

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

RESGATE *IN VITRO* DE HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS DE DENDEZEIRO  
(*Elaeis guineensis* x *Elaeis oleifera*)

**SERGIO AUGUSTO OLIVEIRA ALVES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Botânica da Universidade Federal Rural da Amazônia/ Museu Paraense Emilio Goeldi, Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica Vegetal.

**Orientador: Dr. Benedito Gomes dos Santos Filho**

BELÉM  
Estado do Pará-Brasil  
Março 2007

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

RESGATE *IN VITRO* DE HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS DE DENDEZEIRO  
(*Elaeis guineensis* Jacq.)

**SERGIO AUGUSTO OLIVEIRA ALVES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Botânica do Museu Paraense Emílio Goeldi, Área de concentração: Fisiologia e Biotecnologia de plantas.

BANCA EXAMINADORA

---

Dr. Benedito Gomes dos Santos Filho  
Orientador/Presidente  
Universidade Federal Rural da Amazônia - UFRA

---

Dr. Oriel Filgueira de Lemos  
Embrapa Amazônia Oriental

---

Dr. Heráclito Eugênio Conceição Oliveira  
Embrapa Amazônia Oriental

---

Ph.D. Moacyr Bernadino Dias Filho  
Embrapa Amazônia Oriental

Ao Senhor dos Exércitos, pelo meu novo nascimento.  
Aos meus pais Antonio Sergio e Maria das Graças e ao  
Meu irmão Marlus Fabricius pela nossa união  
Que me torna cada vez mais forte.

**DEDICO**

**“A lei do Senhor e perfeita e refrigera a alma:  
O Testemunho do Senhor é fiel e  
“Da sabedoria aos simplices”**

Salmos 19:7

## AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela sua infinita grandeza e soberania.

Aos meus pais Antonio Sergio e Maria das Graças e meu irmão Marlus Fabricius por tudo que fizeram e representam para mim.

Ao meu tio Luiz Guilherme, uma pessoa muito especial na minha vida enviada por Deus para me fazer acordar para o verdadeiro sentido da vida.

Ao meu amigo e Mestre Dr. Oriel Lemos pela sua amizade, simplicidade e ensinamentos ao longo desses quatro anos na Embrapa Amazônia Oriental- Cpatu.

Ao meu orientador Dr. Benedito Gomes dos Santos Filho pelos ensinamentos e amizade.

Ao Dr. Heráclito Eugênio Oliveira da Conceição pela parceria e ensinamentos no projeto micropropagação do dendezeiro.

Aos meus amigos e amigas de laboratório Lucila Monfort, Andréia Saldanha, Iula Naif, Iracema Cordeiro, Fernando Lacerda, Davison Pinheiro e o funcionário Gerson Martins pela amizade.

As minhas amigas que conviveram diretamente comigo Joseane Cardoso (Intranquãila), Herica Oliveira (minha irmã em Cristo), Ilmarina Campos (Big head) e Silvaney Fonseca pela paciência e amizade.

A Larissa Venâncio, mestrande de genética da UNESP de São José de Rio Preto, pelo seu infinito amor e amizade dedicados a mim.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Amazônia Oriental, Belém, Pará por disponibilizar recursos ao desenvolvimento de minha dissertação.

Ao CNPq pela concessão de um ano de bolsa de estudos fundamentais ao meu curso de Mestrado.

Ao Coordenador do Curso de Botânica Dr. João Ubiratan Moreira pela confiança depositada em mim nas horas em que precisei ficar até tarde no Museu Emilio Goeldi e a secretária executiva do Mestrado Dagmar Mariano pela disponibilidade em me atender sempre.

Aos meus amigos do Museu Goeldi Julio Cerqueira, Luiz Augusto, Genilson Alves, Fábio Batista, Fabio Pamplona, Lívia Rodrigues, Julio, Bernadete, Alison Reis, Eliane Almeida, Rachel Macedo e Alessandra pela amizade.

As minhas amigas inseparáveis de anos e anos de laboratório, de congressos e resumos científicos Leila Márcia Souza e Elaine Amoras Melo.

Aos meus amigos intermitentes e incessantes Isadora França, Alcindo, Jéferson Miranda, Flavia Farias e a minha irmã Shirley Prata por agüentarem meu humor sarcástico e fazerem parte de um mestrado inesquecível.

**SUMÁRIO**

	<b>Página</b>
RESUMO	12
ABSTRACT	13
REVISÃO DE LITERATURA	14
Histórico	14
Ecofisiologia do dendê	15
Importância ecológica	16
Morfologia do dendezeiro	17
Propagação	19
Doenças	20
Importância sócio-econômico	23
Cultura de tecidos	25
Embriogênese somática	28
Embriogênese zigótica	29
Oxidação	30
Objetivos específicos	33
Objetivos geral	33
Hipótese	34
MATERIAL E MÉTODOS	35
Oxidação de embriões	35
Desinfestação dos embriões	35
Resgate de embriões- Embriogênese zigótica	36
Avaliação dos resultados	37
Formação de plântulas	38

Aclimação	39
RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
Oxidação de embriões	39
Desinfestação dos embriões	40
Regeneração dos embriões	42
Formação de plântulas	48
Aclimação	51
CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55



## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
Tabela 1 Quadro comparativo de produtividade e geração de emprego de algumas oleaginosas com potencial para produção de biodiesel.	24
Tabela 2 Tempo versus concentração de hipoclorito de sódio no processo de assepsia de sementes híbridas de dendê.	36
Tabela 3 Duas variedades híbridas de dendê em quatro diferentes meios de cultura. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, 2006..	39
Tabela 4 Porcentagem de embriões contaminados em função dos tratamentos de assepsia aplicados.Embrapa Amazônia Oriental,Belém-PA,2006.	41
Tabela 5 Média de germinação de embriões de dendê germinados em 4 diferentes tratamentos.	42
Tabela 6 Médias do número e comprimento de raízes adicionalmente o comprimento do caule.	49
Tabela 7 Médias do número e comprimento de raízes adicionalmente o comprimento do caule na variedade CI-2061.	50
Tabela 8 Médias do número e comprimento de raízes adicionalmente o comprimento do caule na variedade Cj-2141	50
Tabela 9 Teste de qui –quadrado para comparação dos principais tratamentos no desenvolvimento de plântula a partir de embriões de dendê da variedade CI-2061.	52
Tabela 10 Teste de qui –quadrado para comparação dos efeitos de meios de cultura com NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> e sem NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> no desenvolvimento de plântula a partir de embriões de dendê da variedade CI-2061	52
Tabela 11 Teste de qui –quadrado para comparação dos principais tratamentos no desenvolvimento de plântula a partir de embriões de dendê da variedade Cj-2141.	52
Tabela 12 Teste de qui –quadrado para comparação dos efeitos de meios de cultura com NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> e sem NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> no desenvolvimento de plântula a partir de embriões de dendê da variedade Cj-2141	53

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pagina</b>
Figura 1 Corte longitudinal do fruto de dendê	18
Figura 2 Tipos de dendezeiro em função da espessura do endocarpo	19
Figura 3 Sintomas do Amarelecimento fatal (A.F)	21
Figura 4 Sintoma interno do Anel vermelho (A.V)	22
Figura 5 Sintomas da Fusariose	22
Figura 6 Ilustra o oil palm extraído da polpa e o kernel oil extraído da amêndoa	25
Figura 7 Padrão de desenvolvimento do embrião utilizado para denominação das notas de 0 a 6.	38
Figura 8 Efeito de diferentes concentrações de carvão ativado na porcentagem de oxidação de embriões de dende.	40
Figura 9 Porcentagem de germinação <i>in vitro</i> de embriões de dendê em diferentes tratamentos.	41
Figura 10 Conversão <i>in vitro</i> de embriões de dendê onde se observa a formação da Folha (F), do ápice cotiledonar (A.C) e da Raiz(R).	43
Figura 11 porcentagens de notas (0 – Nenhum desenvolvimento a 6 - Emissão de caulículo e radícula) em meio MS +carvão ativado 0,25% + NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,17g.L <sup>-1</sup> .	44
Figura 12 Porcentagens de notas (0 – Nenhum desenvolvimento a 6 - Emissão de caulículo e radícula) em meio MS +carvão ativado 0,25% + NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,17g.L <sup>-1</sup> + NAA e BAP (0,5mg L <sup>-1</sup> de cada);	44
Figura 13 Porcentagens de notas (0 – Nenhum desenvolvimento a 6 Emissão de caulículo e radícula) em meio ½ MS +carvão ativado 0,25% + NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,17g.L <sup>-1</sup> + NAA e BAP (0,5mg L <sup>-1</sup> de cada);	45
Figura 14 Porcentagens de notas (0 – Nenhum desenvolvimento a 6 - Emissão de caulículo e radícula) em meio ½ MS +carvão ativado 0,25% + NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,17g.L <sup>-1</sup>	46
Figura 15 Aspecto de uma planta desenvolvida <i>in vitro</i> cultivada em meio nutritivo após 2 meses de cultivo.	47

## LISTA DE ABREVIATURAS

A.F Amarelecimento fatal

A.V Anel vermelho

ANA Ácido naftaleno acético.

BAP 6- Benzilaminopurina

MS Meio básico de cultura de Murashige e Skoog (1962)

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> Fosfato diácido de sódio.

## 1- RESUMO

O dendezeiro (*Elaeis guineensis*, Jacq.) é uma planta originária da África. O gênero *Elaeis* tem distribuição no continente africano e na América tropical, compreendendo duas espécies taxonomicamente bem definidas: o *Elaeis guineensis* Jacq -conhecido como dendê verdadeiro, e o *Elaeis oleifera* (H.B.K) Cortés - conhecido como caiaué ou dendê da Amazônia.

Atualmente, a doença que vem se tornando mais nociva é o “Amarelecimento fatal” que tem como principal sintoma um amarelecimento quase imperceptível dos folíolos basais das folhas mais jovens levando a morte da planta. Dentre as alternativas de melhoramento genético, a obtenção de híbridos interespecíficos (*E. guineensis* x *E. oleifera*), apesar de apresentar produção de óleo cerca de 20% menor que o dendezeiro, poderá se tornar a única forma de viabilizar a produção de óleo de palma naquelas áreas afetadas por doenças como o amarelecimento fatal. O trabalho constituiu-se das etapas de controle da oxidação, assepsia, resgate de embriões zigóticos e formação de plântulas.

O presente trabalho teve como objetivo estabelecer um protocolo viável para resgate de embriões zigóticos oriundos dos híbridos interespecíficos (*E.guineensis* x *E.oleifera*). Os experimentos realizados foram inteiramente casualizados. Para assepsia, as sementes híbridas de dendê da variedade SJ 165 que foram desinfestadas com 1% NaClO a 20 minutos obtiveram os melhores resultados. A concentração de 0,25% de carvão ativado foi a mais eficiente contra a oxidação *in vitro* em sementes híbridas de dendezeiro da variedade SJ 165. Foi observado também o efeito genótipo x ambiente, pois as variedades testadas ( CI-2061,Cj-2141,Cj-502 e Cj-492) responderam de maneira diferentes aos meios de cultura utilizados, sendo a variedade CI-2061 que obteve as melhores respostas em todos os tratamentos realizados, não sendo também verificado a influência dos reguladores ANA e BAP (0,5 mg.L<sup>-1</sup> ) na conversão de embriões zigóticos em plântulas. A inserção de 0,17g.L<sup>-1</sup> de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> se mostrou fundamental no desenvolvimento de plântulas normais no processo aclimatização.Foi possível obter mudas de dendê *in vitro* em apenas quatro meses de subcultivo.

Palavras-chave: *Arecaceae*, *variabilidade genética*, *amarelecimento fatal*, *cultura de tecidos*, *regulador de crescimento*.

## ABSTRACT

The Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) it is a plant originated from Africa. The genus *Elaeis* has distribution in the African continent and tropical America, comprehend for two species defined taxonomically: *Elaeis guineensis* Jacq - known as oil palm truth, and the *Elaeis oleifera* (H.B.K) Cortés - known as caiaué or oil palm of the Amazônia.

Currently, there is a disease that is becoming more harmful, the "Yellowish Fatal", that it has as main symptom an almost imperceptible Yellowish of the basal of the leaves youngest taking the death of the plant. Amongst the alternatives of genetic improvement, the attainment of interespecifics hybrids (*E. guineensis* x *E. oleifera*), although the present oil production be 20% minor that the oil palm, will become the only form to make possible the oil production of palm in those areas affected for diseases as the yellowish fatal. The work was constituted of stages of oxidation control, asepsis, rescue of zygotic embryos and plantlets formations.

The present work had as objective to establish a viable protocol for regeneration of zygotic embryos derived of the interspecifics hybrids (*E.guineensis* x *E.oleifera*) to be used in programs of genetic improvement. For asepsis, hybrids seeds of oil palm of SJ 165 variety that were disinfected with 1% of NaOCl getting the best results. The concentration of charcoal actived of 0,25% was more efficient against oxidation process. Also was observed the genotype x environment effect, being the variability CI-2061 that had best responses in all traits realized , not being observed an influence of growth regulators ANA e BAP(0,5mg.L<sup>-1</sup>) at conversation of embryos in plantlets. The insertion of 0,17 g.L<sup>-1</sup> de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> was fundamental in development of normal plantlets in acclimatization. It was possible getting plants *in vitro* in 4 months of subculture.

Keywords: *Areacaceae*, *genetic variability*, *yellowish fatal*, *tissue culture*, *growth regulators*.

## 2- Revisão de literatura

### 2.1 Histórico

O dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq) é uma arecaceae, originária da África, cuja dispersão ocorreu a partir do século XV através do 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).

O dendezeiro consta dos relatos dos primeiros navegadores, como parte integrante da paisagem e da cultura popular da África, desde o século XV. O óleo de palma tem sido utilizado pelo homem desde a época dos faraós egípcios. A espécie foi introduzida no continente americano pelo comércio de escravos, tendo chegado ao Brasil no século XVI, na Bahia. (MULLER et al.,1992).

De acordo com Hartley (1988), há relatos de que pequenas quantidades de óleo de palma foram comercializadas na Inglaterra em 1588 e 1590, contudo, os primeiros registros de importação mostram que em 1790, o Reino Unido tinha importado menos do que 130 t de óleo de palma, em 1810, a importação da África atingiu 1.000 t. A partir da revolução industrial na Europa surgiram novos tipos de demanda, as quais incluíam óleos vegetais para alimentação e lubrificação de máquinas, foi então estabelecido o mercado legítimo do óleo de palma. Durante a década de 1830, de 11.000 a 14.000 t de óleo de palma foram exportados por ano do Oeste da África e, nas décadas de 1840 e 1850, de 25.000 a 30.000 t/ano. Daí em diante até a Primeira Guerra Mundial houve um aumento progressivo, as exportações das colônias Britânicas atingiram 87.000 t/ano em 1911.

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, Amazônia.(VEIGA et al. 2000)

Na região Norte, a introdução aconteceu em 1951 através do antigo Instituto Agrônômico 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. (PANDOLFO, 1981).

A exploração industrial do dendzeiro no país iniciou-se na Bahia, na década de 1960, visando atender a demanda de óleo para uso no resfriamento de lâminas de aço do parque siderúrgico nacional e, posteriormente, expandiu-se para o Estado do Pará (HOMMA & FURLAN JUNIOR, 2001). O cultivo em escala comercial iniciou-se em 1967, no Estado do Pará, com a implantação de 3.000 hectares a partir de um acordo de cooperação entre a Superintendência do Plano de Valorização Econômica da Amazônia (SPVEA) e o IRHO da França, instituição com conceituado conhecimento em dendzeicultura e disposição de material genético melhorado (SANTOS et al., 1998). Todos os projetos com a cultura do dendzeiro tinham participação ativa de órgãos governamentais até meados da década de 1970, quando a iniciativa privada entrou na exploração econômica do dendzeiro e incorporou maior dinâmica à atividade (SANTOS et al., 1998). No início da década de 1980 existiam no país 11.000 hectares de dendzeais plantados, atualmente são mais de 60.000 hectares, 80 % no Estado do Pará.

A expansão mundial da cultura do dendzeiro foi apoiada por importante esforço de pesquisa agrônômica, com um grande progresso sobre o aumento da produtividade. O aumento da produtividade do dendzeiro foi de 315% entre 1951 e 1991, tomando por base as produções obtidas nas primeiras plantações, feitas com variedades do tipo Dura. Esse aumento de produção decorre da melhor eficiência no uso de fertilizantes e do espetacular progresso no potencial genético das sementes utilizadas. (SUFRAMA, 2003).

## **2.2 Ecofisiologia do dendzeiro**

O dendzeiro é uma cultura que se desenvolve muito bem em clima quente e úmido, por isso a disponibilidade de água é um dos principais fatores para o sucesso dessa cultura. Nas regiões que não apresentam chuvas regulares e suficientes, há redução do rendimento em óleo. Segundo Hartley (1988), as condições climáticas ótimas para o desenvolvimento do dendzeiro são encontradas na zona intertropical, quais sejam:

- a) Chuva: acima de 2.000 mm/ano, ideal ao redor de 2.500 mm/ano, com distribuição uniforme durante o ano;
- b) Temperatura: média entre 24 °C e 28 °C, máxima 33 °C e mínima não inferior a 18 °C;
- c) Luminosidade: acima de 1.800 horas/ano de radiação solar.

A água tem uma importância vital no desenvolvimento do dendezeiro. Segundo Surre (1968), e Dufour et al (1988) o déficit hídrico pode alterar a taxa de emissão das inflorescências femininas e, conseqüentemente, diminuir a produção de cachos, além de aumentar o fenômeno do abortamento das inflorescências

O cultivo em solos naturalmente pobres é propiciado através de uma adubação química equilibrada SUFRAMA (2003). O dendezeiro também é tolerante à acidez do solo e toxidez de alumínio, que são problemas comuns em 80% dos solos da Amazônia (PANDOLFO, 1981). Entretanto, solos com diferentes reservas naturais em elementos minerais terão diferentes custos de produção em decorrência de variações na produtividade e na quantidade de fertilizantes que deverão ser aplicados.

Segundo Rodrigues (1993), na Amazônia, o dendezeiro vem sendo cultivado principalmente nos Latossolos e Argissolos, caracterizados como solos ácidos, com baixo nível de bases e deficientes em fósforo. Trabalhos conduzidos em Belém, no Estado do Pará (PACHECO et al, 1987), demonstraram que o fósforo é o elemento mais limitante para o desenvolvimento e a produção do dendezeiro.

### **2.3 Importância ecológica**

De acordo com o INPE (2004), dos cinco milhões de km<sup>2</sup> da Amazônia brasileira, cerca de quatro milhões de km<sup>2</sup> possuem fisionomia de florestas. O desflorestamento da Amazônia em 2000 alcançou mais de 500.000 km<sup>2</sup>, cuja taxa média de crescimento anual situa-se em torno de 18.050 km<sup>2</sup>, período de 1977 a 2003. No Estado do Pará, neste período, a taxa média anual de incremento foi na ordem de 5.763 km<sup>2</sup>.

A ocupação dessas áreas deve ser preferencialmente com culturas perenes, como a seringueira (*Hevea brasiliensis*, HBK), bacurizeiro (*Platonia insignis*, Mart.), coqueiro (*Cocos nucifera*, L.) e dendezeiro (*Elaeis guineensis*, Jacq.) devido terem características semelhantes às árvores de florestas tropicais, além de permitirem



atividades economicamente lucrativas por muitos anos e ecologicamente aceitáveis (VIÉGAS & MULLER, 2000)..

Segundo Muller et al (1992) o dendezeiro gera reduzido impacto ambiental quando plenamente estabelecido, protege o solo contra erosão e expressivo nível de “seqüestro de carbono”, bem como a possibilidade de exploração a longo prazo, 20 a 25 anos, e ao alto potencial de produção de óleo (entre 4.400 a 6.600 litros por ha/ano), tornando-se passível de ser utilizado nessas áreas, especialmente nas estruturas familiares dos colonos dos projetos de assentamento e dos seringueiros. Segundo o INPE (2004) 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. Nos países em desenvolvimento, 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.

Segundo Viégas & Muller, (2000) o dendezeiro é uma planta que possui alta capacidade fotossintética, produção de massa seca total da ordem de 50 toneladas métricas por hectare/ano (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 (DUFRÊNE & SAUGIER, 1993).

## 2.4 Morfologia do dendezeiro

O dendezeiro é uma planta monocotiledônea cujo cariótipo é  $2n = 32$ , pertencente a família das palmeiras, Arecaceae, anteriormente denominada Arecaceae. As arecáceas pertencem à Ordem Arecales.

O gênero *Elaeis* tem sua origem em palmeiras introduzidas na Martinica, e o dendezeiro recebeu seu nome botânico de Jacquin (1763). *Elaeis* é derivado da palavra grega *elaion*, que significa óleo, enquanto o nome específico *guineensis* demonstra que Jacquin atribuíu sua origem à Costa da Guiné. (BARCELOS, 1986)

Atualmente, três espécies são aceitas nesse gênero: *E. guineensis*, *E. oleifera* e *E. odora*, sendo a *Elaeis guineensis* mais comum para produção econômica de óleo, enquanto o caiaué (*Elaeis oleifera*), apesar de não ser um bom produtor quantitativo de óleo, apresenta características desejáveis para programas de melhoramento genético,

como resistência ambiental, menor taxa de crescimento em relação ao dendezeiro africano, óleo da polpa com elevado teor de ácido graxos insaturados e conseqüente, redução da gordura, que podem ser transferidas para híbridos interespecíficos oriundos do cruzamento entre as duas espécies (VALOIS,1997).E por último, a *E. odora* que não é cultivada e pouco se sabe sobre a mesma.

*Elaeis guineensis* em idade adulta apresenta uma coroa com 30 a 45 folhas verdes de 5 a 9 m de comprimento, encimando um estipe cilíndrico único. É uma planta monóica com ciclos sucessivos de inflorescências masculinas e femininas, o que faz com que o modo de reprodução seja através de polinização cruzada (VALOIS, 1997). Algumas vezes, inflorescências hermafroditas e andromórficas desenvolvem-se, principalmente em plantas jovens e na mudança de ciclos sexuais. A produção é constituída de cachos de frutos tipo drupa, da polpa dos quais se extrai um óleo de coloração ‘alaranjada’ comestível, semi-sólido, comumente denominado “óleo de palma”. Da amêndoa extrai-se um óleo de cor ‘amarelo-clara’, igualmente comestível, denominado “óleo de palmiste” (RODRIGUES et al.,2002)

O número de flores femininas no caiaué é ligeiramente superior ao encontrado no dendezeiro; mas, não tem sido constatada a formação de cachos grandes como o esperado (BARCELOS, 2001).

Em geral, para as três espécies dentro do gênero *Elaeis*, o fruto é em drupa monosperma, oval, do tamanho de uma noz (Figura 1).



Figura 1- Corte longitudinal do fruto do dendezeiro

O dendezeiro faz parte da família *Arecaceae*, integrando umas das principais famílias da classe liliopsida. Sua classificação taxonômica é a seguinte:

Reino : *Plantae*  
 Filo : *Magnoliophyta*  
 Classe : *Liliopsida*  
 Ordem : *Arecales*

Família : *Arecaceae*  
 Gênero : *Elaeis*  
 Espécie : *Elaeis guineensis* Jacq

Há também uma classificação que diz respeito à espessura do endocarpo, distinguindo-se os seguintes tipos:

a) Dura: seus frutos apresentam endocarpo com espessura de 2 a 8mm, às vezes menos, 35 a 65% de mesocarpo/fruto e não apresenta anel de fibra quando se observa o fruto após um corte transversal (Figura 2a).

b) Tenera: seus frutos apresentam endocarpo com espessura de 0,5 a 2 mm, 55 a 96% de mesocarpo/fruto e anel de fibras presente no mesocarpo(Figura 2b).

c) Pisífera: seus frutos não apresentam endocarpo e as flores femininas na maioria das vezes são estéreis (Figura 2c).

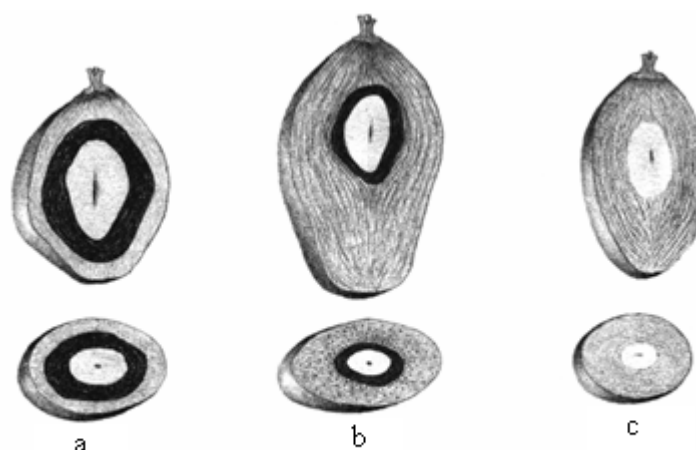


Figura 2. Tipos de frutos de dendezeiro em função da espessura do endocarpo. a) – Fruto do tipo dura. b) – Frutos do tipo tenera. c) – Frutos do tipo psífera.

## 2.5 Propagação

O dendezeiro é propagado apenas por sementes, sendo que os métodos de propagação vegetativa ainda são desconhecidos. Mesmo quando se utilizam híbridos selecionados, as plantas apresentam uma alta variação, constituindo-se um dos principais fatores da baixa produtividade da maioria das plantações comerciais. A clonagem de indivíduos com alto potencial de produção pode contribuir para que produtividades da ordem de 6 a 8 toneladas de óleo de dendê/ha/ano possam ser alcançadas.(VIEGAS & MULLER,2000)

## 2.6 Doenças

O dendezeiro é cultivado na zona equatorial dos quatro continentes, que apresentou somente a partir da década de 1940 a ocorrência de doenças mais sérias, enquanto que na Amazônia só a partir da década de 1980, que se tornaram ameaçadoras para expansão da dendeicultura na região (MÜLLER *et al*,1992).

Como todo cultivo desenvolvido na região tropical úmida, o dendezeiro apresenta problemas de doenças, algumas das quais podem vir a constituir fator limitante à expansão da dendeicultura, tanto no Brasil quanto em outros países produtores de óleo. Segundo Duarte (1999), no estado do Pará, as doenças mais importantes nos dendezais são o amarelecimento fatal (AF), o anel vermelho (AV) e a fusariose ou secamento letal (SL).

**Amarelecimento Fatal (AF)** - A doença amarelecimento fatal (AF) do dendezeiro é extremamente prejudicial para a economia dos países latino-americanos que cultivam essa oleaginosa, em particular para o Brasil, aonde vem causando perdas vultosas a partir de 1984. No Brasil, a doença ocorreu pela primeira vez em 1974, no plantio situado no município de Benevides, Pará, iniciado em 1968. Contudo a sua incidência era esporádica e foi registrada como doença desconhecida. O número de plantas afetadas pelo amarelecimento fatal aumentou nos anos subsequentes até que em 1984 atingiu proporções alarmantes, exigindo medidas de controle mais enérgicas para debelar a doença.(VIEGAS & MULLER ,2000)

Atualmente, esta doença também denominada “podridão da flecha” e “guia podre”, que tem como principal sintoma um amarelecimento quase imperceptível dos folíolos basais das folhas mais jovens. Com a evolução, o amarelecimento fica bem perceptível nas cinco primeiras folhas, surgem necroses nos folíolos, da extremidade para base, até causar a seca completa da folha. Inicialmente, a doença só se manifestava em plantas com mais de quatro anos, mas atualmente, plantas com dois anos de idade já mostram sintomas (Figura 3). Quando a planta apresenta estado avançado da doença, os cachos mais jovens, bem como as inflorescências, abortam e secam (HARTLEY,1988; SILVA *et al.*,1996).

Análises epidemiológica temporal e espacial de dados coletados durante dez anos na área de ocorrência dessa doença demonstraram não existir nenhuma semelhança com os padrões produzidos por doenças de natureza biótica, citadas na literatura

(BERGAMIN FILHO et al.,1998; LARANJEIRA et al .,1998), e admitindo-se que seja de natureza abiótica, especula-se que a causa primária seja de natureza fisiológica ou que essa doença se manifesta após a planta sofrer uma predisposição de natureza fisiológica (VIÉGAS & MÜLLER,2000).



Foto retirada do livro **Doenças de plantas no trópico úmido Brasileiro**. Embrapa Amazônia Oriental, 269p. 1999. Maria de Lourdes Duarte.

Figura 3- Sintomas do amarelecimento fatal ( AF)

**Anel vermelho (AV)** - A doença conhecida popularmente como anel vermelho (AV) do dendezeiro e do coqueiro é muito prejudicial para o desenvolvimento do cultivo dessas palmeiras, tanto no Brasil como em outros países, devido causar a morte das plantas e o extermínio de grandes áreas de plantio.

Na planta afetada surgem tufo de folhas centrais semelhantes a um cartucho, há redução do tamanho das folhas, necrose dos folíolos, diminuição do número de flechas deixando um vazio no centro da coroa da palmeira (MORIN et al., 1986). Quando a palmeira afetada é derrubada, geralmente são observadas larvas do coleóptero *R. palmarum* em diferentes estádios de desenvolvimento, no interior da planta. O parasita penetra nas plantas através das raízes, das bases peciolares e do estipe apresentando sintomas diferenciados de acordo com a via de infecção. No estágio inicial, quando as plantas apresentam apenas encurtamento de folhas e alguns folíolos secando na base das folhas centrais, é possível observar nematóides nos tecidos tenros da base das flechas e pecíolos de folhas jovens como mostra a Figura 4 **A** e **B**.

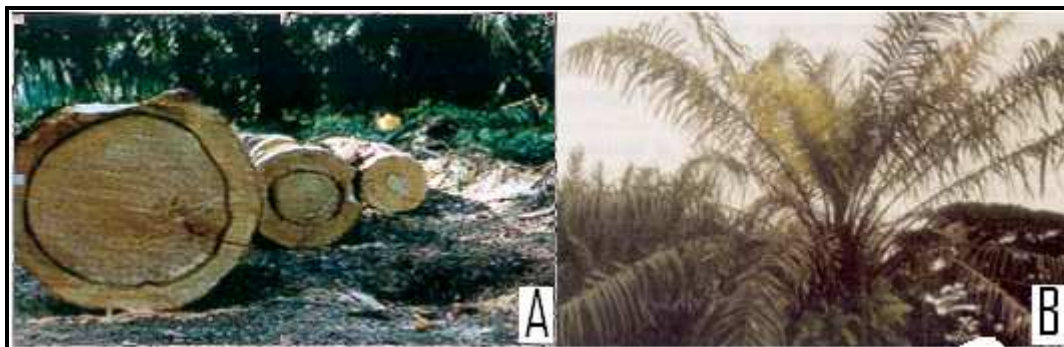


Foto retirada do livro **Doenças de plantas no trópico úmido Brasileiro**. Embrapa Amazônia Oriental, 269p. 1999. Maria de Lourdes Duarte

Figura 4. A) Sintoma interno do A.V B) Sintoma externo do A.V

**Fusariose ou secamento letal (SL)** - A fusariose ou secamento letal é uma doença que causa perdas significativas nas plantações de dendezeiros em vários países da África, dentre os quais: Costa do Marfim, Gana, Benin, Camarões, Congo e Zaire, na Ásia e na América Latina. A expressão dos sintomas do secamento letal varia, dependendo de diversos fatores, dentre os quais: a idade da planta, o estágio da infecção e o grau de susceptibilidade do material, além de fatores ambientais.

Diferentes categorias de sintomas podem ser identificadas. Em plântulas de pré-viveiro, inoculadas com suspensão de conídios do fungo, a infecção pelas raízes mostra um escurecimento dos vasos no sentido ascendente, o qual atinge o pseudobulbo e exhibe uma zona parda-escura que se desenvolve da base para o ápice e provoca deformações nas folhas, tais como: encurtamento, clorose e perfurações no limbo das folhas mais velhas (Figura 5). Esses sintomas podem ser visíveis, nitidamente, três meses após a inoculação de plântulas de pré-viveiro com uma ou duas folhas.



Foto retirada do livro **Doenças de plantas no trópico úmido Brasileiro**. Embrapa Amazônia Oriental, 269p. 1999. Maria de Lourdes Duarte

Figura 5- Sintomas da fusariose

## 2.7 Importância socioeconômica

O primeiro choque do petróleo, em 1973, marcou o fim da era do combustível abundante e barato. Os embargos impostos pelos árabes aos Estados Unidos e as reduções da produção e da exportação fizeram com que o preço do barril de petróleo passasse de US\$ 3 para US\$ 12, entre outubro de 1973 e dezembro de 1974. Com isso, os países exportadores definiram uma nova era para o resto do mundo: a do petróleo caro e escasso. A partir daí, novas alternativas de combustíveis estão sendo testadas em todo o mundo, dentre as quais, o Biodiesel.

Segundo a Agência Nacional do Petróleo (ANP) por meio da Portaria no. 255/2003 define-se biodiesel como sendo um combustível composto de monoalquilésteres de ácidos graxos de cadeia longa, derivados de óleos vegetais ou de gorduras animais, não contendo componentes derivados de petróleo, mas podendo ser utilizado puro ou misturado em qualquer proporção com o diesel mineral para criar uma mistura diesel/biodiesel. Por ser perfeitamente miscível e físico-quimicamente semelhante ao petrodiesel, essa mistura pode ser usada nos motores ciclo diesel (com ignição por compressão) sem a necessidade de modificação ou onerosas adaptações. Biodiesel é fácil de usar, biodegradável, não tóxico, e principalmente livre de enxofre e dos compostos aromáticos. Em um quadro comparativo conforme ilustra a tabela 1, fica bastante clara a vantagem do uso do dendê na produção de óleo se comparadas com outras oleaginosas encontradas do Brasil.

O “Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel” está sendo implantado visando diminuir nossa dependência de petróleo - por ano o país importa 18% dos 39,1 bilhões de litros de óleo diesel que consome a um custo de US\$ 1,22 bilhão - e contribuir para a diminuição da emissão de gases de efeito estufa (GEE) para a atmosfera. Além dos objetivos econômicos e ambientais, o programa tem ainda forte apelo social, pois deverá introduzir nas cadeias produtivas das oleaginosas, milhares de famílias de agricultores rurais, especialmente nas regiões norte e nordeste. Emerge uma nova modalidade da agricultura, a agroenergia.

Em 2002, conforme o seminário internacional do agronegócio do dendê ocorrido em Belém, o governo federal criou o “Programa Brasileiro de Biocombustíveis – Rede Nacional de Biodiesel”, sob a coordenação do Ministério da Ciência e Tecnologia, onde se insere o Programa Probioamazon dendê. Para a Amazônia foi priorizada a cultura do

dendezeiro como fonte geradora de matéria-prima para o desenvolvimento do Programa Biodiesel, em razão dos inúmeros aspectos benéficos que a dendeicultura promove. A implantação do Probioamazon permitirá 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.

Segundo a Federação de Trabalhadores na Agricultura do Pará (Fetagri, 2006) há previsão de cem mil empregos para trabalhadores rurais da agricultura familiar no prazo de dois anos. Essa a previsão da geração de empregos está baseada na produção do biodiesel no Pará, tendo em vista as áreas degradadas no Estado, porque o dendê pode ser cultivado nesse tipo de terreno. No Brasil, considerando-se apenas o Estado do Pará, que concentra aproximadamente 85 % da produção nacional de óleo de palma, verifica-se que a expansão da dendeicultura está baseada principalmente em médias e grandes empresas. O dendezeiro representa a principal matriz energética para produção de óleo vegetal além de possuir maior produção por produtor familiar (Tabela 1).

Tabela 1 Quadro comparativo de produtividade e geração de emprego de algumas oleaginosas com potencial para produção de biodiesel (Adaptado de Holanda, 2004).

Cultura	Produtividade (toneladas de óleo/ha/ano)	Demanda de área (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

O fruto do dendê produz dois tipos de óleo, quais sejam:

1) óleo de dendê ou palm oil que é extraído da polpa usado principalmente na indústria alimentícia de fabricação de margarinas, biscoitos, achocolatados, massa de sorvete e etc. (Figura 6.A);

2) Óleo de palmiste ou kernel Oil extraído da amêndoa, sendo utilizado principalmente na indústria oleoquímica de produção de sabonete e substitutos da manteiga de cacau (Figura 6.B).





Foto retirada do site da Agropalma [www.google.com.br](http://www.google.com.br) acessado no dia 03 de março de 2006

Figura 6 – Óleos de dendê: A - oil palm extraído da polpa e B - kernel oil extraído da amêndoa.

## 2.8 Cultura de tecidos

Os primeiros passos para o desenvolvimento da cultura de tecidos ocorreram no início do século XX, sendo que os maiores avanços foram observados a partir da segunda metade do século (CAVALCANTE, 2001). A cultura de tecidos vegetais compreende um conjunto de técnicas em que um explante (célula, tecido ou órgão) é isolado e cultivado sob condições de assepsia em um meio nutritivo (PASQUAL, 2001).

Lemos (2003) cita dentre outras vantagens da técnica de cultura de tecidos, a micropropagação em massa, multiplicação rápida de genótipos superiores, limpeza clonal, cultura de antera, conservação e intercâmbio de germoplasma, produção de sementes artificiais e clonagem de genes.

O princípio básico da cultura de tecidos é a totipotencialidade das células, ou seja, quaisquer células no organismo vegetal contém toda a informação necessária para regeneração de uma planta completa. Atualmente, a cultura de tecidos é um instrumento valioso na exploração e entendimentos de novas técnicas para o melhoramento de muitas culturas, principalmente daquelas cujos problemas não podem ser solucionados via melhoramento convencional, por si só (LEMOS 2003). Segundo Kerbauy (1999), os estudos *in vitro* de plantas têm sido facilitados pelo fato das plantas possuírem um sistema de desenvolvimento aberto (ou dendritico), ou seja, os órgãos são formados continuamente durante toda vida por meio da atividade dos meristemas apicais, apesar de certos órgãos como folhas, flores e frutos, apresentarem um padrão de desenvolvimento fechado.

Segundo Pasqual (2001) em muitas espécies, os sistemas tradicionais de manutenção e intercambio de germoplasma vem sendo substituído pela conservação de material *in vitro*, principalmente para propagação vegetativa de espécies que apresentam sementes recalcitrantes. Ademais, existe a vantagem de evitar a transmissão de doenças, principalmente viroses, podendo manter grande quantidade de material reprodutivo ocupando pouco espaço, tornando o processo de propagação mais prático e econômico.

O germoplasma representa o conjunto de materiais hereditários de uma espécie. Segundo Towill (2000) este conceito pode ser restrito ao conjunto de genótipos disponíveis para melhoramento de uma espécie cultivada. A diversidade genética contida em um banco de germoplasma deve ser protegida de eventuais perdas para garantir a sua utilização, que tem sido coletada nos centros de origem das culturas, isto é, nos locais onde se deram início os cultivos daquela espécie, ou nas regiões onde se desenvolveram raças locais, para as quais houve migração da cultura. A conservação de recursos genéticos implica na manutenção de coleções *in situ*, ou seja, nos seus locais de ocorrência, ou *ex situ*. Nesse caso, podem ser mantidos indivíduos, sementes, embriões ou outras estruturas vegetais, sob diferentes condições, dependendo do material utilizado no campo ou em casas de vegetação, em câmaras secas sob baixa temperatura, em meio de cultura com baixa concentração salina (conservação *in vitro*).

A cultura de tecidos também auxilia no combate às barreiras impostas ao processo de hibridação interespecífica 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. Em alguns casos, o cultivo *in vitro* de embriões tem solucionado as dificuldades de obtenção de híbridos interespecíficos, consistindo na remoção dos embriões antes do abortamento e seu cultivo em meio nutritivo (BUENO et al., 2001).

As técnicas de cultura de células e tecidos permitem a regeneração de plantas tanto através de formação de gemas caulinares (organogênese) quanto de embriões somáticos (embriogênese). A organogênese *in vitro* envolve uma variedade de seqüências complexas de desenvolvimento, podendo ser classificada de dois tipos; adventícia e não adventícia, sendo que a diferença é que no primeiro caso a organogênese ocorre na ausência de reguladores de crescimento no meio de cultura, sem a formação de calo, enquanto a adventícia é caracterizada pela dependência da presença de reguladores e de formação de calos (CHRISTIANSON & WARNICK, 1998). A

embriogênese somática *in vitro* pode ocorrer de duas maneiras; direta, na qual não há a formação de calos e os embriões somáticos originam-se diretamente de tecidos matrizes; e de forma indireta quando há formação primeiramente de um calo e a partir daí surgem os embriões somáticos.

Por não apresentarem o fenômeno da propagação vegetativa, de modo natural, o interesse em cultura de tecidos como meio para produção em massa de clones com alta produção ou resistência a doenças teve início na década de 1960. Na década seguinte, uma série de metodologias *in vitro* foi desenvolvida sendo que na década de 1980 intensificaram-se os estudos de técnicas de micropropagação e estudos morfogenéticos. Estes estudos em palmeiras têm sido realizados quase que exclusivamente com *C. nucifera*, *E. guineensis* e *P. dactylifera* (BLACKPOOL et al.,1986)

Segundo Tisserat (1989), a cultura de tecidos em palmeiras pode ser dividida em três categorias distintas: 1) propagação clonal; 2) Cultura de embriões; 3) estudos fisiológicos do crescimento e desenvolvimento.

Segundo Cutter Junior & Wilson (1954), os primeiros estudos *in vitro* com palmeiras foram a partir de tecidos meristemáticos de *Cocos nucifera L*, que permitiram avanços significativos na micropropagação de palmeiras e tem mostrado o potencial desta técnica.

A clonagem *in vitro* representa a alternativa mais favorável à propagação vegetativa de pupunha, dendezeiro, tamareira e coqueiro. Entretanto, o dendezeiro tem se mostrado mais factível sob o ponto de vista econômico (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,1989). 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 gemas adventícias e embriões somáticos, sendo observado em palmeiras de um modo geral.

Os primeiros estudos foram conduzidos por Rabéchault em 1967, com o objetivo de superar a dormência em sementes de *Elaeis guineensis* Jacq. Os primeiros resultados estudos foram a formação de embriões em *Elaeis guineensis* Jacq, sem a diferenciação de folhas. Houve a produção de embriões em *Elaeis guineensis* Jacq a partir de embriões imaturos e sua posterior diferenciação radicular em meios com Zeatina.

## 2.9 Embriogênese somática

A embriogênese somática é definida como o processo de desenvolvimento de embriões a partir de células somáticas, ou seja, células que não são produto da fusão gamética (DODDS & ROBERTS, 1985). Segundo Ammirato (1983), a embriogênese somática também pode ser entendida como um processo análogo à embriogênese zigótica em que, uma única célula ou um grupo de células somáticas são precursoras de embriões somáticos. Este sistema é utilizado para a propagação em massa de plantas elites, apresentando grande potencial, pois possibilita elevadas taxas de multiplicação (GUPTA et al. 1993).

Entretanto, os mecanismos relacionados à embriogênese somática não estão totalmente compreendidos, como por exemplo, se a maior parte ou apenas algumas células do explante apresenta capacidade embriogênica e que fatores como o genótipo da planta matriz, condições de cultivo e o meio de cultura podem afetar a embriogênese somática *in vitro*. Segundo Dublin (1991), na embriogênese somática o surgimento dos primeiros embriões, a taxa de embriogênese e o número de embriões produzidos são dependentes do genótipo da planta doadora.

Embriões somáticos podem ser obtidos segundo dois padrões de desenvolvimento: a embriogênese somática indireta, na qual o calo é mantido formado e proliferado antes do desenvolvimento dos embriões, e a direta, em que os embriões se originam diretamente sobre a superfície do explante sem passar pela fase de proliferação de calo (SHARP et al., 1980; MORDHORST et al., 1997).

No caso da embriogênese indireta, o tecido cultivado desenvolve aglomerados de células que se dividem sucessivamente (calo), formando meristemóides ou nódulos vasculares que podem originar brotos, primórdios de raiz ou embrióides (DODDS & ROBERTS, 1985). A expressão destes dois padrões embriogênicos parece estar relacionada com eventos determinativos na citodiferenciação durante o ciclo mitótico. Segundo Yeomon (1970) observou, o destino de determinadas células filhas, após a mitose, define-se em um ciclo mitótico anterior à diferenciação, ou seja, células que passaram por um processo embriogênico são derivadas de uma divisão celular determinativa antecedente. De acordo com Sharp et al. (1980), estas células determinadas podem sofrer uma pausa pós-mitótica até que as condições sejam favoráveis para o início da seqüência de desenvolvimento característico da embriogênese somática.

Para determinar se o processo de desenvolvimento é organogênico ou embriogênico, são utilizados, com frequência, em trabalhos desta natureza, estudos histológicos dos calos e estruturas regeneradas (FALCO et al., 1996a, 1996b; MATSUMOTO et al., 1996).

### **2.11 Embriogenese zigótica**

A cultura de embriões, além de possibilitar a recuperação de híbridos de cruzamentos incompatíveis, pode ser usada para fins de micropropagação, superação de dormência e esterilidade de sementes (HU & FERREIRA, 1998). Também permite estudos detalhados sobre nutrição e fisiologia do embrião. As exigências nutricionais para o crescimento *in vitro* variam com a espécie, e mesmo explantes excisados de diferentes partes de uma planta podem requerer meios de cultura distintos para o seu crescimento (PASQUAL, 2001). Assim, têm-se buscado novos meios nutritivos que se aproximem da composição do endosperma ou saco embrionário e possibilitem o desenvolvimento dos embriões, independentemente da fase em que se encontram (ANDREOLI, 1986).

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 resgatados se forem removidos antes que ocorra o aborto e cultivados artificialmente em meio nutritivo (ASANO & IMAGAWA, 1999).

Euwens et al. (2002) trabalhando com cultura de embriões zigóticos conseguiu obter germinação *in vitro* em dendezeiro em meio MS completo com adição de sacarose a 30g. L<sup>-1</sup> suplementado com ácido naftaleno acético a 0,1mg. L<sup>-1</sup> e kinetina a 0,05mg. L<sup>-1</sup>. Thavarungkul & Kanchanapoom (2002) também conseguiram obter germinação *in vitro* só que usando meio ½ MS suplementado com 0,17g.L<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> além de 100mg.L<sup>-1</sup> de caseína hidrolisada e sacarose a 45 g. L<sup>-1</sup>

As exigências nutricionais para o crescimento *in vitro* variam com a espécie, e mesmo explantes excisados de diferentes partes de uma planta podem requerer meios de cultura distintos para o seu crescimento (PASQUAL, 2001). Assim, têm-se buscado

novos meios nutritivos que se aproximem da composição do endosperma ou saco embrionário e possibilitem o desenvolvimento dos embriões, independentemente da fase em que se encontram.

Segundo Tisserat (1989), o meio mais utilizado no cultivo de palmeiras *in vitro* é o MS ou então o modificado. Para se analisar o efeito dos reguladores vegetais no crescimento e desenvolvimento do embrião de dendê foi adicionado ao meio citocininas, representadas pelo benzilaminopurina (BAP), e auxinas, representadas pelo ácido naftaleno acético (ANA). A maioria dos eventos fisiológicos que ocorrem na planta se dá através dos mecanismos de contrabalanço entre auxina e citocinina (Tisserat, 1989). Além desses fatores, a auxina e a citocinina são necessárias à viabilidade dos vegetais. Uma forma bem simples de se analisar a importância desses dois reguladores é que não se tem registro até então, que nenhum vegetal mutante que tenha perdido a capacidade de sintetizar alguns destes hormônios conseguiu sobreviver por muito tempo.

## **2.12) Oxidação**

Segundo Hu & Ferreira (1998) o escurecimento dos explantes é, em geral, uma dificuldade nos estudos de cultura *in vitro* em palmeiras. A oxidação fenólica é altamente dependente do genótipo. Alguns gêneros de plantas são mais suscetíveis à oxidação fenólica que outros. A oxidação fenólica depende igualmente do tipo de explante utilizado. Explantes jovens em geral oxidam menos que os velhos. Da mesma forma, explantes juvenis apresentam menos problemas de oxidação que os adultos.

A época do ano é um outro fator importante que influencia o teor de polifenóis e conseqüentemente, a oxidação *in vitro*. Regra geral, naqueles períodos do ano mais favoráveis ao crescimento, a concentração de polifenóis nos tecidos é menor e, conseqüentemente, menor a oxidação fenólica dos explantes *in vitro*. (ZIV & HALEVY, 1983)

A oxidação fenólica se dá por meio de uma enzima chamada de polifenol oxidase. Esta enzima contém íons cobre para sua ativação e está presente nos plastídeos. 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. A oxidação fenólica pode ser minimizada por meio dos seguintes procedimentos:

**a) Redução dos danos mecânicos e químicos ao explante** - Durante a excisão e esterilização, deve-se tomar os devidos cuidados para que os danos físicos e químicos ao explante sejam minimizados. Em alguns casos, o uso de cloreto de mercúrio resulta num menor dano e oxidação do tecido (ZIV & HALEVY, 1983).

**b) Remoção de substâncias fenólicas** - A remoção dos polifenóis oxidados ou não imediatamente após a desinfestação contribui para redução da oxidação em fases posteriores de cultivo. A lavagem do explante por 2 a 3 horas pode contribuir para reduzir a exudação e oxidação posterior durante o cultivo (LANE, 1978). Uma outra medida bastante eficaz na remoção dos fenóis oxidados consiste na transferência do explante para meios frescos a cada 1 a 4 semanas de cultivo. Para aqueles casos em que se observa intenso escurecimento em volta do explante, é necessária a transferência para meios frescos ou mesmo a mudança de lugar do explante dentro do mesmo frasco de cultura.

**c) Corte do tecido** - Associado à mudança do meio, é recomendável eliminar a base ou qualquer porção do explante que apresente intensa oxidação.

**d) Uso de meio líquido** - Os danos da oxidação fenólica podem ser reduzidos pelo cultivo em meio líquido, no qual os produtos da oxidação fenólica se difundem. Mesmo assim, a renovação freqüente do meio contribui para reduzir o escurecimento do meio em cultivos subseqüentes. Este procedimento deve ser feito repetidamente enquanto houver escurecimento do meio.

**e) Agente gelificante** - O agar parece contribuir para uma maior oxidação dos explantes e esta oxidação está associada ao nível de agar utilizado. A redução da concentração de agar de 0,8 para 0,4% pode resultar numa redução substancial da oxidação. Da mesma forma, o uso de agarose e, principalmente, gelrite ou fitagel contribui significativamente para a redução do nível de oxidação fenólica. A lavagem do agar com água deionizada contribui adicionalmente para uma menor oxidação.

**f) Adsorção por carvão ativado** - Segundo Teixeira et al. (1993), o carvão ativado representa uma das principais substâncias anti-oxidante utilizadas *in vitro*, adsorvendo substâncias fenólicas ou seus produtos da oxidação, as quinonas.

**g) Adsorção por polivinilpirrolidona (PVP)** - O PVP é uma poliamida utilizada em cromatografia de separação de ácidos aromáticos, aldeídos e fenóis pela sua função adsorvente. Os fenóis são adsorvidos pelo PVP por meio de ligações de hidrogênio, o que previne a oxidação e polimerização, além de adsorver os produtos da oxidação fenólica, ou seja, as quinonas.

**h) Cultivo no escuro ou em baixa intensidade de luz-** O estabelecimento das culturas pode ter melhores resultados caso os explantes sejam cultivados no escuro ou em baixa intensidade luminosa durante as primeiras semanas de cultivo (DURAND-CRESSWELL et al., 1982). Mesmo após este período, o cultivo em condições de luminosidade intermediária contribui para prevenir a oxidação e melhorar o crescimento do explante.

### 2.13) **Importância da cultura *in vitro* de embriões híbridos no melhoramento genético de plantas**

Cruzamentos interespecíficos e intergenéricos oferecem aos melhoristas de plantas um método para aumentar a variabilidade genética e para transferir genes desejáveis entre espécies, principalmente das silvestres para as cultivadas. Em tais cruzamentos podem ocorrer barreiras tanto pré como pós-fertilização, resultando em sementes chochas e embriões abortivos. O uso de hibridação entre espécies diferentes é freqüentemente limitado por falhas no desenvolvimento do endosperma, culminando com degeneração dos embriões antes que atinjam a maturidade. Embriões híbridos podem ser salvos se forem removidos antes que ocorra o aborto e cultivados artificialmente em um meio nutritivo. Melhoristas de frutíferas têm tido sucesso no resgate de embriões e posterior obtenção de plantas a partir de frutos sem sementes de videira (EMERSHAD et al., 1989; GRIBAUDO et al., 1993).

O embrião originado de um processo normal de fecundação pode ser facilmente separado e cultivado sob condições assépticas em meio de cultura adequado, mantendo-se geneticamente estável, produzindo descendentes idênticos a ele. Para a remoção do embrião, basta desinfestar apenas a superfície externa da semente, pelo fato de que o embrião está alojado em região estéril da semente. Assim, o índice de contaminação *in vitro* é muito baixo em relação às demais culturas (ILLG, 1986).

Pasqual et al ( 2003) conseguiu resolver o problema da obtenção híbridos tangerineira ‘Poncã’ (*Citrus reticulata* Blanco) x laranjeira ‘Pera’ (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) , trabalhando com cultivo *in vitro*, visto que há poliembrionia generalizada entre as espécies de Citrus, que resulta normalmente em elevada taxa de aborto do embrião zigótico, devido à competição exercida sobre ele pelos embriões nucelares, geralmente mais vigorosos (Soost & Cameron, 1975).E por meio do cultivo *in vitro*, os embriões provenientes desses híbridos puderam ser obtidos artificialmente em MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescido de 0,3 mg.L<sup>-1</sup> de GA3 (ácido giberélico) e de 1



g.L-1 de carvão ativado e acondicionados em estufas tipo B.O.D., sob temperatura constante de 27 °C e intensidade luminosa de 43 mM.m-2.s-1.

Neves et al (2001) conseguiu obter plântulas híbridas de bananeira *in vitro* a partir de genótipos Calcutta, Malaccensis, Butuhan, França, 0304-02, 1304-06, 4252-04 e 9379-09 Os embriões extraídos foram introduzidos em meio MS com 30 g L-1 de sacarose e 7 g L-1 de ágar, e cultivados em câmara de crescimento, no escuro e em temperatura de 26 ± 2°C. A germinação concentrou-se do quinto ao vigésimo dia de cultivo, apresentando uma média de 53,25% após 45 dias, independentemente do genótipo. As espécies selvagens apresentaram porcentagem média de germinação maior do que a dos genótipos híbridos.

Cunha et al.(2005) trabalhando com sementes híbridas de dendê conseguiu obter artificialmente *in vitro* plântulas oriundas do cruzamento Manicoré (caiaué) x La Mé (dendê) que apresentou em campo uma produção de cachos (22,7 ton/ha/ano), taxa de extração de óleo (22,4%) e produção de óleo (4,45 ton/ha/ano), valores semelhantes aos da produção de plantios comerciais da espécie africana. grande variabilidade genética entre e dentro das origens, o que permite afirmar que com o processo de melhoramento genético será possível obter híbridos interespecíficos tão ou mais produtivos do que a espécie africana usada atualmente nos plantios comerciais.

#### 2.14) **Objetivo Geral**

O objetivo desse estudo foi o resgate de híbridos de dendezeiro (*Elaeis guineensis* x *Elaeis oleifera*) *in vitro*, obtendo mudas saudáveis livres de patógenos.

#### 2.15) **Objetivos específicos**

- Aprimoramento de protocolos de assepsia em sementes híbridas de dendezeiro (*Elaeis guineensis* x *Elaeis oleifera*);
- Seleção dos melhores meios de cultura para obtenção de plântulas híbridas de dendezeiro (*Elaeis guineensis* x *Elaeis oleifera*) *in vitro*;
- Detalhar as fases de desenvolvimento do embrião durante a conversão *in vitro* de embriões zigóticos em plântulas de dendezeiro;
- Seleção das duas melhores variedades de sementes híbridas germinadas *in vitro* (*Elaeis guineensis* x *Elaeis oleifera*);
- Obtenção de mudas de dendezeiro (*Elaeis guineensis* x *Elaeis oleifera*) saudáveis livres de patógenos.

### 2.16) **Hipótese**

Se embriões híbridos de dendê (*Elaeis guineensis* x *Elaeis oleifera*) competentes morfogeneticamente forem selecionados, é possível o resgate de plantas de através da aplicação das técnicas *in vitro*.

### **3-MATERIAL E MÉTODOS**

O Trabalho foi conduzido no laboratório de Biotecnologia e Recursos Genéticos da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, Pará no período de abril de 2005 a outubro de 2006.

#### **3.1 Oxidação de embriões**

Visando avaliar a eficiência do carvão ativado contra o processo de oxidação, sementes híbridas maduras de dendezeiro da variedade SJ 165, oriundas da Embrapa Amazônia Ocidental, estação Rio Urubu, Amazonas. Foram inicialmente lavadas com sabão neutro e água corrente. Posteriormente, foram desinfetadas em câmara de fluxo laminar, imersas em álcool etílico a 70% por um minuto e, em seguida em soluções de NaClO a 1% por 20 minutos.

Foram testadas quatro concentrações de carvão ativado: T1 = 0,0%, T2 = 0,1%, T3 = 0,2% e T4 = 0,25%. Os embriões foram excisados das sementes com a ajuda de um bisturi e logo em seguida foram inoculados no meio de cultura ½ MS com 0,2% de phytigel e sacarose 3%, perfazendo um total de quinze repetições (frascos de 300 mL) por tratamento, sendo que cada frasco continha três embriões, totalizando 45 embriões por tratamento. O meio de cultura teve o pH ajustado para 5,8 antes à esterilização em autoclave a 120° C durante 15 minutos. Foi realizada a análise de regressão para avaliar a porcentagem de oxidação com o aumento da concentração de carvão ativado. O experimento foi avaliado por 30 dias.

#### **3.2 Desinfestação dos embriões**

Visando retirar o excesso de impurezas, sementes híbridas maduras de dendezeiro da variedade SJ 165, oriundas da Embrapa Amazônia Ocidental, estação Rio Urubu, Amazonas. foram inicialmente lavadas com sabão neutro e água corrente. Posteriormente, foram desinfetadas em câmara de fluxo laminar, imersas em álcool etílico a 70% por um minuto e, em seguida em soluções de NaClO a 1% ou 2% combinadas com tempos de 20 ou 40 minutos sob agitação e lavadas, em seguida, quatro vezes em água destilada e autoclavada constituindo um total de quatro tratamentos (Tabela 2).

Tabela 2- Tempo versus concentração de hipoclorito de sódio (NaClO) no processo de assepsia de sementes híbridas de dendê. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, 2006.

Tratamento	Tempo (minutos)	Hipoclorito (% NaClO)
T1	20	1
T2	40	1
T3	20	2
T4	40	2

Com auxílio de um bisturi isolou-se os embriões com a retirada de parte do tegumento, os quais foram inoculados em frascos de vidro, contendo 50 ml de meio de cultura MS (MURASHIGUE & SKOOG 1962) suplementado com 0,2% de phytigel, sacarose 3% e 0,25 % de carvão ativado. O meio de cultura teve o pH ajustado para 5,8 antes à esterilização em autoclave a 120° C durante 15 minutos. Os embriões foram cultivados em sala de crescimento com fase escura por um período de 3 semanas. Após esse período, avaliou-se a média de embriões germinados, porcentagem contaminação e oxidação das sementes.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado perfazendo um total de quatro tratamentos com quinze repetições (frascos de 300 ml), sendo que cada frasco continha três embriões, totalizando 45 embriões por tratamento. Para a media de germinação dos embriões foi feita a análise de variância e a comparação de médias pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade utilizando o software STAT, sendo que os dados foram transformados para  $\sqrt{X+0,5}$  para uniformização dos dados. O experimento foi avaliado por 30 dias.

### 3.3 - Resgates de plantas a partir de embriões zigóticos - embriogênese zigótica

Os embriões de sementes de híbridos de dendezeiro utilizados no experimento foram provenientes do banco de germoplasma de semente de dendê, situado no campo experimental da Embrapa Amazônia Ocidental, estação Rio Urubu, Amazonas. Para o experimento, foram utilizadas 4 variedades: 1) CJ-2141; 2) CI-2061; 3) Cj-502 e Cj-494. Essas variedades foram escolhidas tendo por base o seu desempenho em campo, analisando-se produtividade de cachos e taxa de extração de óleo.

Para seleção do melhor meio de cultura para regeneração de embriões de dendezeiro das quatro variedades estudadas, os embriões foram inoculados em meios de

cultura MS e com metade dos sais ( $\frac{1}{2}$  MS) adicionada de suplementos como os reguladores de crescimento ANA e BAP além do sal  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , completando um total de quatro tratamentos para cada variedade, quais sejam:

T1 -  $\frac{1}{2}$  MS + carvão ativado 0,25% +  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,17g.L<sup>-1</sup>;

T2 - MS + carvão ativado 0,25% +  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,17g.L<sup>-1</sup>;

T3 - MS + carvão ativado 0,25% +  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,17g.L<sup>-1</sup> + NAA e BAP (0,5mg L<sup>-1</sup> de cada);

T4 -  $\frac{1}{2}$  MS + carvão ativado 0,25% +  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,17g.L<sup>-1</sup> + NAA e BAP (0,5mg.L<sup>-1</sup> de cada).

O Valor do pH de todos os meios de cultura foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem por 20 minutos, a 120°C e sob pressão de 1,5 atm. Os embriões foram inoculados em frascos de 300 mL com 50 mL de meio de cultura e cultivados por um período de oito semanas, sendo a primeira semana, em cada tratamento, no escuro.

### 3.3.1 - Avaliação dos resultados

A avaliação foi feita atribuindo notas às respostas do embrião, variando de 0 a 6 (Figura 7), sendo:

- a) Nota zero atribuída ao embrião sem desenvolvimento;
- b) Nota 1 para o embrião que obteve uma turgidez inicial;
- c) Nota 2 para o embrião que obteve um início de curvatura;
- d) Nota 3 para embrião parcialmente curvo;
- e) Nota 4 para embrião totalmente curvo ;
- f) Nota 5 para o embrião com início de desenvolvimento aéreo e radicular;
- g) Nota 6 para o embrião com total desenvolvimento aéreo e radicular.

Portanto, os melhores tratamentos serão aqueles que apresentaram a maior porcentagem de notas 6 durante o período de tempo analisado.

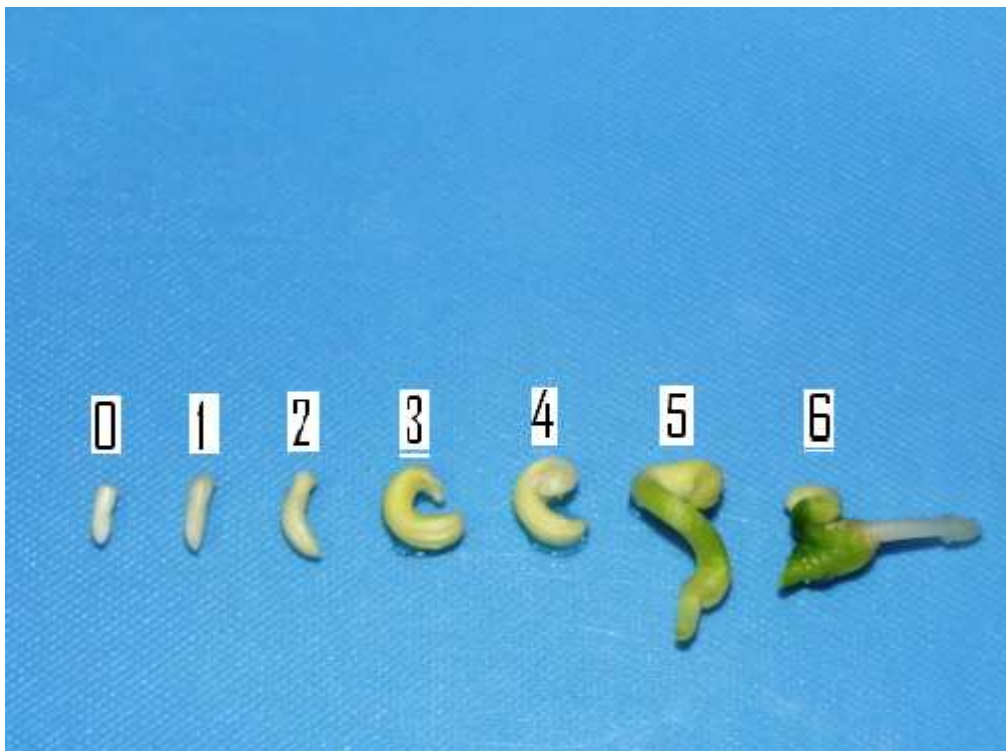


Figura 7- Padrão de desenvolvimento do embrião utilizado para denominação das notas de 0 a 6.

### 3.4) Formação de plântulas

Com base nos dados obtidos no primeiro experimento, foi realizado o segundo experimento para avaliar o desenvolvimento dos embriões até a conversão em plântulas completas com folha e raízes. Para isso foram utilizadas as variedades com melhor desempenho no primeiro experimento, quais sejam: CI-2061 e Cj-2141.

Após a quebra da semente e extração dos embriões zigóticos com o auxílio de pinça e bisturi foi realizada a desinfestação dos mesmos. Em câmara de fluxo laminar, os embriões foram imersos em álcool etílico a 70% por 60 segundos e solução de hipoclorito de sódio 1% por 20 minutos, sendo em seguida lavadas quatro vezes em água destilada e autoclavada.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, sendo realizadas 10 repetições (10 frascos de 300 mL) com 50 mL de meio para cada tratamento, sendo que cada frasco continha 3 embriões, perfazendo um total de 30 embriões por tratamento. O experimento foi avaliado por 60 dias, na qual se analisou o número e comprimento de raízes, além do comprimento do caule. Os dados foram analisados num fatorial de 2x4; variedades CI-2061 e Cj-2141 e quatro meios de cultura (Tabela 3) através da análise da

variância e teste de tukey com 5% de probabilidade para a comparação de médias. Os dados foram transformados por  $\sqrt{x+0,5}$ . O experimento foi avaliado por 60 dias.

Tabela 3 - Duas variedades híbridas de dendê em quatro diferentes meios de cultura. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, 2006.

VARIEDADES	TRATAMENTOS
CI-2061	T1-1/2MS+0,25% C.A+0,17g.L <sup>-1</sup> de NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	T2- 1/2MS+0,25% C.A
Cj-2141	T3 - MS+0,25% C.A+0,17g.L <sup>-1</sup> de NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	T4 - MS+0,25% C.A

### 3.5) Aclimatização

As plântulas obtidas *in vitro* foram transferidas para bandejas plásticas descartáveis de 36 cm x 27 cm constituídas de 24 células, sendo que cada célula continha 2 plântulas. O substrato utilizado foi a vermiculita. As plântulas foram nutridas com solução de NPK (6,5-6,0-19) quinzenalmente com 30 ml por célula. Após 60 dias foram avaliados os aspectos morfológicos da planta, sendo adotadas duas classificações; Plântulas normais e Plântulas anormais (Folhas torcidas).

No total, foram aclimatadas 133 plântulas, provenientes dos quatro tratamentos anteriores (Tabela 3). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 4 tratamentos e 15 repetições (3 embriões por repetição). Os resultados foram avaliados através do teste de qui-quadrado.

## 4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Oxidação de embriões

As melhores respostas foram obtidas à medida que se aumentou a concentração de carvão ativado. A menor média de embriões oxidados foi o T4 composto de 0,25% de carvão ativado que obteve uma média de 0,6 embriões oxidados. Cavalcante (2001), trabalhando com açaizeiro (*Euterpe oleraceae*) obteve resultados semelhantes só com uma concentração de 0,2% de carvão ativado. Esse resultado mostra a eficácia do carvão ativado com agente anti-oxidante, pois segundo Teixeira et al (1993), o carvão ativado apresenta cargas residuais, as quais são capazes de adsorver substâncias

fenólicas ou seus produtos da oxidação, as quinonas, evitando com isso o desencadeamento do processo oxidativo *in vitro*.

Pode-se observar (Figura 8) que a linha de regressão mostrou tendência linear decrescente, pois na medida em que se aumentou a concentração de carvão ativado, diminuiu a porcentagem de oxidação, sugerindo que o aumento da concentração de carvão ativado poderia diminuir ainda mais porcentagem de oxidação. Entretanto, o aumento da concentração de carvão ativado pode ser prejudicial ao meio de cultura, pois segundo Teixeira et al, (1993) o uso de carvão ativado pode adsorver outras substâncias do meio nutritivo como, por exemplo, os reguladores de crescimento, acarretando efeitos indesejáveis ao cultivo *in vitro*.

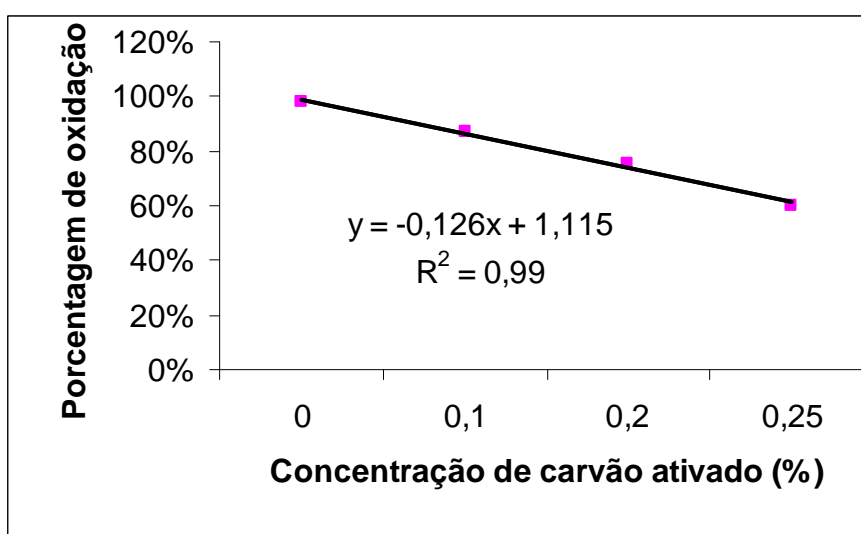


Figura 8 - Efeito de diferentes concentrações de carvão ativado na porcentagem de oxidação de embriões de dendê.

#### 4.2.1-Desinfestação dos embriões

No processo de desinfestação de sementes de dendê, foram utilizadas duas concentrações de hipoclorito de sódio em dois intervalos de tempos diferentes, sendo que as taxas de contaminação oscilaram entre 22 a 28%, não havendo diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade entre os tratamentos analisados (Tabela 4).



Tabela 4- Porcentagem de embriões contaminados e não contaminados em função dos tratamentos de assepsia aplicados. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, 2006.

Tempo	NaClO 1%		NaClO 2%	
	Contaminação%	Não contaminadas%	Contaminação%	Não contaminadas%
20 minutos	22 (10) a	78 (35) a	22 (9) a	78 (36) a
40 minutos	28 (13) a	72 (32) a	22 (10) a	78 (35) a

Porcentagens seguidas da mesma letra na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo teste de tukey ( $p < 0,05$ ).

Os embriões provenientes do processo de assepsia supracitados desencadearam o processo de germinação que oscilou entre 67 a 90%. As melhores porcentagens foram em ordem decrescente de T1(90%), T3 (88%), T2 (74%) e T4 (67%), como ilustra a (Figura 9).

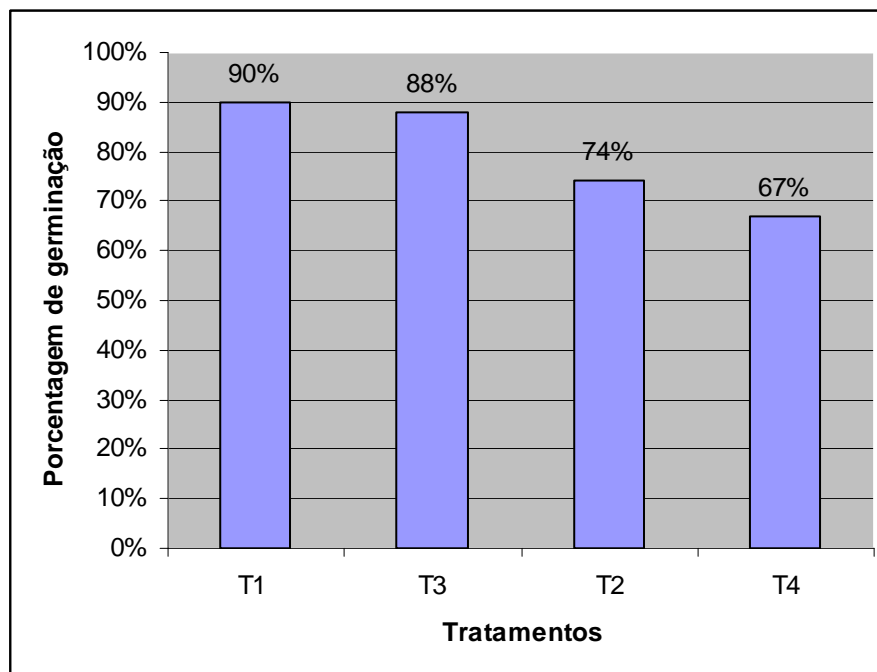


Figura 9 - Porcentagem de germinação *in vitro* de embriões de dendê em 4 diferentes tratamentos. (T1- 1% NaClO a 20 minutos ; T2- 1% NaClO a 40 minutos ; T3- 2 % NaClO4 a 20 minutos e T4- 2% NaClO4 a 40 minutos)

Quando se analisou a média de embriões germinados, houve diferença significativa a nível de 5 % de probabilidade em todos os tratamentos analisados. A média de germinação oscilou entre 0,88 a 1,18. Os melhores tratamentos foram T1 (1,18) e T3 (1,17) (Tabela 5). Desta forma, uma menor concentração de hipoclorito (1% de NaClO) combinado com menor tempo exposição, é mais favorável ao desenvolvimento do embrião, favorecendo o processo de germinação. Pereira et al (2006) obtiveram uma porcentagem de germinação similar de 85,9% em embriões zigóticos de Murmuru (*Astrocharyum ulei*) com a mesma concentração de hipoclorito, em 10 minutos de exposição. Este resultado também assemelha-se ao obtido por Cavalcante (2001), em sementes de açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart), que obteve uma porcentagem de 88,80% de embriões germinados na mesma concentração de hipoclorito no mesmo intervalo de tempo.

Tabela 5 - Média de germinação de embriões de dendezeiro germinados em quatro diferentes tratamentos. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, 2006.

Tratamentos	Média de embriões germinados
T1	1,18 a
T3	1,17 a
T2	1,02 c
T4	0,88 d

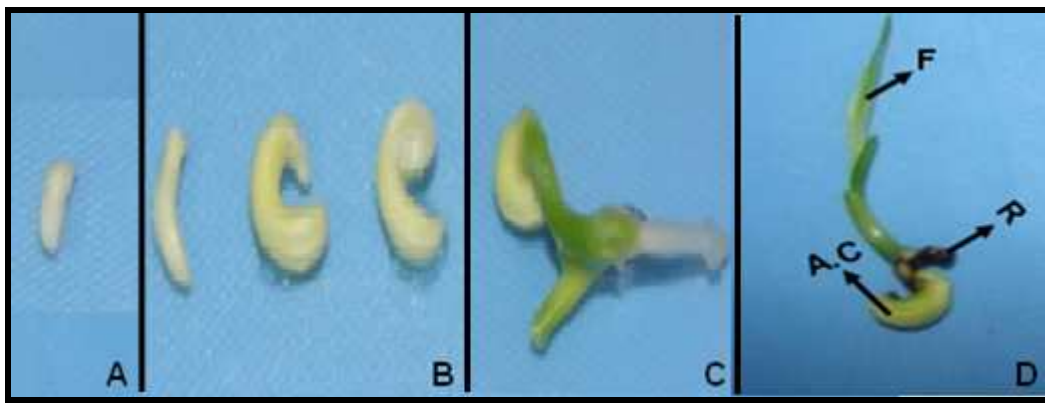
Médias seguidas da mesma letra na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo teste de tukey ( $p < 0,05$ ).

**Média geral =1,06**

**C.V =10,25**

#### 4.3- Resgate de embriões zigóticos

Após a primeira semana de cultivo observou-se apenas o intumescimento dos embriões zigóticos (Figura 10A). Com 17 dias se verificou o início de curvatura do embrião que permaneceu se curvando até o final da terceira semana (21 dias) (Figura 10 B), e após isso, iniciou-se emissão da radícula e posteriormente da parte aérea aos 30 dias (Figura 10C). Aos 40 dias, a diferenciação estava bastante evidente, onde se observou a formação do ápice cotiledonar, raiz propriamente dita e folha (Figura 10 D).



**Figura 10** - Conversão *in vitro* de embriões zigóticos em plântulas de dendezeiro da variedade CI-2061. A) Embrião intumescido. B) Processo de curvatura do embrião. C) Emissão da radícula e da parte aérea da plântula e D) Formação da Folha (F), do ápice cotiledonar (A.C) e da Raiz(R).

Os resultados obtidos demonstram que os embriões apresentaram diferentes respostas quando submetidos ao meio MS e  $\frac{1}{2}$  MS na presença ou ausência de reguladores de crescimento.

No meio MS suplementado com  $0,17\text{g.L}^{-1}$  de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  e na ausência de reguladores de crescimento, a porcentagem de notas 6 obtidas pelos embriões oscilou entre 0 a 37,93% (Figura 11). A variedade que respondeu melhor a esse meio foi a Cj-2141, que no final do experimento, apresentou a maior porcentagem de notas 6 (37,93%), ou seja, embriões com total desenvolvimento aéreo e radicular em 8 semanas de tratamento. Entretanto, a variedade Cj-502 não obteve uma resposta satisfatória, não obtendo nenhuma nota 6, cujos embriões em sua maioria obtiveram as maiores porcentagens de nota 0 (84%), ou seja, nenhum desenvolvimento embrionário.

Já o mesmo meio MS suplementado com a presença dos reguladores de crescimento BAP e ANA a  $0,5\text{ mg.L}^{-1}$  cada, as porcentagens de notas 6 obtidas foram menores, onde apenas as variedades CI-2061 com 20% e a variedade Cj-2141 com 6,60% apresentaram notas 6, não sendo encontrada nas demais variedades (figura 12).

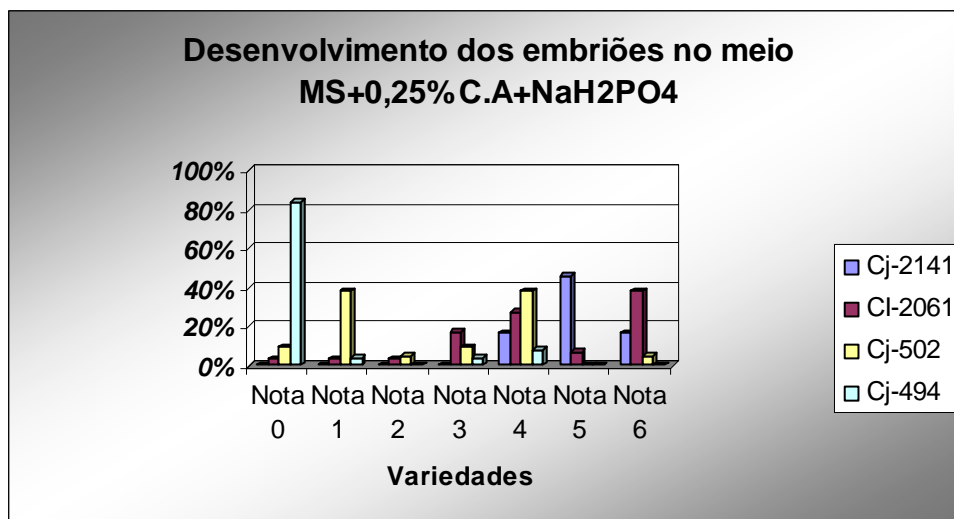


Figura 11 – Porcentagens de notas obtidas pelas variedades híbridas de dendezeiro em meio MS +carvão ativado 0,25% + NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,17g.L<sup>-1</sup>. Notas: .0- nenhum desenvolvimento embrionário; 1- Embrião com turgidez inicial;2-Início de curvatura do embrião;3- embrião parcialmente curvo; 4- Embrião totalmente curvo; 5- Com início de desenvolvimento aéreo e radicular e 6-Embrião com total desenvolvimento aéreo e radicular

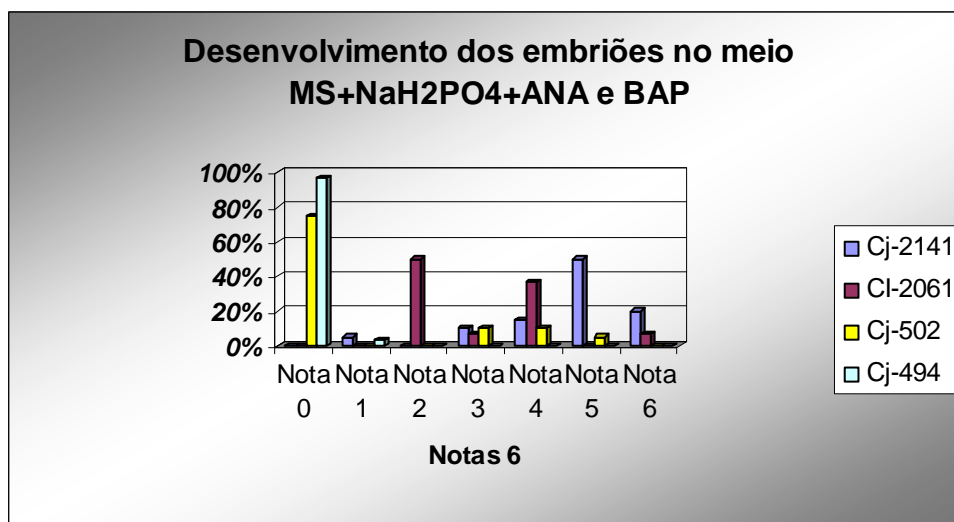


Figura 12 – Porcentagens de notas obtidas pelas variedades híbridas de dendê em meio MS +carvão ativado 0,25% + NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,17g.L<sup>-1</sup>+ANA e BAP(0,5mg.L<sup>-1</sup>) Notas: .0- nenhum desenvolvimento embrionário; 1- Embrião com turgidez inicial;2-Início de curvatura do embrião;3- embrião parcialmente curvo; 4- Embrião totalmente curvo; 5- Com início de desenvolvimento aéreo e radicular e 6-Embrião com total desenvolvimento aéreo e radicular

No meio com a metade das concentrações de sais ( $\frac{1}{2}$  MS), o comportamento dos embriões foram semelhante aos obtidos no meio MS, visto que os reguladores de crescimento não influenciaram de maneira significativa no desenvolvimento dos embriões.

No meio  $\frac{1}{2}$  MS suplementado com  $0,17\text{g.L}^{-1}$  de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  e acrescido de  $0,5\text{mg.L}^{-1}$  BAP e de ANA houve um total de 51,03% de nota 6, distribuídos em 20% para variedade Cj-2141 e 31% para a variedade CI-2061. Enquanto que as variedades Cj-502 e Cj-594 apresentaram desenvolvimento inferior, não obtendo nenhuma nota 6, apresentando em sua maioria embriões com nenhum desenvolvimento embrionário (nota 0). (Figura 13).

Entretanto, no meio com a  $\frac{1}{2}\text{MS}$  suplementado com apenas  $0,17\text{g.L}^{-1}$  de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , sem a presença de reguladores de crescimento, houve uma porcentagem maior de nota 6, distribuídas em 20% na variedade Cj-2141 e 37,93% na variedade CI-2061, totalizando 57,93% (Figura 14). As variedades Cj-502 e Cj-594 obtiveram desenvolvimento inferior em relação as outras duas estudadas, não obtendo nenhuma nota 6, sendo que seus embriões em sua maioria, não obtiveram nenhum desenvolvimento embrionário.(Figura14).

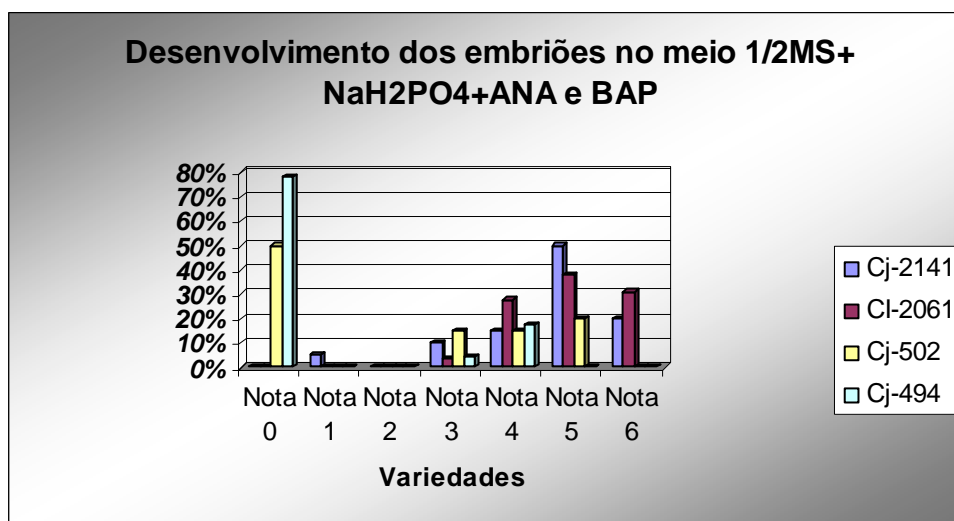


Figura 13 – Porcentagens de notas obtidas pelas variedades híbridas de dendê em meio  $\frac{1}{2}$  MS +carvão ativado 0,25% +  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$   $0,17\text{g.L}^{-1}$ +ANA e BAP( $0,5\text{mg.L}^{-1}$ ) Notas: .0-nenhum desenvolvimento embrionário; 1- Embrião com turgidez inicial;2-Início de curvatura do embrião;3- embrião parcialmente curvo; 4- Embrião totalmente curvo; 5- Com início de desenvolvimento aéreo e radicular e 6-Embrião com total desenvolvimento aéreo e radicular

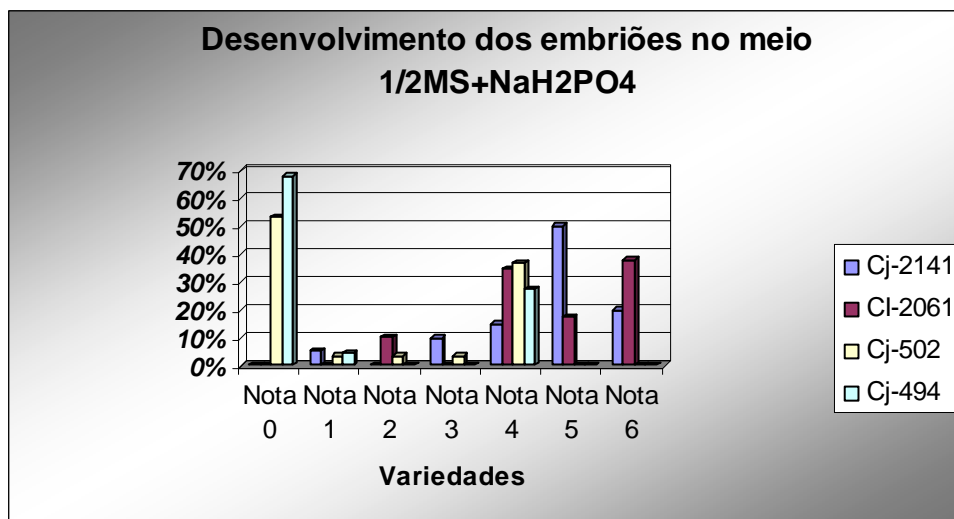


Figura 14 – Porcentagens de notas obtidas pelas variedades híbridas de dendê em meio  $\frac{1}{2}$  MS +carvão ativado 0,25% + NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,17g.L<sup>-1</sup>. Notas: .0- nenhum desenvolvimento embrionário; 1- Embrião com turgidez inicial;2-Início de curvatura do embrião;3- embrião parcialmente curvo; 4- Embrião totalmente curvo; 5- Com início de desenvolvimento aéreo e radicular e 6-Embrião com total desenvolvimento aéreo e radicular

As variedades CI-2061 e Cj-2141 obtiveram melhores respostas tanto no meio MS quanto no meio 1/2MS independentemente da presença ou ausência de reguladores de crescimento. As outras duas variedades Cj-502 e Cj-494 obtiveram respostas inferiores em todos os meios de cultura avaliados. Essa diferença observada entre as variedades estudadas reflete exatamente o efeito do genótipo x ambiente. A interação genótipo x ambiente foi definida por SHELBOURNE (1972) como sendo a variação entre genótipos em resposta a diferentes condições ambientais, ou seja, o mesmo genótipo responde de maneira diferenciada de acordo com o ambiente em que se encontra.,(KAGEYAMA ,1980).

Segundo Fantini Junior & Graça, (1990) a superioridade genética de uma variedade para uma determinada característica, pode ser revelada quando essa variedade é cultivada em determinados meios nutritivos com diferentes combinações de reguladores de crescimento, 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.Portanto, a cultura de tecidos é uma ferramenta importante no melhoramento genético e na identificação de genótipos que apresentem alta estabilidade fenotípica ,ou seja, genótipos que possuem boa

adaptabilidade geral, capazes de produzir bem sob diferentes condições de meio, com amplas flutuações estacionais (CRUZ & REGAZZI, 2001).

Os embriões cultivados na presença dos reguladores (BAP e NAA a  $0,5 \text{ mg. L}^{-1}$ ) tanto no meio MS como no meio  $\frac{1}{2}$  MS obtiveram resultados inferiores quando comparados com os meios que não os continham em todas as variedades analisadas. Segundo Lemos (2003), esta ação inibidora dos reguladores de crescimento pode indicar que os embriões estão em um estágio cotiledonar, pois nesta fase eles sintetizam os hormônios necessários para o seu desenvolvimento, visto que a adição de BAP e NAA ( $0,5 \text{ mg. L}^{-1}$ ) pouco influenciou na formação de plântulas.

As plântulas completas com a presença de folhas e raízes foram obtidas após dois meses de inoculação (Figura 15) nas variedades CI-2061 e Cj-2141, possibilitando a transferência para condições *ex vitro*. Silva (2002), trabalhando com coqueiro (*Cocos nucifera* L) conseguiu obter plantas adultas em dois meses e meio utilizando meio MS completo só que com uma concentração menor de reguladores que foi  $0,1 \text{ mg. L}^{-1}$  de NAA e BAP.



Figura 15 – Aspecto de uma planta desenvolvida *in vitro* cultivada em meio nutritivo após 2 meses de cultivo.

Durante todos os experimentos realizados, os reguladores de crescimento não tiveram um efeito significativo, considerando que nos meios que não continham esses reguladores também foi verificada a formação de raízes e folhas. Provavelmente, a inserção de 0,25% de carvão ativado no meio de cultura possa ter minimizado o efeito dos reguladores, pois segundo Teixeira et al, 1993, o carvão ativado tem a propriedade de adsorver dentre outras

substâncias os reguladores de crescimento. Portanto, para que de fato os reguladores tivessem algum efeito, teriam-se duas alternativas: ou se aumentaria a concentração dos reguladores ; ou então se reduziria a concentração de carvão ativado para que se encontrasse uma ideal entre os reguladores e o anti-oxidante. Cavalcante (2001), estudando a conversão de embriões zigóticos em plântulas de açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) em meio MS com 0,25% de carvão ativado, também verificou a não necessidade de inserção de reguladores de crescimento no processo de formação de plântulas. Em contraste, Kanchanapoom & Domyoas (1999), estudando formação de plântulas em dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq) em meio ½ MS suplementado com  $0,17\text{g.L}^{-1}$   $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , necessitaram da inclusão  $2,5\text{mg.L}^{-1}$  de 2,4D para formação de plantas de maneira eficaz, porém sem a presença de carvão ativado no meio de cultura.

Silva (2002) estudando o efeito de reguladores de crescimento na formação de plântulas de coqueiro (*Cocos Nucifera* L) verificou um comportamento diferente. No início da germinação com adição de giberilina e BAP, o embrião obtinha ótimo resultado com a formação de brotação apical e ápices radiculares, contudo, em torno do trigésimo dia, os embriões escureciam, paralisando o desenvolvimento, levando o embrião a sua posterior morte.

#### **4.4 Formação de plântulas**

Em relação ao desenvolvimento da planta, a variedade CI-2061 respondeu melhor em todos os parâmetros analisados quando comparados com a variedade Cj-2141. Na formação de raiz (número de raízes), a variedade CI-2061 obteve uma média de 1,36 ,diferindo significativamente a nível de 5% de probabilidade da média obtida pela variedade Cj-2141 que foi de 1,12. O mesmo ocorreu em relação ao comprimento da raiz e do caule, pois as médias obtidas pela a variedade CI-2061 foram de 2,37 e 2,56 contra 1,76 e 2,06 obtidas pela variedade Cj-2141 em relação ao comprimento da raiz e do caule respectivamente ,que também diferiu significativamente a nível de 5% de probabilidade. (Tabela 6).



Tabela 6 – Médias do número e comprimento de raízes adicionalmente o comprimento do caule. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, 2006.

Variedades	Médias do número de Raízes	Média do comprimento da raiz	Média do comprimento do caule
CI-2061	1,36 a	2,37 a	2,56 a
Cj-2141	1,12 b	1,76 b	2,06 b

Médias seguidas da mesma letra na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo teste de tukey ( $p < 0,05$ ).

Na variedade CI-2061, as melhores respostas em relação ao número de raízes, comprimento de raízes e comprimento do caule foram obtidas em meio de cultura com metade das concentrações de sais ( $\frac{1}{2}$  MS).

Em relação ao número e comprimento de raízes e o comprimento do caule, os embriões apresentaram as melhores respostas no tratamento T1 ( $\frac{1}{2}$  MS +  $0,17\text{g.L}^{-1}$  de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) diferindo significativamente a nível de 5% de probabilidade dos demais tratamentos (Tabela 7). Estes resultados concordam com os obtidos por Rajesh et al., (2003) e Euwens et al., (2002) que obtiveram resultados semelhantes em cultura de embriões *in vitro* dendê (*Elaeis guineensis* jacq) com meio  $\frac{1}{2}$  MS só que além de  $0,17\text{g.L}^{-1}$  de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  inserido no meio, também havia  $0,1\text{ g.L}^{-1}$  de arginina. A combinação do meio  $\frac{1}{2}$ MS com a adição de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  se mostrou fundamental no desenvolvimento de plântula, pois no T2 composto do mesmo meio ( $\frac{1}{2}$  MS ) só que sem a presença de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , os resultados foram inferiores. O fato dos embriões terem se desenvolvido melhor em meio  $\frac{1}{2}$  MS, pode ser explicado levando em consideração a questão da maturidade dos embriões, pois as sementes da variedade CI-2061 estavam no estágio maduro, na qual segundo Lemos (2003), os embriões necessitam de uma quantidade menor de nutrientes, sendo capazes de produzir seus próprios recursos nutricionais.

Tabela 7– Médias do número e comprimento de raízes adicionalmente o comprimento do caule na variedade CI-2061. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, 2006.

Número de Raízes		Comprimento de Raiz		Comprimento do Caule	
Tratamento	Média	Tratamento	Média	Tratamento	Média
T1	1,53 a	T1	2,99 a	T1	2,61 a
T2	1,37 b	T4	2,47 b	T3	2,41 b
T4	1,27 b	T2	2,10 bc	T2	2,37 b
T3	1,26 b	T3	1,92 c	T4	2,30 b

Médias seguidas da mesma letra na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo teste de tukey ( $p < 0,05$ ).

A variedade Cj-2141 obteve respostas diferentes das obtidas pela variedade CI-2061. Em relação ao número de raízes, as melhores respostas foram obtidas por T<sub>3</sub> (1,20), que diferiu significativamente a 5% de probabilidade dos demais tratamentos. Já para o comprimento da raiz, não houve diferença significativa entre os tratamentos analisados. Em relação ao comprimento do caule, os melhores resultados foram T<sub>4</sub>(2,32) e T<sub>3</sub>(2,12) havendo diferença significativa a nível de 5% de probabilidade dos demais tratamentos (Tabela 8).

Tabela 8– Médias do número e comprimento de raízes adicionalmente o comprimento do caule na variedade Cj-2141. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, 2006.

Número de Raízes		Comprimento de Raiz		Comprimento do Caule	
Tratamento	Média	Tratamento	Média	Tratamento	Média
T3	1,20 a	T3	1,88 a	T4	2,32 a
T4	1,10 b	T4	1,85 a	T3	2,20 a
T1	1,05 b	T2	1,66 a	T2	1,91 b
T2	1,04 b	T1	1,65 a	T1	1,91 b

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de tukey ( $p < 0,05$ )

O T<sub>3</sub> composto de meio MS + 0,25% C.A + 0,17g.L<sup>-1</sup> de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e o T<sub>4</sub> composto de meio MS + 0,2% C.A foram os tratamentos que em geral obtiveram os melhores resultados para as duas variedades utilizadas. Para a variedade Cj-2141 diferentemente da CI-2061, a introdução de 0,17g.L<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> não atuou de maneira significativa para proporcionar um melhor desenvolvimento da planta. A variedade Cj-2141 obteve melhores resultados em meio MS completo, indicando a necessidade de um suporte nutricional maior que a variedade CI-2061. Fato este que pode ser explicado

pela condição de imaturidade dos embriões da variedade Cj-2141, pois segundo Santiago (2001), quanto mais imaturo for um embrião, maior será o requerimento nutricional e mais complexo como, por exemplo, de reguladores de crescimento, uma alta concentração de açúcares, água de coco e etc.

#### **4.5 Aclimatização**

Considerando que todas as plântulas enraizadas obtidas provenientes dos quatro tratamentos (Tabela 3) das duas variedades CI-2061 e Cj- 2141, o teste de qui-quadrado não revelou significância a nível de 5 % de probabilidade entre as plântulas formadas entre si (Tabela 9 e 11). Entretanto, ao se comparar o efeito da adição ou não de  $0,17\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  nos meios de cultura antes da formação das plântulas, ficou evidente que este teve um papel fundamental no processo de formação de raízes e folhas (tabelas 10 e 12), pois na aclimatização que é a fase subsequente, a plantas provenientes de tratamentos que continha  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  obtiveram resultados mais significativos se comparados com as plantas que não os continha. Estes resultados são semelhantes aos obtido por Lemos (2003), pois o  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  também se mostrou fundamental quando adicionado ao meio MS e  $\frac{1}{2}$  MS na conversão de embriões zigóticos em plântulas. Segundo (George, 1993) o  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  é a forma como o fósforo é absorvido no meio de cultura. Pelo fato do fósforo atuar no metabolismo energético e no processo de regulação enzimática, sua presença é fundamental na maioria das culturas *in vitro*, pois segundo Santiago (2001), a perfeita diferenciação da parte aérea é umas das conseqüências da adição do fósforo ao meio de cultura. Além disso, o fósforo faz parte da constituição dos nucleotídeos ,unidades formadoras dos ácidos nucléicos como o DNA e RNA, sendo esses ácidos diretamente envolvidos no processo de síntese de proteínas, que irão constituir as estruturas morfológicas das plantas.

Tabela 9- Teste de qui-quadrado para comparação dos principais tratamentos no desenvolvimento de plântula a partir de embriões de dendê da variedade CI-2061. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA,2006.

Tratamento	Plântula normal	Plântula anormal	Total
1-1/2MS+0,2%C.A+0,17g.L <sup>-1</sup> de NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	12	8	20
2-1/2MS+0,2%C.A;	5	10	15
3-MS+0,2%C.A+0,17g.L <sup>-1</sup> de NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ;	12	5	17
4-MS+0,2%C.A;	07	10	17
Total	36	33	69

$\chi^2 = 5.75^{NS}$ ; g.l = 3

<sup>NS</sup> Não significativo ao nível de 5% de probabilidade

Tabela 10- Teste de qui –quadrado para comparação dos efeitos de meios de cultura com NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e sem NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> no desenvolvimento de plântula a partir de embriões de dendê da variedade CI-2061. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA,2006.

Tratamento	Plântula normal	Plântula anormal	Total
1-Com NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	24	13	37
2-Sem NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	12	20	32
Total	36	33	69

$\chi^2 = 5.15^*$ ; g.l = 1

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

Tabela 11- Teste de qui –quadrado para comparação dos principais tratamentos no desenvolvimento de plântula a partir de embriões de dendê da variedade Cj-2141. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA,2006.

Tratamento	Plântula normal	Plântula anormal	Total
1-1/2MS+0,2%C.A+0,17g.L <sup>-1</sup> de NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	11	07	18
2-1/2MS+0,2%C.A;	04	08	12
3-MS+0,2%C.A+0,17g.L <sup>-1</sup> de NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ;	11	04	15
4-MS+0,2%C.A;	08	11	19
Total	34	30	64

$\chi^2 = 5.73^{NS}$ ; g.l = 3

<sup>NS</sup> Não significativo ao nível de probabilidade

Tabela 12- Teste de qui –quadrado para comparação dos efeitos de meios de cultura com  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  e sem  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  no desenvolvimento de plântula a partir de embriões de dendê da variedade Cj-2141. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA,2006.

Tratamento	Plântula normal	Plântula anormal	Total
1-Com $\text{NaH}_2\text{PO}_4$	22	11	33
2-Sem $\text{NaH}_2\text{PO}_4$	12	19	31
Total	34	30	64

$\chi^2 = 5.01^*$  ; g.l = 1

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

## 5- CONCLUSÕES

- Para diminuição do processo de oxidação *in vitro* de dendê a concentração 0,25% de carvão ativado se mostrou mais eficaz.
- No processo de germinação de embriões zigóticos, o menor tempo de exposição ao NaClO se mostrou fundamental ao desenvolvimento do embrião.
- Os reguladores de crescimento ANA e BAP (0,5mg. L<sup>-1</sup> de cada) não foram determinantes no meio MS e ½ MS para conversão de embriões zigóticos em plântulas em todas as variedades utilizadas.
- Há grande influência do genótipo na germinação *in vitro*.
- A variedade CI-2061 obteve melhores respostas em todos os aspectos analisados, sendo o meio ½ MS + 0,25% C.A + 0,17g.L<sup>-1</sup> de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> o mais eficaz para formação de plântulas.
- É possível a formação em quatro meses de mudas a partir da germinação *in vitro* de embriões zigóticos de sementes híbridas de dendezeiro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

ANDREOLI, C. Cultura de embriões. In: SIMPÓSIO DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 1., 1985, Brasília. Anais... Brasília: ABCTP/EMBRAPA, 1986.p. 25-28.

AMMIRATO, P.V. 1983. **Embryogenesis.** In Handbook of plant cell culture (D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V.Ammirato & Y. Yamada, eds.). Macmilian Publisher Co., New York, p.82-123.

ASANO, Y.; IMAGAWA, M. **Hybrid seed formation among *Dioscorea opposita* Thunb. Cvs Nagaimo, Ichioimo, Tsukuneimo and *Dioscorea japonica* Thunb.** Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, Tokyo, v. 68, n. 3, p. 591-597, 1999.

BARCELOS, E. 1986. **Características genético-ecológicas de populações naturais de caiaué (*Elaeis oleifera* (H.B.K.) Cortés) na Amazônia brasileira.** Dissertação de Mestrado, PPG INPA/FUA, Manaus

BARCELOS, E.; MORALES, E.A.V. **Limitações, avanços tecnológicos e perspectivas para a transferência de tecnologia no Agronegócio do dendê.** In: MÜLLER, A.A.; FURLAN JÚNIOR, J. Agronegócio do dendê: uma alternativa social, econômica e ambiental para o desenvolvimento sustentável da Amazônia. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2001. p.125-130.

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, n. 3, p. 391-396, 1998

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, 1986. 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.

CAVALCANTE, A.S.L. **Respostas morfogênicas in vitro de açaizeiro (Euterpe oleracea L.) e de cupuçuazeiro (Theobroma grandiflorum (Wild. Ex Spreng )Schum)**. Tese de Doutorado da Universidade Federal do Ceara- UFC. Fortaleza.2001

CHRISTIANSON, M.L.; WARNICK,D.A **Organogenesis in vitro as a developmental process**. *Hortscience, Alexandria* , Virginia, v.23, p.515-519, 1988.

CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2001. 390p.

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.

DODDS, J.H.; ROBERTS, L.W. **Experiments in plant tissue culture**. 2.ed.Cambridge : Cambridge University, 1985. 216p

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

DUBLIN, P. **Multiplicación vegetativa de café, hevea y cacao**. In: ROCA, N. M.; MROGINSKI, L. A. (Eds.). Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones. CIAT: Cali, p. 577-619.1991

DUFOUR, F.; QUENCEZ, P.; SCHMITY, G. **Technique de culture en solutions nutritives du palmier à huile et du cocotier**. *Oléagineux, Paris*, v. 33, n. 10, p. 485-490, oct. 1988



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

DURAND-CRESSWELL, R.; BOULAYL, M.& FRANCKET, A. **Vegetative propagation of Eucaliptus.** In: Tissue Culture in Forestry. Bonga & Durazan, eds. MartinusNijhoff. The Hague. p. 15-151, 1982.

C.J. EEUWENS; S. LORD; C.R. DONOUGH; V. RAO; G. VALLEJO; S. NELSON  
**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: 311–323, 2002.

EMERSHAD, R.L.; RAMMING, D.W.; SERPE, M.D. **In ovulo embryo development and plant formation from stenospermocarpic genotypes of Vitis vinifera.** American Journal of Botany, Columbus, v.76, n.4, p.397-402, Apr. 1989.

FALCO, M.C.; MENDES, B.M.J.; TULMANN NETO, A. **Cell suspension culture of sugarcane: growth, management and plant regeneration.** Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, v.8, n.1, p.1-6, 1996a.

FALCO, M.C.; MENDES, B.M.J.; TULMANN NETO, A.; GLORIA, B.A. da.  
**Histological characterization of in vitro regeneration of Saccharum sp.** Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, v.8, n.2, p.93-97, 1996b.

FANTINI JUNIOR, M. & GRAÇA, M. E. C. **Propagação in vitro de Eucalyptus saligna.** In: 6° CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 3, 1990, Campos do Jordão. Anais... São Paulo: Soc. Brasileira de Silvicultura, 1990, p. 373-378.

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.

GRIBAUDO, I.; ZANETTI, R.; BOTTA, R.; VALLANIA, R.; EYNARD, I. **In óvulo embryo culture of stenos permocarpic grapes.** **Vitis**, Siebeldingen, v.32, n.1, p.9-14, Jan. 1993.

GUPTA, P.K., PULLMAN, G., TIMMIS, R., KREITINGER, M., CARLSON, W.C., GROB, J. & WELTY, E. **Forestry in the 21st Century.** **Bio/Technology** 11:454-459. 1993

GEORGE, E. F. **The derivation, preparation, and use of culture media,** In: **Plant propagation by tissue culture.** Exegetics, Edington. X, p. 344-419, 1996

HANDLEY, L.W.; BECWAR, M.R. et al. **Research and development of commercial tissue culture systems in loblolly pine.** **Tappi Journal**, Atlanta, v.78, n.5, p. 169-175, 1995.

HARTLEY, C.W.S. **The oil palm (*Elaeis guineensis*).** London: Longman, 1988. 806p.

HOMMA, A.K.O.; FURLAN JÚNIOR, J.; CARVALHO, R.A.; FERREIRA, C.A.P. **Bases para uma política de desenvolvimento da cultura do dendezeiro na Amazônia.** In: VIÉGAS, I.J.; MÜLLER, A.A. **A cultura do dendezeiro na Amazônia brasileira.** Belém, Embrapa Amazônia Oriental/Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2000. p. 11-30.

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: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1998. p. 371-393.

ILLG, R.D. **Metodologia de seleção in vitro para resistência a fatores causadores de estresse.** In: SIMPÓSIO NACIONAL DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 1., 1985, Brasília. Anais. Brasília: ABCTP/ EMBRAPA, 1986. p.45-47.

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

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

JACQUIN, N. J. **Selectarum Stirpium Americanarum Historia**. Icones, Tab. 73-78. Viennae: A. Blumauer. 1763.

KANCHANAPOOM, K; DOMYOAS; P. **The Origin and Development of Embryoids in Oil Palm ( *Elaeis guineensis* Jacq) Embryo Culture**. Science Asia 195-202 Vol. 25 (1999).

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

LANE, W.D. **Regeneration of apple plants from shoot meristem tips**. Plant Sci. Lett. v.13, p. 281-285, 1978.

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.

LEMOS, O .F.P. **Mutagênese e tecnologia in vitro no melhoramento genético de pimenta- do-reino ( *Piper nigrum* L.)**. Piracicaba, 2003.159p. Tese de doutorado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

MATSUMOTO, T.K.; WEBB, D.T.; KUEHNLE, A.R. **Histology and origin of somatic embryos derived from anthurium andraeanum Linden ex Andre Lamina**. American Society for Horticultural Science Journal, Alexandria, v.121, n.3, p.404-407, 1996

MORDHORST, A.P.; TOONEN, M.A.J.; VRIES, S.C. **Plant Embryogenesis**. Critical Reviews in Plant Sciences. v.16, n.8, p.535-576, 1997.

MORIN, J.P., F. LUCCHINI, J.M DE FERREIRA & L.S. FRAGA. **Le controle de Rhynchophorus palmarum par piégeage à l'aide de morceaux de palmier**. Oléagineux 41: 57-62. 1986.

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

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

PACHECO, A.R.; TAILLIEZ, B.J.; VIÉGAS, I.J.M. **Resposta de N-P-K-Ca e Mg no desenvolvimento de mudas de dendê na região de Manaus-AM**. Belém: Embrapa-UEPAE de Belém, 1987. 17p.

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

PASQUAL, M. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações: meios de cultura**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 74 p.

PEREIRA, J.E.S; MACIEL, T.M.S; COSTA, F.H.S; PEREIRA, M.A.A . **Germinação in vitro de embriões zigóticos de murmurú (*Astrocaryum ulei*)**. Ciênc. agrotec., Lavras, v. 30, n. 2, p. 251-256, mar./abr., 2006

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

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

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", 1993. 81p. (Tese M.Sc.).

RODRIGUES, M.R.L.; AMBLARD, P.; SILVA, E.B.; MACÊDO, J.L.V.; CUNHA, R.N.V.; TAVARES, A.M. **Avaliação do estado nutricional do dendezeiro: análise foliar.** Manaus, Embrapa Amazônia Ocidental, (Embrapa Amazônia Ocidental. Circular Técnica, 11). 9p. 2002.

SANTIAGO, E. J. A.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O.; SANTANA, J. R. F.; GOMES, G. A. C.; **Meios de cultura: Cultura de tecidos.** Paiva e Paiva, UFLA, Lavras, M.G. 3:22-35. 2001

SANTOS, M.A.S.; D'ÁVILA, J.L.; COSTA, R.M.Q.; COSTA, D.H.M.; REBELLO, F.K.; LOPES, M.L.B. **O comportamento do mercado de óleo de dendê no Brasil e na Amazônia.** Belém: Banco da Amazônia S.A. Estudos Setoriais, 11. 1998. 27p.

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

SHELBOURNE, C. **Genotype environment interaction: its study and its implications in forest tree improvement.** In: IUFRO GENETIC SABRAO JOINT SYMPOSIA, Tokyo, 1972. Proceedings. Tokyo, 1972. p. B-1(I) 1-27.

SILVA, H.M. **O anel vermelho do dendezeiro e do coqueiro.** Belém: EMBRAPA-CPATU, (EMBRAPA-CPATU. Documentos, 60). 17p.1996

SILVA, V.S. **Regeneração in vitro de embriões de *Cocos nucifera* L.** Dissertação de Mestrado da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2002.

SUFRAMA. **Potencialidades regionais Estudo de viabilidade econômica Dendê.** Sumário Executivo. Manaus, 2003. In: [http://www.suframa.gov.br/publicacoes/proj\\_pot\\_regionais/sumario/dende.pdf](http://www.suframa.gov.br/publicacoes/proj_pot_regionais/sumario/dende.pdf) (acessado em 04/08/2006).

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

TISSERAT, B. Palms. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D.J. **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nighoff, 1989. p.339-356

TOWILL, L. E. 2000. **Germplasm preservation**. In: R. N. Trigiano & D. J. Gray(Ed.) Plant tissue culture concepts and laboratory exercises. 2nd. Edition. CRC Press, Boca Raton, pp. 337-353.

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.

TURNER, P.D. **Oil palm disease and disorders**. Oxford University, 1981. 280p.

VALOIS, A.C.C. **Possibilidades da cultura do dendê na Amazônia**. Brasília: Embrapa-Cenargen,.. (Embrapa-Cenargen. Comunicado Técnico, n.19). 7p. 1997

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,. 374p 2000

VIÉGAS, I. de J.M; MÜLLER, A.A. **A cultura do dendezeiro na Amazônia Brasileira**. Belém: EMBRAPA/CPATU. 374p.2000

ZIV, M. & HALEVY, A.H. **Control of oxidative browning and in vitro propagation of *Strelitzia reginae***. HortScience, vol. 18, p.434-436, 1983.

YEOMON,M.M. **Early development in callus cultures**. International journal of cytology, v .29, p 283-409,1970.

