

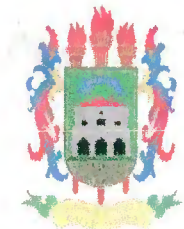
**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA**

**CONVERSÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE HÍBRIDOS DE
DENDEZEIRO (*ELAIS GUINEENSIS* X *E. OLEIFERA*) EM PLÂNTULAS**

JOSEANE DE NAZARÉ OLIVEIRA CARDOSO

Belém- Pará

2010



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

**CONVERSÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE HÍBRIDOS DE
DENDEZEIRO (*ELAIS GUINEENSIS* X *E. OLEIFERA*) EM PLÂNTULAS**

JOSEANE DE NAZARÉ OLIVEIRA CARDOSO

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, para obtenção do título de **Mestre**.

Orientador: Prof. Dr. Vicente Savonitti Miranda

Co-orientador: Dr. Oriel Filgueira de Lemos

Belém- Pará

2010

Cardoso, Joseane de Nazaré Oliveira

Conversão in vitro de embriões zigóticos de híbrido de dendezeiro (*Elaeis guineenses* x *E. oleifera*) em plântulas/, Joseane de Nazaré Oliveira Cardoso. - Belém, 2010.

81f.:il.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal Rural da Amazônia, 2010.

1. Melhoramento genético 2. Hibridação interespecífica 3. Cultura de embrião. 4. *Elaeis guineenses*. 5 *E. oleifera* Título.

CDD – 631.5233

CONVERSÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE HÍBRIDOS DE
DENDEZEIRO (*ELAIS GUINEENSIS X E. OLEIFERA*) EM PLÂNTULAS

JOSEANE DE NAZARÉ OLIVEIRA CARDOSO

Dissertação apresentada à Universidade
Federal Rural da Amazônia como parte das
exigências do Curso de Mestrado em
Agronomia, área de concentração em
Produção Vegetal, para obtenção do título
de Mestre.

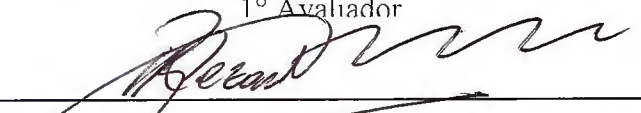
Banca Examinadora



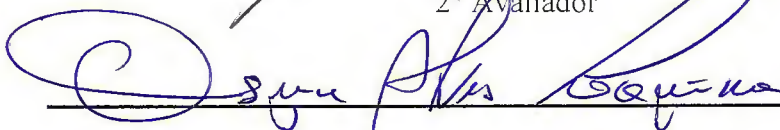
Biólogo DSc. Prof. Vicente Savoniti Miranda
(Universidade Federal Rural da Amazônia)
Presidente da Banca- Orientador



Bióloga DSc. Elisa Ferreira Moura
(Embrapa Amazônia Oriental)
1º Avaliador


Biólogo DSc. Prof. Roberto Cezar Lobo da Costa
(Universidade Federal Rural da Amazônia)

2º Avaliador



Engenheiro Agrônomo DSc. Osmar Alves Lameira
(Embrapa Amazônia Oriental)

3º Avaliador

DEDICO

À Deus e a minha Nossa Senhora de Nazaré (Minha Nazica) por tudo o que já alcancei em minha vida e por me proporcionar saúde para que eu sonhe cada vez mais e conquiste meus objetivos.

À minha mãe Celina, motivo maior de minha existência e por tudo o que ela representa para mim; que me deu oportunidade de estudar e alcançar todos os meus objetivos, sendo meu porto seguro, minha maior incentivadora, meu motivo de orgulho, minha vida, meu amor...

OFEREÇO

Aos meus irmãos (Geovana e Genoval), por tudo o que sou e por todo o amor concebido; meus sobrinhos (Andresa Caroline, Suelem, Karina, João Pedro, João Victor, João Paulo e Geovane) pelo carinho; Ao Dr. Oriel Lemos e Ilmarina Menezes por acreditarem que eu poderia ser capaz; aos meus amigos que nunca me abandonaram.

AGRADECIMENTOS

À meu Deus pai todo poderoso pela minha existência e por jamais me desvirtuar do caminho da fé, por quem agradeço todas as graças alcançadas em minha vida..

À minha Nazica por tudo o que ela representa para mim e por sempre ter confortado meu coração nas horas mais difíceis da vida. Muito obrigada pelas bênçãos minha Nossa Senhora e por sempre me mostrar que existe uma luz no fim do túnel.

À minha mãe, meu maior exemplo de vida e superação, minha inspiração de cada dia, meu maior motivo de sonhar sempre e de acreditar que nada na vida é por acaso; que sempre esteve comigo, me apoiando, vibrando com cada acerto e fazendo com que eu aprendesse com meus erros; que muitas vezes abriu mão dos seus sonhos para que o meu fosse realizado. Nem em mil vidas mãe, lhe agradecerei todo o incentivo e vontade de que eu pudesse alcançar tudo aquilo que me propus a conquistar. Tudo o que faço é exclusivamente pela senhora.

À minha amada irmã, que mesmo distante, vibra com cada vitória. Que me criou, sempre me incentivou e jamais deixou de acreditar em mim.

Ao meu irmão-pai que me deu oportunidade de correr atrás de tudo aquilo que sempre sonhei. Sem você mano, podés ter certeza que não eu conseguiria.

À todos os meus sobrinhos pelo amor e respeito de sempre. Amo vocês.

Ao meu cunhado e também Engenheiro Agrônomo Ildeci Maciel por ter me mostrado a beleza do que é fazer Agronomia.

A minha cunhada Cristiane por todas as palavras amigas nas horas de aflição.

Ao meu "pai", amigo, companheiro, confidente e orientador Dr. Oriel Lemos, pelos 6 anos de convivência e amizade. Muito obrigada por tudo aquilo que o senhor fez por mim. Sem o senhor este sonho jamais se realizaria. Não tenho palavras para lhe agradecer toda a dedicação, aos "ralhos", as alegrias e aos choros proporcionados. Como o senhor diz "A sabedoria é a única coisa que levamos dessa vida". Obrigada Riri.

À minha grande "mãe", irmã, amiga, orientadora, psicóloga, confidente, e grande incentivadora a alcançar meus objetivos Dra. Ilmarina Menezes vulgo Big head of my life. Apenas uma palavra lhe define: humildade. Humildade ao ensinar, ao

expor, ao aconselhar, ao admitir os erros, ao ouvir. ..Big, só tenho que agradecer à Deus por ter te colocado em meu caminho. Jamais esquecerei de tudo o que já vivemos e todas as gargalhadas que já demos nessa vida. Que Deus ilumine todos os seus passos e te guie sempre no caminho da solidariedade. À sua família um muito obrigada pela compreensão e pelo carinho concedidos à minha pessoa. Valeu Big head of my life.

Ao meu grande amigo Sérgio Augusto (Meu cuinho) e Leila Márcia (Minha Atoinha) pela fiel amizade, pela paciência, risadas e por todos os ensinamentos prestados.

A minha amiga irmã Fabrícia Kelly por todo o carinho e amizade concedida ao longo desse curso; que muitas vezes enxugou minhas lágrimas nos momentos de desespero. Jamais esquecerei de você minha amiga.

Ao meu amigo de todas as horas Bruno Brabo (BB) pela força quando sempre precisei. Muito obrigada pelo apoio, pela torcida em que tudo desse certo e graças à Deus deu.

Aos meus amigos da Ufra Josemar e Daniel pela convivência e pelos belos momentos proporcionados.

À minha eterna irmã de espírito Carla Cristina (Minha Pêri) por tudo o que você fez por mim durante esses anos. Muito obrigada pelo carinho, amor nas palavras, cumplicidade, solidariedade, e pela força quando pensei em desistir. Se hoje estou aqui, devo muito à você e sua família também da qual tenho certeza de que faço parte..

À minha irmã de vidas passadas Camila Ramos, um muito obrigada pelas pesquisas, pelas altas conversas na madrugada, pela paciência, conselhos, e orações para que eu alcançasse meus objetivos.

À minha irmã de adoção Jaqueline Veloso. Inesquecível Jaque. Muito obrigada pelo apoio, incentivo e força, sempre. Jamais esquecerei tudo o que fizestes por mim.

Ao meu "irmão", amigo, confidente, apoiador e grande incentivador Raphael Cardoso. Agradeço à minha Nazica por você ter aparecido em minha vida. Meu amigo mais fofo, onde todas as minhas fraquezas eram motivo de palavras de superação, de apoio e de fé que tudo iria se resolver. Nós conseguimos, amigo!

Ao meu gordinho mais fofinho Rafinha Alves. Serei eternamente grata pelos favores, amizade e cumplicidade que temos. Sua humildade me faz admirar lhe cada vez mais.

Ao meu "cunhado" e amigo Paulo Pugget, OBRIGADO por tudo. Pelas digitações, pela ajuda, pelos favores nas horas de maior desespero, por sempre "quebrar meu galho", pela sincera amizade e pela confiança depositada.

Ao meu "filho" Leony Ribeiro (Zinho) pelas descontrações nos momentos de aflição, tornando cada desespero um motivo de alegria.

Aos meus queridos amigos da Unama: Marcos Pinheiro, Pacheco, Osiris Mazzinghy, Thiago Mendes, Paulo Cachorrão, Capitão Ângelo e Professor Marcelino pela torcida de que tudo desse certo, sempre.

Aos meus grandes amigos da Juventude Bicolor (Sérgio Serra, Clodomir Araújo, Leonardo, Carlito, Bruno, Clóvis e Shirlene Pérola Negra). Obrigada por tornar minha vida mais feliz e por me ajudarem sempre que precisei. Deus dará em dobro à vocês tudo aquilo que fizeram por mim.

Às duplas dinâmicas, minhas amigas, Caroline (Pikixita) e Joice Pinho; e Carla (Loira do tchan) e a meiga Gisele por todas as confidências, ajuda, pensamento positivo, orações para que tudo desse certo. Sei que posso contar com vocês sempre e saibam que meus agradecimentos são sinceros e que sem vocês esse trabalho não teria se realizado.

Ao meu amigo Fernando Lacerda pela amizade e torcida durante esses anos.

Ao meu mestre Hans Muller, que me ensinou que humildade é uma virtude e não um fardo.

Ao meu querido amigo e professor Dr. Roberto Cezar pelos ensinamentos e por me mostrar que podemos ser capazes de conseguirmos alcançar tudo o que queremos, basta acreditarmos.

Ao meu amigo Prof. Antônio Rodrigues Fernandes por toda a confiança depositada.

À Dra. Elisa Moura pelas considerações feitas para a finalização da Dissertação.

Aos meus queridos amigos técnicos do laboratório Sr. José Carlos, Gilberto e Lísias Aline, pela ajuda no desenvolvimento do trabalho.

Ao queridíssimo Seu Isaías Nascimento da Embrapa Amazônia Oriental pelos hipocloritos, álcools, e todo tipo de material que me doava quando faltava para o desenvolvimento do meu trabalho.

À minha prima Alessandra Cardoso, com quem tive o primeiro contato com a Cultura de Tecidos e que me ensinou parte do que sei.

Aos meus amigos do Pibic-Ufra Ari, Edu, Reinaldo e Dimas. Um muito obrigada por todos os favores sempre concedidos com muito carinho.

As queridas pessoas que fizeram o curso comigo se tornar mais prazeroso Katiene Carvalho, Alessandra Moraes, Joseane Castro e Patrícia Maia.

Aos vigilantes da Embrapa Amazônia Oriental Cristiano Souza, Heraldito Freitas, André Tourão, Róbson Viana e o inspetor Sebastião Aniceto pelas caronas na bicicleta, pelo cuidado comigo quando saía altas horas da Embrapa, por me livrarem das aranhas e das "visagens" existentes no laboratório.

Às faxineiras Tiazinha e Odaíze por sempre me ajudarem a deixar tudo em ordem.

Ao Davi e Iwanne pela ajuda nos gráficos e análise estatística. Vocês foram anjos que Deus colocou em minha vida.

À Hérica Oliveira pelos anos de convívio.

Às colegas de laboratório Lana Reis, Meiciane, Dayane, Thalia Gama e Helen Moura pela compreensão no desenvolvimento dos trabalhos.

À coordenadora do Mestrado Prof. Herdjânia Veras de Lima e a secretária da pós graduação Gracy Kelly.

À Embrapa Amazônia Oriental pela utilização da infra estrutura do Laboratório de Biotecnologia onde desenvolvi minhas pesquisas.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao meu orientador e amigo Dr. Vicente Miranda por me orientar.

Muito obrigada à todos vocês que fizeram e farão parte da minha história para todo o sempre.. "Ninguém nunca chega ao sucesso sozinho. Nunca."

*“E ainda se vier, noites traiçoeiras, se a
cruz pesada for, Cristo estará contigo. O
mundo pode até fazer você chorar, mas
Deus te quer sorrindo”.*

(Refrão da música Noites Traiçoeiras - Padre Marcelo)

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS	xv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
INTRODUÇÃO	18
REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 Histórico	19
2.2 Morfologia do dendezeiro	21
2.3 Importância ambiental	23
2.4 Importância sócio-econômica	24
2.5 Pragas e doenças do dendezeiro	28
2.6 Recursos genéticos e melhoramento genético de plantas	29
2.7 Germinação e propagação vegetativa	32
2.8 Aplicação de cultura de tecidos em dendezeiro	33
2.9 Resgate de embriões	36
3. MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1 Obtenção e preparo dos embriões	39
3.2. Inoculação dos embriões zigóticos	41
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1 Contaminação dos embriões	43
4.2 Oxidação dos embriões	45
4.3 Estabelecimento e Conversão de embriões <i>in vitro</i> em plântulas de dendê.	47
5. CONCLUSÃO	63
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
7. ANEXO	77
7.1 Anexo 1	78
7.2 Anexo 2	79
7.3 Anexo 3	80
7.4 Anexo 4	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Produção e geração de emprego de algumas oleaginosas com potencial para produção de biodiesel no Estado do Pará.	26
Tabela 2: Composição do meio de cultura de Murashige & Skoog (1962).	78
Tabela 3: Composição do meio de cultura Y ₃ (Eeuwens, 1976).	79
Tabela 4- Resumo da análise de variância para germinação (GER), Oxidação (OXI), Contaminação (CONT), Comprimento caulinar (Com Caul), Altura (ALT) e Comprimento radicular (Com Rad) dos híbridos CN 514, CM 353 e CN 470 de dendê, submetidos a diferentes meios de cultura. Embrapa, Belém-PA, 2010.	80
Tabela 5- Resumo da comparação de médias para germinação (GER), Oxidação (OXI), Contaminação (CONT), Comprimento caulinar (Com Caul), Altura (ALT) e Comprimento radicular (Com Rad) dos híbridos CN 514, CM 353 e CN 470 de dendê, submetidos a diferentes meios de cultura. Embrapa, Belém-PA, 2010.	80
Tabela 6- Resumo da análise de variância para germinação (GER), Oxidação (OXI), Contaminação (CONT), Comprimento caulinar (Com Caul), Altura (ALT) e Comprimento radicular (Com Rad) dos híbridos CM 378, CM 865 e CM 887 de dendê, submetidos a diferentes meios de cultura. Embrapa, Belém-PA, 2010.	81
Tabela 7- Resumo da comparação de médias para germinação (GER), Oxidação (OXI), Contaminação (CONT), Comprimento caulinar (Com Caul), Altura (ALT) e Comprimento radicular (Com Rad) dos híbridos CM 378, CM 865 e CM 887 de dendê, submetidos a diferentes meios de cultura. Embrapa, Belém-PA, 2010.	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Corte longitudinal do fruto do dendezeiro.	22
Figura 2: Tipos de frutos de dendezeiro em função da espessura do endocarpo. Figura 2a – Frutos do tipo dura. Figura 2 b – Frutos do tipo tenera. Figura 2c – Frutos do tipo psifera.	22
Figura 3: Óleos de dendê: A – óleo de palma: extraído da polpa e B – óleo de palmiste: extraído da amêndoa.	25
Figura 4: Etapas do processo de transformação primário do dendê, e respectivos subprodutos e usos.	27
Figura 5 – Danos causados pelo Amarelecimento Fatal. Fonte: Alessandra de Jesus Boari.	29
Figura 6: Etapas do processo de assepsia e inoculação de embriões de dendê. A: Lavagem das sementes ; B: Imersão das sementes em solução de derosal 0,2%; C: Secagem das sementes; D: Quebra das sementes; E: Retirada do embrião; F: Inoculação do embrião.	40
Figura 7: Experimento 1- Porcentagem de contaminação dos genótipos de dendê inoculados em meio de cultura.	43
Figura 8: Experimento 2 - Porcentagem de contaminação dos 17 genótipos de dendê inoculados em meio de cultura.	44
Figura 9: Experimento 1 - Porcentagem de oxidação dos 17 genótipos de dendê inoculados em meio de cultura.	45
Figura 10: Experimento 2 - Porcentagem de oxidação dos 17 genótipos de dendê inoculados em meio de cultura.	46
Figura 11: Experimento 1- Porcentagem de germinação <i>in vitro</i> de 3 diferentes genótipos de embriões de híbridos de dendê em 4 diferentes tratamentos.	48
Figura 12: Desenvolvimento completo de plântulas de híbridos de dendezeiro; A: Embrião na fase escura aos 12 dias de cultivo; B: Embrião na fase escura aos 21 dias; C: Início do processo de emissão da radícula em embriões de dendezeiro; D: Embrião aos trinta dias de cultivo; E: Conversão <i>in vitro</i> de embriões de dendê a uma planta completa, onde se observa a formação da folha (F), do ápice cotiledonar (A.C) e da raiz(R); F: Aspecto de uma planta desenvolvida <i>in vitro</i> cultivada em meio nutritivo após 3 meses de cultivo.	50
Figura 13- Experimento 1: Comparação em percentual dos diferentes genótipos de dendê em diferentes meios de cultura para os parâmetros germinação, oxidação e contaminação.	51

Figura 14- Experimento 1: comprimento radicular (cm) dos genótipos de dendê inoculados em diferentes meios de cultura.	52
Figura 15- Experimento 1: comprimento caulinar (cm) dos genótipos de dendê inoculados em diferentes meios de cultura.	52
Figura 16- Experimento 1: Altura da planta (cm) dos genótipos de dendê inoculados em diferentes meios de cultura.	54
Figura 17- Experimento 1: Comparação dos diferentes genótipos de dendê em diferentes meios de cultura para os parâmetros comprimento caulinar, altura e comprimento radicular.	55
Figura 18: Experimento 2 - Porcentagem de germinação <i>in vitro</i> de 3 genótipos de híbridos de embriões de dendê em 4 diferentes tratamentos.	56
Figura 19: Desenvolvimento completo de plântulas de híbridos de dendezeiro A: Embrião na fase escura aos sete dias de cultivo; B: Embrião na fase escura aos 21 dias; Figura C: Início do processo de emissão da radícula em embriões de dendezeiro; D: Embrião aos trinta dias de cultivo; E: Conversão <i>in vitro</i> de embriões de dendê a uma planta completa, onde se observa a formação da folha (F), do ápice cotiledonar (A.C) e da raiz(R); F: Aspecto de uma planta desenvolvida <i>in vitro</i> cultivada em meio nutritivo após 3 meses de cultivo.	58
Figura 20- Experimento 2: Comparação em percentual dos diferentes genótipos de dendê em diferentes meios de cultura para os parâmetros germinação, oxidação e contaminação.	59
Figura 21- Experimento 2: comprimento radicular (cm) dos genótipos de dendê inoculados em diferentes meios de cultura.	60
Figura 22- Experimento 2: comprimento caulinar (cm) dos genótipos de dendê inoculados em diferentes meios de cultura.	61
Figura 23- Experimento 2: Altura da planta (cm) dos genótipos de dendê inoculados em diferentes meios de cultura.	62
Figura 24- Experimento 2: Comparação dos diferentes genótipos de dendê em diferentes meios de cultura para os parâmetros comprimento caulinar, altura e comprimento radicular.	62

LISTA DE ABREVIATURAS

AIB	Ácido indolbutírico
AIA	Ácido indolacético
A.F	Doença do dendezeiro: Amarelecimento fatal
ANA	Ácido naftaleno acético
A.V	Doença do dendezeiro: Anel vermelho
BAP	6- Benzilaminopurina
C.A	Carvão ativado
cm	centímetro
EDTA	Etilenodiamino tetraacetato
GA ₃	Giberelina
G x A	Genótipo- Ambiente
ha	hectare
mL	mililitro
mg	miligrama
MS	Meio básico de cultura de Murashige e Skoog (1962)
NaH ₂ PO ₄	Fosfato diácido de sódio.
Y ₃	Meio básico de cultura Y ₃ (Eeuwens, 1976)
uM	Micrômetro
2,4-D	Ácido diclorofenoxiacético
2 iP	2-isopentenil

RESUMO

O dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq) se constitui numa das principais espécies para o cultivo em áreas devastadas. Apresenta como principal fator limitante da expansão do cultivo no Pará, a doença conhecida como amarelecimento fatal (AF) associada às dificuldades de aquisição de sementes de híbridos. Dentro do programa de melhoramento genético, a hibridação interespecífica entre as duas espécies principais, *Elaeis guineensis* e *E. oleifera* tem gerado híbridos com resistência ao AF, porém a germinação das sementes é baixa, alcançando cerca de 30%. O objetivo deste trabalho foi aplicar as técnicas de cultura de tecidos para converter “in vitro” embriões zigóticos de híbridos de dendezeiro (*E. guineensis* e *E. oleifera*) em plântulas. Foram inoculados embriões zigóticos de híbridos de dendezeiro (*Elaeis guineensis* x *E. oleifera*) em quatro meios de cultura diferentes, e avaliado respostas quanto à germinação e formação de plântulas, e os dados foram submetidos a análise de variância e teste de comparação de média de Tukey a 5% de probabilidade. Dos 31 híbridos inoculados nos dois experimentos, somente 6 germinaram. O híbrido CN 470 não manifestou contaminação apresentou menores taxas de oxidação nos tratamentos MS e ½ Y3 . O híbrido CM 887 não sofreu oxidação nos meios de cultura utilizados. A média geral de germinação dos híbridos alcançou cerca de 75%. O híbrido CN 514, no meio de cultura Y3 foi apresentou a maior taxa de conversão de embriões zigóticos em plântulas (100%), sendo observado grande influência do genótipo na germinação *in vitro*. As plântulas do híbrido CN 470 apresentaram maior desenvolvimento do comprimento de raiz (5,63), enquanto que em altura de plântulas, o genótipo CM 887 foi apresentou a maior média de crescimento (3,1 cm). Aos três meses é possível a conversão de embriões de híbridos de dendezeiro em plântula pela aplicação das técnicas de cultura de tecidos via cultura de embrião zigótico.

PALAVRAS-CHAVE: *Elaeis guineensis* e *E. oleifera*, hibridação interespecífica, cultura de embrião, melhoramento genético, amarelecimento fatal.

ABSTRACT

The oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq) is the one of the main species for cultivation in the devastated areas. However, the plant has two big barriers for the increase of cultivated areas in Para State that are a disease known as fatal yellowing (AF) and the great difficulties in the acquisition of seed hybrids. Within the program of genetic improvement, there is interspecific hybridization between the two main species, *Elaeis guineensis* and *E. oleifera* and the results of these crosses are the generation of hybrids with resistance to AF, though with the serious problem; the seeds demonstrate low germination reaching about 30% only. Therefore, the objective of this study, it was to apply the techniques of tissue culture to convert in vitro zygotic embryos of hybrid oil palm (*E. guineensis* and *E. oleifera*) in seedlings. Zygotic embryos were inoculated hybrid oil palm (*Elaeis guineensis* x *E. oleifera*) in four differences culture media, evaluating the responses of germination and seedling development, and the data were evaluated throughout of analysis of variance and comparison Tukey test with average 5% probability. The total of 31 hybrids inoculated in both experiments, only 6 germinated. Hybrid CN 470 did not show contamination neither lower oxidation treatments in MS and ½ Y3. The hybrid CM 887 did not suffer oxidation in the culture media used. The overall average germination of hybrids reached about 75%. The hybrid CN 514, in the Y3 culture medium demonstrated the highest conversion rate of zygotic embryos into plantlets (100%), and it was observed a great influence of genotype on in vitro germination. The seedlings of hybrid CN 470 showed greater development of root length (5.63), while the genotype CM 887 showed the better results in terms of height, reaching the average growth of 3.1 cm. At three months is possible to transfer embryos of hybrid oil palm seedlings in the techniques of tissue culture throughout the culture of zygotic embryo.

KEYWORDS: *Elaeis guineensis* and *E. oleifera*, the interspecific hybridization, embryo culture, breeding, yellowing fatal.

CONVERSÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE HÍBRIDOS DE DENDEZEIRO (*Elaeis guineensis* X *E. oleifera*) EM PLÂNTULAS

1. INTRODUÇÃO

O dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq) é uma palmácea, originária da África, cuja dispersão ocorreu a partir do século XV, com o comércio de escravos (Muller et al., 1992). Pertence ao gênero *Elaeis* com duas espécies de interesse genético: o caiaué, *Elaeis oleifera* (HBK) Cortez, e o dendezeiro, *Elaeis guineensis*, Jacq. (Surre & Ziller, 1969; Viégas & Muller, 2000).

No Brasil, foi introduzido por escravos em 1670, dando origem ao dendezeais subespontâneos que ocorrem na zona litorânea da Bahia. Na região Norte, a sua introdução aconteceu em 1951, através do antigo Instituto Agrônomo do Norte -IAN (hoje EMBRAPA-CPATU) que importou algumas linhagens do Institut de Recherches pour les Huilles et Oleagineux (IRHO/França), para avaliar o desempenho dessa cultura nas condições edafoclimáticas da Amazônia Brasileira.

O agronegócio do dendê movimenta cifras da ordem de US\$ 9 bilhões/ano, gerando mais de 250.000 empregos diretos, só na zona rural (Agriannual, 2008). No Brasil, considerando-se apenas o Estado do Pará, são concentrados aproximadamente 85 % do agronegócio representando assim, a principal matriz para produção nacional de óleo de palma.

Dentre as alternativas de melhoramento genético, a obtenção de híbridos interespecíficos (caiaué x dendezeiro), apesar de apresentar produção de biomassa de 20% menor que o dendezeiro (Barcelos, 2005), poderá se tornar a única forma de viabilizar a manutenção da espécie nas áreas afetadas por doenças como o amarelecimento fatal (AF). A ampla variabilidade presente na espécie americana permite que se possa programar a obtenção de híbridos, sua avaliação e seleção em campo (Ooi et al., 1981; Amblard et al., 1995).

Um dos principais problemas da cultura no Brasil é o amarelecimento fatal, doença que causa a morte da planta (Duarte, 1999) trazendo grande redução na produção

da dendeicultura, com perdas de plantas já no segundo ano em campo. Essa doença causou a erradicação de mais de 2.000 ha somente no Estado do Pará.

A aplicação das técnicas *in vitro* permitem o regaste de embriões de cruzamentos intra e inter específicos, geração de variabilidade genética por mutações induzidas e a seleção precoce de material dentro dos programas de melhoramento genético da cultura, sendo uma alternativa viável para o melhoramento genético do dendezeiro (Viégas & Muller, 2000), por meio do aumento da taxa de formação de plântula dos híbridos interespecíficos, cujo percentual germinativo da hibridização entre o *E. guineensis* e o *E. oleifera* é entre 25% e 30% (Chia, 2009).

O objetivo deste trabalho foi aplicar as técnicas de cultura de tecidos para converter “*in vitro*” embriões zigóticos de híbridos de dendezeiro (*E. guineensis* x *E. oleifera*) em plântulas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Histórico

O dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq) é uma palmeira originária da Costa Ocidental da África (Golfo da Guiné), originalmente identificado por Jacquin em 1763 ao observar dendezeiros introduzidos na Martinica, oriundos do Oeste Africano, de onde acabou herdando a denominação *guineensis*, segundo Purselove (1972).

Pertencente à família Arecaceae e é normalmente cultivada em regiões tropicais úmidas na África, Ásia e América, onde é também conhecido como palmeira-de-óleo-africana, avora, palma-de-guiné, palma, dendém (em Angola), palmeira-dendém ou coqueiro-de-dendê. É considerada a segunda mais importante fonte de óleo vegetal (Henderson & Osborne, 2000; Wahid et al., 2004), e foi introduzida no Brasil no século XVII via comércio dos escravos (Muller et al., 1992).

Os primeiros plantios industriais de dendezeiros datam do início do século passado. A África contava, em 1939, com apenas 14.000 hectares de plantações comerciais, enquanto que, desde 1935, os países do sudeste asiático (Malásia e Indonésia) já eram os primeiros exportadores mundiais de óleo de palma. No Brasil, as primeiras plantações industriais de dendezeiro são do início da década de 1960, na Bahia, e logo após, no Pará.

Na região Norte do Brasil, a introdução aconteceu em 1951 através do antigo Instituto Agrônomo do Norte - IAN (atualmente Embrapa Amazônia Oriental) que importou algumas linhagens do Instituto de Recherches pour les Huilles et Oleagineux (IRHO/França), para avaliar o desempenho dessa cultura nas condições edafoclimáticas da Amazônia Brasileira.

Na região amazônica, ocorre o caiaué (*Elaeis oleifera*, Cortés), ou o dendê nativo, que se estende às zonas tropicais do Norte da América do Sul e na América Central. Esta espécie produz pouco óleo, mas tem sido importante na hibridação com *E. guineensis*, na obtenção de cruzamentos resistentes a determinadas doenças (Veiga, et al., 2005).

No gênero *Elaeis* existem duas espécies de interesse comercial:

Elaeis oleifera: nativa da América Latina também é encontrada no Brasil e conhecida como caiaué. Tem sido procurada para obtenção de híbridos com a *Elaeis guineensis*.

Elaeis guineensis: nativo da África, é classificado quanto à espessura do endocarpo do fruto, que se subdividem (Muller 1980) (Figura 2):

- a) Dura: material com frutos com endocarpo de espessura ente 2 e 6 mm, com fibras dispersas em sua polpa;
- b) Tenera: material com frutos com endocarpo de espessura 0,5 a 2,5 cm e com um anel de fibras ao redor do endocarpo. Este grupo originou-se a partir do cruzamento entre os grupos Dura e Pisifera e, por fim;
- c) Pisifera: material com frutos sem endocarpo e com alta taxa de infertilidade nas flores femininas.

2.2. Morfologia do dendezeiro

O dendezeiro é uma planta monocotiledônea cujo cariótipo é $2n = 32$. É uma palmeira com até 15m de altura, com raízes fasciculadas, estipe ereto, escuro, sem ramificações, anelado (devido a cicatrizes deixadas por folhas antigas). As folhas podem alcançar até 1 metro de comprimento, tendo bases recobertas com espinhos. As flores são creme-amareladas e estão aglomeradas em cachos. Na idade adulta, apresenta uma coroa com 30 a 45 folhas verdes de 5 a 9 m de comprimento, encimando um estipe cilíndrico único.

A flor é do tipo inflorescência de cor creme-amarelada, e encontram-se aglomeradas em cachos, no encontro das palmas, em seis a oito hastes por ano, amadurecendo duas vezes em cada translação. Os frutos são do tipo drupas ovóides amarelos ou cor-de-laranja de tamanho variável e contém sementes que são divididas em exocarpo, mesocarpo e endocarpo (Figura 1).



Figura 1: Corte longitudinal do fruto do dendezeiro.

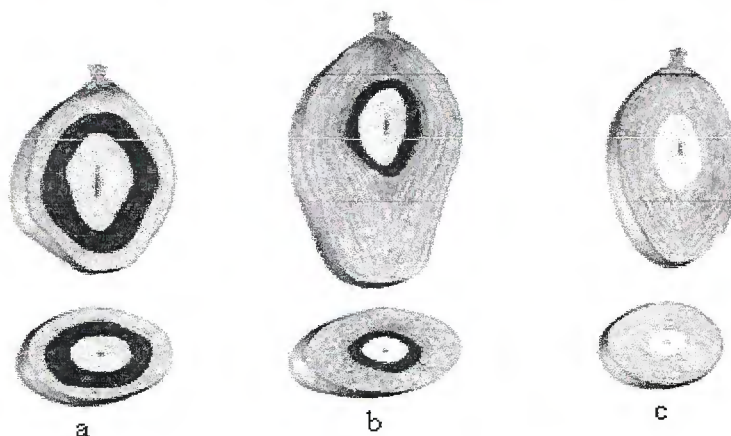


Figura 2: Tipos de frutos de dendezeiro em função da espessura do endocarpo. Figura 2a – Frutos do tipo dura. Figura 2 b – Frutos do tipo tenera. Figura 2c – Frutos do tipo psifera.

Os cachos de frutos maduros são colhidos em intervalos de 7 a 10 dias ao longo da vida econômica da palma, tendo normalmente de 30 a 40 cm de comprimento. Do mesocarpo, extrai-se o óleo que tem grande importância econômica. O fruto do dendê produz dois tipos de óleo: o óleo de dendê ou de palma (palm oil, como é conhecido no mercado internacional), extraído da parte externa do fruto, o mesocarpo; e o óleo de palmiste (palm kernel oil), extraído da semente, similar ao óleo de coco e de babaçu.

O dendê inicia a sua produção no terceiro ano, podendo a exploração se estender até os trinta anos, sendo considerada a oleaginosa de maior produtividade com três a oito toneladas de óleo $\text{ha}^{-1} \text{ano}^{-1}$, produzindo durante o ano todo (Muller, 1992).

Segundo Pandolfo (1981), pode-se extrair até 22% de óleo de polpa e até 3,5% de óleo de amêndoa sobre o peso do cacho.

2.3. Importância ambiental

Dos 5 milhões de km² da Amazônia brasileira, cerca de 4 milhões de km² possuem fisionomia de floresta segundo o Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE, 2004), portanto, a superfície total da floresta tropical brasileira soma cerca de 200 milhões de km². Ainda segundo o INPE (2004), o desmatamento da Amazônia em 2002 alcançou mais de 500.000 km², cuja taxa média de crescimento anual situa-se em torno de 18.050 Km² no período de 1977 a 2003. De acordo com os dados do INPE (2004) tem sido uma taxa média anual de incremento na ordem de 5.763 km².

Essas áreas devastadas podem ser ocupadas preferencialmente com culturas perenes como a seringueira (*Hevea brasiliensis* HBK), bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.), e dendezeiro (*E. guineensis* Jacq.), devido terem características semelhantes às árvores de florestas tropicais, além de permitirem atividades economicamente lucrativas por muitos anos e ambientalmente aceitáveis. Dado ao reduzido impacto ambiental gerado pelo dendezeiro quando plenamente estabelecido, a palmeira protege o solo contra erosão, e possui um expressivo nível de “seqüestro de carbono”, visto que a maior contribuição para a emissão de carbono para a atmosfera provém da queima de combustíveis fósseis (petróleo e carvão mineral) nos grandes centros urbanos dos países desenvolvidos (Valois, 2007). Desta forma, o dendezeiro por ter alta capacidade fotossintética, captura o carbono emitido por estes grandes centros diminuindo assim o aquecimento global.

As emissões de carbono decorrem, também, da queima da biomassa proveniente da vegetação primária ou secundária (Veiga et al. 2000). As propostas para compensar as emissões desse elemento, pela fixação ou seqüestro de quantidades de carbono equivalentes, tem sido, principalmente, pelo plantio de florestas, portanto, o dendezeiro contribui para a conservação de energia e recursos naturais.

Esta cultura possui uma alta produtividade de óleo, (entre 4.400 a 6.600 litros por ha/ano), o que a torna passível de ser utilizada nessas áreas, especialmente nas

estruturas familiares dos colonos dos projetos de assentamento e dos seringueiros, gerando assim aumento de empregos nestas regiões (Valois, 1997).

Além disso, o dendezeiro possui alta capacidade fotossintética, pois a produção de massa seca total dessa palmeira é da ordem de 50 toneladas métricas por hectare anualmente (parte aérea = 30 t e raízes = 20 t). A produção de massa seca da parte aérea do dendezeiro, com exceção de plantações de eucalipto fertilizado, é superior àquela das florestas tropicais e temperadas (Dufrene & Saugier, 1993).

Portanto é possível dar preferência para implantação da cultura do dendê no aproveitamento de áreas sem cobertura vegetal, contribuindo para recuperação de áreas degradadas em substituição a outros cultivos decadentes ou ainda, na renovação de dendezais subespontâneos (Veiga et al 2000).

2.4. Importância sócio-econômica

Segundo Pandolfo (1981), do ponto de vista social, a cultura do dendezeiro demonstrou uma boa alternativa para regiões de baixa renda, não só pelo grande número de empregos que gera, como também por oferecer características ocupacionais que alcançam toda a estrutura familiar. Economicamente, por ser uma planta perene, caracteriza-se pelo elevado rendimento e produção contínua durante todo ano, com possibilidades de suprir não só as necessidades regionais e nacionais, como também ampliar as exportações, visto que, é um produto com grande demanda no mercado internacional.

A produção nacional de dendê é liderada atualmente pelo Estado do Pará, seguido pela Bahia, Amapá e Amazonas. Esta produção é insuficiente para atender a demanda nacional, tanto que o país importa, em média, 40.000 toneladas de óleo de palma, de palmiste e derivados de palma. Isso constitui uma clara indicação de que esta cultura tem possibilidade de duplicar a atual área plantada, baseada em uma política de substituição de importações (Viégas & Müller, 2000).

O principal produto do dendezeiro é o óleo extraído industrialmente da polpa - óleo de dendê internacionalmente conhecido como "palm oil" - tendo grande potencial de crescimento no mundo dentre as culturas de significado econômico (Corley, 2009).

O dendezeiro possui a maior produtividade dentre as culturas oleíferas, produzindo de 3 a 5 t de óleo por hectare/ ano, enquanto a soja por exemplo, produz de

400 a 600 kg de óleo por hectare/ ano (Agrianual, 2008). O óleo de dendê ocupa hoje o 1º lugar na produção mundial de óleos (Oil World Annual, 2009), servindo de suporte para dois grandes setores industriais: indústria alimentícia e indústria oleoquímica (Figura 3).

O óleo de dendê (Figura 3A) que é originado do mesocarpo é insumo no preparo de sabões, detergentes, velas, produtos farmacêuticos, cosméticos, corantes naturais, margarinas e substituto do diesel. O óleo de palmiste (Figura 3 B) que é extraído da amêndoa ou endosperma em virtude de sua qualidade e do elevado teor de ácido láurico entra como matéria-prima na fabricação de sabonetes, detergentes, pomadas, maioneses, podendo também ser utilizado na produção de chocolates, como substituto da manteiga de cacau. (Valois, 1997).



Figura 3: Óleos de dendê: A – óleo de palma: extraído da polpa e B – óleo de palmiste: extraído da amêndoa.

No Estado do Pará, o dendezeiro representa a principal matriz energética para produção de óleo vegetal além de possuir maior produção por produtor familiar (Tabela 1).

Tabela 1: Produção e geração de emprego de algumas oleaginosas com potencial para produção de biodiesel no Estado do Pará.

Cultura	Produtividade (toneladas óleo/ha/ano)	Demanda de (ha) para produzir 1.000 t de óleo	Área por produtor familiar (ha)	Produção por produtor familiar (toneladas/ano)
Mamona	0,7	1.429	4	2,8
Soja	0,5	2.000	20	10,0
Amendoim	0,7	1.429	16	11,2
Babaçu	0,12	8.333	5	0,6
Dendê	5	200	5	25,0

(Adaptado de Holanda, 2004).

Outra opção de aproveitamento do dendê está no biodiesel, cuja base de produção é o óleo vegetal oriundo da mamona, algodão, soja, girassol, canola, babaçu, pequi, milho, entre outras oleaginosas, e o próprio dendê. O biodiesel é uma nova alternativa econômica e desejável por se tratar de um combustível absolutamente renovável e menos agressivo ao meio ambiente (Valois, 1997).

Em 2002, conforme o seminário internacional do agronegócio do dendê ocorrido em Belém, o governo Federal criou o Programa Brasileiro de Biocombustíveis (Probio) – Rede Nacional de Biodiesel, sob a coordenação do Ministério da Ciência e Tecnologia, onde se insere o Programa Probioamazon dendê que tem por objetivo reduzir a dependência brasileira dos combustíveis fósseis e ampliar as reservas de energia alternativa que é um dos componentes desse reordenamento.

O dendezeiro possui excelente potencial produtivo dos quais seus subprodutos e outros usos (Figura 4), servem como fonte geradora de matéria-prima. A implantação do Probioamazon visa potencializar a produção de biomassa energética e, ao mesmo tempo, implantar um amplo programa de geração de emprego e renda para melhorar a qualidade de vida da população que vive nesta região.

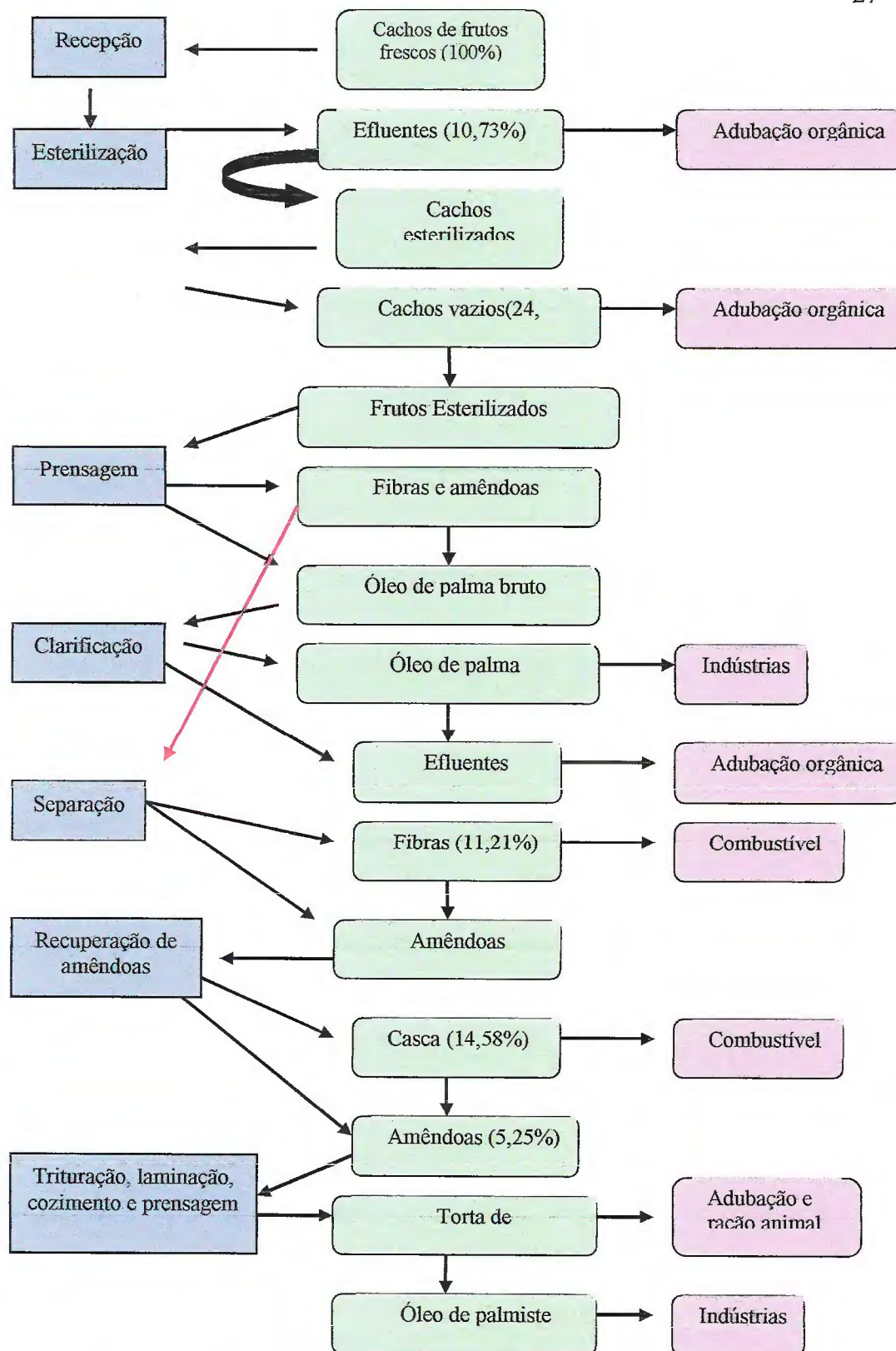


Figura 4: Etapas do processo de transformação primário do dendê, com respectivos subprodutos e usos.

Fonte: Production Supply and distribution (USDA, 2009).

2.5. Pragas e Doenças do dendzeiro

O cultivo do dendê também está sujeito a uma infestação acentuada de pragas e doenças (Medeiros & Sano, 2008), que muitas vezes é fator limitante à expansão da cultura. A principal praga do dendzeiro de importância econômica na Bahia é o *Rhynchophorus palmarum*, cujas larvas alimentam-se dos tecidos do estipe, fazendo galerias que podem provocar uma podridão interna e quando atinge o meristema provoca a morte da planta (Laranjeira, 1998).

O Amarelecimento Fatal (AF) do dendzeiro é um problema de extrema importância para a economia dos países que cultivam essa oleaginosa, em particular para o Brasil, aonde vem causando perdas vultosas desde 1984, expandindo-se de forma avassaladora (Figura 5), com severas perdas em plantações industriais, tendo havido mais de 5.000 hectares de dendzais erradicados e centenas de demissões no Estado do Pará.

A primeira constatação da doença do AF na América Latina ocorreu na Colômbia em 1967, na plantação La Arenosa, em Turbo como afirmava Turner (1981). O AF se caracteriza inicialmente pelo ligeiro amarelecimento dos folíolos basais das folhas intermediárias (3, 4, 5 e 6) e mais tarde pelo aparecimento de necroses nas extremidades dos folíolos que evoluem para a seca total dessas folhas. Apesar de ser considerado o mais sério problema fitossanitário dessa palmácea no Brasil, o AF ainda tem causa desconhecida e não possui medidas de controle eficazes (Trindade 1995). Van Slobbe (1991) relata que, geralmente, as plantas morrem 7 a 10 meses após o aparecimento dos primeiros sintomas, quando não ocorre a remissão. A partir da morte da folha flecha, não há mais a produção de cachos.



Figura 5 – Danos causados pelo Amarelecimento Fatal.
Fonte: Alessandra de Jesus Boari.

Nos anos 90, apesar da continuidade das pesquisas no ramo biótico alguns estudos se voltaram para uma possível origem abiótica do AF. Neste período destacam-se os estudos de modelos epidemiológicos, abordando padrões espaciais e temporais do AF (Bergamin et al. (1998), Laranjeira et al. (1998) e Van de Lande e Zadocks, (1999). Com o insucesso das tentativas de identificação de um agente causal todos estes estudos contribuíram para a formulação de várias hipóteses, onde atualmente, impera dois ramos científicos: Causa Biótica (estes ainda buscam um agente e/ou vetor) e causa estritamente Abiótica (acreditam que fatores fisico-químicos estariam causando as anomalias).

2.6. Recursos genéticos e Melhoramento Genético do Dendzeiro

No melhoramento de espécies alógamas, como o dendê, procura-se explorar a natureza heterozigótica dos genótipos. Em razão da heterozigose das espécies alógamas, estas tendem a ser menos uniformes do que as autógamias. O melhoramento genético do dendzeiro tem como objetivo o aumento do potencial de produção de óleo por unidade de área plantada.

A utilização do germoplasma de *E. oleifera* poderá aumentar as possibilidades de progresso sobre outras diferentes características agronômicas, para as quais o *E. guineensis* não apresenta variabilidade genética capaz de permitir resultados consideráveis em um programa de melhoramento genético. Características como tolerância a pragas e doenças estão presentes em diferentes níveis nos híbridos entre as

duas espécies e merecem ser melhor exploradas, além de que o caiaué é a única fonte atualmente disponível de tolerância ao AF. Essa “doença”, cujo agente etiológico é desconhecido, é uma grave ameaça à dendeicultura latino-americana, dado ao alto grau de mortalidade das plantas causado pela mesma (Bergamin et al, 1998).

A exploração e uso da coleção de germoplasma disponível na Embrapa Amazônia Ocidental, realizado em Manaus, possibilitarão a oferta de materiais mais produtivos, resistentes a doenças e com picos de produção diferenciados, implicando em maior rentabilidade para o agronegócio do dendê e maior segurança aos elevados investimentos requeridos pela atividade. A manutenção de coleções de germoplasma de dendê em campo requer que outras maneiras de conservação sejam utilizadas uma vez que os riscos de perdas de genótipos são grandes.

A espécie *E. oleifera* é amplamente distribuída na Amazônia Brasileira, sendo pouco conhecidas as suas características, como a existência do modelo de variação entre os materiais coletados nas suas condições naturais, fatores muito importantes na definição do programa de melhoramento para exportação dos recursos genéticos da espécie (OoI et al., 1981).

Hartley (1988) salientou a importância do *E. oleifera*, conhecido com o nome comum de caiaué que se comportava como resistente em áreas com AF, para o programa de melhoramento genético quando cruzado com *E. guineensis*, originando um híbrido interespecífico. Daí adotou-se nos procedimentos do programa de melhoramento o uso do caiaué para obtenção de híbridos sendo obtidos materiais com resistência e produtividade boa de óleo.

A hibridação interespecífica entre o caiaué (*E. oleifera*), e o dendezeiro (*E. guineensis* Jacq.), tem sido explorada com o objetivo de desenvolver cultivares tão produtivas quanto as de dendezeiro, aliada à resistência a pragas e doenças, principalmente o amarelecimento fatal, alta taxa de óleos insaturados e reduzido crescimento do tronco características do caiaué (Barcelos et al., 2000).

Todavia, especificamente com plantas perenes, no caso do dendê, o emprego das técnicas convencionais de melhoramento é dificultado por diversos fatores, destacando-se o longo período da fase juvenil, a demora para a estabilização da produção e a alta heterozigosidade dos melhores indivíduos.

Por ser uma cultura perene com longo ciclo de produção e devido ao alto custo de manutenção e avaliação dos experimentos, é necessário definir o período de tempo mínimo para uma avaliação estável de produção dos híbridos interespecíficos dendê x caiaué (Turner e Yong, 1969; Lerner, 1977).

O cultivo de variedades híbridas interespecíficas de dendê, responsável pelas elevadas produtividades, verificadas na dendeicultura internacional tem como inconveniente uma estreita base genética, apesar da grande disponibilidade de recursos genéticos nas coleções de germoplasma dos programas de melhoramento genético. (Barcelos, 2005)

Apesar do esforço de coleta e conservação, os programas de melhoramento não têm sido capazes de explorar a diversidade genética disposta para a disponibilização de novas variedades de dendê aos produtores. A avaliação dos recursos genéticos da cultura deve ser considerada como de alta prioridade. Porém, as coleções são geralmente pouco avaliadas e de manutenção onerosa, como acontece para diversas outras culturas.

Os resultados esperados são a manutenção adequada das plantas para que possam expressar seu potencial genético e a partir dos dados de caracterização e avaliação selecionar genótipos para serem utilizados no programa de melhoramento genético do dendezeiro visando ampliar a base genética dos genitores atualmente utilizados na produção de sementes comerciais, obter variedades mais produtivas e com picos de produção diferenciados das atuais (Towil, 2007).

O desenvolvimento de estratégias para a conservação de germoplasma de dendê torna-se necessário, e uma das formas de conservação seria através da cultura *in vitro* de embriões zigóticos. Cabe ao melhoramento de plantas a importante tarefa de aumentar a produtividade e melhorar a qualidade das sementes de dendê, com baixo custo, sem agressão ao ambiente.

A reprodução de genótipos especialmente no caso dos híbridos interespecíficos, também deverá ser assistida pela multiplicação *in vitro* para garantir a reprodução de cruzamentos ou genótipos em escala comercial e também garantir maior ganho genético com a seleção de indivíduos superiores dentro das progênies, que são altamente heterogêneas. As estratégias de propagação são a micropropagação de genótipos e o resgate de embriões *in vitro* de cruzamentos.

Chia et al. 2009, trabalhando com as taxas de germinação de pólen dos híbridos interespecíficos entre o caiaué e o dendezeiro obteve resultados com germinação elevada, variando de 54,8% a 58,3%, o que constata que esses valores são suficientes para o sucesso da realização de cruzamentos nos programas de melhoramento genético interespecífico.

2.7. Germinação e Propagação Vegetativa

O dendezeiro é propagado por semente e sua germinação começa pelo alongamento do embrião, forçando a sua passagem através do poro germinativo. O embrião emergente forma um “botão” de tecido que rapidamente desenvolve uma plúmula (broto caulinar) em uma radícula. Ao mesmo tempo, a outra extremidade do embrião (haustório) aumenta, originando uma estrutura esponjosa que ocupa a cavidade inteira da amêndoa após cerca de 3 meses, enquanto o endosperma é degradado e absorvido.

Embora a primeira folha apareça entre 20 e 40 dias, ela não se expande completamente e a plântula permanece parcialmente dependente do suprimento do material de reserva do endosperma (principalmente triacilglicerol) até cerca de sessenta dias (Oo & Stumpf 1983). A germinação é lenta e esporádica, e altas temperaturas são necessárias para uma germinação satisfatória. Sementes armazenadas de dendê germinam mais rapidamente do que as sementes novas. Para germinação rápida e regular, recomenda-se uma temperatura de estocagem de 39 a 40° C por 80 dias, em um baixo conteúdo de umidade na semente, porém não inferior à 14,5% . O conteúdo ótimo de umidade para germinação é de 21 a 22% para as sementes do grupo Dura, e 28 a 30% para Tenera (Purselove, 1972).

Devido ao cruzamento ser interespecífico, há perdas muito grandes na formação do embrião, com abortamentos em torno de 70%. Isto diminui a taxa de germinação dos híbridos que varia entre 25 e 30% (Chia, 2009). Por isso que a técnica da cultura de tecidos é tão importante, pois com o resgate dos embriões antes que ocorra o abortamento do mesmo é importante para que se possa aumentar a taxa de germinação dos híbridos.

2.8. Aplicação da Cultura de Tecidos em Palmeiras.

A técnica de cultivo *in vitro* se apresenta como uma alternativa, não só no desenvolvimento de protocolos para produção de plantas a partir da culturas de calos de embriogênese somática, mas também na cultura de embriões zigóticos.

Os primeiros estudos *in vitro* com palmeiras foram realizados por Cutter Júnior & Wilson (1954), usando tecidos meristemáticos de *Cocos nucifera* L. A partir desses resultados, foram obtidos avanços consideráveis na micropropagação de palmeiras e, os estudos até agora, têm mostrado o potencial desta técnica (Tisserat, 1989; Blackpool et al., 2001; Silva, 2002).

Cruzamentos interespecíficos como é o caso do híbrido obtido pelo cruzamento da *E. guineensis* x *E. oleifera* podem ser usados para transferir genes desejáveis entre as plantas. Entretanto segundo Gomathinayagam et al. (1999) em tais cruzamentos podem ocorrer barreiras tanto pré como pós- zigóticas, resultando em sementes com embriões abortivos.

A hibridização entre espécies é frequentemente limitada por falhas no desenvolvimento do endosperma, culminando com a degeneração de embriões antes que atinjam a maturidade. Esses podem ser salvos se forem removidos antes que ocorra o aborto e cultivados artificialmente em meio nutritivo (Bueno et al., 2001).

A cultura de tecidos é uma alternativa que auxilia no combate às barreiras impostas ao processo de hibridização interespecífica que estão relacionadas com a diferença no número, na homologia e morfologia dos cromossomos e grau de semelhança genética, além da anatomia do sistema reprodutivo. Mesmo que a fertilização nos cruzamentos seja possível, frequentemente ocorrem limitações devidas ao aborto ou desenvolvimento anormal do embrião (Bueno et al., 2001).

A técnica se baseia no fenômeno da totipotência, isto é, na capacidade que a célula vegetal possui de se organizar em um novo indivíduo, mantendo a informação genética necessária, sem haver recombinação gênica, dando origem a uma nova planta (Ramalho et al., 2000).

Dentre as palmeiras, com exceção da tamareira, o dendezeiro foi aquela em que mais se desenvolveu através da micropropagação. A via preferencial é a embriogênese

somática, sendo que já existem vários processos de cultura de tecidos patenteados, indicando o avanço do grau de domínio dessa técnica (Gonçalves 1994).

A embriogênese somática *in vitro* foi descrita pela primeira vez, independentemente, por Steward *et al.* (1958) em cenoura. Ela é uma importante ferramenta para a propagação de genótipos de dendezeiro. Entretanto, os protocolos de cultura de tecidos são bastante dependentes do genótipo das plantas. Para o dendê, Corley & Tinker (2003) relataram que, apesar da indução de calos em 100% dos genótipos testados, a formação de embriões somáticos só ocorreu em 85% destes materiais. O processo de embriogênese somática foi obtido em diferentes genótipos de *E. guineensis* com variações na composição dos meios de cultura e tempos de subcultivo, indicando a interação dos protocolos com o genótipo. Dessa forma, são necessárias adaptações e testes para obter protocolo de embriogênese somática para os genótipos de dendê adaptados ao Estado do Pará.

A obtenção de processos de embriogênese a partir de tecidos adultos é essencial, já que só a partir desses tecidos é mantido o genótipo da planta. Apesar dos processos de embriogênese somática a partir de inflorescências serem demorados, podendo levar entre um a dois anos (Teixeira et al., 2004), obtém-se embriões somáticos com genótipo idêntico ao da planta doadora. Além disso, têm a vantagem de manterem a planta matriz viva, ao contrário dos protocolos em que se usam folhas jovens como explante, que podem levar a planta à morte (Corley & Tinker, 2003). Assim, a clonagem de genótipos de *E. guineensis* com tolerância ao amarelecimento fatal (AF) poderia ser obtida por meio de indução de embriogênese somática a partir de inflorescências imaturas.

Alves (2007), trabalhando com resgate de híbridos interespecíficos de dendezeiro, verificou diferentes respostas *in vitro* de híbridos (*E. guineensis* x *E. oleifera*) a diferentes meios de cultura refletindo bem o efeito genótipo x ambiente.

Diversas palmeiras de importância econômica têm sido multiplicadas com maior ou menor sucesso, como *C. nucifera* L. (coqueiro), *Phoenix dactylifera* L. (tamareira), *E. guineensis* Jacq. (dendezeiro), *Euterpe edulis* Mart. (jussara, palmitero) e *Bactris gassipaes* Kunth (pupunheira) (Pinhiero, 1986).

Entretanto, o dendezeiro tem se mostrado mais factível sob o ponto de vista econômico conforme dados de Almeida (1994). Os principais problemas relacionados à cultura de tecidos de palmeiras estão associados à obtenção de explantes adequados, ao

estabelecimento de culturas viáveis e a rápida oxidação dos tecidos injuriados (Tisserat 1982). Segundo Stein (1988), devido as palmeiras serem plantas recalcitrantes à micropropagação, a adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura é fundamental à indução de regeneração de plantas completas de dendê.

A embriogênese somática foi considerada a opção mais apropriada para regeneração de espécies florestais (Rock, 2005), incluindo várias espécies de palmeiras (Steinmacher et al 2006). Em muitos casos, ela é a única forma de propagação *in vitro*, como para palmeiras em geral e para *Theobroma grandiflorum* (Filho, 2001).

Um dos primeiros relatos da cultura de tecidos em dendezeiro provavelmente tenha sido o trabalho de Staritsky (1970), citado por Almeida (1994) que descreveu um procedimento para a cultura de ápices meristemáticos em meio de cultura contendo 100 mg.L⁻¹ de caseína hidrolisada, 0,1 mg.L⁻¹ de cinetina e 5 mg.L⁻¹ de ANA ou AIA. De acordo com os resultados, houve a iniciação de brotações e raízes em alguns explantes em cultivo, sem haver, no entanto, a formação de plantas completas.

Ainda na década de 70, Rabéchault & Martin (1976) tentaram a cultura *in vitro* de dendezeiro por meio da formação de calos. Neste trabalho, os calos foram observados na primeira semana de cultivo em meio suplementado com 1 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 0,5 a 1 mg.L⁻¹ de cinetina. Estruturas vegetativas foram observadas após algumas semanas de cultivo, embora a formação de brotos não tenha acontecido. Jones (1994) observou a formação de calos a partir de embriões excisados de sementes maduras. Subseqüentemente, partes destes calos se diferenciaram em estruturas globulares, muitas das quais originando plântulas no final do processo.

Resultados similares foram obtidos por Ahée et al. (1995) que obtiveram calos embriogênicos a partir de explantes foliares. A formação destes calos ocorreu entre dois e três meses após a inoculação, em 20 a 60% dos explantes. Estes calos apresentavam densas áreas de células meristemáticas e uma vez transferidos para meios de cultura contendo auxinas e citocininas resultou no desenvolvimento dos embriões somáticos.

A produção de embrióides a partir da cultura de embriões imaturos e sua posterior diferenciação radicular em meio com 1,25 mg.L⁻¹ de zeatina foi alcançada por Rodriguez (1999). Teixeira et al. (2003) obtiveram a formação de tecido embriogênico a partir de embriões zigóticos em meio básico de cultura Y₃ (Eeuwens, 1976) suplementado com 500 μM de 2,4-D, com posterior regeneração de plantas. Resultados

semelhantes foram obtidos por Cid (1997) com um híbrido de dendezeiro em meio inicial com 2,4-D e 2iP, sendo os mesmos transferidos em seguida para meio sem auxinas para a proliferação de brotos e indução do enraizamento em meio suplementado com ANA.

Segmentos de inflorescências de dendezeiro cresceram e fotossintetizaram em meio suplementado com 5 mg.L⁻¹ de AIA (Pinedo Panduro, 1997). Resultados importantes foram obtidos por Teixeira et al. (1994) com a formação de tecidos embriogênicos a partir de inflorescências jovens cultivadas em meio MS suplementado com 475 e 500 µM de ácido diclorofenoxiacético (2,4-D). A formação de embriões somáticos e posterior regeneração de plântulas foi obtida em meio com 15µM de ácido naftaleno acético (ANA) e 2 µM de 6- benzilaminopurina (BAP).

A concentração de 1 mg.L⁻¹ de giberelina (GA₃) estimulou a formação de raízes em embriões somáticos de nucela de *Citrus* (Button e Borgnman, 1991). Também foi demonstrado o efeito estimulador do GA₃ no enraizamento de embriões somáticos (Kochba et al. 1994).

2.9. Resgate de embriões

No início do século, Hanning (1904) publicou um trabalho que representa um marco para o estudo da fisiologia do desenvolvimento do embrião (Raghavan, 1976). Utilizando meios de cultura contendo sais minerais, açúcares e amino ácidos, Hanning foi capaz de cultivar embriões isolados de *Raphanus* e *Cochlearia*. Desde então, a técnica de cultura de embriões tem-se expandido e dado importantes contribuições em estudos básicos da fisiologia do desenvolvimento do embrião, em programas de melhoramento genético, pela recuperação de híbridos de interesse de cruzamentos incompatíveis, bem como para a quebra de dormência de sementes, observada em algumas espécies (Ferreira et al., 2000).

A cultura de embriões, isto é, o cultivo de embrião em meio de cultura, é empregada para produzir plântulas originadas de cruzamentos incompatíveis ou para aumentar a população de plântulas em espécies que apresentam problemas de baixa germinação. Além disso, nos estudos sobre micropropagação *in vitro* de palmeiras, os embriões zigóticos têm sido o tipo de explante mais utilizado por sua maior

competência regenerativa. Tecidos foliares, ápices caulinares, gemas laterais, ápices radiculares e inflorescências também têm sido utilizados (Torres, 1998).

Este tipo de cultivo tem sido usado para superar dormência de sementes, em virtude da imaturidade do embrião ou da presença de substâncias inibidoras no endosperma, testar a viabilidade de sementes, recuperar híbridos raros de cruzamentos incompatíveis, para estudo dos aspectos nutricionais e fisiológicos do desenvolvimento do embrião e como fonte de explantes devido a elevada totipotência. Além disso esta técnica oferece um sistema controlado para estudar os problemas nutricionais, fisiológicos e bioquímicos dos embriões em vários estádios de desenvolvimento (Tisserat, 1984).

Conforme Pinheiro (1986), citando Hodel (1977), a cultura de embrião em palmeiras, devido ao lento processo de germinação, resultado de um espesso e duro endocarpo do fruto, é de suma importância para obtenção de plântulas enraizadas, em menor espaço de tempo. Acrescenta-se a isso o fato de que tecidos embrionários são excelentes explantes para serem usados em estudos, visando a propagação clonal *in vitro* em virtude de sua natureza juvenil e alto potencial regenerativo (Pierik, 1990). Entretanto, um importante aspecto da cultura de embriões de dendezeiro é definir um meio de cultura que possa sustentar o seu crescimento e desenvolvimento (Hu & Ferreira, 1998).

Euwens et al. (2002) trabalhando com cultura de embriões zigóticos de dendê conseguiu obter germinação *in vitro* em dendezeiro em meio básico de cultura de Murashigue e Skoog (MS) completo com adição de sacarose a 30g. L^{-1} suplementado com ácido naftaleno acético a $0,1\text{mg. L}^{-1}$ e cinetina a $0,05\text{mg. L}^{-1}$. Williams et al., (2002) também conseguiram obter germinação *in vitro* usando meio $\frac{1}{2}$ MS suplementado com $0,17\text{g.L}^{-1}$ NaH_2PO_4 além de 100mg.L^{-1} de caseína hidrolisada e sacarose a 45g. L^{-1} .

O primeiro trabalho visando regeneração de embrião somático em café (*Coffea canephora*) foi relatado por Starisky (1970). A regeneração de embriões somáticos a partir de calos embriogênicos de café já está bem documentada (Sondahl & Sharp, 1977; Boxtel, J.van & Berthouly, 1996). Entretanto, a falta de sincronização dos embriões durante a fase de diferenciação tem sido relatada em várias publicações (Sondahl & Sharp, 1977; Boxtel & Berthouly, 1996; Berthouly & Michaux-Ferriere,

1996). A maior frequência observada de embriões na fase globular provavelmente se deve ao período de cultivo, que foi de 60 dias, em todos os experimentos realizados. A melhor resposta de regeneração foi obtida no meio MS, com 4% de sacarose para *Coffea canephora*, o que confirma os dados apresentados por Boxtel & Berthouly (1996).

Trabalhos realizados com a regeneração *in vitro* de embriões somáticos na manga (*Manguifera indica*) obtiveram resultados satisfatórios com o meio MS adicionado de giberelina na concentração de 0,2 μM (Litz & Lavi, 2007).

Alves (2007), trabalhando com o resgate de embriões *in vitro* de híbridos de dendezeiro com a utilização do genótipo CI-2061, obteve os melhores resultados em todos os aspectos analisados, sendo o meio $\frac{1}{2}$ MS + 0,2% carvão ativado (C.A) + 0,17g.L⁻¹ de NaH₂PO₄ mais eficaz para formação de plântulas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia e Recursos Genéticos da EMBRAPA Amazônia Oriental em Belém-Pará e constou de atividades relacionadas à assepsia e isolamento de embrião, cultura de embriões zigóticos para conversão em plantas, e aclimatação das plantas.

Os experimentos subseqüentes são uma continuação dos trabalhos realizados no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Amazônia Oriental, no período de 2004 a 2007 (Alves, 2007), dos quais foram testados: a assepsia, os meios de cultura e as concentrações de sais a serem utilizadas no meio de cultura. Foram utilizados 31 híbridos no geral provenientes da Embrapa Amazônia Ocidental. Entretanto, nos experimentos 1 e 2 somente 3 híbridos germinaram, sendo eles: experimento 1: CN 470, CN 514 e CN 353. Experimento 2: CM 887, CM 865 e CM 378.

3.1. Obtenção e preparo dos embriões

Os embriões zigóticos de sementes de híbridos de dendezeiro utilizados nos experimentos foram provenientes do banco de germoplasma de cruzamentos realizados pelo programa de melhoramento genético de dendê, situado no campo experimental da Embrapa Amazônia Ocidental, estação do Rio Urubu, Amazonas. Os embriões zigóticos foram retirados de sementes maduras 13 meses após a abertura da inflorescência.

No primeiro ensaio estabelecido, foram utilizados 11 híbridos (SM 887, SM 830, SM 413, CM 807, CM 504, CM 535, CM 145, CM 341, CN 456, CN 698 e CN 423) de dendezeiro, coletados de janeiro à abril de 2008, os quais depois de inoculados tiveram 100% de contaminação provavelmente por fungo e bactéria, impedindo a continuação dos experimentos.

O primeiro experimento, foi composto por 17 híbridos (CN 470, CN 514, CN 353, CN 535, CN 540, CN 883, CN 830, CM 834, CN 871, CM 609, CM 680, CM 543, CM 230, SM 673, CM 460, CM 235 e CM 798), provenientes da Embrapa Amazônia Ocidental e coletados de junho de 2008 à outubro de 2008.

O segundo experimento, foi composto por 14 híbridos (CM 378, CM 887, CM 865, CM 830, SM 576, CM 743, CM 809, CM 421, CM 658, CM 467, CM 500, CM

505, CM 417e CM 420) proveniente do mesmo local dos híbridos anteriores e coletados de fevereiro à abril de 2009.

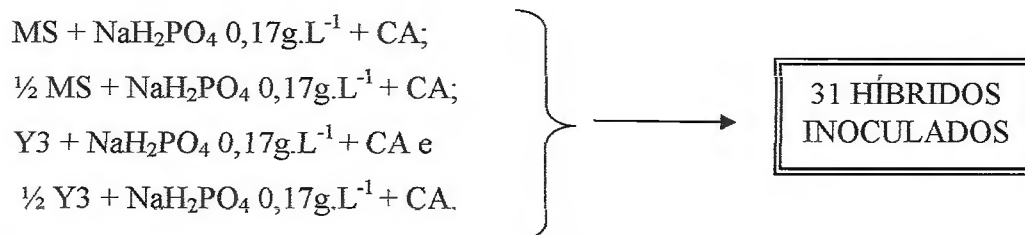
As sementes, dos dois experimentos, foram inicialmente lavadas em água corrente com detergente neutro, e imersas no fungicida Derosal 0,2 % por 20 minutos. Em seguida, as sementes foram quebradas manualmente com o auxílio de um martelo para a retirada do tegumento. Posteriormente, as sementes foram desinfestadas em câmara de fluxo laminar, sendo imersas em álcool etílico a 70% por um minuto e, em seguida em solução de NaClO a 2,5 % por 20 minutos sob agitação, e após isso, lavadas cinco vezes e imersas por vinte e quatro horas em água destilada e autoclavada. Após esse período, os embriões foram excisados e inoculadas em meios de cultura (Figura 6).



Figura 6: Etapas do processo de assepsia e inoculação de embriões de dendê. A: Lavagem das sementes ; B: Imersão das sementes em solução de derosal 0,2%; C: Secagem das sementes; D: Quebra das sementes; E: Retirada do embrião; F: Inoculação do embrião.

3.2. Inoculação dos embriões zigóticos

Os embriões assépticos foram inoculados em frascos de 300 mL, contendo 40 mL de meio de cultura MS (Murashigue e Skoog, 1962) e Y₃ (Eeuwens, 1976), completo e com metade de sais (Anexo 1 e 2), suplementado com 0,2 % de carvão ativado (C.A), 0,2% de sacarose e 0,17g.L⁻¹ de tampão fosfato NaH₂PO₄ e solidificado com 0,7% de ágar. O pH foi ajustado para 5,8 antes da esterilização em autoclave a 120 °C sob pressão de 1 atm durante 20 minutos. Os meios de cultura foram assim identificados para cada tratamento:



Cada tratamento acima foi composto por cinco frascos, cada um representando uma repetição, com cinco embriões por frasco, totalizando 25 híbridos por tratamento, sendo 100 embriões por genótipo utilizado. Os embriões foram cultivados em sala de crescimento no escuro por um período de 4 semanas. Após esse período, os frascos contendo os embriões foram transferidos para a sala de cultivo, sob fotoperíodo de 16 h luz. dia⁻¹, com intensidade de luz de 25 μmol. s⁻¹.cm⁻² e temperatura de 25 ± 3° C.

Durante o cultivo, os embriões que não manifestaram nenhum tipo de desenvolvimento foram avaliados quanto a percentagem total de contaminação e oxidação por híbrido, sendo eles: Experimento 1: CN 535, CN 540, CN 883, CN 830, CM 834, CN 871, CM 609, CM 680, CM 543, CM 230, SM 673, CM 460, CM 235 e CM 798 e experimento 2: CM 830, SM 576, CM 743, CM 809, CM 421, CM 658, CM 467, CM 500, CM 505, CM 417 e CM 420. Os 6 embriões que germinaram (Experimento 1: CN 470, CN 514 e CN 353; Experimento 2: CM 887, CM 865 e CM 378), foram avaliados quanto a percentagem de contaminação e oxidação dos embriões, comprimento do caule, comprimento da raiz, altura da planta, embriões germinados até a formação de plântulas (Figura 7). Os dados foram submetidos á análise de variância, utilizando o programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2009), e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade. O delineamento utilizado foi o

inteiramente casualizado com arranjo fatorial de 3 (híbridos) x 4 (tratamentos), perfazendo assim um total de quatro tratamentos no geral para cada híbrido utilizado. Os experimentos foram avaliados duas vezes por semana durante 12 semanas .

As plantas obtidas *in vitro* dos experimentos supracitados foram transferidas para bandejas de plásticos contendo células com duas plantas, cujo substrato utilizado foi a vermiculita onde as plantas foram nutridas com solução de $\frac{1}{2}$ MS para o desenvolvimento das mudas e aclimatadas em casa de vegetação sob condições de 50% de luz de sombrite.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Contaminação dos Embriões

Experimento 1:

Os resultados de contaminação são mostrados na Figura 8. De uma forma geral, a contaminação variou entre 7,5% e 37,5%. O genótipo CN 470 foi o que apresentou os menores resultados com percentagem de 7,5% no geral, seguido dos híbridos CM 543 (8,5%), CN 798 (13,5%), CM 680 (17,75%), CM 609 e CM 230 com 20% de contaminação respectivamente. O híbrido CN 514 foi o que apresentou a maior média com 37,5% de contaminação e esse resultado pode ser creditado a problemas de pós colheita, como o armazenamento. (Figura 7).

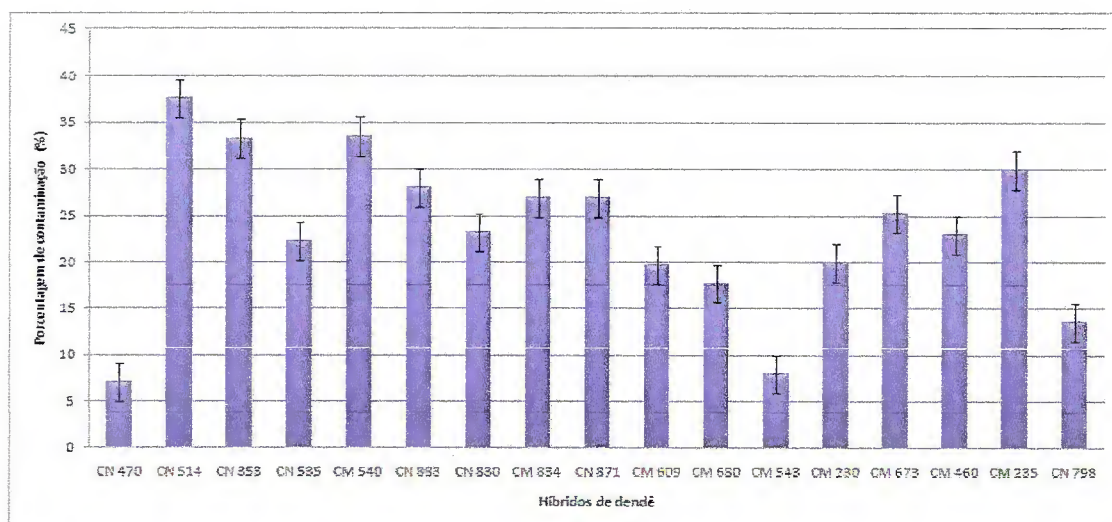


Figura 7: Experimento 1- Porcentagem de contaminação dos genótipos de dendê inoculados em meio de cultura.

Os resultados obtidos pelo híbrido CN 470 estão de acordo com os apresentados por Alves (2007), que trabalhando com resgate de híbridos interespecíficos de dendezeiro, obteve as menores percentagens de apenas 5% de contaminação dos embriões excisados e inoculados.

Experimento 2:

O genótipo CM 378 não apresentou contaminação. Os maiores valores de contaminação no segundo experimento foram apresentados pelos híbridos CM 500 (41%) e CM 658 (33%). Os genótipos CM 887 (31%), CM 865 (30%) e CM 809 (29%), obtiveram percentagens em ordem decrescente (Figura 8), e estão de acordo com os apresentados por Teixeira (2005), que trabalhando com embriões de cupuaçu obteve percentagens parecidas (44% e 38%) de contaminação de embriões inoculados em meio de cultura $\frac{1}{2}$ Y3. Alves (2007), obteve resultados de 54% trabalhando com híbridos de dendezeiro, na concentração de 1% por 15 minutos em hipoclorito de sódio.

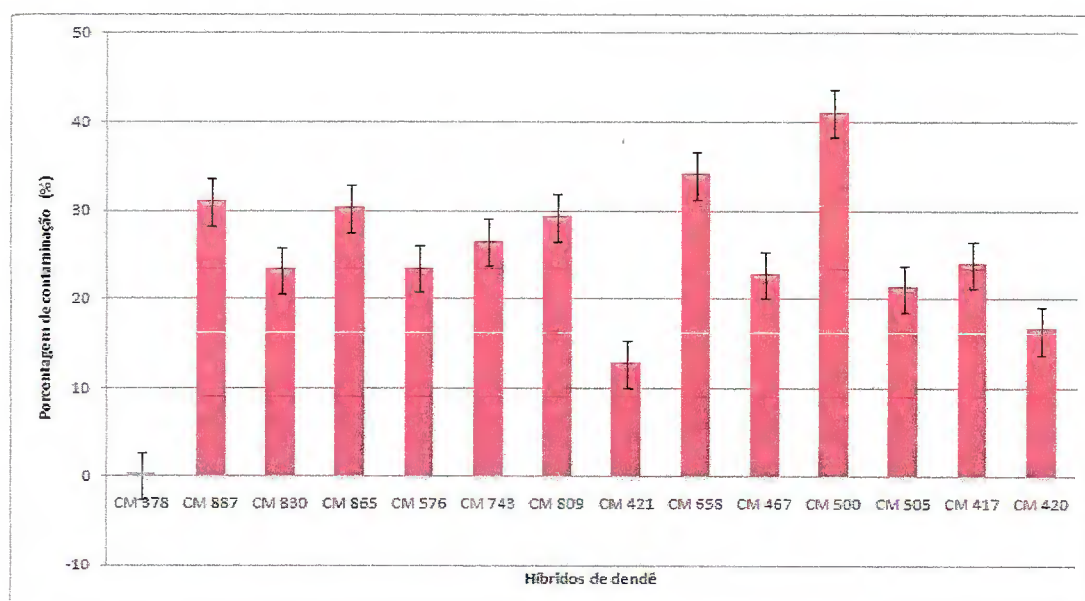


Figura 8: Experimento 2 - Porcentagem de contaminação dos 17 genótipos de dendê inoculados em meio de cultura.

Segundo Solano (2009), em experimento utilizando alguns híbridos em comum à esse trabalho, as altas contaminações ocorrentes entre eles se dá devido ao próprio material genético utilizado, que pode ser mais susceptível à entrada de bactérias que se alojam dentro das sementes. Para Filho (2005), o ataque por fungos em cultivos *in vitro* muito têm a ver com a manipulação asséptica feita antes da inoculação de cada material genético. Geralmente quando esta contaminação se manifesta através de fungos, isso pode estar relacionado com alguns microorganismos fúngicos que estejam presentes no

ar, e quando este processo é manifestado via bactéria, na maioria das vezes, estas já vem contidas dentro dos embriões que serão inoculados.

4.2. Oxidação dos embriões

Experimento 1:

Na avaliação para oxidação no primeiro experimento e feitas as percentagens gerais de oxidação por genótipo, o híbrido CN 470 não apresentou oxidação em nenhum dos tratamentos. Em contraste, os três híbridos que mostraram as maiores percentagens de oxidação foram: CN 353 (36%), CN 514 e CN 540 com 24% (Figura 9).

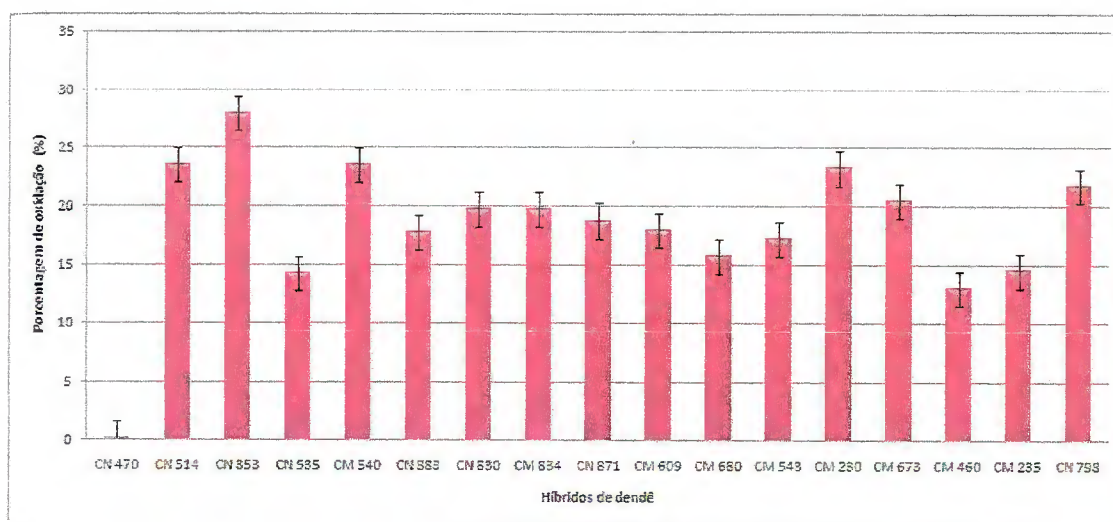


Figura 9: Experimento 1 - Porcentagem de oxidação dos 17 genótipos de dendê inoculados em meio de cultura.

As melhores respostas obtidas com o genótipo CN 470 em que não ocorreu oxidação, demonstram que há diferença entre os genótipos quanto a exsudação de compostos fenólicos e, conseqüentemente, do fenômeno da oxidação. Esses resultados estão de acordo com Ashburner et al. (1993) que controlaram a oxidação por fenóis na cultura *in vitro* de embriões de coco (*Cocos nucifera* L.), efetuando a suplementação com carvão ativado a 0,2% adicionados ao meio MS.

Cavalcante (2001), trabalhando com a viabilidade de pólen *in vivo* e *in vitro* em genótipos de açazeiro (*Euterpe oleraceae*) também não obteve oxidação em nenhum

genótipo inoculado, utilizando a concentração de 0,2% de carvão ativado com solução de Baker em meio de cultura.

Esse resultado mostra a eficácia do carvão ativado como agente anti-oxidante, pois segundo Teixeira (1993), o carvão ativado apresenta cargas residuais, as quais são capazes de adsorver substâncias fenólicas ou seus produtos de oxidação, as quinonas, evitando com isso o desencadeamento do processo oxidativo *in vitro*.

Experimento 2:

Neste experimento, o híbrido CM 378 obteve as menores percentagens de oxidação com apenas 7%. Em contrapartida, o híbrido CM 887 apresentou o maior percentual com 51% de contaminação (Figura 10). A oxidação dos polifenóis leva à produção de substâncias amareladas de composição complexa, do tipo quinonas. Estas substâncias podem se ligar a proteínas das membranas ou enzimas, acarretando toxidez e morte da célula (Valois et al. 1980), e isso é o que provavelmente pode ter acontecido para todos os outros genótipos inoculados e que de uma forma geral mostraram se susceptíveis à oxidação (Figura 10).

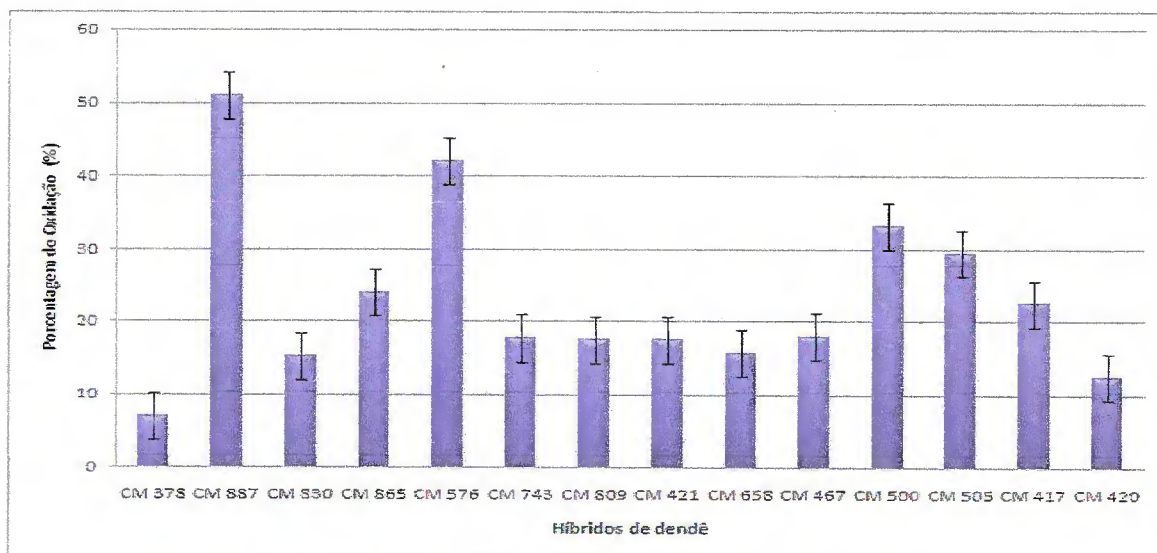


Figura 10: Experimento 2 - Porcentagem de oxidação dos 17 genótipos de dandê inoculados em meio de cultura.

Os embriões que não germinaram mostravam sinais de oxidação nos primeiros dias após a inoculação. Os que não oxidaram e nem contaminaram, não desenvolveram

nenhum processo germinativo. Alguns destes apresentaram, inicialmente, desempenho semelhante aos germinados, mas senesceram em até 15 dias.

Nos experimentos 1 e 2 foram avaliados os 31 híbridos inoculados quanto a contaminação e oxidação, porém para a fase seguinte apenas 6 híbridos foram avaliados, pois se estabeleceram e germinaram.

4.3. Estabelecimento e conversão de embriões zigóticos *in vitro* em plântulas de dendê.

Experimento 1:

Os embriões que não sofreram processos de oxidação e de contaminação desencadearam o processo de germinação que oscilou entre 0 e 100% (Figura 11) dependendo do tratamento. As melhores porcentagens ocorreram para o genótipo CN 514 e foram em ordem decrescente, tais quais: Y3 (100 %), MS (88, 89 %), ½ MS (70, 36%) e ½ Y3 (40,74%), como ilustra a Figura 11. Por conseguinte, o genótipo CN 353, obteve o melhor resultado no tratamento ½ MS (85,18%), seguido dos tratamentos ½ Y3 (25,92%) e MS (29,62%). O híbrido CN 470, com o tratamento MS obteve o melhor resultado quando comparado com os outros tratamentos avaliados, para este tratamento a porcentagem de germinação foi de 85,18%, muito acima dos outros meios de cultura referentes ao mesmo híbrido.

Em embriões zigóticos de *B. eriospatha* e *B. capitata* houveram elevados percentuais de germinação *in vitro*, de 85% e 89 % respectivamente em meio MS e Y3 completo de sais, adicionando NaH_2PO_4 , independentemente do uso de reguladores de crescimento (Santiago, 2001).

Ainda para o híbrido CN 470, os tratamentos que obtiveram os menores resultados foram o ½ MS (29,62%) e ½ Y3 (18,51%), não apresentando no tratamento Y3 germinação de nenhuma planta.

Estes resultados estão de acordo com Alves (2007), quando trabalhou com embriões zigóticos de dendezeiro, onde as menores taxas de germinação ocorreram no meio de cultura composto por Y3 suplementado com $0,17 \text{ NaH}_2\text{PO}_4 \text{ g. L}^{-1}$.

Os maiores resultados de germinação estão de acordo com os obtidos por Tomlinsom (1960) e Lorenzi (1996) onde embriões zigóticos de *E. guineensis*, tipo

pisifera de dendê, se desenvolveram rapidamente em plântulas quando cultivadas em meio contendo carvão ativado adicionados aos meios MS e Y3 e suas respectivas metades.

O híbrido CN 470 apresentou resultados inferiores quando comparados com os outros híbridos utilizados, não germinando assim, nenhuma planta (Figura 11, anexo 3). Essa diferença observada entre os híbridos estudados reflete bem o efeito do genótipo x ambiente. Segundo Fantini Junior & Graça (1990) a superioridade genética de um híbrido para uma determinada característica pode ser revelada quando esse híbrido é cultivado em determinados meios nutritivos associadas com o NaH_2PO_4 $0,17\text{g.L}^{-1}$, ou seja, a resposta de explantes em um sistema de cultura de tecidos depende do genótipo do material colocado em cultura. Segundo Handley et al. (1995), vários estudos tem demonstrado que a resposta a um determinado sistema de cultura de células é dependente do genótipo. Desta forma, os três genótipos que germinaram demonstraram a superioridade genética perante os demais genótipos inoculados, caracterizando ainda mais a interação genótipo-ambiente.

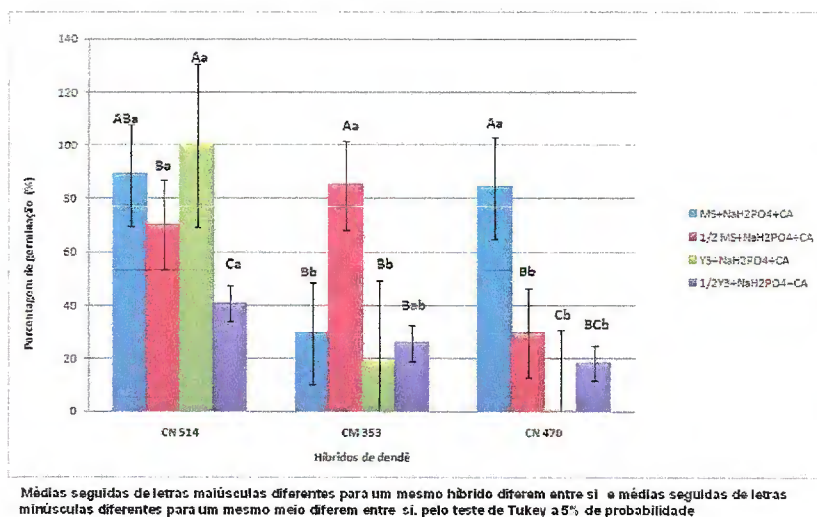


Figura 11: Experimento 1- Porcentagem de germinação *in vitro* de 3 diferentes genótipos de embriões de híbridos de dendê em 4 diferentes tratamentos.

Após a primeira semana de cultivo, na fase escura, foi observado apenas o entumescimento dos embriões zigóticos. (Figura 12 A). Com 12 dias, houve o início do gancho plumular que manteve se curvando até o final da terceira semana (21 dias) (Figura 12 B), quando se iniciou o processo de emissão da radícula (Figura 12 C) e posteriormente da parte aérea aos 30 dias (Figura 12 D). Quando completados sessenta

dias, a diferenciação estava bastante clara, onde se observou a formação do ápice cotiledonar, raiz propriamente dita e folha (Figura 12 E). Aos três meses, a plântula já estava totalmente desenvolvida (Figura 12 F) em todos os tratamentos, possibilitando a transferência para condições *ex vitro*. Silva (2002), trabalhando com coqueiro (*C. mucifera*) conseguiu obter plantas adultas em dois meses e meio utilizando meio MS completo. Sharma *et al.* (1980) constataram que, dentro de seis semanas, embriões zigóticos de tamareira (*Phoenix dactylifera L.*) dão origem a plântulas. Sob condições *in vitro*, embriões zigóticos de murumuru (*Astrocaryum murumuru*) germinam a partir da segunda semana de cultivo (Pereira, 2006).

Pelos resultados obtidos, fica evidenciado que o embrião em condições de cultivo *in vitro*, com a utilização de antioxidantes (carvão ativado) e meio adequado, permite uma maior viabilidade de germinação do que em condições *ex vitro*, possivelmente pela eliminação do mecanismo de dormência, ocasionado no fruto-semente, além de reduzir substancialmente o tempo para germinação, que em *in vitro* foi de 30 dias. Silva (2002) também obteve melhor desenvolvimento de embriões nos meios de cultivo MS e Y3, suplementados com 60 g L⁻¹ de sacarose.

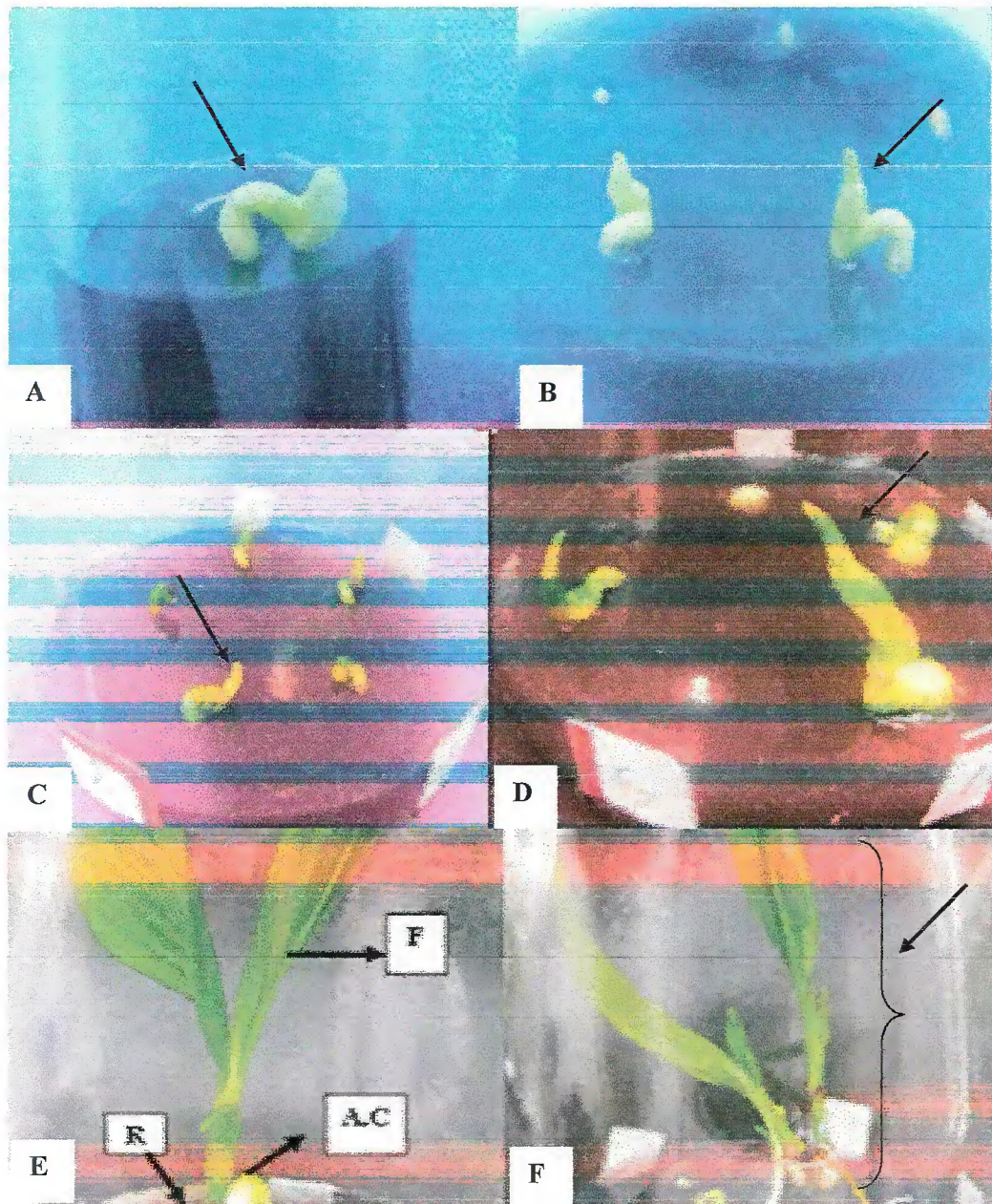


Figura 12: Desenvolvimento completo de plântulas de híbridos de dendezeiro; A: Embrião na fase escura aos 12 dias de cultivo; B: Embrião na fase escura aos 21 dias; C: Início do processo de emissão da radícula em embriões de dendezeiro; D: Embrião aos trinta dias de cultivo; E: Conversão *in vitro* de embriões de dendê a uma planta completa, onde se observa a formação da folha (F), do ápice cotiledonar (A.C) e da raiz(R); F: Aspecto de uma planta desenvolvida *in vitro* cultivada em meio nutritivo após 3 meses de cultivo.

Desta forma, temos que para a variável germinação, o genótipo que obteve a maior média foi o CN 514 no meio Y3 com a germinação de todos os embriões inoculados, seguido do meio MS. Os genótipos CN 470 e CN 353 obtiveram germinações parecidas nos meios MS e ½ MS. Para a variável contaminação, novamente o híbrido CN 514 mostrou-se mais eficaz nos tratamentos MS, Y3 onde nenhum embrião foi contaminado. Resultados parecidos foram encontrados no genótipo CN 470, no tratamento ½ Y3 onde nenhum embrião foi contaminado. Quanto a oxidação, neste mesmo genótipo, tratamento ½ MS, genótipo 514, tratamento Y3 e CN 514 tratamento ½ Y3 não foram encontrados nenhuma oxidação (Figura 13).

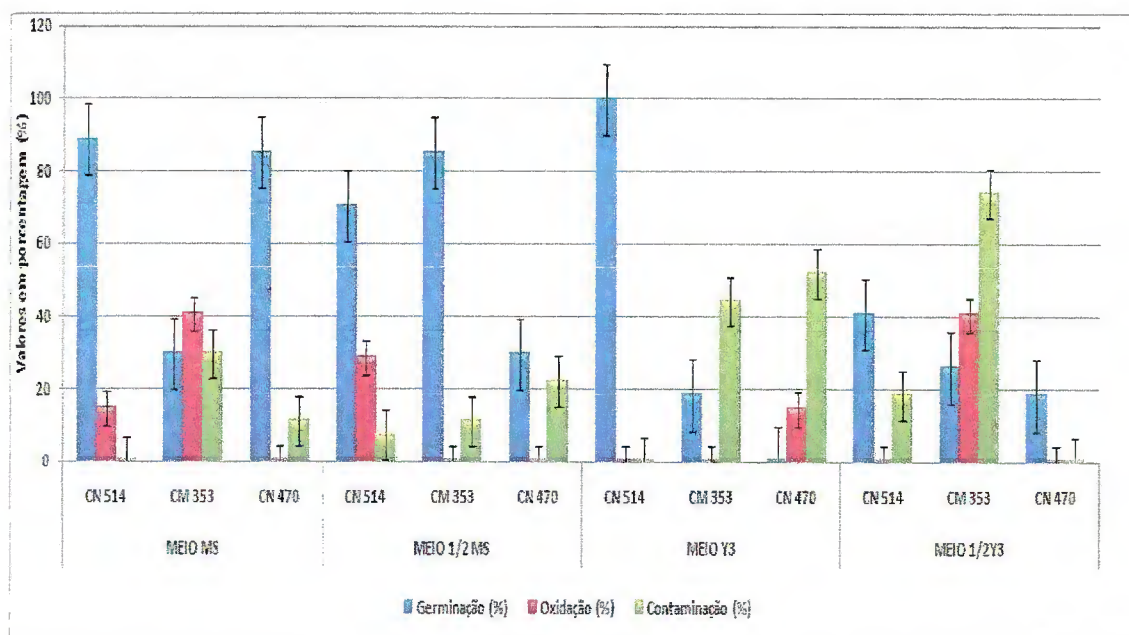
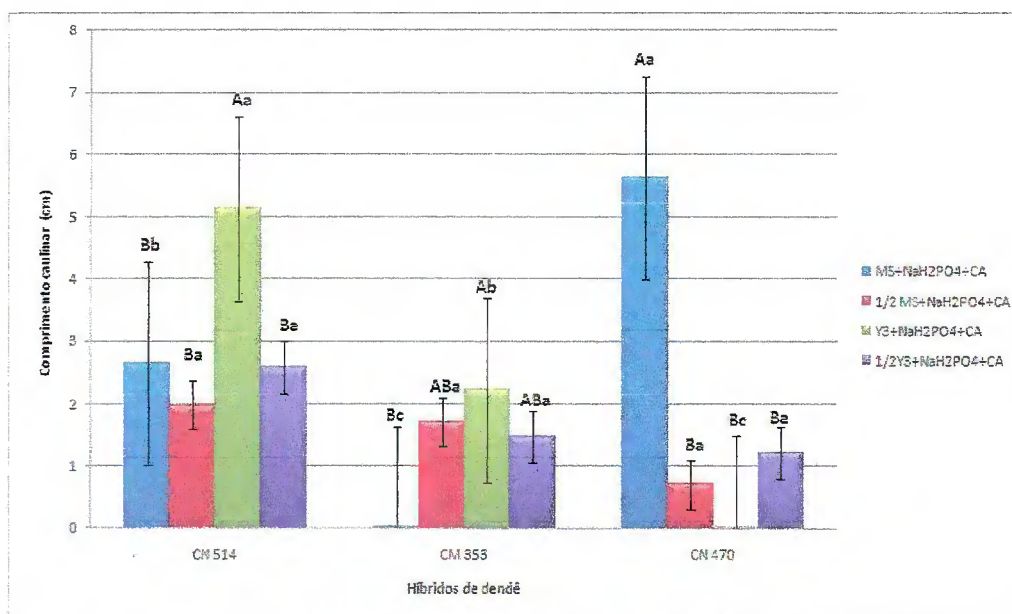


Figura 13- Experimento 1: Comparação em percentual dos diferentes genótipos de dendê em diferentes meios de cultura para os parâmetros germinação, oxidação e contaminação.

Para o híbrido CN 470, que apresentou conversão de embrião em plântulas, a média de comprimento de raiz para os quatro tratamentos variou de 0 (ausência de raiz) a 5,63 cm. Não houve diferença significativa entre as médias, pelo teste de Tukey, entre os tratamentos $\frac{1}{2}$ MS e $\frac{1}{2}$ Y3, entretanto o valor do tratamento MS foi superior estatisticamente do valor apresentado pelo tratamento $\frac{1}{2}$ Y3, utilizando teste de Tukey. (Figura 14, anexo 3). Estes resultados estão de acordo com Grattapaglia e Machado (1998), onde observou se que os meios MS completos de sais são mais utilizados por serem mais adequados para o estabelecimento da cultura, embora em alguns casos, melhores resultados possam ser obtidos com meios contendo a metade dos mesmos, como ocorreu para a característica comprimento das raízes na cultura do pessegueiro (*Prunus persica*).



Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes para um mesmo híbrido diferem entre si e médias seguidas de letras minúsculas diferentes para um mesmo meio diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Figura 14- Experimento 1: comprimento radicular (cm) dos genótipos de dendê inoculados em diferentes meios de cultura.

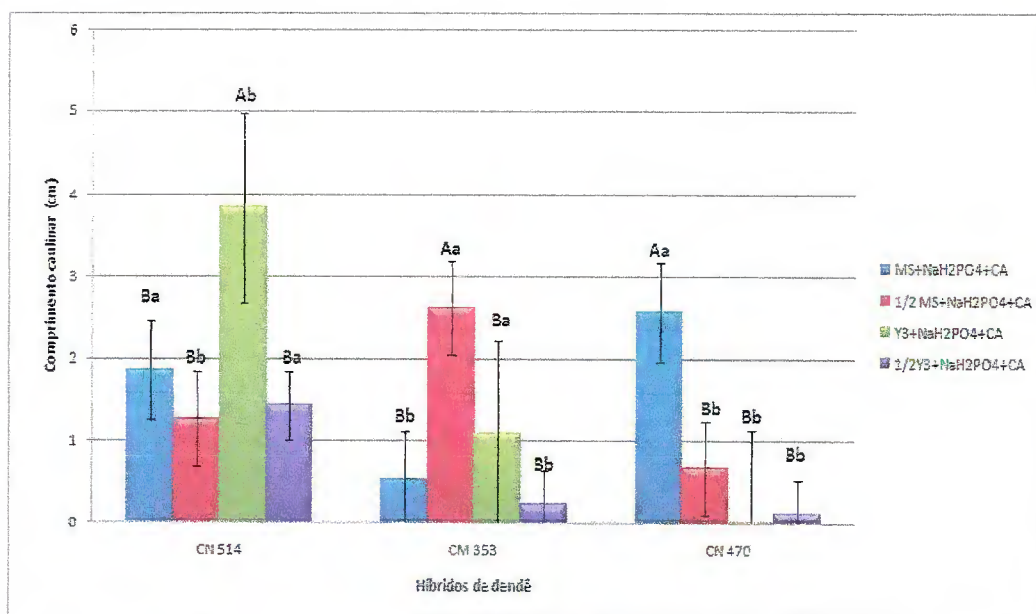
Para o híbrido CN 353 a avaliação de comprimento de raiz mostrou uma maior média para o tratamento T3 com 2,22, sem diferença estatística entre os tratamentos $\frac{1}{2}$ MS e $\frac{1}{2}$ Y3 que apresentaram valores de 1,72 cm e 1,48 cm respectivamente. Valores de MS se mostrou diferente quando comparado aos demais tratamentos (Figura 14, anexo 2).

Na avaliação do híbrido CN 514, a maior média em termos absolutos para comprimento de raiz foi o tratamento Y3 com 5,13 cm, diferindo se estatisticamente das médias dos demais tratamentos MS, ½ MS e ½ Y3 com valores de 2,65; 1,98 e 2,58 cm respectivamente (Figura 14, anexo 2).

No comprimento de caule, maior comprimento foi no genótipo CN 514, tratamento Y3 que apresentou uma média de 3,83, diferindo se estatisticamente dos demais tratamentos que obtiveram valores de 1,86 e 1,43 dos tratamentos MS e ½ Y3 e não diferente estatisticamente do valor 1,27 do tratamento ½ MS (Figura 15, anexo 2).

Quanto ao comprimento do caule o genótipo CN 353 obteve o valor 2,62 cm com o tratamento ½ MS, diferindo se estatisticamente dos demais, que obtiveram valores 1,09 cm para Y3, e MS e ½ MS mostraram as médias mais baixas 0,53 e 0,23 diferentes entre os outros tratamentos, porém iguais entre si (Figura 15, anexo 2).

Quanto ao comprimento do caule, os tratamentos T2, T3 e T4 não tiveram diferença estatística pelo teste de Tukey, apenas o tratamento T1 se mostrou superior aos demais apresentando uma média de 2,57 cm, diferindo estatisticamente dos demais ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de tukey (Figura 15, anexo 3).



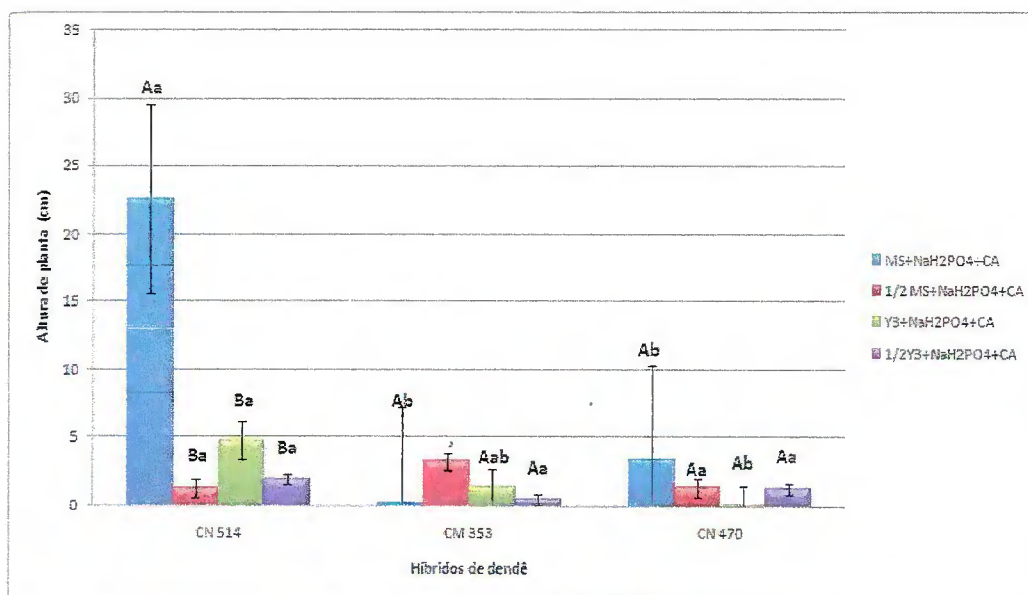
Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes para um mesmo híbrido diferem entre si e médias seguidas de letras minúsculas diferentes para um mesmo meio diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Figura 15- Experimento 1: comprimento caulinar (cm) dos genótipos de dendê inoculados em diferentes meios de cultura.

Para altura de plantas a maior média encontrada foi no genótipo CN 514 com 22,52 cm no tratamento MS, diferindo se estatisticamente dos demais que obtiveram valores mais baixos de 4,72 cm no tratamento Y3, 1,83 no $\frac{1}{2}$ Y3 e finalmente 1,24 no $\frac{1}{2}$ MS, não diferindo estatisticamente entre si (Figura 16, anexo 3).

No genótipo CM 353, para altura de plantas a média de $\frac{1}{2}$ MS foi de 3,22, um número absoluto maior do que os tratamentos Y3 e $\frac{1}{2}$ Y3 sem diferir entretanto estatisticamente (Figura 16, anexo 3).

No híbrido CN 470, o valor maior é mostrado no tratamento MS com 3,35 cm, entretanto esse valor não se mostra estatisticamente diferente dos tratamentos $\frac{1}{2}$ MS e $\frac{1}{2}$ Y3. Nessa avaliação, o tratamento Y3 o que mostrou menor valor diferente estatisticamente dos demais tratamentos (Figura 16, anexo 3).



Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes para um mesmo híbrido diferem entre si e médias seguidas de letras minúsculas diferentes para um mesmo meio diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Figura 16- Experimento 1: Altura da planta (cm) dos genótipos de dendê inoculados em diferentes meios de cultura.

Desta forma, podemos observar que o genótipo CN 470, tratamento MS mostrou os maiores resultados para a variável comprimento radicular quando comparados aos outros tratamentos. O híbrido CN 514, tratamento Y3, obteve os maiores resultados para comprimento caulinar, perante os demais tratamentos utilizados. E, quanto à altura de

planta, o genótipo CN 514, tratamento MS, consideravelmente obteve os maiores resultados em comparação aos outros híbridos. (Figura 17, anexo 3).

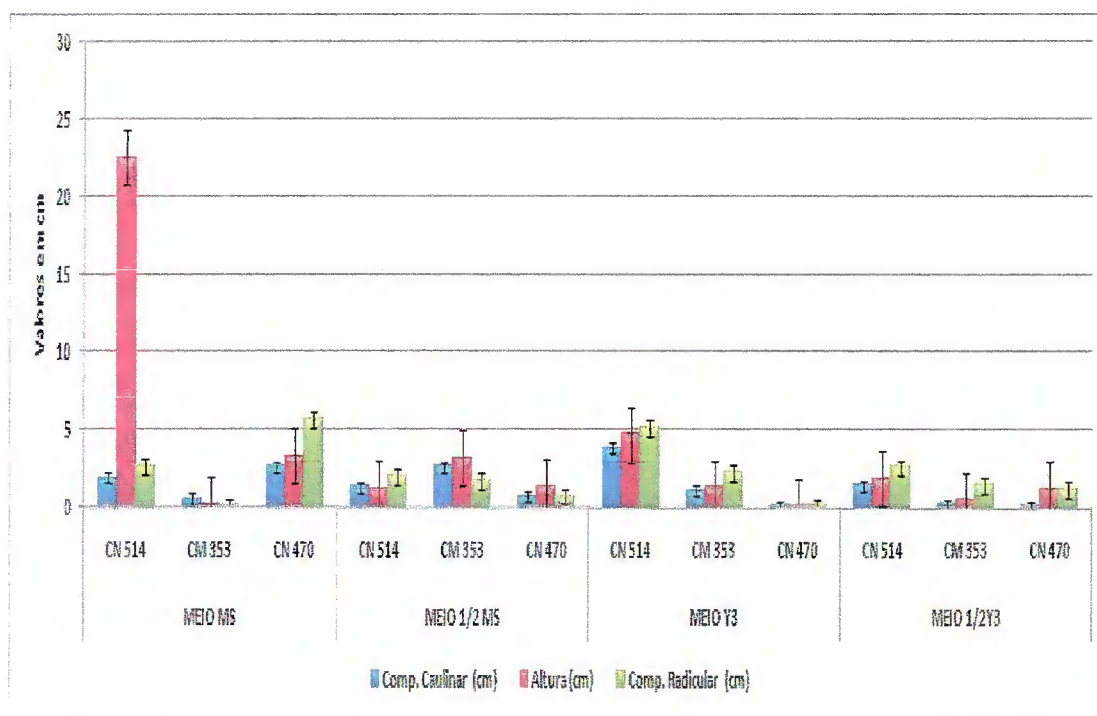
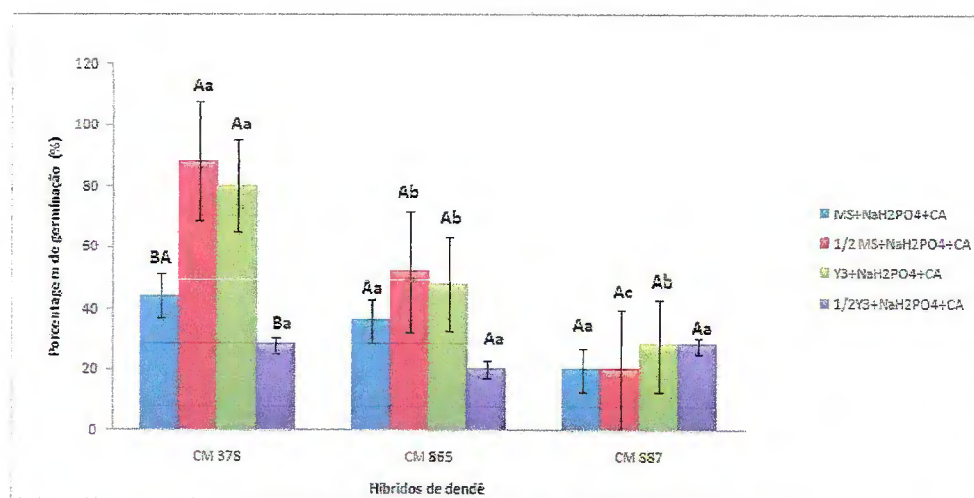


Figura 17- Experimento 1: Comparação dos diferentes genótipos de dendê em diferentes meios de cultura para os parâmetros comprimento caulinar, altura e comprimento radicular.

Experimento 2:

Neste experimento, três híbridos avaliados (CM 378, CM 865 e CM 887) germinaram e se desenvolveram sendo que o genótipo CM 378 obteve os melhores resultados nos tratamentos ½ MS e Y3 com percentual de 88% e 80% respectivamente, não diferindo estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Estes resultados concordam com os obtidos por Teixeira (2009), onde trabalhou com resgate de híbridos interespecíficos (CM 567 e CM 487) de dendezeiro nos mesmos tratamentos utilizados suplementados com zeatina na concentração de 0,1 µM, obtendo percentagem de germinação de 90%.

Ainda no genótipo CM 378, os tratamentos com MS e ½ Y3 apresentaram a menor percentagem de germinação, com 44% e 28%, respectivamente não diferindo estatisticamente entre si. O genótipo CM 865 nos tratamentos ½ MS e Y3, foram encontrados os percentuais de 52% e 48% e 36% e 20% para os tratamentos MS e ½ Y3. O híbrido CM 887 obteve a mesma percentagem germinativa de 28% nos tratamentos Y3 e ½ Y3 e 20% para MS e ½ MS (Figura 18). Conceição (2000), estudando a germinação de sementes de timbó (*Derris urucu*) (Lippil & A.C.Smith) Macbride, verificou que as concentrações dos sais 1/2 MS e MS não interferiram no número de sementes germinadas aos 12 dias de cultivo *in vitro*, não existindo diferença estatística entre os meios MS; MS/2; MS/4; MS/8 e MS/16.



Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes para um mesmo híbrido diferem entre si e médias seguidas de letras minúsculas diferentes para um mesmo meio diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Figura 18: Experimento 2 - Porcentagem de germinação *in vitro* de 3 genótipos de híbridos de embriões de dende em 4 diferentes tratamentos.

As plântulas completas com a presença de folhas e raízes foram obtidas ao final de três meses de inoculação (Figura 16), em todos os tratamentos, possibilitando a transferência para condições *ex vitro*. Pierik (2007), trabalhando com pupunheira (*Bactris gasipaes*) conseguiu obter plantas adultas em três meses utilizando meio MS completo suplementado com giberelina na concentração de 20 μM . Figueiredo (2008) constatou que, dentro de oito semanas, embriões somáticos de acaizeiro (*E. edulis* M.) dão origem a plântulas.

Após 17 dias de cultivo dos embriões zigóticos na fase escura observou-se o início do desenvolvimento do gancho plumular (Figura 19 A), que permaneceu se curvando até o final da quarta semana (30 dias) (Figura 19 B) quando se iniciou o processo de emissão da radícula (Figura 19 C) e posteriormente da parte aérea aos 45 dias (Figura 19 D). Quando completados setenta e dois dias, a diferenciação estava bastante clara, onde se observou a formação do ápice cotiledonar, raiz propriamente dita e folha (Figura 19 E). Aos finais dos três meses a plântula já estava totalmente desenvolvida (Figura 19 F).

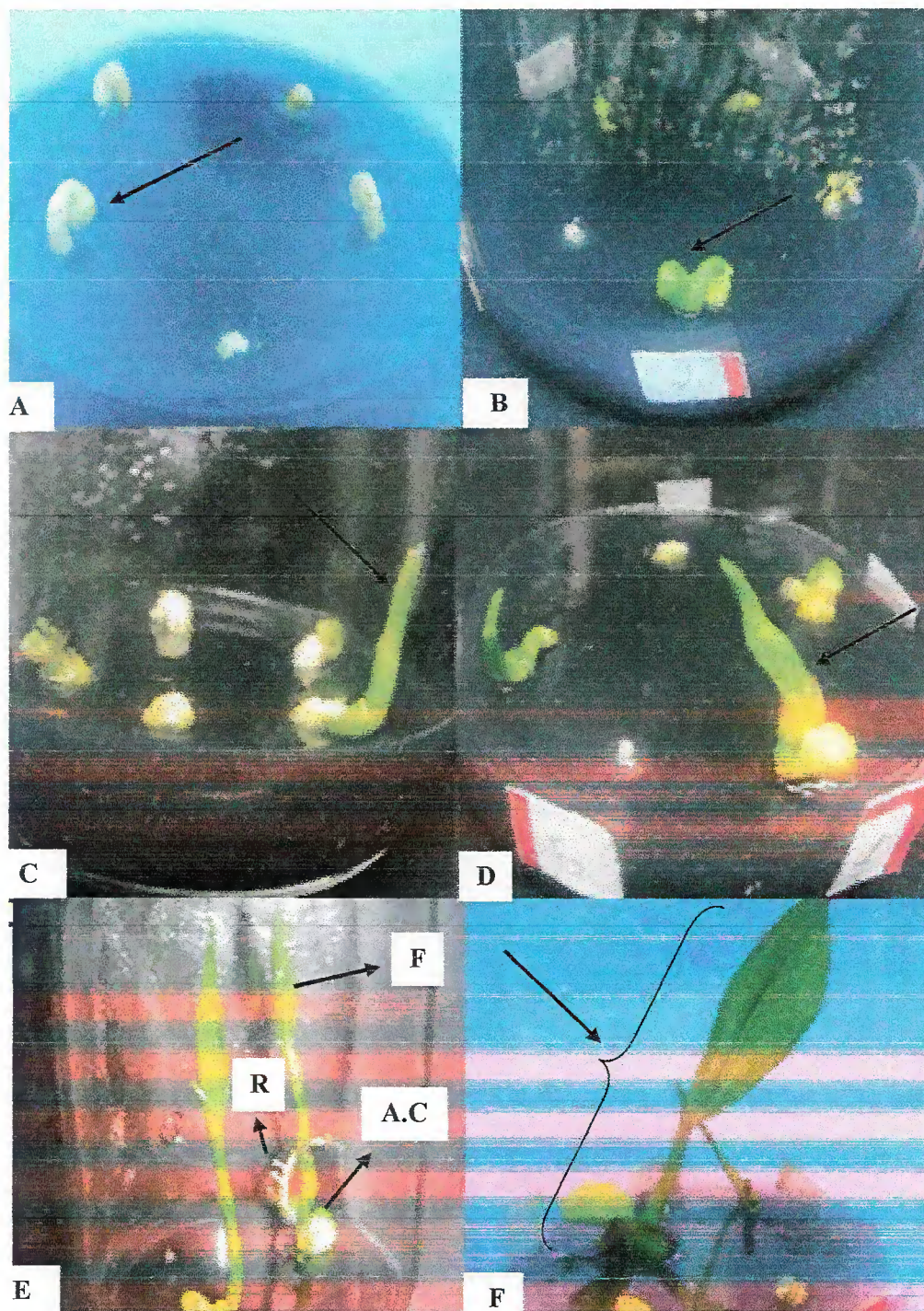


Figura 19: Desenvolvimento completo de plântulas de híbridos de dendezeiro A: Embrião na fase escura aos sete dias de cultivo; B: Embrião na fase escura aos 21 dias; Figura C: Início do processo de emissão da radícula em embriões de dendezeiro; D: Embrião aos trinta dias de cultivo; E: Conversão *in vitro* de embriões de dendê a uma planta completa, onde se observa a formação da folha (F), do ápice cotiledonar (A.C) e da raiz(R); F: Aspecto de uma planta desenvolvida *in vitro* cultivada em meio nutritivo após 3 meses de cultivo.

Assim, temos que para a variável germinação, o híbrido CM 378, tratamento $\frac{1}{2}$ MS e Y3, obteve os maiores resultados. Os híbridos CM 378 (MS), 887($\frac{1}{2}$ MS), 865 (Y3) e 378($\frac{1}{2}$ Y3) não apresentaram processo de contaminação. Para contaminação, o híbrido CM 887 ($\frac{1}{2}$ Y3) e Y3), foram os que mais apresentaram processo de contaminação.

Para a variável oxidação, o híbrido CM 887 ($\frac{1}{2}$ MS e $\frac{1}{2}$ Y3), CM 378 ($\frac{1}{2}$ Y3) não apresentaram processo oxidativo. Os híbridos 865 tratamento $\frac{1}{2}$ MS e CM 378, Y3 obteve os resultados mais expressivos de oxidação (Figura 20).

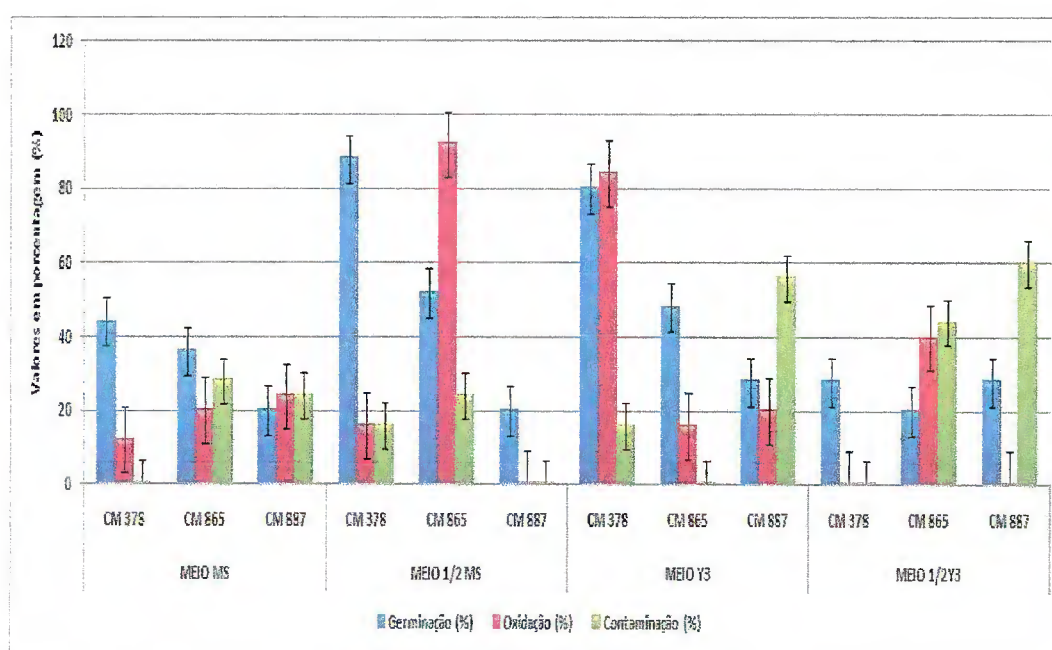
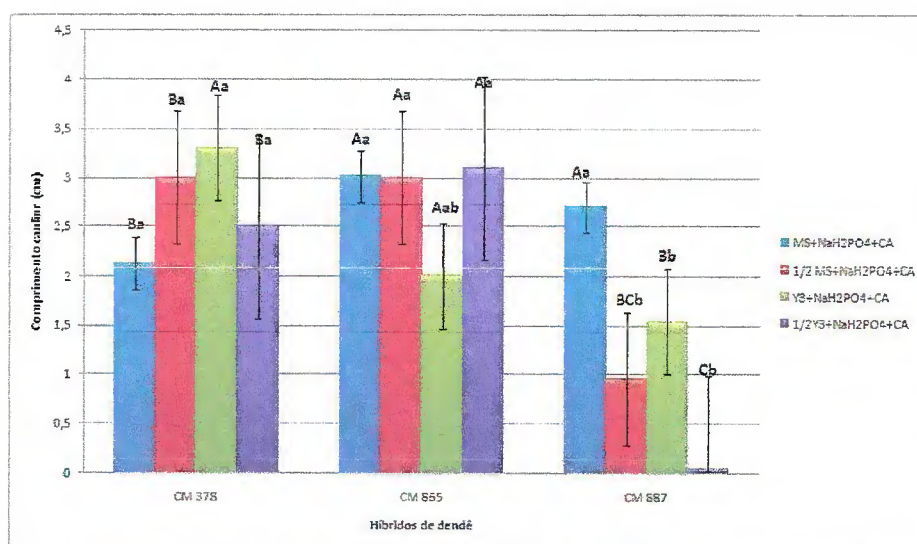


Figura 20- Experimento 2: Comparação em percentual dos diferentes genótipos de dendê em diferentes meios de cultura para os parâmetros germinação, oxidação e contaminação.

Para o experimento dois, considerando o híbrido CM 378, a maior média para comprimento de raiz foi verificada no tratamento Y3 com média de 3,30 cm, valor que não diferiu estatisticamente dos demais tratamentos MS, $\frac{1}{2}$ MS e $\frac{1}{2}$ Y3 com médias de 2,12; 3,0 e 2,5 cm, respectivamente (Figura 21).

O híbrido CM 865 apresentou para comprimento de raiz uma média 3,1 para o tratamento $\frac{1}{2}$ Y3 seguidos de 3,02; 3,0 e 2,0 para os tratamentos MS, $\frac{1}{2}$ MS e Y3 sem diferença estatística significativa (Figura 21).

O genótipo 887 obteve maiores valores no tratamento MS com 2,7 cm para comprimento de raízes, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos. Estes resultados concordam com os que Alves (2007), obteve trabalhando com híbridos interespecíficos de dendezeiro em que a variedade CI-2061 obteve uma maior média que foi de 1,36 diferindo significativamente a nível de 5% de probabilidade da média obtida pela variedade Cj-2141 que foi de 1,12 cm. Os tratamentos 1/2 MS e Y3 não diferem estatisticamente entre si. O tratamento Y3 não apresentou valores significativos, o que provém da não formação de nenhuma raiz (Figura 21).



Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes para um mesmo híbrido diferem entre si e médias seguidas de letras minúsculas diferentes para um mesmo meio diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Figura 21- Experimento 1: comprimento radicular (cm) dos genótipos de dende inoculados em diferentes meios de cultura.

O comprimento de caule apresentou a maior média de 1,99 cm para o tratamento T1 no genótipo CM 378, não diferindo estatisticamente do tratamento 1/2 MS que apresentou 1,74 cm. Os tratamentos Y3 (1,04 cm) e 1/2 Y3 (1,14 cm) não diferiram estatisticamente entre si (Figura 22, anexo 4).

O comprimento de caule para genótipo 865 mostrou a maior média no tratamento 1/2 Y3 com 1,96 cm, seguidos por 1,78; 1,71 e 1,0 cm para os tratamentos MS, Y3 e 1/2 MS, sem diferença significativa (Figura 22 anexo 4).

No genótipo CM 887, o tratamento MS apresentou o maior resultado quando comparados com os todos os outros híbridos com 2,44 cm diferindo se estatisticamente

dos mesmos. Os tratamentos $\frac{1}{2}$ MS, Y3 e $\frac{1}{2}$ Y3 apresentaram os seguintes resultados: 0,86 cm, 0,74 cm e 1,2 cm que não diferiram estatisticamente entre si (Figura 22, anexo 4).

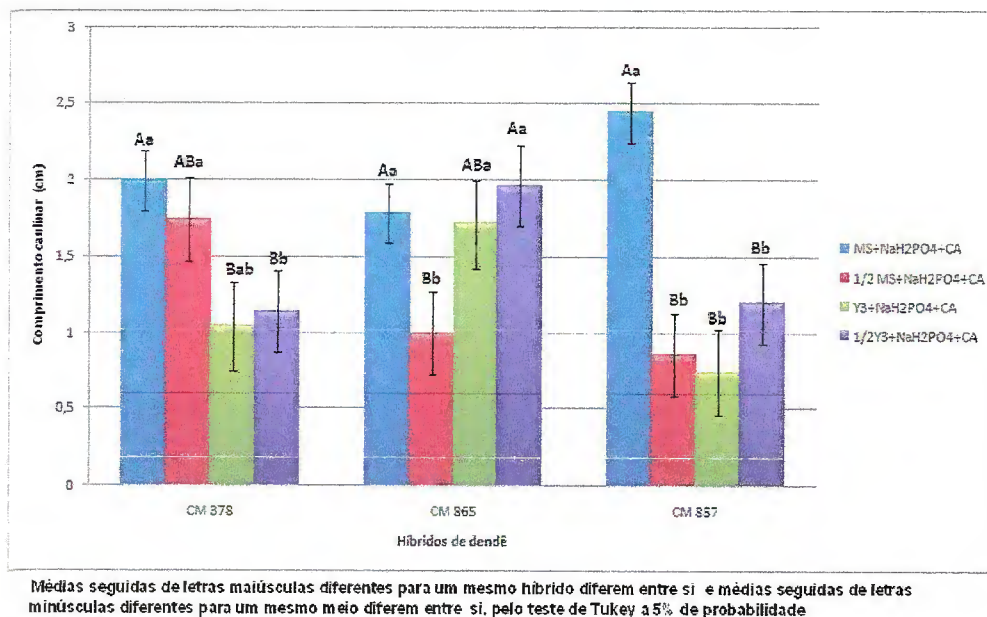


Figura 22- Experimento 2: comprimento caulinar (cm) dos genótipos de dendê inoculados em diferentes meios de cultura.

Quanto à média da altura de plantas, a maior média encontrada em todo os genótipos foi encontrada no genótipo CM 887, sendo apresentada no tratamento MS com 3,1 cm diferindo estatisticamente dos demais tratamentos, os quais obtiveram 1,35 cm ($\frac{1}{2}$ Y3), e 0,74 cm (Y3) não diferindo estatisticamente entre si. A menor média também foi encontrada neste genótipo com 0,58 cm. O genótipo CM 378, tratamento $\frac{1}{2}$ MS apresentou 2,71 cm, seguida por 1,99 cm do tratamento MS; 1,50 cm do tratamento Y3 e 1,22 cm do tratamento $\frac{1}{2}$ Y3. Essas médias diferiram entre si quando aplicado a comparação de médias usando o teste de Tukey a 5 de probabilidade (Figura 23, anexo 4).

Para altura de plantas no genótipo CM 865, os tratamentos MS e $\frac{1}{2}$ MS apresentaram as maiores medidas de 1,78 cm e 1,33 cm, não diferindo se assim significativamente entre si, o teste de Tukey a 5% de probabilidade (Figura 23, anexo 4).

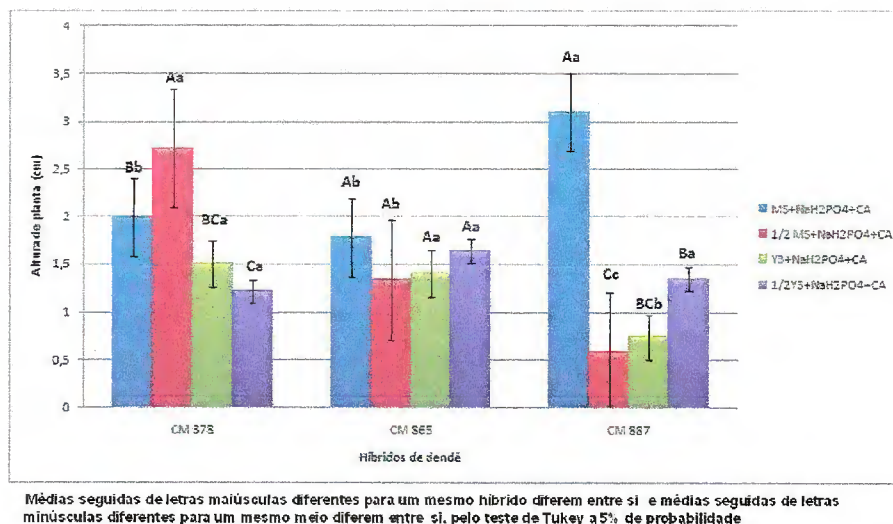


Figura 23- Experimento 2: Altura da planta (cm) dos genótipos de dendê inoculados em diferentes meios de cultura.

Assim, temos que para comprimento da raiz, o híbrido CM 378 (Y3) obteve a maior média, diferindo se estatisticamente quando comparadas com os tratamentos do mesmo híbrido utilizado. Para altura da planta e comprimento caulinar, o genótipo CM 887, tratamento MS representou a maior média das variáveis analisadas (Figura 24, anexo 4).

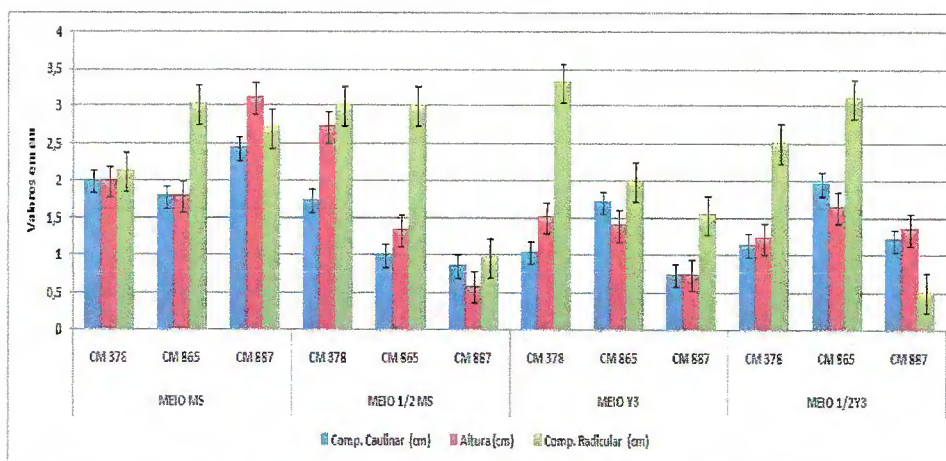


Figura 24- Experimento 2: Comparação dos diferentes genótipos de dendê em diferentes meios de cultura para os parâmetros comprimento caulinar, altura e comprimento radicular.

5- CONCLUSÃO

O genótipo mais indicado para a conversão de embriões zigóticos de híbridos de dendezeiro foi o CN 514, no tratamento Y3.

Devido à influência do genótipo com a meio de cultura, temos que para cada híbrido utilizado obteve se meios de cultura diferentes, tais quais: o híbrido CN 470 apresentou ser o mais adequado para o desenvolvimento de raiz, enquanto que para altura das plantas o genótipo CM 887 foi o que obteve a maior média apresentada.

Aos três meses de idade, é possível a conversão de embriões de híbridos (CN 514, CN 353, CN 378, CN 887 e CN 865) de dendezeiro até a formação de plântulas totalmente desenvolvidas.

6- REFERÊNCIAS

AGRIANUAL. **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: Fnp Consultoria e Comércio, p. 46-47, 2008.

ALMEIDA, M. de. **Emprego da cultura in vitro para multiplicação vegetativa de pupunha (*Bactris gasipaes* H.B.K.) Palmae**. 1994. 78f. Tese (Doutorado em Ciências). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba 1994.

ALVES, S.A.O. Oliveira. **Resgate de embriões in vitro de híbridos de dendezeiro**. (. 2007, 60 p. (Dissertação de Mestrado Biologia Tropical). Museu Paraense Emílio Goeldi, 2007.

AMBLARD, P.; NOIRET, J.M.; KOUMÉ, B.; POITIER, F.; ADON, B. **Performances comparées des hybrides interespécifiques et du matériel commercial *E. guineensis***. OCL. v. 2, n. 5, p. 335-340, 1995.

AYALA, L. S. Relatório de visita à Denpasa (1999). In: DENPASA. **Pesquisa sobre amarelecimento fatal do dendezeiro**. Belém, PA, 2001. v. 1, 319 p.

BARCELOS, E.; NUNES, C.D.M.; CUNHA, R.N.V. da. **Melhoramento Genético e produção de sementes comerciais de dendezeiro**. In.: Viégas, I.J.; Müller, A.A. A cultura do dendezeiro na Amazônia brasileira. Embrapa Amazônia Oriental, Belém/ Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus. 2005. p.145-174.

BARCELOS, E.; PACHECO, A. R.; MÜLLER, A. A.; VIÉGAS, I. de J. M.; TINÔCO, P. B. **Dendê: informações básicas para o seu cultivo**. Belém, PA: Embrapa Uepae de Belém: Brasília, DF: Embrapa-DDT 2000. (Embrapa Uepae de Belém. Documentos, 1).

BERGAMIN FILHO, A., AMORIM, L., LARANJEIRA, F.F., BERGER, R.D., HAU, B. **Análise temporal do Amarelecimento Fatal do dendezeiro como ferramenta para elucidar sua etiologia.** *Fitopatologia Brasileira*, v.23, p. 391-396, 1998.b

BLACKPOOL, A.L.; RICHARD, L.B.; BLAKE, J. Regeneration in palms, In: VASIL, I. K. (Ed.). **Cell cultures and somatic cell genetics of plants.** New York: Academic Press, 2001. v.3, p.321-222.

BUENO, L.C.S ; MENDES, A.N.G; CARVALHO, S.P de. **Melhoramento de plantas: princípios e procedimentos.** Lavras: UFLA, 2001.

BUTTON, C.B; BERGMAN, E.V.; **Produção de mudas de dendezeiro na Amazônia.** (Circular Técnica, 8). Manaus, Embrapa Amazônia Ocidental, 2001. 11p

BUTTON, J.; BOTHA, C.E.J. Enzymic maceration of *Citrus* and the regeneration of plants from single cells. **Journal Experimental of Botany**, London, v.26, n.94, p.723-729, Oct. 1975.

CAVALCANTE, A. da S. L. **Resposta morfogenéticas *in vitro* de acaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) e de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* (Wild. ex Spreng.) Schum.).** 2001. 124 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2001.

CHIA, Gilson Sanchez; R. L. Vieira; R. N. V. Cunha; R. N. C Rocha. **Germinação *in vitro* de pólen de híbridos interespecíficos entre o caiaué e o dendezeiro.** *Ciência Rural* vol.39 no.5 Santa Maria ago. 2009.

CONCEIÇÃO, H. E. O. da. **Cultivo *in vitro*, nutrição mineral e quantificação de reotenóides em tímós (*Derris* sp).** 2000. 191 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

CORLEY R.H.V, Barrett JN, Jones LH. **Vegetative propagation of oil palm via tissue culture**. Oil Palm News 22:2-7, 2009.

CORLEY, R.H.V, & Tinker, P.B. **The Oil Palm**, Blackwell Science, 4th edition, 562 p., 2003.

CUTTER JUNIOR, V.M.; WILSON, K.S. **Effect of coconut endosperm and other growth stimulants upon development in vitro of embryos of *Cocos nucifera***. Botanical Gazette, Chicago, v.115, n.3, p.234-240, Mar. 1954.

DUARTE, M. de L. R. **Doenças de plantas no trópico úmido Brasileiro. I plantas industriais**. Belém :Embrapa Amazonia Oriental, 269p.1999.

DUFRENE, E.; SAUGIER, B. **Gas exchange of oil palm in relation to light, vapour pressure deficit, temperature and leaf age**. Oléagineux, v. 48, n. 8-9, p. 347-356. 1993.

EUWENS, C. J. **Effects of organic nutrients and hormones on growth and development of tissue explants from coconut (*Cocos nucifera*) and date (*Phoenix dactylifera*) palms cultured in vitro**. Physiologia Plantarum, 42: 173-178. 2002.

EUWENS, C.J; S. LORD; DONOUGH,C.R; RAO,V;VALLEJO,G; NELSON. S. **Effects of tissue culture conditions during embryoid multiplication on the incidence of “mantled” flowering in clonally propagated oil palm**. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 70: p311-323, 2002.

EUWENS, C.J. **Mineral requirements for growth and callus initiation os tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera*) and cultured in vitro**. Physiologia Plantarum, Copenhagen, v. 36, p. 23-28, 1976. [

FANTINI JUNIOR, M.; GRAÇA, M. E. C. **Propagação *in vitro* de *Eucalyptus saligna***. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 6., Campos do Jordão. **Anais...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Silvicultura, 1990. p. 373-378

FAURE, O.; DEWITTE, W.; NOUGARÈDE, A.; VAN OCKELEN, H. **Precociously germinating somatic embryos of *Vitis vinifera* have lower ABA and IAA levels than their germinating zygotic counterparts**. *Physiologia Plantarum*, Edinburgh, v.102, p. 591-595.1998.

FERREIRA, M. E; CALDAS, L. S; PEREIRA, E. A. **Aplicações da Cultura de Tecidos no Melhoramento Genético de Plantas**. In: TORRES, A. C; CALDAS, L. S; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA – SPI/EMBRAPA – CNPH, v. 1, p. 11-20. 2009

FERRI, M. G. **Botânica: morfologia interna das plantas (anatomia)**. 9. ed. São Paulo: Nobel, 1990. 114p.

FILHO, C. F. **Desenvolvimento de calos em explantes de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) em função da concentração de auxinas e do meio líquido**. *Revista Brasileira de Fruticultura*, V. 23, n.3, p. 473-476. 2001.

FREIRE, F.C.O. **As doenças do dendê (*Elais guineensis* Jacq.) na região amazônica brasileira**. Belém: EMBRAPA-UEPAE de Belém, 1988. (EMBRAPA- UEPAE de Belém. Circular Técnica, 2).

GOMATHINAYAGAM, P.; RAM, S. G.; RATHNASWAMY, R.; RATHNASWAMY, N. M. **Interspecific hybridization between *Vigna unguiculata* (L.) Walp. and *V. vexillata* (L.) A. Rich. through *in vitro* embryo culture**. *Euphytica*, Wageningen, v. 102, n. 2, p. 203-209, 1999.

GONÇALVES, J.C.G. **Biodiesel: tendências no mundo e no Brasil**. **Informe Agropecuário**, v.26, p.713, 1994.

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

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, 2009.

HANNIG, E. **Zur physiologie pflanzlicher embryonen**. I. Veber die Kultur von cruciferen embryonen ausserhalb des embryosaaacks. Botanische Zeitung, v.62, p. 45-80, 1904.

HARTLEY, C.S.W. **The oil palm**. 3rd. ed. Tropical agriculture, Series. England. 1983.761p.

HARTLEY, C. W. S. **The oil palm**. Essex: Longman, 1988. 761 p.

HENDERSON, J.; OSBORNE, D.J. **The oil palm in all our lives: how this came about**. Endeavour, 24(2), p.63-68, 2000.

HODEL. J.H. **Tissue culture in the citrus industry**. In: Plant cell, tissue and organ culture. Reinert, J. & Bajaj, Y.P.S. (eds.). pp. 70-92. Springer-Verlag. Berlin, 1977.

HOLANDA, A. **Biodiesel e Inclusão Social**. Cadernos de Altos Estudos. Conselho de Altos Estudos e Avaliação Tecnológica. Nº 1. Brasília, 2004. 200p.

HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. Cultura de embriões. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPq, 1998. v. 1, p. 371-393.

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS. **Taxas de desflorestamento obtidas por classificação de 207 imagens LANDSAT**, 2004.

JONES, B.K.O. **Resposta de N-P-K-Ca e Mg no desenvolvimento de mudas de dendê na região de Manaus-AM**. Belém: Embrapa-UEPAE de Belém, 1994. 17p.

KOCHBA, J.; SPIEGEL-ROY, P. **The effect of auxins, cytokinins and inhibitors on embryogenesis in habituated ovular callus of the 'Shamouti' orange (*Citrus sinensis*)**. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie, Stuttgart, v.81, p.283-288, 1997.

KOCHBA, Nagasawa A (1988) Development of an embryogenic suspension culture of soybean (*Glycine max* Merrill). *Plant Cell Tissue Org Cult* 15:125-136

KAGEYAMA, P.Y. **Variação genética em uma população de *Eucalyptus grandis* (Hill) Maiden**. Piracicaba, 1980. 125p. (Tese-Doutoramento-ESALQ).

LARANJEIRA, F.F.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; BERGER, R.D.; HAU, B. **Análise espacial do amarelecimento fatal do dendezeiro como ferramenta para elucidar sua etiologia**. Fitopatologia Brasileira. V. 23, n. 3, p. 397-403, 1998.

LORENZI, H. (Coord.) 1996. **Palmeiras no Brasil: exóticas e nativas**. Nova Odessa: Plantarum. 303pp.

LEDO, A.S.; Lameira, O.A.; Benbadis, A.K.; Menezes, I.C.; Oliveira, M.S.P.; Medeiros-Filho, S. **Somatic embryogenesis from zygotic embryos of *Euterpe oleracea* Mart**. Revista Brasileira de Fruticultura, v.24, p.601-603, 2002.

LERNER, U. **Seed storage behavior in *Elaeis guineensis***. Seed Science Research, v.1, p.99-104, 1991.

LITZ, R.E. & Lavi U. **Biotechnology**. In: Litz, R.E. **The mango: Botany, production and uses**. CAB International. Wallingford. 597 p. 1997

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495p.

MEDEIROS, J. S.; SANO, E. **Análise multitemporal de imagens digitais do Landsat TM na detecção de áreas afetadas por ataques de lagartas (*Sibine fusca*) na cultura de dende (*Elaeis guineensis*)**. In: Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, 5. Natal. 11-15 outubro., 1988. Anais. São José dos Campos, INPE, 2008.

MULLER, A. A. **Curso sobre a cultura do dendezeiro (*Elaeis guineensis* jacq)**. Belém, 1992. 55p.

MULLER, A. A. **Dendezeiro: Da cultura à colheita. (*Elaeis guineensis* jacq)**. Belém, 1980. 55p.

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

OIL WORLD ANNUAL disponível na internet www.oilworld.biz/annual acessado em 25 de fevereiro de 2009.

Oo. J.A; STUMPF, H M. **Growth and organized development of cultured carrots. II. Organization in cultures from freely suspended cells. *Amer. Jour. Bot.*, 454:705-8, 1983.**

OOI, S. C.; SILVA, E. B.; MÜLLER, A. A. E.; NASCIMENTO, J. **Oil palm genetic resources – native *E. oleifera***. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, DF, v. 16, n. 3, p. 385-395, 1981.

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

PEREIRA, Jonny Everson Scherwinski. **Ciência e agrotecnologia**. vol.30 no.2 Lavras Mar./Apr, 2006.

PIERIK, R.L.M. **In vitro culture of higher plants**. Dordrecht: Martinus Nyjhoff Publishers, 2007. 344p.

PIERIK, R. L. M. **Cultivo in vitro de las plantas superiores**. 3. ed. Madrid: Mundi-Prensa, 2000. 326 p.

PIERIK, R. L. M. **Cultivo in vitro de las plantas superiores**. Martins: Nijoff, 1990. 326 p.

PINEDO E PANDURO, E.L.S.. **A propagação in vitro de plantas. O que é isso?** Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento. v.2, n. 25, 1997.

PINHEIRO, CUB. **Germinação de palmeiras**. Teresina, Embrapa- UEPAE. 1986, 102 p.

PREECE, F. E.; COMPTON, M. E. I. Problems with explant exudation in micropropagation. In: BAJAJ, Y. P. S. **Biotechnology in agriculture and forestry: 17 – High-Tech and micropropagation I**. Berlin: Springer Verlag, 1991. p.168-189.

PURSEGLOVE, J.W. **Genetic diversity of Brazilian oil palm (*Elaeis oleifera* H.B.K.) germplasm collected in the Amazon forest**. Euphytica, v.124, p.35-45, 1972.

RABÉCHAULT, H.; MARTIN, J.P. Multiplication vegetative du palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq) à l'aide de cultures de tissus foliaires. **Comptes Rendus des Séances de l'Académie des Sciences. Serie D: Sciences Naturelles**, Paris, France, v,283, p.1735-1737, 1976.

RAGHAVAN, V.; TORREY, J. G. **Effects of certain growth substances on the growth and morphogenesis of immature embryos of capsella in culture**. Plant Physiology, v. 39, p. 691- 699, 1976.

RAMALHO, M. A. P.; ABREU, A. de F. B.; SANTOS, J. B. 2000. **Melhoramento de espécies autógamas**. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S. de; VALADARES-INGLIS, M. C. (Eds.). **Recursos genéticos e melhoramento plantas**. Rondonópolis: Fundação MT. p. 201-230.

ROCK, S.M.A. **O comportamento do mercado de óleo de palma no Brasil e na Amazônia**. Belém, Banco da Amazônia S.A., Estudos Setoriais, 11. 2005. 27p.

RODRIGUES, M.R.L. **Resposta do dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) à aplicação de fertilizantes nas condições do médio Amazonas**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 1999. 81p. (Tese M.Sc.).

SANTIAGO, M.M.D.; ROCHA, M.B. **O mercado de frutas e as estimativas dos preços recebidos pelos fruticultores no Estado de São Paulo. 1990-2000**. Informações Econômicas-São Paulo, v.31, n.2, 2001.

SHARMA, D.R.; KUMARI, R.; CHOWDHURY, J.B. ***In vitro* culture of female date palm (*P.dactylifera* L.) tissues**. Euphytica, Wageningen, v. 29, n. 1, p. 169-174, 1980

SILVA, V.S. **Regeneração *in vitro* de embriões de *Cocos nucifera* L.** 2002. 72p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

SOLANO, H. R. S; **Regeneração *in vitro* de embriões de híbridos interespecíficos de dendezeiro (*Elais. Guineensis* Jac.) L.** Dissertação de Mestrado da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2009.

SONDAHL, M.R. & Sham, L.C. ***In vitro* methods applied to coffee: Plant Tissue Culture: Methods and Applications in Agriculture**. Thorpe, T.A. (ed.). pp. 325-47. Academic Press. New York, 1977.

STARITSKY. J. **Über die Kontrolle die Morphogenese und die Induktion von Advetiveembryonem an gewebeulturen aus karotten**. Planta, 53:318-33, 1970.

STEINMACHER, V.C.; Hasegawa, P.M.; Janick, J. **Asexual embryogenesis in *Theobroma cacao***. L. Jour. Amer. Soc. Hort. Sci., 104(2):145-48, 2006.

STEIN, M. de L. R. **Doenças de plantas no trópico úmido Brasileiro**. I plantas industriais. Belém :Embrapa Amazonia Oriental, 1988. 269p.

STEWART J, Pannetier C, Michaux-Ferri. **Histology of embryogenic formations during *in vitro* culture of oil palm *Elaeis guineensis* Jacq.** Orlagineux 45:409-418, 1958

SURRE, C.; ZILLER, R. **La palmera de aceite**. Editorial Blume. Coleccion Agricultura Tropical. 1969.

TEIXEIRA, J. B; CARVALHO, C. H. S. ; REZENDE, J.C. ; TEIXEIRA, J. B. ; SANTOS, A.C.R. . **Produção de clones de cupuaçuzeiro. Produção de cupuaçu com qualidade**. Revista brasileira de Fruticultura , 2009, v 37. , p. 103-110.

TEIXEIRA, J. B; DAMATTA, F.M. ; CARVALHO, C. H. S. ; RENA, Alemar Braga . **Aspectos fisiológicos do crescimento e da produção do cupuaçuzeiro**. In:João Batista Teixeira. (Org.). Clones decupuaçu: origem, características e recomendações. 01 ed. Brasília: Embrapa Cenargen, 2005, v. 01, p. 57-66.

TEIXEIRA, J.B.; Sandahl, M.R.; Kirby, E.G. **Somatic embryogenesis from immature inflorescences of oil palm**. Plant Cell Reports, v.13, p.247-250, 2004.

TEIXEIRA, J.B.; SÖNDAHL, M.R.; KIRBY, E.G. **Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of oil palm**. Plant Cell Tissue and Organ Culture, v.34, p. 227-233,2003.

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

TISSERAT, B. Date palm. In: Sharp, W.R.; EVANS, D.A.; AMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. (Ed.) **Handboobk of plant cell culture**. New York: Mcmillan, 1984. V.2, p.505-545.

TISSERAT, B. **Factors involved in the production of plantets from date palm callus cultures**. Dordrecht: Euphytica, v.31, n,1, p.201-214, jan.-Mar. 1982.

TISSERAT, B. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J (Ed.) **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecth: Martinus Nijhoff, 1989.p.339-356.

TOMLINSON, P.B. **Essays on the morphology of palms; germination and seedlings**. **Principes**, v. 4, n. 2, p. 56-61, 1960.

TORRES, A .C.; CALDAS, L.S.; FERREIRA , A.T. **Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas**. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPq, 1998. v.1, p .11- 20.

TOWILL, L. E. **Germplasm preservation**. In: R. N. Trigiano & D. J. Gray(Ed.) **Plant tissue culture concepts and laboratory exercises**. 2nd. Edition. CRC Press, Boca Raton, 2007. pp. 337-353.

TRINDADE, H.M. **O anel vermelho do dendezeiro e do coqueiro**. Belém: EMBRPA-CPATU, (EMBRAPA-CPATU. Documentos, 60). 17p.1995.

TURNER, H.N.; Young, S.S.Y. 1969. **Quantitative genetics in sheep breeding**. Cornell University, Ithaca, NY. 332pp.

- USDA. **Production, Supply and distribution on line.** Disponível em www.usda.gov.br. Acesso em maio de 2009.
- VALOIS, A.C.C. **Comunicado técnico da cultura do dendê na Amazônia, 1997.** 7p.
- VALOIS, A.C.C. **Possibilidades da cultura do dendê na Amazônia.** Brasília: Embrapa-Cenargen,.. (Embrapa-Cenargen. Comunicado Técnico, n.19). 7p. 2007.
- VAN DE LANDE, H.L. e ZADOCKS J.C. **Spatial patterns of spear rot in oil palm plantations in Suriname.** *Plant Pathology*, v.48, n.2, p. 189-201, 1999.
- VAN SLOBBE, W. G. **Amarelecimento fatal: final report.** Belém, PA: Denpasa, 1991. 100 p.
- VEIGA, A. S. JÚNIOR, J. F. KALTNER, F. J. **Políticas públicas na agroindústria do dendê na visão do produtor.** Belém, 2005, 24p.
- VEIGA, A.S.; SMIT, L.; FÚRIA, L.R.R. **Avaliação do dendezeiro como opção para o seqüestro de carbono na Amazônia.** In: VIÉGAS, I. de J.M.; MÜLLER, A.A. (ed). *A cultura do dendezeiro na Amazônia Brasileira.* Belém: EMBRAPA/CPATU, 2000. 374p
- VIÉGAS, I. de J.M; MÜLLER, A.A. **A cultura do dendezeiro na Amazônia Brasileira.** Belém: EMBRAPA/CPATU, 2000. 374p.
- WAHID, M.B.; ABDULLAH, S.N.; HENSON, I.E. **Oil Palm - Achievements and Potential.** In: 4th International Crop Science Congress, Brisbane, Queensland, 2004.
- WALDOW, D. A. G.; GOLLE, D. P.; ROSA, F. C.; HANAUER, J. G.; CURTI, A. R.; REINIGER, L. R. S. **Germinação de embriões de *Butia capitata* in vitro com ácido giberélico.** In: SIMPÓSIO DE BIODIVERSIDADE, 1.; 2007, Santa Maria. *Anais...* Santa Maria: UFSM, 1946. p. 22-23.

WILLIAMS, E.S., MAHESWARAN, B. **Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group.** *Ann. Bot.*, 57:443-462. 2002.

ANEXO

ANEXO 1- Tabela 2- Composição do meio de cultura de Murashige & Skoog (1962).

Composto	MS (mg.L ⁻¹)
Macronutrientes	
- KNO ₃	1.900
- NH ₄ NO ₃	1.650
- MgSO ₄ .7H ₂ O	370
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
KH ₂ PO ₄	170
Micronutrientes	
MnSO ₄ . 4H ₂ O	22,3
KI	0,83
H ₃ BO ₃	6,2
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
Fe-EDTA	
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
NaEDTA	37,3
Vitaminas	
Tiamina - HCl	0,1
Ácido nicotínico	0,5
Piridoxina – HCl	0,5
Glicina	2,0
Mioinositol	100,0

ANEXO 2: Tabela 3- Composição do meio de cultura Y₃ (Eeuwens, 1976).

MEIO Y3 MODIFICADO	(mg / 1000 mL)
KN ₃	2022
KCl	1491
NH ₄ Cl	535
Na ₂ H ₂ P ₀ ₄	240
CaCl ₂ 2H ₂ O	294
MgSO ₄ 7H ₂ O	246,5
KI	8,3
COCl ₂	0,25
H ₃ B ₀ ₃	3,09
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,25
MnSO ₄ 4H ₂ O	7,55
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,25
ZnSO ₄ 7H ₂ O	7,19
FeSO ₄ 7H ₂ O	13,9
Na ₂ EDTA	18,7
L-glutamina	100
L-arginina	120
L-asparagina	88
Cisteína	500 (Não utilizar)
PVP-40	5000
Sacarose	30000

ANEXO 3:

Experimento 1:

Tabela 4- Resumo da análise de variância para germinação (GER), Oxidação (OXI), Contaminação (CONT), Comprimento caulinar (Com Caul), Altura (ALT) e Comprimento radicular (Com Rad) dos híbridos CN 514, CM 353 e CN 470 de dendê, submetidos a diferentes meios de cultura. Embrapa, Belém-PA, 2010.

Fonte de variação	Valores de F						
	GL	GER	OXI	CONT	Com Caul	ALT	Com Rad
Híbrido	2	50,9835**	6,4349**	12,6752**	27,1480**	29,9841**	11,3476**
Meio de Cultura	3	26,2016**	2,6750 ^{NS}	3,6494*	12,0696**	21,6528**	3,8597*
Híbrido x Meio	6	24,3207**	6,3021**	5,4547**	245489**	19,9619**	14,9244**
Resíduo	96	354,9267	414,0365	792,1212	0,5769	15,3581	2,4859
C.V.	-	38,1521	188,3789	124,9229	56,0667	113,0676	74,6882
Média Geral	-	49,3800	10,8016	22,5296	1,3547	3,4660	2,1110

*, ** e ^{NS} – Significativos a 0,05 e 0,01 de probabilidade e não significativo, respectivamente, pelo teste F.

Tabela 5- Resumo da comparação de médias para germinação (GER), Oxidação (OXI), Contaminação (CONT), Comprimento caulinar (Com Caul), Altura (ALT) e Comprimento radicular (Com Rad) dos híbridos CN 514, CM 353 e CN 470 de dendê, submetidos a diferentes meios de cultura. Embrapa, Belém-PA, 2010.

VARIÁVEIS	CN 514				CM 353				CN 470			
	MS	½ MS	Y3	½ Y3	MS	½ MS	Y3	½ Y3	MS	½ MS	Y3	½ Y3
GER	88,89	70,36	100	40,74	29,62	85,18	18,52	25,92	85,18	29,62	0 Cb	18,51
	ABa	Ba	Aa	Ca	Bb	Aa	Bb	Bab	Aa	Bb		BCb
OXI	14,81	18,52	0	0 Ab	40,74	0 Ba	0 Ba	40,74	0 Ab	0 Aa	14,81	0 Ab
	Ab	Aa	Aa		Aa			Aa			Aa	
CONT.	0 Aa	7,41	0	18,52	29,63	11,11	44,44	74,07	11,11	22,22	51,85	0 Bb
		Aa	Ab	Ab	Ba	Ba	ABa	Aa	Ba	ABa	Aa	
Com Caul	1,86	1,27	3,83	1,43	0,53	2,62	1,09	0,23	2,57	0,68	0 Bb	0,12
	Ba	Bb	Ab	Ba	Bb	Aa	Ba	Bb	Aa	Bb		Bb
ALT	22,52	1,24	4,72	1,89	0,22	3,22	1,31	0,51	3,35	1,36	0 Ab	1,22
	Aa	Ba	Ba	Ba	Ab	Aa	Aab	Aa	Ab	Aa		Aa
Com Rad	2,65	1,98	5,13	2,58	0 Bc	1,72	2,22	1,48	5,63	0,71	0 Bc	1,22
	Bb	Ba	Aa	Ba		ABa	Ab	ABa	Aa	Ba		Ba

Médias representadas por letras maiúsculas diferentes na horizontal diferem entre si para um mesmo híbrido e médias representadas por letras minúsculas diferentes na horizontal diferem entre si para híbridos diferentes, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

ANEXO 4:

Experimento 2:

Tabela 6- Resumo da análise de variância para germinação (GER), Oxidação (OXI), Contaminação (CONT), Comprimento caulinar (Com Caul), Altura (ALT) e Comprimento radicular (Com Rad) dos híbridos CM 378, CM 865 e CM 887 de dendê, submetidos a diferentes meios de cultura. Embrapa, Belém-PA, 2010.

Fonte de variação	Valores de F						
	GL	GER	OXI	CONT	Com Caul	ALT	Com Rad
Híbrido	2	15,4488**	11,2093**	6,1444**	2,3279 ^{NS}	5,2631**	33,3462**
Meio de Cultura	3	6,8189**	5,8863**	2,1741 ^{NS}	13,0895**	18,6729**	3,3683*
Híbrido x Meio	6	2,7874*	13,4832**	3,9963**	5,8220**	15,9811**	7,6591**
Resíduo	48	423,3333	430,0000	600,0000	0,2000	0,1778	0,4408
C.V.	-	50,1831	76,8016	109,6786	30,4400	26,1358	29,0907
Média Geral	-	41,0000	27,0000	22,3333	1,4600	1,6100	2,2800

*, ** e ^{NS} – Significativos a 0,05 e 0,01 de probabilidade e não significativo, respectivamente, pelo teste F.

Tabela 7- Resumo da comparação de médias para germinação (GER), Oxidação (OXI), Contaminação (CONT), Comprimento caulinar (Com Caul), Altura (ALT) e Comprimento radicular (Com Rad) dos híbridos CM 378, CM 865 e CM 887 de dendê, submetidos a diferentes meios de cultura. Embrapa, Belém-PA, 2010.

VARIÁVEIS	CM 378				CM 865				CM 887			
	MS	½ MS	Y3	½ Y3	MS	½ MS	Y3	½ Y3	MS	½ MS	Y3	½ Y3
GER	44	88	80	28	36	52Ab	48	20	20Aa	20	28	28
	Ba	Aa	Aa	Ba	Aa		Ab	Aa	Ac	Ab	Aa	
OXI	12	16	84	0	20	92	16	40	24	0	20	0
	Ba	Bb	Aa	Bb	Ba	Aa	Bb	Ba	Aa	Ab	Ab	Ab
CONT.	0	16	16	0	28	24	0	44	24	0	56	60
	Aa	Aa	Ab	Ab	ABa	Aba	Bb	Aa	ABa	Ba	Aa	Aa
Com Caul	1,99	1,74	1,04	1,14	1,78	1 Bb	1,71	1,96	2,44	0,86	0,74	1,2
	Aa	ABa	Bab	Bb	Aa		ABa	Aa	Aa	Bb	Bb	Bb
ALT	1,99	2,71	1,50	1,22	1,78	1,33	1,40	1,64	3,1	0,58	0,74	1,35
	Bb	Aa	BCa	Ca	Ab	Ab	Aa	Aa	Aa	Cc	BCb	Ba
Com Rad	2,12	3	3,30	2,5	3,02	3 Aa	2	3,1	2,7	0,96	1,54	0
	Ba	ABa	Aa	ABa	Aa		Aab	Aa	Aa	BCb	Bb	Cb

Médias representadas por letras maiúsculas diferentes na horizontal diferem entre si para um mesmo híbrido e médias representadas por letras minúsculas diferentes na horizontal diferem entre si para híbridos diferentes, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.