estádios de maturação dos embriões somáticos. Nesse estudo, observou-se que em média os embriões globulares apresentam cerca de 40 μg de ácidos graxos totais por mg de massa seca, enquanto que os embriões cotiledonares apresentam aproximadamente 360 $\mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ de massa seca.

Analisando o conteúdo de óleo e a composição dos ácidos graxos que constituem os frutos, sementes e embriões zigóticos de *Elaeis guineensis*, Dussert *et al.* (2013) também relataram que, em contraste com o que acontece com o endosperma, onde a maior parte do óleo é armazenada nos estádios iniciais da embriogênese, no embrião zigótico observa-se uma contínua acumulação de ácidos graxos totais durante todo o desenvolvimento embrionário, no entanto, com valores relativamente mais moderadas. Segundo estes autores, em embriões maduros da espécie, quantidades significativas destes compostos de reserva podem ser claramente observadas ao longo da periferia das células em crescimento e desenvolvimento.

Tais resultados encontram-se de acordo com os obtidos no atual estudo, no qual, durante todo o transcorrer da embriogênese somática de folhas imaturas de dendzeiro, também foi verificada uma grande participação dos ácidos graxos totais na dinâmica do acúmulo e conversão das reservas energéticas presentes no corpo dos propágulos em desenvolvimento (Figura 7).

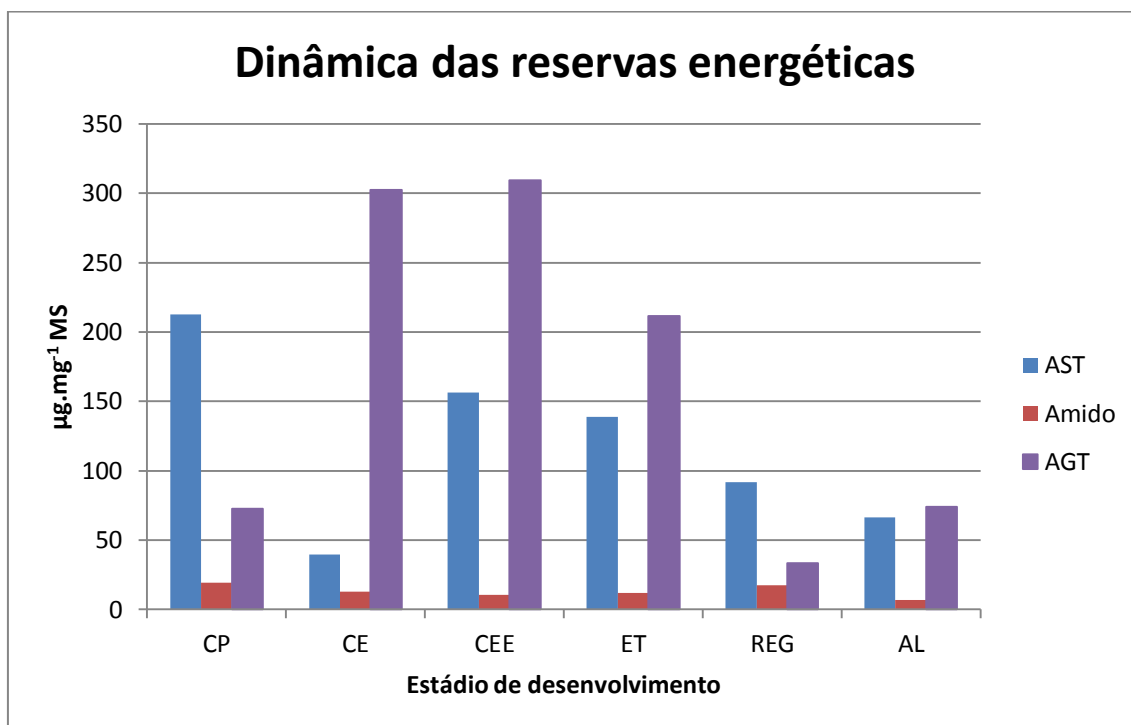


Figura 7. Teores de açúcares solúveis totais (AST), amido e ácidos graxos totais (AGT) entre as etapas de multiplicação e regeneração da embriogênese somática de folhas imaturas de dendzeiro. Abreviações: CP = calo primário; CE = calo embriogênico; CEE = calo embriogênico com embriões somáticos; ET = embrião torpedo; REG = regeneração; CR = planta em crescimento.

Em relação aos teores dos ácidos graxos que constituem os compostos lipídicos entre as etapas de multiplicação e regeneração da embriogênese somática de folhas imaturas de dendzeiro, os resultados são apresentados na Tabela 1.

Verificou-se que nestas etapas do desenvolvimento embriogênico, os lipídeos presentes nos propágulos em cultivo são compostos pelos ácidos graxos: ácido mirístico (C14:0), ácido pentadecílico (C15:0), ácido palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0), ácido oléico (C18:1), ácido linoléico (C18:2), ácido linolênico (C18:3), ácido araquídico (C20:0), ácido gadoléico (C20:1), ácido behênico (C22:0) e ácido erúcico (C22:1).

No entanto, observou-se que, de forma geral, os lipídeos que constituem os tecidos dos explantes em desenvolvimento são compostos em sua grande maioria pelo ácido palmítico e pelo ácido linoléico, que juntos possuem uma abundância relativa média de aproximadamente 80% (Figura 8).

Tabela 1. Teores dos ácidos graxos que constituem os lipídeos entre as etapas de multiplicação e regeneração da embriogênese somática de folhas imaturas de dendezeiro.

Ácido graxo ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ MS)	Estádio de desenvolvimento					
	CP	CE	CEE	ET	REG	CR
C14:0	2,0 \pm 0,0 A	2,0 \pm 0,0 A	2,0 \pm 0,0 A	2,0 \pm 0,0 A	2,0 \pm 0,0 A	1,3 \pm 0,6 A
C15:0	0,6 \pm 0,6 A	1,3 \pm 0,6 A	1,3 \pm 0,6 A	2,0 \pm 0,0 A	0,0 \pm 0,0* A	0,0 \pm 0,0 A
C16:0	30,0 \pm 1,1 D	93,3 \pm 5,6 B	105,3 \pm 1,7 A	81,3 \pm 4,0 C	15,3 \pm 0,6 E	24,6 \pm 1,7 D
C18:0	2,6 \pm 0,6 D	15,3 \pm 0,6 A	12,6 \pm 0,6 B	9,3 \pm 0,6 C	2,0 \pm 0,0 D	4,0 \pm 0,0 D
C18:1	2,0 \pm 0,0 C	6,6 \pm 0,6 B	8,0 \pm 0,0 A	8,6 \pm 0,6 A	0,0 \pm 0,0 D	2,0 \pm 0,0 C
C18:1⁽²⁾	0,0 \pm 0,0 C	2,0 \pm 0,0 B	4,0 \pm 0,0 A	2,6 \pm 0,6 B	0,0 \pm 0,0 C	0,0 \pm 0,0 C
C18:2	27,3 \pm 0,6 C	163,3 \pm 8,6 A	159,3 \pm 2,6 A	96,6 \pm 6,3 B	11,3 \pm 0,6 D	26,0 \pm 2,0 C
C18:3	7,3 \pm 0,6 B	6,6 \pm 0,6 B	6,0 \pm 0,0 B	4,0 \pm 0,0 C	2,6 \pm 0,6 C	15,3 \pm 1,3 A
C20:0	0,6 \pm 0,6 B	4,0 \pm 0,0 A	3,3 \pm 0,6 A	1,3 \pm 0,6 B	0,0 \pm 0,0 B	0,0 \pm 0,0 B
C20:1	0,0 \pm 0,0 A	1,3 \pm 0,6 A	0,6 \pm 0,6 A	0,6 \pm 0,6 A	0,0 \pm 0,0 A	0,0 \pm 0,0 A
C22:0	0,0 \pm 0,0 C	4,0 \pm 0,0 A	4,0 \pm 0,0 A	2,0 \pm 0,0 B	0,0 \pm 0,0 C	0,6 \pm 0,6 C
C22:1	0,0 \pm 0,0 B	2,0 \pm 0,0 A	2,0 \pm 0,0 A	0,6 \pm 0,6 B	0,0 \pm 0,0 B	0,0 \pm 0,0 B

Abreviações: CP = calo primário; CE = calo embriogênico; CEE = calo embriogênico com embriões somáticos; ET = embrião torpedo; REG = regeneração; CR = planta em crescimento; C14:0 = mirístico; C15:0 = pentadecílico; C16:0 = palmítico; C18:0 = esteárico; C18:1 = oléico; C18:1⁽²⁾ = não identificado; C18:2 = linoléico; C18:3 = linolênico; C20:0 = araquídico; C20:1 = gadoléico; C22:0 = behênico; C22:1 = erúcico. Os dados representam as médias seguidas dos erros padrões. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade na comparação dos índices de cada ácido graxo entre os diferentes estádios embriogênicos. *Valor abaixo do limite mínimo de detecção.

O ácido palmítico (C16:0) é o ácido graxo saturado mais comumente encontrado nos óleos vegetais. Este composto recebe essa nomenclatura por ser o principal componente do óleo produzido pelas palmeiras, entre elas o dendzeiro. Segundo Ohlrogge (1994), o ácido palmítico, composto produzido pela conversão do excesso de hidratos de carbono presentes nos organismos vegetais, é o primeiro ácido graxo produzido durante a síntese dos ácidos graxos, e o precursor de ácidos graxos de cadeias mais longas.

O ácido linoleico (C18:2) também é um ácido graxo de grande ocorrência nos óleos vegetais. Este por sua vez, é um ácido graxo insaturado que segundo Pollard *et al.* (2015), encontra-se em maior concentração nos tecidos que constituem as sementes e os embriões das plantas.

Ao analisar o perfil dos ácidos graxos de embriões somáticos de *Simmondsia chinensis*, oriundos tanto da embriogênese somática de embriões zigóticos quanto da embriogênese somática de folhas imaturas, Aly *et al.* (2008) também reportaram que o ácido palmítico e o ácido linoléico, juntamente com o ácido oléico, são os ácidos graxos de maior relevância na composição dos lipídeos.

Quanto aos níveis destes ácidos graxos, constatou-se que no início da etapa de multiplicação o ácido palmítico apresentava uma abundância relativa de aproximadamente 40% da composição dos ácidos graxos totais presentes nos calos primários e o ácido linoléico cerca de 35%. Em contrapartida, nos calos embriogênicos o ácido linoléico representava aproximadamente 55% da composição destes compostos de reserva, enquanto que o ácido palmítico compreendia cerca de 30%.

Pescador *et al.* (2012), no estudo comparativo do armazenamento de reservas de lipídeos durante a embriogênese somática e zigótica de *Acca sellowiana*, também relataram resultados parecidos. Nesse trabalho, observou-se que em massas não embriogênicas os percentuais relativos destes ácidos graxos foram de 47% de ácido palmítico e 17% de ácido linoléico. Já nas massas celulares indutoras de embriões somáticos, as frequências relativas destes ácidos graxos foram de 63% de ácido linoléico e 9% de ácido palmítico,

abundâncias relativas que segundo os autores, são bem próximas às encontradas nos embriões zigóticos e somáticos da espécie.

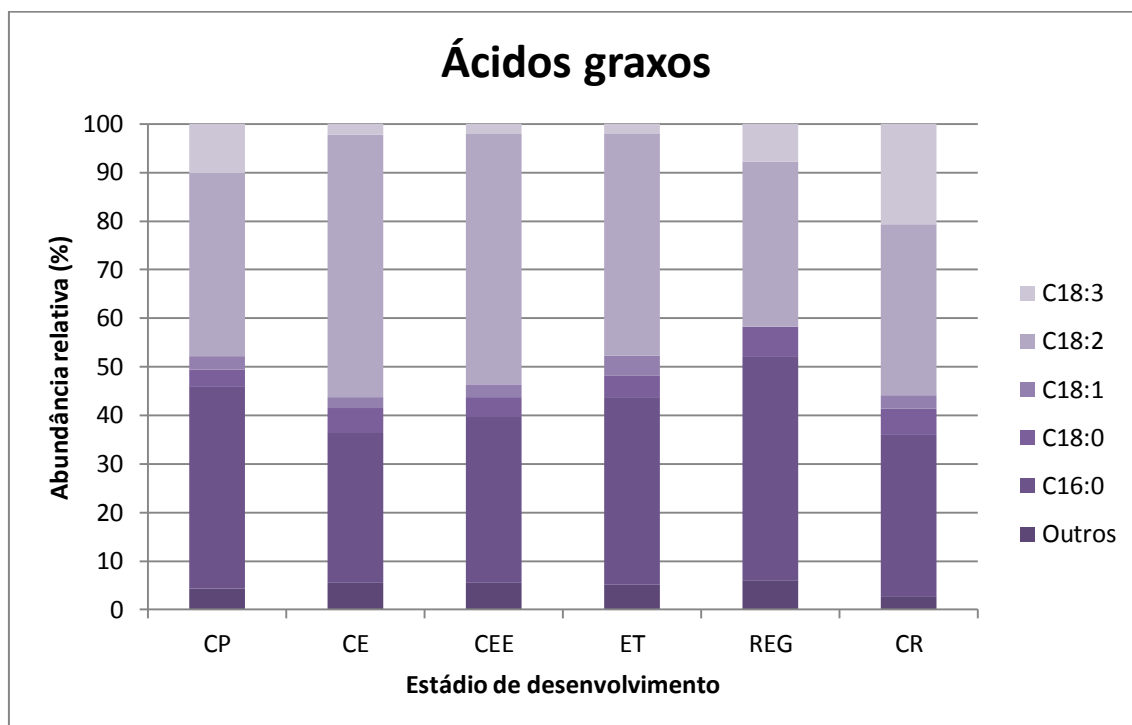


Figura 8. Abundâncias relativas dos ácidos graxos de maior relevância na constituição dos lipídeos entre as etapas de multiplicação e regeneração da embriogênese somática de folhas imaturas de dendezeiro. Abreviações: CP = calo primário; CE = calo embriogênico; CEE = calo embriogênico com embriões somáticos; ET = embrião torpeda; REG = regeneração; CR = planta em crescimento; C14:0 = mirístico; C15:0 = pentadecílico; C16:0 = palmítico; C18:0 = esteárico; C18:1 = oléico; C18:2 = linoléico; C18:3 = linolênico.

Tais resultados estão de acordo com os obtidos por Reidiboym-Tallex & March (1999), na análise da composição lipídica de calos não embriogênicos e embriogênicos de *Prunus avium*, onde também foi constatado que nas massas não embriogênicas ocorre uma elevada proporção de ácido palmítico em relação aos demais ácidos graxos, enquanto que nos tecidos embriogênicos, os lipídios aparecem mais com ácidos graxos menos saturados, como o ácido linoléico.

Segundo estes autores, esta proporção dos ácidos graxos pode ser atribuída à menor atividade metabólica das células parenquimáticas que formam boa parte da estrutura dos calos primários, pois o aumento do metabolismo celular auxilia a conversão do ácido palmítico em ácidos graxos insaturados com cadeias mais longas, entre eles o ácido linoléico.

Em relação às etapas de diferenciação e regeneração, verificou-se que, as abundâncias relativas de ácido palmítico aumentaram gradativamente, subindo de cerca de 30% para aproximadamente 46%. Concomitantemente a esse processo, constatou-se a mobilização do ácido linoléico, que teve suas abundâncias relativas reduzidas de cerca de 55% para menos de 35%.

Dussert *et al.* (2013), analisando bioquimicamente o desenvolvimento da embriogênese zigótica de *Elaeis guineensis*, também observaram que durante o decorrer do processo de maturação os teores de ácido linoléico sofreram uma redução significativa, caindo de aproximadamente 30% para valores próximos a 20%. No entanto, nesse trabalho a acumulação de ácido palmítico nos tecidos dos embriões em maturação não foi constatada, permanecendo em torno de 25% durante toda a embriogênese.

Por outro lado, no estudo da dinâmica do armazenamento de corpos lipídicos durante a embriogênese somática de *Picea abies*, Grigová *et al.* (2007) constataram que, nos estádios finais do desenvolvimento embriogênico, ocorre uma redução significativa nas proporções de ácido palmítico de forma simultânea ao aumento das proporções de ácido linoléico.

3.4 Aminoácidos livres

Os resultados referentes aos teores de aminoácidos totais livres em razão do estágio de desenvolvimento embriogênico são apresentados na Figura 9. Verificou-se que, de forma geral, entre as etapas de multiplicação e diferenciação são observadas as maiores concentrações de aminoácidos totais livres, que durante estas fases do processo giram em torno de 2.250 nmol.mg⁻¹ de massa seca.

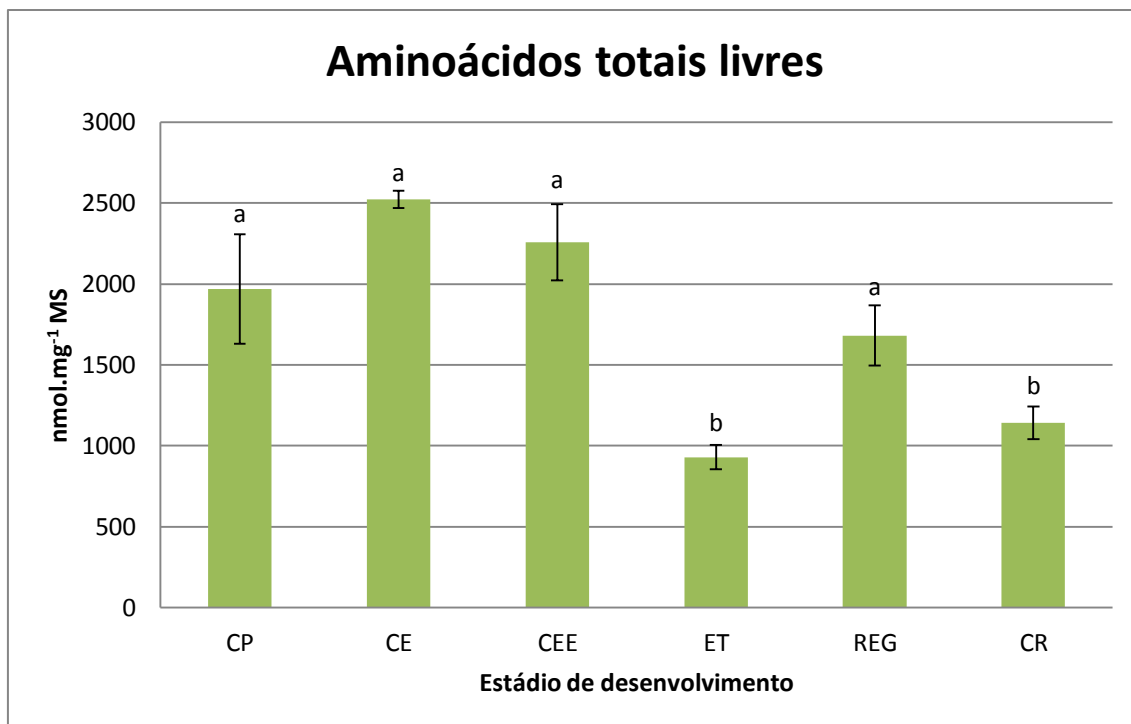


Figura 9. Teores de aminoácidos totais livres entre as etapas de multiplicação e regeneração da embriogênese somática de folhas imaturas de dendezeiro. Abreviações: CP = calo primário; CE = calo embriogênico; CEE = calo embriogênico com embriões somáticos; ET = embrião torpeda; REG = regeneração; CR = planta em crescimento. Os dados representam as médias seguidas dos erros padrões. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

No estudo bioquímico da embriogênese somática de embriões zigóticos de *Elaeis guineensis*, Gomes *et al.* (2014) também verificaram na composição de calos primários, calos embriogênicos e calos embriogênicos em processo de diferenciação, a existência de quantidades expressivas de aminoácidos totais livres. Segundo os autores, durante esses estádios do desenvolvimento embrionário da espécie os aminoácidos totais livres são constituídos em sua maioria por arginina, asparagina, alanina, leucina, glutamina e serina.

Para Fehér *et al.* (2003), os elevados teores de aminoácidos totais livres, constatados nessas etapas da embriogênese somática vegetal, se devem principalmente ao aumento da atividade metabólica dos cultivos estimulado pela presença de auxinas nos meios nutritivos, entre elas o 2,4-D e o Picloram.

No entanto, é provável que no caso da embriogênese somática de folhas imaturas de dendezeiro, tais resultados estejam associados também com a suplementação dos meios de indução, multiplicação e diferenciação com quantidades significativas de compostos nitrogenados, como a glutamina, a caseína hidrolisada, a cisteína e a asparagina que, assim, favoreceu a síntese e o acúmulo de aminoácidos livres.

Por outro lado, após a transferência dos explantes para meios nutritivos livres de reguladores de crescimento e isentos desses compostos nitrogenados, ou seja, durante a etapa de regeneração dos embriões somáticos, verificou-se que os índices de aminoácidos totais livres decaíram subitamente, apresentando nos embriões somáticos em fase de torpedo cerca de 930 nmol.mg⁻¹ de massa seca.

Estudando o metabolismo dos aminoácidos na embriogênese somática de *Acca sellowiana* realizada a partir de embriões zigóticos de frutos maduros, Booz *et al.* (2009) também constataram durante o transcorrer do processo de maturação, a ocorrência de uma queda significativa nos índices de aminoácidos totais livres nos tecidos dos explantes em cultivo.

Segundo Cangahuala-Inocente *et al.* (2014), no processo de maturação dos embriões somáticos a redução dos valores de aminoácidos livres ocorre, provavelmente, em consequência de sua incorporação para a formação de proteínas associadas com o processo de histodiferenciação dos propágulos.

Para Hirner *et al.* (1998), durante o decorrer do processo de maturação a diminuição dos níveis de aminoácidos totais livres se deve também à síntese de proteínas LEA, geralmente realizada nos estádios tardios do desenvolvimento embrionário, mais especificamente, segundo os autores, nos embriões em estágio cotiledonar.

Em relação à fase de regeneração, constatou-se nos tecidos dos explantes em desenvolvimento a ocorrência de um aumento significativo nas concentrações de aminoácidos totais livres, que durante esse processo alcançaram valores médios de aproximadamente 1.680 nmol.mg⁻¹ de massa seca.

Resultados semelhantes também foram relatados por Kumar & Kumari (2011), na análise bioquímica da embriogênese somática de hipocótilos de *Carthamus tinctorius*, onde também foi constatado um aumento expressivo nos teores de aminoácidos totais livres concomitantemente à conversão dos embriões somáticos em plantas.

Por fim, durante o crescimento dos cultivos regenerados, na parte final da etapa de regeneração, observou-se um novo processo de mobilização dos aminoácidos totais livres contidos nos tecidos dos explante, que nessa fase da embriogênese somática de folhas imaturas de dendezeiro, caíram para cerca de 1.150 nmol.mg⁻¹ de massa seca.

Tais resultados, assim como verificado na análise dos níveis de amido, provavelmente estão relacionados também com a transição da planta da heterotrofia para a autotrofia, onde possivelmente os aminoácidos livres estão sendo utilizados como fonte de nutrientes e como compostos básicos para a biosíntese de outros metabólitos de interesse (King & Gifford, 1997; Müntz *et al.*, 2001).

Quanto à análise dos teores de prolina em razão do estágio de desenvolvimento embriogênico, os resultados são apresentados na Figura 10. Verificou-se que no início da etapa de multiplicação os calos embriogênicos são os cultivos que apresentam as maiores concentrações de prolina, em média cerca de 390 nmol.mg⁻¹ de massa seca, resultado estatisticamente superior ao constatado nos calos primários, que apresentam em média apenas 150 nmol.mg⁻¹ de massa seca.

Na análise dos níveis endógenos de aminoácidos livres contidos em culturas embriogênicas de *Vigna mungo*, Sen *et al.* (2002) também relataram a presença de índices expressivos de prolina nos tecidos que constituíam os calos embriogênicos da espécie. De acordo com os autores, nessa etapa do desenvolvimento embriogênico esses compostos são responsáveis por fornecer nitrogênio orgânico às células vegetais em intenso processo de divisão, além de promover a proteção das mesmas contra a ocorrência de um possível estresse associado ao cultivo *in vitro*.

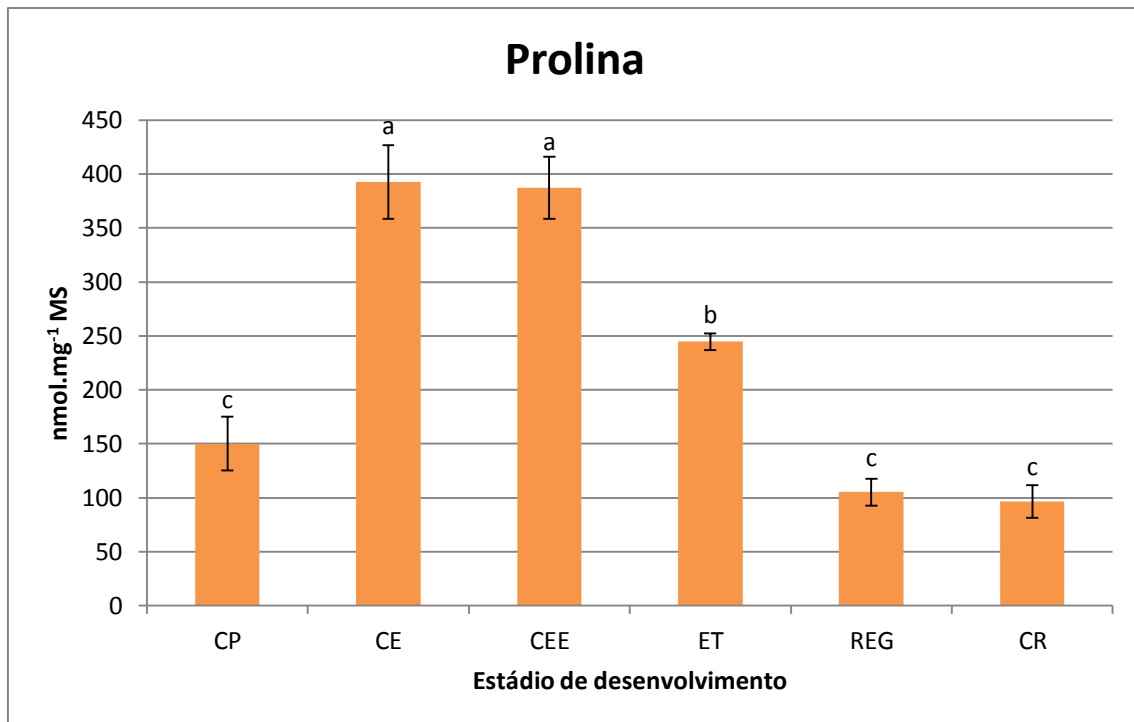


Figura 10. Teores de prolina entre as etapas de multiplicação e regeneração da embriogênese somática de folhas imaturas de dendezeiro. Abreviações: CP = calo primário; CE = calo embriogênico; CEE = calo embriogênico com embriões somáticos; ET = embrião torpedo; REG = regeneração; CR = planta em crescimento. Os dados representam as médias seguidas dos erros padrões. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Já para Gomes *et al.* (2014), nessa fase da embriogênese somática o acúmulo de prolina nos tecidos dos cultivos em desenvolvimento está possivelmente associado ao estresse inerente à desprogramação e reprogramação celular induzida pelas elevadas concentrações de auxinas acrescidas aos meios nutritivos.

Tais resultados estão de acordo com Verbruggen & Hermans (2008) e Lehmann *et al.* (2010), que afirmam que em plantas vasculares o teor de prolina aumenta significativamente em função de diversas condições de estresse ambiental. Segundo Szabados & Savouré (2010), em plantas submetidas a condições de estresses abióticos, o acúmulo de prolina tem a função de proteção, ajudando a estabilizar as proteínas, o DNA e as

membranas celulares, além de aumentar a capacidade das enzimas antioxidantes.

Por outro lado, durante o processo de diferenciação dos embriões somáticos os níveis de prolina existentes nos propágulos não apresentaram variações significativas, mantendo-se próximos de 390 nmol.mg^{-1} de massa seca. Em contrapartida, na fase regeneração dos embriões somáticos verificou-se que as concentrações de prolina contidas nos tecidos dos cultivos em desenvolvimento diminuíram gradativamente, apresentando no final desse processo valores de aproximadamente 100 nmol.mg^{-1} de massa seca.

Estudando as alterações dos teores de prolina em embriões somáticos de *Juglans regia* oriundos da embriogênese somática de cotilédones imaturos, Jariteh *et al.* (2015) também relataram que, de forma geral, durante o decorrer do processo de maturação os níveis de prolina diminuem progressivamente. Segundo os autores, tais resultados demonstram que a dessecação inerente do processo de maturação dos embriões somáticos, possivelmente, não está promovendo às culturas níveis significativos de estresse osmótico.

Por fim, durante o estágio final da regeneração, quando os cultivos regenerados entraram em crescimento, também foi constatado que os níveis de prolina contidos nos explantes mantiveram-se constantes, permanecendo nessa fase da embriogênese somática de folhas imaturas de dendezeiro com valores próximos a 100 nmol.mg^{-1} de massa seca.

Nieves *et al.* (2008), examinando o conteúdo de prolina na embriogênese somática de folhas jovens de *Saccharum* sp., também não relataram o acúmulo desse metabólito em regenerantes com aproximadamente 30 dias de cultivo. No entanto, diferentemente do constatado no presente trabalho, nesse estudo verificou-se que no processo de crescimento dos propágulos as concentrações de prolina diminuem de forma significativa.

3.5 Proteínas totais

Os resultados referentes aos teores de proteínas totais em razão do estágio de desenvolvimento embriogênico são apresentados na Figura 11. No

início da fase de multiplicação verificou-se que os calos embriogênicos são os cultivos que apresentam as maiores concentrações de proteínas totais, em média, cerca de $63 \mu\text{g.mg}^{-1}$ de massa seca, resultado estatisticamente superior ao constatado nos calos primários, que apresentam em média $36 \mu\text{g.mg}^{-1}$ de massa seca.

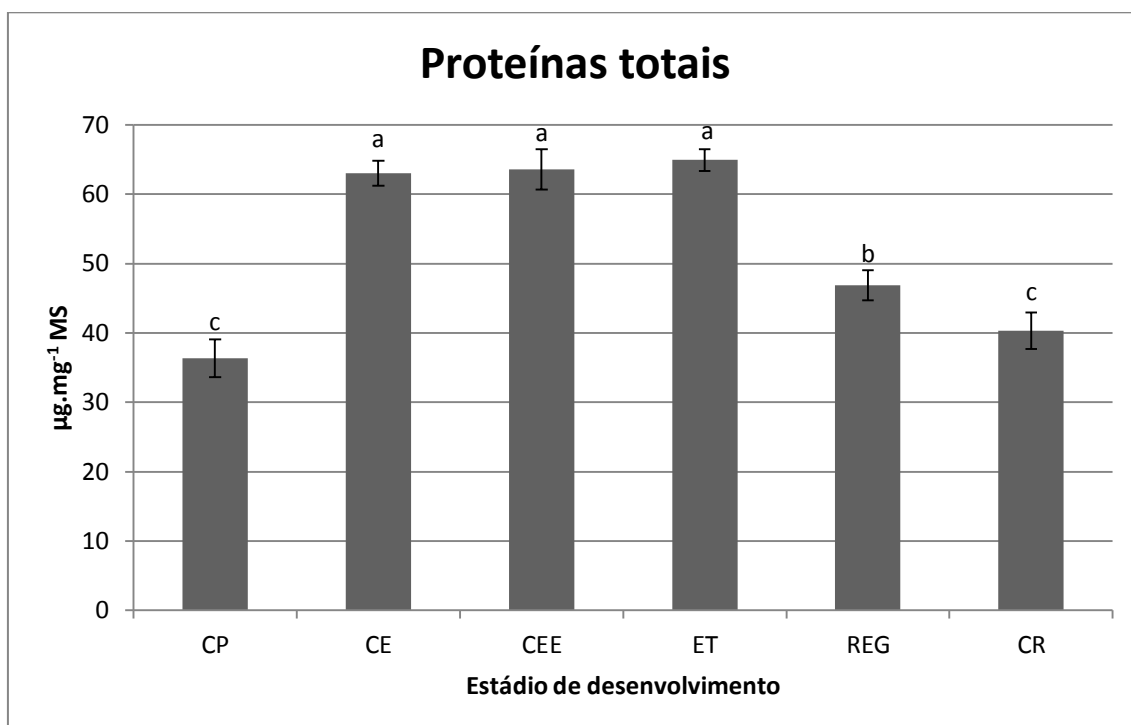


Figura 11. Teores de proteínas totais entre as etapas de multiplicação e regeneração da embriogênese somática de folhas imaturas de dendezeiro. Abreviações: CP = calo primário; CE = calo embriogênico; CEE = calo embriogênico com embriões somáticos; ET = embrião torpedo; REG = regeneração; CR = planta em crescimento. Os dados representam as médias seguidas dos erros padrões. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Warchoń *et al.* (2015) também constataram durante a caracterização bioquímica de linhagens embriogênicas de *Cordyline australis*, obtidas a partir da embriogênese somática de folhas imaturas, que calos embriogênicos possuem um nível mais elevado de proteínas totais que calos com características não embriogênicas, como os calos primários.

Tais resultados corroboram Fehér *et al.* (2003) que afirmam que a aquisição da competência embriogênica pelas células somáticas, realizada por meio de sua desdiferenciação e reprogramação, é um processo complexo que envolve a expressão de uma série de proteínas.

De acordo com Silva *et al.* (2014a), na embriogênese somática de embriões zigóticos de dendezeiro, diversas proteínas também estão envolvidas com a aquisição da competência embriogênica dos cultivos. Entre elas, destacam-se aquelas envolvidas com o estresse oxidativo, com o ciclo celular, com o acúmulo de amido, com o metabolismo energético, com o metabolismo do nitrogênio e com o processamento de proteínas.

Quanto à etapa de diferenciação e o estágio inicial da regeneração, ou seja, nas fases de calo embriogênico contendo embriões somáticos diferenciados e de embriões somáticos em estágio de torpedo, observou-se que as concentrações de proteínas totais nos explantes não diferiram estatisticamente entre si, mantendo-se com valores próximos a $63 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de massa seca.

Resultados distintos aos constatados por Kumar & Kumari (2011) e Jariteh *et al.* (2015), no estudo das alterações bioquímicas que ocorrem durante a embriogênese somática de hipocótilos de *Carthamus tinctorius* e de cotilédones imaturos de *Juglans regia*, respectivamente, onde foi relatado que, de forma geral, os índices de proteínas totais decaem de forma significativa durante os diferentes estádios de maturidade dos embriões somáticos.

Analisando a dinâmica das mudanças fisiológicas e bioquímicas envolvidas na embriogênese somática de embriões zigóticos de *Acca sellowiana*, Cangahuala-Inocente *et al.* (2014) também encontraram diferenças expressivas nas concentrações de proteínas totais entre os diferentes estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos. No entanto, verificou-se em goiabeira-serrana que as concentrações destes metabólitos aumentam gradativamente com o decorrer do processo.

Por fim, nos dois últimos estádios da etapa de regeneração da embriogênese somática de folhas imaturas de dendezeiro, observou-se que os

teores de proteínas totais dos propágulos reduziram de forma progressiva, atingindo ao final do cultivo índices de aproximadamente $40 \mu\text{g.mg}^{-1}$ de massa seca.

Resultados semelhantes aos relatados por Nieves *et al.* (2008), que no estudo bioquímico da embriogênese somática de folhas jovens de *Saccharum* sp., também constataram a diminuição dos teores de proteínas totais em regenerantes com aproximadamente 30 dias de cultivo.

No estudo comparativo dos índices de proteínas totais durante os estádios de aquisição e desenvolvimento da embriogênese somática de *Elaeis guineensis*, realizada a partir de embriões zigóticos de frutos maduros, Gomes *et al.* (2014) também relataram que durante a fase de regeneração de plantas ocorre uma redução expressiva nos índices de proteínas totais, que nesse estudo, caíram de aproximadamente $220 \mu\text{g.mg}^{-1}$ de massa seca para cerca de $180 \mu\text{g.mg}^{-1}$.

Segundo Aberlenc-Bertossi *et al.* (2008), nesse estágio de desenvolvimento da embriogênese somática de culturas em suspensão do dendezeiro são expressas principalmente proteínas relacionadas com a via glicolítica e proteínas de reserva, especialmente globulinas.

4. CONCLUSÕES

No início da multiplicação os calos primários são os propágulos que apresentam as maiores concentrações de açúcares solúveis totais. Por outro lado, entre a diferenciação e o início da regeneração não é constatada a ocorrência de variações expressivas nos índices destes compostos, que após esse período apresentam uma significativa redução.

Até o primeiro estágio da etapa de regeneração os açúcares solúveis totais existentes nos explantes são constituídos em sua maioria por sacarose. Em contrapartida, após essa fase a glicose e a frutose são os açúcares solúveis de maior relevância na composição dos açúcares solúveis totais.

No início da multiplicação os calos primários também são os cultivos que apresentam os maiores níveis de amido. Entretanto, verifica-se nesse composto que durante a etapa de diferenciação seus teores apresentam uma diminuição significativa. Já na regeneração constata-se a ocorrência de um acúmulo gradativo de amido, que ao final desse processo é então mobilizado.

Em relação aos ácidos graxos totais, observa-se que no início da multiplicação os calos embriogênicos são os explantes que apresentam as maiores concentrações. Após essa fase, verifica-se que estes metabólitos continuam com níveis relativamente elevados, apresentando ao final da etapa de diferenciação, de forma geral, uma redução progressiva. Tais compostos, independentemente da etapa analisada, são constituídos em sua maior parte por ácido palmítico e ácido linoléico.

Quanto aos aminoácidos totais livres, verifica-se que no geral entre a multiplicação e diferenciação são observadas as maiores concentrações. Após esse período, constata-se que os índices destes metabólitos decaem até o início da etapa de regeneração. Em seguida, os aminoácidos totais livres são acumulados nos regenerantes e então mobilizados no crescimento inicial da planta.

Por fim, na análise das proteínas totais verifica-se que no início da multiplicação os calos embriogênicos são os propágulos que apresentam as maiores concentrações. Em contrapartida, entre a diferenciação e o início da

regeneração não são constatadas diferenças estatísticas nos índices destes compostos, que após esse processo reduzem de forma progressiva.

Tais resultados podem ajudar a elucidar as alterações bioquímicas e fisiológicas que ocorrem durante o desenvolvimento embriogênico do dendezeiro, além de auxiliar a compreensão e otimização dos protocolos de embriogênese somática da espécie.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABERLENC-BERTOSSI, F.; CHABRILLANGE, N.; DUVAL, Y.; TREGAR, J. Contrasting globulin and cysteine proteinase gene expression patterns reveal fundamental developmental differences between zygotic and somatic embryos of oil palm. **Tree Physiology**, v.28, p.1157-1167, 2008.

ALY, M. A.; AMER, E. A.; AL-ZAYADNEH, W. A.; ELDIN, A. E. N. Growth regulators influence the fatty acid profiles of *in vitro* induced jojoba somatic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.93, p.107-114, 2008.

AMARAL, L. I. V.; COSTA, P. M. F.; AIDAR, M. P. M.; GASPAR, M. BUCKERIDGE, M. S. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. **Hoehnea**, v.34, p.425-431, 2007.

BALZON, T. A.; LUIZ, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. New approaches to improve the efficiency of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) from mature zygotic embryos. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v.49, p.41-50, 2013.

BAUD, S.; BOUTIN, J. P.; MIQUEL, M.; LEPINIEC, L.; ROCHAT, C. An integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.40, p.151-160, 2002.

BOOZ, M. R.; KERBAUY, G. B.; GUERRA, M. P.; PESCADOR, R. The role of γ -aminobutyric acid (Gaba) in somatic embryogenesis of *Acca sellowiana* Berg. (Myrtaceae). **Brazilian Society of Plant Physiology**, v.21, p.271-280, 2009.

BRADFORD, M. M. A rapid sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1956.

CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; SILVEIRA, V.; CAPRESTANO, C. A.; FLOH, E. I.; GUERRA, M. P. Dynamics of physiological and biochemical changes during somatic embryogenesis of *Acca sellowiana*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v.50, p.166-175, 2014.

CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; STEINER, N.; MALDONADO, S. B. GUERRA, M. P. Patterns of protein and carbohydrate accumulation during somatic embryogenesis of *Acca sellowiana*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, p.217-224, 2009.

CHANPRASERT, W.; MYINT, T.; SRIKUL, S.; WONGSRI, O. Effects of neonicotinoid and method of breaking dormancy on seed germination and seedling vigour of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Journal of Oil Palm Research**, v.24, p.1227-1234, 2012.

CHOI, D. S.; ANDRADE, M. H. C.; WILLIS, L. B.; CHO, C. W.; SCHOENHEIT, J.; BOCCAZZI, P.; SAMBANTHANMURTHI, R.; SINSKEY, A. J.; RHA, C. K. Effect of agitation and aeration of yield optimization of oil palm suspension culture. **Journal of Palm Oil Research**, v.1, p.23-34, 2008.

CONSTANTIN, M.; NCHU, W. A.; GODSWILL, N. N.; WIENDI, N. M. A.; WACHJAR, A.; FRANK, N. E. G. Induction of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq. var. Tenera) callogenesis and somatic embryogenesis from young leaf explants. **Journal of Applied Biology and Biotechnology**, v.3, p.4-10, 2015.

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

CUNHA, A. C.; FERNANDES-FERREIRA, M. Ontogenic variations in free and esterified fatty acids during somatic embryogenesis of flax (*Linum usitatissimum* L.). **Plant Science**, v.164, p.863-872, 2003.

DELROT, S.; ATANASSOVA, R.; MAUROUSSET, L. Regulation of sugar, amino acid and peptide plant membrane transporter. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1465, p.281-306, 2000.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, p.350-356, 1956.

DUSSERT, S.; GUERIN, C.; ANDERSSON, M.; JOËT, T.; TRANBARGER, T. J.; PIZOT, M.; SARAH, G.; OMORE, A.; DURAND-GASSELIN, T.; MORCILLO, F. Comparative transcriptome analysis of three oil palm fruit and seed tissues that differ in oil content and fatty acid composition. **Plant Physiology**, v.162, p.1337-1358, 2013.

DUVAL, Y.; DURAND-GASSELIN, T.; KONAN, K. C. *In vitro* vegetative propagation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Oleagineux**, v.43, p.145-47, 1988.

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

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, p.1039-1042, 2011.

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

GOMES, H. T.; BARTOS, P. M. C.; SILVA, C. O.; AMARAL, L. I. V.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. Comparative biochemical profiling during the stages of acquisition and development of somatic embryogenesis in African oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Plant Growth Regulation**, v.74, p.199-208, 2014.

GRIGOVÁ, M.; KUBEŠ, M.; DRÁŽNÁ, N.; ŘEZANKA, T.; & LIPAVSKÁ, H. Storage lipid dynamics in somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies*): histochemical and quantitative analyses. **Tree Physiology**, v.27, p.1533-1540, 2007.

HAMEED, H. B.; LAI, L. F.; CHIN, L. H. Production of biodiesel from palm oil (*Elaeis guineensis*) using heterogeneous catalyst: An optimized process. **Fuel Processing Technology**, v.90, p.606-610, 2009.

HANSEN, S.B.; PADFIELD, R.; SYAYUTI, K.; EVERS, S.; ZAKARIAH, Z.; MASTURA, S. Trends in global palm oil sustainability research. **Journal of Cleaner Production**, v.100, p.140-149, 2015.

HIRNER, B.; FISCHER, W.; RENTSCH, D.; KWART, M.; FROMMER, W. B. Developmental control of H⁺/amino acid permease gene expression during seed development of *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v.14, p.535-544, 1998.

HOEKSTRA, F. A.; GOLOVINA E. A. Membrane behavior during dehydration: Implication for desiccation tolerance. **Russian Journal of Plant Physiology**, v.46, p.295-306, 1999.

IRAQUI, D.; TREMBLAY, F. M.; Analysis of carbohydrate metabolism enzymes and cellular contents of sugars and proteins during spruce somatic embryogenesis suggests a regulatory role of exogenous sucrose in embryo development. **Journal of Experimental Botany**, v.52, p.301-2311, 2001.

JARITEH, M.; EBRAHIMZADEH, H.; NIKNAM, V.; MIRMASOUMI, M.; VAHDATI, K. Developmental changes of protein, proline and some antioxidant enzymes activities in somatic and zygotic embryos of Persian walnut (*Juglans regia* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.122, p.101-115, 2015.

JAYANTHI, M.; SUSANTHI, B.; MOHAN, N. M.; MANDAL, P. K. *In vitro* somatic embryogenesis and plantlet regeneration from immature male inflorescence of adult dura and tenera palms of *Elaeis guineensis* (Jacq.). **SpringerPlus**, v.4, p.256-262, 2015.

JOUANNIC, S.; LARTAUD, M.; HERVÉ, J.; COLLIN, M.; ORIEUX, Y.; VERDEIL, J. L.; TREGGAR, J. W. The shoot apical meristem of oil palm (*Elaeis guineensis*; *Arecaceae*): developmental progression and dynamics. **Annals of Botany**, v.108, p.1477-1487, 2011.

KING, J. E.; GIFFORD, D. J. Amino acid utilization in seeds of Loblolly pine during germination and early seedling growth. **Plant Physiology**, v.113, p.1125-1135, 1997.

KUMAR, S. P.; KUMARI, B. D. R. Factors affecting on somatic embryogenesis of safflower (*Carthamus tinctorius* L) at morphological and biochemical levels. **World Journal of Agricultural Sciences**, v.7, p.197-205, 2011.

LAURENS, L. M.; QUINN, M.; VAN WYCHEN, S.; TEMPLETON, D. W.; WOLFRUM, E. J. Accurate and reliable quantification of total microalgal fuel potential as fatty acid methyl esters by in situ transesterification. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.403, p.167-178, 2012.

LEHMANN, S.; FUNCK, D.; SZABADOS, L.; RENTSCH, D. Proline metabolism and transport in plant development. **Amino acids**, v.39, p.949-962, 2010.

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

MARTINE, B.M.; LAURENT, K.K.; PIERRE, B.J.; EUGÈNE, K.K.; HILAIRE, K.T.; JUSTIN, K.Y. Effect of storage and heat treatments on the germination of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) seed. **African Journal of Agricultural Research**, v.4, p.931-937, 2009.

MERKLE, S. A.; PARROTT, W. A.; FLINN, B. S. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis in plants. In: THORPE, T. A. (Ed.) **In Vitro Embryogenesis in Plants**. Springer Netherlands, p.155-203, 1995.

MUKHERJEE, I.; SOVACUOL, B.K. Palm oil-based biofuels and sustainability in southeast Asia: A review of Indonesia, Malaysia, and Thailand. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.37, p.1-12, 2014.

MÜNTZ, K.; BELOZERSKY, M. A.; DUNAEVSKY, Y. E.; SCHLERETH, A.; TIEDEMANN, J. Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. **Journal of Experimental Botany**, v.52, p.1741-1752, 2001.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

MYINT, T.; CHANPRASERT, W.; SRIKUL, S. Germination of seed of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) as affected by different mechanical scarification methods. **Seed Science and Technology**, v.38, p.635-345, 2010.

NIEVES, N.; SAGARRA, F.; GONZÁLEZ, R.; LEZCANO, Y.; CID, M.; BLANCO, M. A.; CASTILLO, R. Effect of exogenous arginine on sugarcane (*Saccharum* sp.) somatic embryogenesis, free polyamines and the contents of the soluble proteins and praline. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.95, p.313-320, 2008.

OHLROGGE, J. B. Design of new plant products: engineering of fatty acid metabolism. **Plant physiology**, v.104, p.821-826, 1994

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

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

PESCADOR, R.; KERBAUY, G. B.; KRAUS, J. E.; FERREIRA, W. M.; GUERRA, M. P.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. de C. Changes in soluble carbohydrates and starch amounts during somatic and zygotic embryogenesis

of *Acca sellowiana* (Myrtaceae). **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v.44, p.289-299, 2008.

PESCADOR, R.; KERBAUY, G. B.; SANTOS, D. Y. A. C.; DAL VESCO, L. L.; FRAGA, H. P. F.; GUERRA, M. P. Comparative study of reserve lipid accumulation during somatic and zygotic *Acca sellowiana* (O. Berg.) Burret embryogenesis. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.34, p.771-778, 2012.

POLLARD, M.; MARTIN, T. M.; SHACHAR-HILL, Y. Lipid analysis of developing *Camelina sativa* seeds and cultured embryos. **Phytochemistry**, v.118, p.23-32, 2015.

RABÉCHAULT, H.; MARTIN, J.P. Multiplication végétative du palmier a huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) a l'aide de cultures de tissus foliaires. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Academie des Sciences**, v.285, p.1735-1737, 1976.

REIDIBOYM-TALLEUX, L.; MARCH, G. D. Lipid and fatty acid composition in non-embryogenic calli and embryogenic tissues in wild cherry (*Prunus avium*). **Physiologia Plantarum**, v.105, p.513-520, 1999.

REINERT, J. Morphogenese und ihre kontrolle an geweberkulturen aus karotten. **Naturwissenschaften**, v.45, p.344-345, 1958.

RIVAL, A.; ABERLENC, F.; MORCILLO, F.; TREGEAR, J.; VERDEIL, J. L.; DUVAL, Y. Scaling-up *in vitro* clonal propagation through somatic embryogenesis : the case of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, v.3, p.74-82, 1997.

SAUTER, J. J.; VAN CLEVE, B. Biochemical and ultrastructural results during starch-sugar-conversion in ray parenchyma cells of *Populus* during cold adaptation. **Journal of Plant Physiology**, v.139, p.19-26, 1991.

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

SEN, J.; KALIA, S.; GUHA-MUKHERJEE, S. Level of endogenous free amino acids during various stages of culture of *Vigna mungo* (L.) Hepper-somatics embryogenesis, organogenesis and plant regeneration. **Current Science**. v.82, p.429-433, 2002.

SILVA, R. C.; CARMO, L. S. C.; LUIS, Z. G. L.; SILVA, L. P.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; MEHTA, A. Proteomic identification of differentially expressed proteins during the acquisition of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Journal of Proteomics**, v.104, p.112-127, 2014a.

SILVA, R. C.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. The histodifferentiation events involved during the acquisition and development of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Plant Growth Regulation**, v.72, p.67-80, 2014b.

SOH, A. C.; WONG, G.; TAN, C. C.; CHEW, P. S.; CHONG, S. P.; 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.

STARITSKY, G. Tissue culture of the oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) as a tool for its vegetative propagation. **Euphytica**, v.19, p.288-292, 1970.

SUNDRAM, K.; SAMBANTHAMURTHI, R.; TAN, Y. Palm fruit chemistry and nutrition. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v.12, p.355-362, 2003.

SZABADOS, L.; SAVOURÉ, A. Proline: a multifunctional amino acid. **Trends in Plant Science**, v.15, p.89-97, 2010.

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

TURNHAM, E.; NORTHCOTE, D. H. The incorporation of [^{14}C] acetate into lipids during embryogenesis in oil palm tissue cultures. **Phytochemistry**, v.23, p.35-39, 1984.

VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C. Proline accumulation in plants: a review. **Amino Acids**, v.35, p.753-759, 2008

WAHID, M. B.; ABDULLAH, S. N. A.; HENSON, I. E. Oil palm - Achievements and potential. **Plant Production Science**, v.8, p.288-297, 2005.

WARCHOŁ, M.; SKRZYPEK, E.; KUSIBAB, T.; DUBERT, F. Induction of somatic embryogenesis and biochemical characterization of *Cordyline australis* (G. Forst.) Endl. 'Red Star' callus. **Scientia Horticulturae**, v.192, p.338-345, 2015.

WEBER, H.; BORISJUK, L.; WOBUS, U. Sugar important and metabolism during seed development. **Trend Plant Science**, v.2, p.169-174, 1997.

WIENDI, N. M. A.; CONSTANTIN, M.; WACHYAR, A. Study of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq) *in vitro* embryogenesis using young leaves explants. **Journal of Tropical Crop Science**, v.2, p.5-9, 2015.

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

YEMM, E. W.; COCKING, E. C. The determination of amino acids with ninhydrin. **Analyst**, v.80, p.209-213, 1955.

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