

UTILIZAÇÃO DE XILOGLUCANA NA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE DENDEZEIRO (*Elaeis guineensis* Jacq.)

¹Carla de Moraes Antunes

²Rafaela Carla Mattia

³Maria-Rita Sierakowski

⁴Regina Caetano Quisen

³Marguerite Quoirin

¹Graduanda em Agronomia – UFPR, Curitiba, PR – ca_ufpr@yahoo.com.br

²Bióloga – UFPR – rafamattia@hotmail.com

³Prof. Dra. – UFPR – mquoirin@ufpr.br

⁴Pesquisadora – Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus

RESUMO

O dendezeiro possui um notável potencial para produção de óleo vegetal, considerado matéria-prima valiosa na produção de biocombustíveis. A xiloglucana (XG) é um polissacarídeo obtido de sementes. Neste estudo, foi utilizada a técnica de micropropagação vegetal via embriogênese somática a partir de embriões zigóticos. O objetivo foi testar diferentes meios de cultura contendo misturas de XG e de Gelrite®. Foram utilizadas sementes maduras de dendê. As sementes foram desinfestadas com NaOCl a 12% por 10 minutos. Após, foram lavadas com água destilada estéril em câmara de fluxo laminar. Os embriões foram excisados e inoculados em meio de cultura Y3-1, acrescido de 1 µM de cinetina, 0,1 µM de ácido giberélico e 0,1 µM de 2,4-D, permanecendo neste meio por 30 dias. Após, foram cortados em fatias e transferidos para quatro tratamentos em meio Y3-2, com 10 µM de 2,4-D e várias proporções de Gelrite® e XG. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25± 2°C de dia e 18± 2°C de noite. Maior desenvolvimento de embriões somáticos foi verificado no tratamento sem XG. Maior desenvolvimento de massas embriogênicas foi observado nos tratamentos que foram transferidos de meio com 10 µM de 2,4-D para meio isento de 2,4-D.

ABSTRACT

USE OF XYLOGLUCAN IN SOMATIC EMBRYOGENESIS FROM ZYGOTIC EMBRYOS OF OIL PALM (*Elaeis guineensis* Jacq.)

The oil palm has a remarkable potential for production of vegetable oil, considered valuable raw material for the production of biofuels. The xyloglucan (XG) is a polysaccharide obtained from seeds. In this study, was used the technique of plant micropropagation via somatic embryogenesis from zygotic embryos. The aim was to test different culture medium containing mixtures of XG and Gelrite®. Mature seeds of oil palm were used. The seeds were disinfested with NaOCl 12% for 10 minutes. After, were washed with sterile distilled water in a laminar flow chamber. The embryos were excised and inoculated in culture medium Y3-1, plus 1 µM kinetin, 0,1 µM gibberellic acid e 0,1 µM 2,4-acid dichlorophenoxyacetic (2,4-D), remaining in this media for 30 days. After, were cut into slices and transferred to four treatments in medium Y3-2, with µM 2,4-D and different proportions of Gelrite® and XG. The cultures were kept in growth room with temperature of 25± 2°C during the day and 18± 2°C during the night. Further development of somatic embryos was verified in the treatment without XG. Further development of embryogenic masses was observed in the treatments that were transferred of medium with 10 µM 2,4-D to medium without 2,4-D.

INTRODUÇÃO

A utilização de energias limpas e renováveis torna-se cada vez mais importante à medida que as matérias-primas não-renováveis utilizadas atualmente em larga escala para abastecer a demanda de energia no mundo gradativamente tornam-se mais escassas. Neste cenário, os biocombustíveis tornam-se extremamente importantes como uma alternativa à finitude dos recursos energéticos utilizados atualmente, além de contribuírem com a diminuição dos efeitos poluidores causados por esses recursos.

A demanda mundial por combustíveis renováveis tem se expandido de forma muito rápida nos últimos anos e deverá acelerar ainda mais, principalmente nos países que são grandes consumidores de combustíveis. Frente à esta realidade, em 2002 o governo brasileiro instituiu o Programa Brasileiro de Biocombustíveis, numa

Utilizacao de xiloglucana ...
2010 SP-PP-S8738



CPAA-23007-1

Embrapa Amazônia Ocidental
SIN - BIBLIOTECA

S
8738

8738

tentativa de viabilizar a utilização do biodiesel, considerando que este combustível poderia contribuir favoravelmente para o equacionamento de questões como a geração de emprego e renda, inclusão social, redução das emissões de gases poluentes, das disparidades regionais de desenvolvimento e da dependência de importações de petróleo, abrangendo aspectos de natureza social, estratégica, econômica e ambiental (MIRAGAYA, 2005).

O programa brasileiro de biocombustíveis busca viabilizar a utilização do biodiesel, constituído das misturas de ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos, obtidos da reação química de transesterificação de diversos óleos, entre eles o de dendê (MIRAGAYA, 2005).

O Brasil tem capacidade para produzir combustíveis alternativos a partir de diversas espécies oleaginosas. O dendezeiro (*Elaeis guineensis*) mostra-se como a cultura mais promissora para a produção de óleo e sua consequente conversão em biocombustível. Entre as plantas oleaginosas mais utilizadas, o dendezeiro é a espécie com maior produtividade, podendo atingir 6 toneladas de óleo por hectare por ano. Contudo, diante das exigências edafoclimáticas, seu cultivo no território brasileiro prevalece em áreas restritas nos estados do Pará e Bahia. Além disso, o uso do biodiesel produzido a partir do óleo de dendê limita-se a regiões de clima quente, em função de suas características físico-químicas. O óleo solidifica à temperaturas amenas, inviabilizando seu uso nas regiões sul do Brasil (TEIXEIRA, 2005).

O dendezeiro, pertencente à família Arecaceae, é originário do continente africano. Desenvolve-se em climas de região tropical, em vários tipos de solo ricos em matéria orgânica (CARVALHO *et al.*, 2001). O óleo extraído das sementes do dendê tem uso alimentício, medicinal, oleoquímico e industrial (MIRAGAYA, 2005).

A propagação do dendezeiro ocorre por meio de sementes e, mesmo quando se utilizam híbridos selecionados, as plantas podem apresentar alta variabilidade, constituindo-se num dos principais fatores da baixa produtividade em plantios comerciais (JUAN e RODRIGUES, 1989).

Devido à dificuldade de usar a propagação via sementes, a cultura de tecidos surge como uma excelente alternativa para a multiplicação clonal de espécies selecionadas (SCHERWINSKI-PEREIRA *et al.*, 2007).

A técnica de clonagem *in vitro* de plantas tornou-se possível mediante a cultura de tecidos, fundamentando-se na totipotência das células vegetais, por meio da regeneração *in vitro*, via organogênese ou embriogênese somática, para originar as novas plantas (CARVALHO *et al.*, 2006). Porém, como método de propagação vegetativa e como sistema para estudos morfogênicos, apresenta resultados relativamente escassos para o caso das Palmáceas (GUERRA *et al.*, 1999).

As características biológicas do dendezeiro não permitem sua propagação vegetativa por meio de métodos convencionais. Além disso, a excisão de ápices leva à morte da planta mãe. Portanto, o melhor caminho para a propagação clonal de dendezeiro é pelo método de embriogênese somática (DUVAL *et al.*, 1995). A cultura de tecidos em dendezeiro tem sido comprometida principalmente com o propósito de propagação clonal (TEIXEIRA *et al.*, 1993).

A xiloglucana (XG) é uma hemicelulose da parede celular primária das plantas, que também aparece em sementes de algumas dicotiledôneas como polissacarídeo de reserva (SALAMONI, 2004). As xiloglucanas são encontradas em grandes quantidades nas sementes de *Hymenaea courbaril*, popularmente conhecida como jatobá (SOUZA LIMA, 2005). A XG bruta já foi combinada com ágar, obtendo-se interação entre os dois polissacarídeos e formação de um gel verdadeiro (LIMA-NISHIMURA, 2002). A possibilidade de substituição de parte do agente geleificante ágar ou gelana pela xiloglucana nos meios de cultura, a partir da formação de um gel verdadeiro, pode proporcionar uma redução de custos em micropropagação vegetal.

OBJETIVOS

Contribuir para a otimização de um protocolo de embriogênese somática de dendezeiro (*Elaeis guineensis*).
Testar misturas de agentes geleificantes como Gelrite® e xiloglucana (XG) em um protocolo de embriogênese somática de dendezeiro.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A espécie *Elaeis guineensis*

O dendezeiro pertence a família Arecaceae. No estágio adulto, esta monocotiledônea arborecente apresenta características típicas de palmeiras, com uma copa consistindo de 40 a 50 folhas abertas e um cone com 40 a 50 folhas em vários estágios de desenvolvimento.

O dendezeiro é uma palmeira de origem africana, trazida para o Brasil no século XVII pelos escravos. É uma planta perene, com vida econômica de 25 anos, quando em exploração agroindustrial. As características de planta perene, com produção distribuída durante todos os meses do ano, sem entressafas e alta produtividade,

conferem a esta palmeira atributos de grande importância econômica, ecológica e social. É uma cultura agroindustrial, devendo a plantação estar sempre próxima da indústria de extração de óleo (BARCELOS *et al.*, 1995).

Entre as oleaginosas, a cultura do dendê é a de maior produtividade, com um rendimento de 4 a 6 toneladas/ha. A produção de óleo de dendê exige longos tempos para colheita, mínimo de três anos, necessidade de extração do óleo dentro de 24 horas após sua colheita e a mecanização da colheita é bastante difícil (SUFRAMA, 2003).

A reprodução de dendezeiro para aumento do rendimento é lento e difícil porque as plantas são naturalmente incompatíveis e porque o rendimento de frutos e conteúdo de óleo somente podem ser avaliados depois de 6 a 10 anos quando as mudas começam a florescer. A propagação vegetativa não é possível por meios tradicionais e as populações de mudas são variáveis. Dentro da família de árvores resultantes de um cruzamento, as melhores podem produzir até 60% mais do que a média. A micropropagação, portanto, parece fornecer meios ideais de clonar genótipos desejáveis e durante a década de 70 programas de pesquisa foram estabelecidos para explorar apropriadas técnicas comerciais (NOIRET, 1981).

Inúmeras justificativas tem sido reportadas ao uso de técnicas de cultura *in vitro* em palmeiras como uma prática auxiliar para estudos morfogênicos e para acelerar programas de melhoramento genético. No caso de palmeiras, os programas de melhoramento são demorados e complexos devido ao longo ciclo, hábito de crescimento e ausência de métodos convencionais de propagação vegetativa. Neste contexto, a cultura de tecidos, quando integrada a um programa de melhoramento, torna-se um instrumento valioso na obtenção de plantas livres de vírus, na propagação vegetativa *in vitro* para clonagem rápida de genótipos superiores, na preservação e intercâmbio de germoplasma e no melhoramento genético. Portanto, a clonagem de embriões zigóticos maduros, ou imaturos, com alto potencial de produção, é de grande importância. Com isso, é possível buscar um aumento da produtividade e da uniformidade fisiológica (FERREIRA *et al.*, 1998).

Embriogênese somática

A embriogênese somática *in vitro* foi observada, de início, em 1958, em cultivo de células isoladas em raiz de cenoura (STEWART, 1958). Consiste na formação de embriões somáticos a partir de tecidos somáticos; neste processo, as células ou tecidos somáticos se desenvolvem até a formação completa de uma planta, por meio de uma série de estádios, característicos do desenvolvimento de embriões zigóticos (CARVALHO *et al.*, 2006).

Do ponto de vista do potencial de multiplicação e custos envolvidos, a embriogênese somática apresenta uma enorme vantagem sobre os outros sistemas de micropropagação. Grandes quantidades de embriões podem se formar em suspensões de células embriogênicas com um mínimo de manipulação manual e espaço físico de laboratório, principais componentes do custo de uma planta micropropagada (STYER, 1985).

Durante seu desenvolvimento, o embrião somático apresenta muitas semelhanças morfológicas com o embrião zigótico, pois ambos apresentam uma diferenciação inicial em estrutura bipolar, constituída de ápice caulinar e radicular, e passam por estádios de desenvolvimento pró-embriônicos e pelos embriônicos propriamente ditos: globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar (GUERRA *et al.*, 1999).

Dois padrões básicos de expressão da embriogênese somática ocorrem *in vitro*. O primeiro corresponde ao modelo direto, no qual os embriões somáticos originam-se dos tecidos-matrizes sem a formação de estádios intermediários de calo. O segundo padrão corresponde ao modelo indireto no qual os embriões somáticos se formam a partir de um calo, que apresenta células em diferentes estádios de diferenciação e, conseqüentemente, com diferentes graus de determinação, as quais podem adquirir novas competências mediadas por mensageiros químicos específicos (GUERRA *et al.*, 1999).

A embriogênese somática indireta requer que as células diferenciadas do explante sejam induzidas a se dividir para formar calos indiferenciados para que, então, a partir daí, as células redeterminem seu padrão embriogênico novamente (GEORGE, 1993).

No processo de embriogênese somática, são utilizados hormônios sintéticos ou reguladores vegetais. Os reguladores vegetais são uma classe de compostos químicos endógenos facilmente transportados para células responsivas, onde estão diretamente envolvidos no controle da atividade gênica, na transcrição e na tradução, em um grande número de processos. Em geral, na maioria dos modelos de embriogênese somática induzidas *in vitro*, as auxinas e entre elas o 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético), adicionadas ao meio de cultura, são consideradas as substâncias responsáveis por desencadear os processos de desdiferenciação (modelos indiretos) e rediferenciação (modelos diretos), alterando a determinação e conferindo novas competências às células responsivas presentes (GUERRA *et al.*, 1999).

O primeiro passo em qualquer protocolo de embriogênese somática é tratar os explantes em direção a um caminho que expresse seu potencial para a formação de embriões. Na embriogênese somática indireta, a indução de calos é necessária para explantes que não contêm células predeterminadas para formar embriões

somáticos diretamente. A indução é conquistada por meio da transferência das células para um meio de cultura com uma alta concentração de auxina (2,4-D) (HARTMANN *et al.*, 2002).

As auxinas estão envolvidas na indução e iniciação de embriões somáticos. A alta concentração de auxinas utilizadas para indução, contudo, usualmente é inibitória para o desenvolvimento dos embriões a partir dos estádios globulares até a condição de plantas (GAMBORG *et al.*, 1995).

Uma fase importante no desenvolvimento do embrião, tanto no zigótico quanto no somático, é o processo de maturação, fase em que ocorrem várias mudanças morfológicas e bioquímicas, evidente pela deposição de materiais armazenados, pela interrupção da germinação e pela tolerância à dessecação, principalmente em espécies com sementes ortodoxas (THOMAS *et al.*, 1993).

Embriogênese somática em dendezeiro

A cultura de tecidos de dendezeiro tem sido empreendida principalmente com o propósito de propagação clonal. Estudos iniciais utilizaram embriões zigóticos maduros e mudas como explantes. O uso de embriões como explantes são convenientes porque frutos são prontamente disponíveis, tem um alto grau de uniformidade fisiológica e podem ser expedidos para longas distâncias (TEIXEIRA *et al.*, 1993).

A indução e multiplicação de células embriogênicas friáveis de dendezeiro são importantes para a produção massal de embriões somáticos e para o estabelecimento de suspensões de células embriogênicas. A possibilidade de se obter suspensões embriogênicas de alta qualidade derivadas de explantes de plantas elite de dendezeiro podem conduzir à utilização de um eficiente método de micropropagação por possibilitar desenvolvimento de embriões em grande quantidade de culturas (TEIXEIRA *et al.*, 1995).

A regeneração do dendê por meio da embriogênese somática compreende quatro passos (calogênese, embriogênese, desenvolvimento caulinar e enraizamento). A cultura *in vitro* desta planta é caracterizada por um extenso período de tempo (cerca de dois anos entre a inoculação dos primeiros explantes até a aclimatização das plantas regeneradas), a baixa eficiência de alguns passos do processo e a produção de polifenóis. A influência desses fatores para o sucesso da regeneração é pouco conhecida (DUVAL *et al.*, 1995).

Xiloglucanas

As xiloglucanas são polissacarídeos vegetais, com função estrutural e de reserva, encontradas na parede celular e no endosperma de sementes (REID, 1985). Na parede celular são responsáveis pela viscoelasticidade. Entre outras propriedades, possui a habilidade de modificar a viscosidade dos meios aquosos formando géis através de interações com outros polissacarídeos (FREITAS *et al.*, 2005).

As xiloglucanas são encontradas em grandes quantidades nas sementes de *Hymenaea courbaril*, popularmente conhecida como jatobá. A constituição das xiloglucanas é basicamente uma cadeia principal de unidades de glucose, parcialmente substituídas em O-4 por unidades de β -D-galactopiranosil e substituídas em O-6 por unidades de α -D-Xilopiranosil parcialmente substituídos em O-2 por unidades β -D-galactopiranosil (SOUZA LIMA, 2005).

No Brasil, o ágar é importado e seu alto custo constitui em uma restrição econômica para a pesquisa e para laboratórios comerciais (LIMA-NISHIMURA *et al.*, 2003). A perspectiva da aplicação de polissacarídeos na cultura *in vitro* de plantas, e a existência de oligossacarídeos de XG com atividade biológica impulsionaram a realização de trabalhos especificamente dentro da aplicação biotecnológica. Com isso, por meio da observação de um gel verdadeiro, foi possível observar a interação entre o ágar do meio de cultura e o polissacarídeo de sementes de *Hymenaea courbaril* (LIMA-NISHIMURA *et al.*, 2003).

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Micropropagação Vegetal, no Departamento de Botânica, localizado no setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba-Paraná.

A xiloglucana foi extraída de sementes de jatobá no Laboratório POLINATBIOTEC do Departamento de Química da UFPR.

Foram utilizadas sementes maduras de dendezeiro fornecidas pela EMBRAPA Amazônia Ocidental (Manaus, Brasil). O tegumento das sementes foi quebrado e removido com o auxílio de uma morsa.

As sementes foram desinfestadas com hipoclorito de sódio a 12% por 10 minutos e em seguida foram lavadas com água destilada estéril por três vezes, sendo todo o processo realizado em câmara de fluxo laminar.

Embriões zigóticos maduros foram excisados das sementes de dendê e inoculados em placas de Petri de 10 cm de diâmetro e 2 cm de altura contendo aproximadamente 40 mL de meio de indução de embriogênese em cada.

A composição de compostos orgânicos e reguladores vegetais nos meios de cultura foi diferente os variados tratamentos e para as diferentes fases dos experimentos, de acordo com os sucessivos estádios de diferenciação apresentados pelos embriões. Todos os meios continham sais do meio Y3 (Eeuwens, 1976) e sacarose em diferentes concentrações. O pH dos meios de cultura foi ajustado em 5,5 ou 6,0 com NaOH 1N ou HCL 1N antes de serem autoclavados a 120°C por 20 minutos.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento, com temperatura em torno de 25°C ± 2°C de dia e de 18± 1°C de noite, em condições de escuro para a indução e manutenção de calos e massas embriogênicas, e em fotoperíodo de 16 horas para a maturação dos embriões somáticos, sob luz fluorescente do tipo branca fria com fluxo de fótons de aproximadamente 40 μmol.m⁻².s⁻¹.

Experimento 1

Efeito dos agentes geleificantes

As sementes de dendezeiro foram coletadas em março de 2008 e armazenadas por quatro meses. Em seguida, cinquenta embriões foram inoculados em placas de Petri contendo meio de cultura Y3-1 semi-sólido, num total de 5 placas com 10 embriões em cada.

Os embriões permaneceram no meio Y3-1 por 27 dias, até que se observasse o intumescimento e o crescimento em comprimento e diâmetro dos mesmos. Em seguida, foram cortados em fatias de aproximadamente 1 mm e inoculados em meio de cultura Y3-2. Neste meio, foram utilizadas quatro combinações de Gelrite® e xiloglucana como agentes geleificantes, correspondendo aos tratamentos Controle, 1, 2 e 3 (Tabela 1). Foram utilizadas 6 placas por tratamento com 5 explantes cada.

TABELA 1 Proporções de gelrite® e xiloglucana em g.L⁻¹ utilizadas na solidificação do meio de cultura Y3-2 para embriogênese somática de dendê
Proportions of gelrite® and xyloglucan in g.L⁻¹ used in solidification of culture medium Y3-2 for somatic embryogenesis of oil palm

	Controle	Tratamento 1	Tratamento 2	Tratamento 3
Gelrite	2	1,6	1,2	1
Xiloglucana	0	0,4	0,8	1

Após serem subcultivados por aproximadamente 120 dias em meio Y3-2, os explantes de 3 placas de cada tratamento foram transferidos para meio Y3-2 modificado com 5 μM de 2,4-D e os das 3 placas restantes para meio Y3-2 sem 2,4-D (Y3-3).

Os explantes que apresentaram formação de embriões somáticos em meio Y3-2 após 90 dias foram transferidos para meio de regeneração RM (Teixeira *et al.*, 1995) e mantidos em condição de luz, para que pudesse ocorrer o desenvolvimento dos embriões e a conversão em plantas.

RESULTADOS

Todos os explantes oriundos de embriões zigóticos maduros de dendezeiro apresentaram aumento em volume e comprimento nos primeiros 27 dias após a inoculação em meio Y3-1.

As respostas morfogenéticas começaram a ser visualizadas após a transferência dos embriões intumescidos para meio Y3-2, com o início da formação de calos. Os calos formados apresentaram, na sua maioria, coloração branco-amarelada para todas as combinações de Gelrite®/XG após 30, 60, 90 e 120 dias (Tabela 2).

TABELA 2 Formação de calos a partir de embriões zigóticos de *Elaeis guineensis* cultivados em meio de cultura Y3-2, solidificado com combinações de Gelrite/XG após 30, 60, 90 e 120 dias
Callus formation from zygotic embryos of *Elaeis guineensis* cultured in medium Y3-2, solidified with combinations of Gelrite/XG after 30, 60, 90 and 120 days

Gelrite®/XG (g.L ⁻¹)	Explantes parcialmente oxidados (%)				Formação de calos (%)			
	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias
2/0	27	57	60	60	97	97	97	97
1,6/0,4	40	50	55	66	68	70	70	76
1,2/0,8	23	47	50	53	63	63	66	66
1/1	50	47	53	56	53	60	66	76

*percentagem do total sem os explantes contaminados

Todas as combinações de Gelrite®/XG foram eficientes para a formação de calos, que puderam ser observados já nos primeiros 30 dias de cultivo. A formação de calos aumentou de modo crescente nos subcultivos seguintes, sendo que o tratamento contendo apenas Gelrite® como agente geleificante apresentou a maior porcentagem de calos formados, como pode-se observar na tabela 2.

Em todos os subcultivos também pôde-se observar um escurecimento dos explantes devido à oxidação, sendo que a combinação de 1,6/0,4 de Gelrite®/XG foi a que apresentou a maior porcentagem.

Após permanecerem 120 dias em meio Y3-2 para indução e formação de calos, metade dos explantes de cada tratamento foram transferidos para meio Y3-2 com redução da concentração de 2,4-D pela metade, enquanto a outra metade dos explantes de cada tratamento foram transferidos para meio Y3-3.

Em 8 semanas de subcultivo em meio Y3-2, observou-se formação de massas embriogênicas em todas as combinações de Gelrite®/XG, tanto nos explantes em meios que tiveram a concentração de auxina reduzida quanto nos meios sem auxina (Tabela 3). As massas embriogênicas observadas após 60 e 90 dias em meio Y3-2 apresentaram morfologia friável e coloração branca-amarelada.

TABELA 3 Formação de massas embriogênicas a partir de embriões zigóticos de *Elaeis guineensis* após cultivo por 90 dias em meio Y3-2*, suplementado com 5 µM de 2,4-D e na ausência de 2,4-D
Formation of embryogenic masses from zygotic embryos of *Elaeis guineensis* after cultivation for 90 days in medium Y3-2*, supplemented with 5 µM of 2,4-D and without 2,4-D

2,4-D (µM)	Gelrite®/XG (g.L ⁻¹)			
	2 / 0	1,6 / 0,4	1,2 / 0,8	1 / 1
5	83	77	66	83
0	83	77	83	83

* % de explantes formando massas embriogênicas

Houve formação de embriões somáticos no estágio globular em todas as combinações de Gelrite®/XG, bem como nos explantes que tiveram a concentração de auxina reduzida ou eliminada no meio (Tabela 4). Embriões nos estádios cordiforme e torpedo após 60 e 90 dias em meio Y3-2 foram observados no tratamento que continha apenas Gelrite® e no tratamento que possuía a combinação de 1,6 / 0,4 de Gelrite®/XG.

TABELA 4 Formação de embriões somáticos globulares a partir de embriões zigóticos de *Elaeis guineensis* após cultivo por 90 dias em meio Y3-2*, suplementado com 5 µM de 2,4-D e na ausência de 2,4-D
Formation of globular somatic embryos from zygotic embryos of *Elaeis guineensis* after cultivation for 90 days in medium Y3-2*, supplemented with 5 µM of 2,4-D and without 2,4-D

2,4-D (µM)	Gelrite®/XG (g.L ⁻¹)			
	2 / 0	1,6 / 0,4	1,2 / 0,8	1 / 1
5	12,0	3,3	0	11,0
0	20,0	13,0	12,0	0

* % de explantes formando embriões somáticos

Para três tratamentos que continham as seguintes proporções de Gelrite®/XG, 2 /0; 1,6 / 0,4 e 1,2 / 0,8, a eliminação de 2,4-D após subcultivo de 120 dias em meio com 10 μM de 2,4-D apresentou melhores resultados, com formação de 20, 13 e 12% de embriões somáticos ao final de 90 dias de cultivo em meio Y3-2, respectivamente.

Os explantes que apresentaram formação de embriões somáticos em estágio globular e cordiforme foram transferidos para meio Y3-3, sem reguladores vegetais, e os explantes que continham embriões em estádios torpedo e cotiledonar foram transferidos para meio de conversão RM, a fim de se obter a conversão em plantas.

DISCUSSÃO

Os resultados para obtenção de calos a partir de embriões zigóticos maduros de *Elaeis guineensis* foram semelhantes aos obtidos por Teixeira *et al.* (1995) utilizando meio de cultura Y3 (Eeuwens, 1976). Massas embriogênicas friáveis de coloração amarelada e apresentando pequenos agregados de células foram obtidas nos experimentos, resultados semelhantes aos obtidos por Teixeira *et al.* (1995) para indução de embriões somáticos a partir de embriões zigóticos maduros e imaturos de dendezeiro mantidos em meio de cultura acrescido das auxinas 2,4-D ou picloram.

Neste experimento, a partir da instalação das culturas de embriões zigóticos de dendezeiro, houve a formação de calos, seguidos de massas embriogênicas friáveis e posterior formação de embriões somáticos. Este padrão de embriogênese somática é similar ao obtido por Teixeira *et al.* (1993) com embriões zigóticos de dendezeiro.

Teixeira *et al.* (1993) obtiveram uma porcentagem de 93% de explantes formando calos a partir de embriões zigóticos maduros de dendezeiro cultivados por três meses em meio Y3 adicionado de 500 μM de 2,4-D e 0,3% de carvão ativado, enquanto a porcentagem de formação de calos a partir de embriões imaturos variou de 55% a 88%. Neste trabalho, após a manutenção das culturas em meio de indução de calos e a formação das massas embriogênicas friáveis, estas foram transferidas para meio de regeneração, onde houve a diferenciação e desenvolvimento normal de embriões somáticos, demonstrando um protocolo eficiente para embriogênese somática de dendezeiro a partir de embriões zigóticos.

Os resultados positivos para formação de embriões somáticos podem ser explicados pelo fato das auxinas estarem envolvidas na indução e iniciação de embriões somáticos. Em muitas espécies, o processo de iniciação se verifica ao se cultivar o explante em meio de cultura com concentração relativamente elevada de 2,4-D. O desenvolvimento subsequente dos embriões somáticos ocorre após transferência do calo ou suspensão celular para meio com baixa concentração de auxina, ou desprovido desta substância (GUERRA *et al.*, 1999).

Scherwinski-Pereira *et al.* (2007) também verificaram que a influência de auxinas sobre os explantes mostrou ser fundamental para a indução e, conseqüentemente, a formação de embriões somáticos a partir de estruturas foliares e de discos apicais de plantas jovens de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq).

Apesar de todos os tratamentos terem induzido a formação de massas embriogênicas friáveis e iniciação de embriões somáticos neste experimento, observou-se a paralisação da formação dos embriões somáticos em estágio globular em grande parte dos explantes, sem progressão para os estágios subsequentes. É provável que as altas concentrações de 2,4-D tenham inibido a progressão das culturas, sendo recomendável a redução do tempo de permanência dos explantes em culturas com as concentrações de 2,4-D indicadas.

Tem-se observado que, em alguns sistemas, os embriões somáticos tornam-se habituados durante períodos prolongados de subcultivos em 2,4-D, resultando na perda do potencial de maturação. Em *Ipomoea batatas*, os embriões somáticos perdem a capacidade de se converter em plantas quando as culturas são mantidas por longos períodos em meio com 2,4-D (TAUTORUS *et al.*, 1991).

A alta taxa de oxidação observada nos tratamentos também pode ser conferida ao tempo de permanência elevado dos explantes em meio contendo 2,4-D, sugerindo-se a diminuição deste tempo em culturas futuras. Segundo Wooi (1990), o escurecimento dos explantes não é um fator negativo em dendezeiro.

A possibilidade de substituição de parte do agente geleificante Gelrite® pelo polissacarídeo xiloglucana nos meios de cultura pode ser uma nova ferramenta para redução de custos, pois se apresenta como um método simples e natural para a aplicação em micropropagação.

Lima-Nishimura *et al.* (2003) verificaram um crescimento de caules maior e uma taxa de multiplicação elevada durante a micropropagação de macieiras Marubakaido (*Malus prunifolia* Borkh) e Jonagored (*Malus domestica*) quando cultivadas em meio de cultura composto pela mistura de 0,4% de ágar e 0,2% de xiloglucana extraída de sementes de jatobá (*Hymenaea courbaril*), em comparação com as cultivadas em meio de cultura composto somente por ágar.

Com relação à contribuição da xiloglucana para a formação e o desenvolvimento de massas embriogênicas e embriões somáticos, as maiores porcentagens dos mesmos neste trabalho foram obtidas no tratamento que não apresenta a combinação de xiloglucana e Gelrite no meio de cultura, o que não exclui a possibilidade de a xiloglucana contribuir para o processo de embriogênese somática, visto que nos tratamentos com a adição de xiloglucana também houve a formação de embriões somáticos, principalmente no meio que contém uma concentração de Gelrite®/Xiloglucana de 1,2/0,8 g.L⁻¹, onde apareceram embriões somáticos em estádios mais avançados de diferenciação. Esse processo também foi descrito no trabalho de Lima-Nishimura (2002), onde a substituição de 33% de ágar por xiloglucana proporcionou um aumento no número de embriões somáticos regenerados e uma diminuição no tempo de cultivo para embriogênese somática em cenoura (*Daucus carota*).

Lima-Nishimura (2002) ainda observou, em outros experimentos, realizados com café (*Coffea canephora* e *Coffea arabica*) que, em relação ao meio com Gelrite® (controle), o meio geleificado com Gelrite®/Xiloglucana promoveu um desenvolvimento mais rápido dos embriões somáticos para o estágio cotiledonar. Neste mesmo trabalho, numa análise da porcentagem de plantas regeneradas por embriões somáticos, o meio com Gelrite®/Xiloglucana se sobrepôs, novamente, ao meio controle, promovendo o dobro de regeneração deste.

Com relação à utilização da xiloglucana como um dos componentes geleificantes dos meios de cultura para embriogênese somática em dendezeiro no presente trabalho, não foi verificada uma correlação direta entre a presença da xiloglucana e a formação de massas embriogênicas e embriões somáticos. Diferenças genéticas e fisiológicas entre espécies podem influenciar a capacidade de formação de embriões somáticos em meios solidificados com misturas de agentes geleificantes como ágar e gelana com a xiloglucana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, S.R.M. **Princípios da Cultura de Tecidos Vegetais**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 16 p., 2002.
- BARCELOS, E., CHAILLARD, H., NUNES, C., MACÊDO, J., RODRIGUES, M., CUNHA, R., TAVARES, A., DANTAS, J., BORGES, R., SANTOS, W. **A Cultura do Dendê**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental – Brasília: EMBRAPA-SPI, 1995. 68 p.; 16 cm. – (Coleção plantar, 32).
- CALDAS, L.S., HARIDASAN, P., FERREIRA M.E. Meios Nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ. v.1, p.87-116, 1998.
- CARVALHO, A.R.V.; REIS, V.M.; BALDANI, V.L.D. **O dendê (*Elaeis guineensis* Jacq.)**. Rio de Janeiro: Embrapa Agrobiologia, p. 25, 2001.
- CARVALHO, J; LIMA, M.; AIRES, P.; VIDAL, M.; PIMENTEL, N. **Embriogênese Somática**. Campina Grande, 35 p. 2006. (Embrapa Algodão. Documentos, 152).
- CID, L.P.B. **A propagação *in vitro* de plantas**. Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento, v.2, n.19, p.16-21, 2001.
- CRUDEN, R.W. **Temporal dioecism: systematic breadth, associated traits, and temporal patterns**. Bot Gaz. 149:1-15, 1988.
- DUVAL, Y., ENGELMANN, F., DURAND-GASSELIN, T. Somatic Embryogenesis in Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). In: **Biotechnology in Agriculture and Forestry. Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I**. Y.P.S Bajaj. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, v. 30, 1995.
- EEUWENS, C.J. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera* L.) and culture *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, v. 36. p. 23-28, 1976.
- FERREIRA, A.T.; CALDAS, L.S.; PEREIRA, E.A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de Tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, v.1, p.21-24, 1998.

FINER, J.J. Plant regeneration via embryogenic suspension cultures. In: DIXON, R. A.; GONZALES, R.A. **Plant cell culture: a practical approach**. Oxford University Press, New York, 2 ed., p. 99-125, 1994.

FREITAS, R.A. MARTIN, S., SANTOS, G.L., VALENGA, F., BUCKERIDGE, M.S., REICHER, F., SIERAKOWSKI, M.R. Physico-Chemical Properties of Seed Xyloglucans from Different Sources. **Carbohydrate Polymers**, 60, p. 507-514, 2005.

GAMBORG, O.L., PHILLIPS, G.C. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture: Fundamental Methods**. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. Nova York, 1995.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture: The technology**. Exegetics Limited, England, 1 ed., v. 1, p. 285-455, 1993.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture: In practice**. Exegetics Limited, England, 2 ed., v. 2, p. 619-631, 1996.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa- CNPH. v.1, p 183-242, 1998.

GUERRA, M.P., HANDRO, W. Somatic embryogenesis in tissue cultures. In: AHUJA, M.R. **Woody Plant Biotechnology**. New York: Plenum Press, 1991. p. 189-196.

GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A.C; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-CBAB, v.2, p.533-568, 1999.

HARTMANN, H.T., KESTER, D.E. DAVIES, F.T.Jr., GENEVE, R.L. **Plant propagation: Principles and Practices**. Prentice Hall, New Jersey, 7 ed., p. 639-643, 2002.

JUAN, A; RODRIGUES, A. Produção de embriões em dendê a partir de cultura de embriões imaturos. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 1, p. 119-120, 1989.

KAO, K.N & MICHAYLUK, M.R. Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts of very low population densities in liquid media. **Planta**, 126:105-110, 1975.

LIMA-NISHIMURA, N., QUOIRIN, M. NADDAF, Y.G., WILHELM, H.M., RIBAS, L.L.F. SIERAKOWSKI, M.-R. A Xiloglucan from seeds of the native Brazilian species *Hymenaea courbaril* for micropropagation of Marubakaido and Jonagored apples. **Plant Cell Report**, 21:402-407, 2003.

LIMA-NISHIMURA, N. **Utilização da xiloglucana extraída de sementes de *Hymenaea courbaril* L. em géis para a micropropagação de cenoura, café e macieira**. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Departamento de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2002.

MIRAGAYA, J.C.G. **Biodiesel: tendências no mundo e no Brasil**. Informe Agropecuário. Minas Gerais, v. 26, p. 229, 2005.

MORAES, F.M.S. **Análise proteômica da embriogênese somática e da aquisição de competência embriogênica de *Ocotea catharinensis* mez (Lauracea)**. Dissertação (Pós-Graduação em Biologia Molecular) – Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas, Universidade de Brasília. Brasília, 2006.

NOIRET, J.M. Application de la culture in vitro à l'amélioration et à la production de matériel clonal chez le palmier à huile. **Oléagineux**. 36:123-126, 1981.

OBATÃ, C.V. Embriogênese somática indireta em explantes foliares de *Coffea arabica* L. **Ciências Agrotécnicas**, Lavras. v. 27, n. 1, pg. 107-116, jan/fev., 2003.

PREECE, J.E. Can Nutrient Salts Partially Substitute for Plant Growth Regulators? **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, v. 1, p. 26-37, 1995.

QUOIRIN, M. **Micropropagação. In: Manual de Cultura de Tecidos Vegetais in vitro** (apostila). UFPR, Curitiba, 2003.

REID, J.S.G. Structure and function in legume seed polysaccharides. In: Brett, C.T.; Hillman, J.R. **Biochemistry of plant cell walls**. London. Ed. Cambridge University Press., p.259-268, 1985.

SALAMONI, A.T. **Obtenção, caracterização e efeitos de xiloglucanas e derivados de sementes de jatobá na cultura de tecidos vegetais**. Curitiba, 2004. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Departamento de Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E.; MACIEL, S.A; SILVA, T.L.; GUEDES, R.; FERMINO, J.R.; P.C.P. Indução da embriogênese somática em dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq) a partir de estruturas foliares e potencial de indução utilizando discos apicais de plantas jovens. **16º Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais/3º Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas/1º Simpósio de Plantas Ornamentais Nativas**. p. 837-840, 2007.

SILVA, J.C. **Macaúba: fonte de matéria-prima para os setores alimentício, energético e industrial**. Viçosa, Minas Gerais, 59 p., 2005.

SOUZA LIMA, M. M.; BORSALI, E.; ALMEIDA DE SOUZA, R. P.; FINGER, F. L.; SIERAKOWSKI, M. R.; CARDOSO, M. L. Estudo reológico da xiloglucana de *Hymenaea courbaril*. **Anais da 57ª Reunião Anual da SBPC - Fortaleza, CE - Julho/2005**.

STEINMACHER, D.A.; CANGAHUALA-INOCENTE, G.C.; CLEMENT, C.R.; GUERRA, M.P. **Somatic embryogenesis from peach palm zygotic embryos**. In *Vitro Cell.Dev.Biol. – Plant* (2007) 43:124-132.

STEWART, F.C., MAPES, M.O., MEARS, K. Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures from freely suspended cells. **American Journal of Botany**, v.45, p.705-708, 1958.

STYER, D.J. Bioreactor technology for plant propagation. **Basic Life Science**, v. 32, p. 117-130, 1985.

SUFRAMA. **Estudo de viabilidade econômica: dendê**. 2003. Disponível em: <
http://www.suframa.gov.br/suframa_publicacoes.cfm> Acesso em: 12/11/2009.

TAUTORUS, T.E., FOWKE, L.C., DUNSTAN, D.I. Somatic embryogenesis in conifers. **Can. J. Bot.**, 1873-1899, 1991.

TEIXEIRA, L.C. Potencialidades de oleaginosas para produção de biodiesel. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 229, p. 18-27, 2005.

TEIXEIRA, J. B., SÖNDAHL, M. R., NAKAMURA, T., KIRBY, E. G. Establishment of oil palm cell suspensions and plant regeneration. **Plant Cell Tissue, and Organ Culture**, v. 40, p.105 - 111, 1995.

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

THOMAS, T.L. Gene expression during plant embryogenesis and germination: an overview. **Plant Cell**, v.5, p.1401-1410, 1993.

TORRES, A. C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. v.1, p. 183-260. Brasília: Embrapa SPI/ Embrapa-CNPQ, 1998.

TORRES, A. C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. v.2, p. 533-558. Brasília: Embrapa SPI/ Embrapa-CNPQ, 1999.

TORRES, A.C.; FERREIRA, A.T.; SÁ, F.G.; BUSO, J.A.; CALDAS, L.S.; NASCIMENTO, A.S.; BRÍGIDO, M.M.; ROMANO, E. **Glossário de Biotecnologia Vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 128 p., 2000.

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

WOOL, K.C. Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.): tissue culture and micropropagation. In: **Biotechnology in Agriculture and Forestry**. Bajaj YPS, vol. 10. Legumes and oilseed crops I. Springer. Berlin Heidelberg New York, p. 569-592, 1990.