

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

Multiplicação, diferenciação, alongamento *in vitro* e estabelecimento de mudas clonais de *Elaeis guineensis* Jacq. (arecaceae)

João Victor Baptista Silveira
Magister Scientiae

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025**

JOÃO VICTOR BAPTISTA SILVEIRA

Multiplicação, diferenciação, alongamento *in vitro* e estabelecimento de mudas clonais de *Elaeis guineensis* Jacq. (arecaceae)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Sergio Yoshimitsu Motoike

Coorientador: Diego Ismael Rocha

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S587m
2025
Silveira, João Victor Baptista, 1998-
Multiplicação, diferenciação, alongamento *in vitro* e
estabelecimento de mudas clonais de *Elaeis guineensis* Jacq.
(Arecaceae) / João Victor Baptista Silveira. – Viçosa, MG, 2025.
1 dissertação eletrônica (73 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Sérgio Yoshimitsu Motoike.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Agronomia, 2025.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2025.594>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Dendezeiro - Melhoramento genético. 2. Dendezeiro -
Efeito da auxina. 3. Carbono ativado. 4. Dendezeiro -
Propagação in vitro. I. Motoike, Sérgio Yoshimitsu, 1967-.
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Agronomia. Programa de Pós-Graduação em Genética e
Melhoramento. III. Título.

CDD 22. ed. 633.851

JOÃO VICTOR BAPTISTA SILVEIRA

Multiplicação, diferenciação, alongamento *in vitro* e estabelecimento de mudas clonais de *Elaeis guineensis* Jacq. (arecaceae)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 1 de agosto de 2025.

Assentimento:

João Victor Baptista Silveira
Autor

Sergio Yoshimitsu Motoike
Orientador

Essa dissertação foi assinada digitalmente pelo autor em 19/09/2025 às 10:51:21 e pelo orientador em 25/09/2025 às 10:45:40. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **10AK.YXXI.GDNZ** e clique no botão 'Validar documento'.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes agências de pesquisa brasileiras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), por possibilitar a realização da pós-graduação em Genética e Melhoramento e permitir meu crescimento como profissional e cidadão.

Ao programa de pós-graduação em Genética e Melhoramento da UFV, por todo apoio e incentivo.

Agradeço ao Departamento de Agronomia, setor de Fruticultura e todos os associados, essenciais à minha formação e de milhares de estudantes.

Sou grato a Agropalma S.A. pela parceria e disponibilização dos materiais genéticos.

À FAPEMIG (APQ-02581-21) e a Rede Mineira de Biotecnologia em Multiplicação e Clonagem de Plantas (RED-00225-23).

Aos meus orientadores Drs. Sérgio Yoshimitsu Motoike e Diego Ismael Rocha, serei eternamente grato por me receberem e acolherem durante esse período. Obrigado pelo tempo, atenção e dedicação na minha orientação e supervisão. Que este seja o primeiro de muitos trabalhos com a colaboração de vocês.

Aos membros da banca avaliadora, por aceitar nosso convite e auxiliar na construção do mesmo.

Sou grato a todos os colegas do Laboratório de Cultura de Células e Tecidos Vegetais (LCT), do setor de Fruticultura do Departamento de Agronomia (DAA), da UFV, pelas experiências e trocas.

Aos profissionais e pesquisadores que auxiliaram na construção desse e muitos outros trabalhos, que este seja o início de uma longa parceria e amizade. Obrigado Ana Claudia Ferreira da Cruz, Thamires Fernanda Gomes, Gabriel Parreiras e Tsylla Assis.

A todos os técnicos e profissionais associados ao laboratório e setor, por toda colaboração e paciência. Um carinho especial a Elaine Rocha, Francisco Assis Lopes, Elizete Pires, Hugo de Oliveira Leite, Carlos Alberto (Bebeto), José Sabino Filho e Vanessa Soares Miranda.

À minha família e amigos, obrigado por toda dedicação, tempo e amor, sem vocês não seria possível.

Ao meu companheiro Lucas Gomes Dias Silva, por me apoiar, incentivar e ajudar, parte essencial dessa jornada.

Serei eternamente grato à todas as amigadas construídas nesse

trajeto, obrigado por aguentarem meus surtos e alegrias, tornando o caminho mais leve.

A todos estudantes da graduação que acompanharam este trabalho, a presença de vocês me possibilitou uma nova visão como pesquisador e tutor.

À Dr^a Natane Amaral Miranda Pádua, por me iniciar na pesquisa e incentivar na busca pela melhor capacitação e formação.

Agradeço também a equipe do REMAPE, pela ajuda, direcionamento e troca de experiências.

Sou eternamente grato a todos, que de alguma forma colaboraram com este trabalho, de forma emocional, intelectual ou científica, bem como na minha formação como pesquisador e cidadão.

RESUMO

SILVEIRA, João Victor Baptista, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2025. **Multiplicação, diferenciação, alongamento *in vitro* e estabelecimento de mudas clonais de *Elaeis guineensis* Jacq. (arecaceae).** Orientador: Sergio Yoshimitsu Motoike. Coorientador: Diego Ismael Rocha.

Elaeis guineensis Jacq., conhecida popularmente como Dendezeiro ou palma de óleo, é uma palmeira da família Arecaceae, considerada uma importante oleaginosa, com ampla utilização nos setores alimentício, de cosméticos e biocombustíveis. Para a perpetuação de materiais genéticos superiores e sua multiplicação em larga escala, o cultivo *in vitro* através da embriogênese somática é essencial. O presente trabalho teve como objetivo geral a otimização de protocolos de micropropagação de mudas clonais de diferentes materiais genéticos de *E. guineensis*. Sendo dividido em dois experimentos, (i): A influência de concentrações de auxinas (2,4-D e AIA) na multiplicação e regeneração de calos embriogênicos de *Elaeis guineensis* e, (ii): O efeito de concentrações de carvão ativado no alongamento e estabelecimento de mudas clonais de diferentes genótipos. Para o experimento (i), calos friáveis multiplicados *in vitro* foram inoculados em placas de Petri contendo 30 mL de meio de cultura Y3 modificado, acrescidos de 2,4-D (0, 9 e 18 μM) e AIA (0, 28,43 e 56,86 μM), respectivamente. Para a multiplicação de calos embriogênicos, a presença de 2,4-D é fundamental, enquanto sua ausência é necessária para formação de embriões somáticos. A utilização do meio de cultura convencional, de 9 μmol de 2,4-D + 28,43 μmol de AIA, possibilitou a obtenção de calos embriogênicos de maior qualidade, com aumento da sua proporção e baixa oxidação. A presença de 2,4-D, está diretamente associada à sinalização para a divisão celular, porém sua retirada potencializa a diferenciação em embriões somáticos. No experimento (ii), foram avaliados o desempenho de 4 genótipos em função de cinco (5) concentrações de carvão ativado (0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 g.L^{-1}) adicionadas ao meio de cultura C4, durante o alongamento *in vitro* de mudas clonais de *E. guineensis*. É possível a obtenção de mudas clonais viáveis de todos os materiais genéticos avaliados, porém é necessário maior ajuste para materiais pouco responsivos. Genótipos aparentados apresentaram desenvolvimento superior ao longo do estudo, sugere-se um efeito da genética dos parentais. A ausência do carvão ativado permite melhores respostas para o estabelecimento de mudas clonais de *E. guineensis*. Todavia a análise estatística de regressão polinomial demonstrou que o uso de 2,8 g.L^{-1} de carvão ativado permite a otimização de embriogênese somática secundária, resultando em maior

número de plantas nesta condição.

Palavras-chave: auxinas ; carvão ativado ; Palma de óleo ; genética ; regeneração *in vitro*

ABSTRACT

SILVEIRA, João Victor Baptista, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2025. ***In vitro* multiplication, differentiation, elongation, and establishment of clonal seedlings of *Elaeis guineensis* Jacq. (arecaceae).** Adviser: Sergio Yoshimitsu Motoike. Co-adviser: Diego Ismael Rocha.

Elaeis guineensis Jacq., commonly known as African oil palm, is a member of the Arecaceae family and is considered one of the most important oil-bearing crops, with wide applications in the food, cosmetic, and biofuel industries. For the perpetuation of superior genetic materials and their large-scale multiplication, *in vitro* culture through somatic embryogenesis is essential. The present study aimed to optimize micropropagation protocols for clonal plantlets of different *E. guineensis* genotypes. The research was divided into two experiments: (i) the influence of auxin concentrations (2,4-D and IAA) on the multiplication and regeneration of embryogenic calli of *E. guineensis*, and (ii) the effect of different concentrations of activated charcoal on the elongation and establishment of clonal plantlets of four genotypes. In experiment (i), friable calli multiplied *in vitro* were inoculated in Petri dishes containing 30 mL of modified Y3 medium supplemented with 2,4-D (0, 9, and 18 μM) and IAA (0, 28.43, and 56.86 μM), respectively. For the multiplication of embryogenic calli, the presence of 2,4-D was found to be essential, whereas its absence was required for somatic embryo formation. The use of the conventional medium containing 9 μM 2,4-D + 28.43 μM IAA enabled the production of higher-quality embryogenic calli, with increased proportion and reduced oxidation. The presence of 2,4-D was directly associated with cell division signaling, whereas its removal enhanced differentiation into somatic embryos. In experiment (ii), the performance of four genotypes was evaluated under five concentrations of activated charcoal (0, 1.0, 2.0, 3.0, and 4.0 g L^{-1}) added to C4 medium during *in vitro* elongation of clonal plantlets of *E. guineensis*. Viable clonal plantlets were obtained for all tested genotypes, although further adjustments are required for less responsive materials. Related genotypes showed

superior development throughout the study, suggesting an effect of parental genetics. The absence of activated charcoal favored better responses for the establishment of clonal plantlets of *E. guineensis*. However, polynomial regression analysis demonstrated that the use of 2.8 g L^{-1} of activated charcoal optimized secondary somatic embryogenesis, resulting in a greater number of plants under this condition.

Keywords: auxins ; activated charcoal; Oil palm; genetics; in vitro regeneration

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1: Efeito de auxinas na multiplicação e diferenciação de calos embriogênicos de *Elaeis guineensis* Jacq. (Arecaeae)

Figura 1 - Fluxograma do experimento de auxinas, em ordem cronológica da esquerda para direita, contendo: explante inicial, efeito das auxinas e efeito residual.34

Figura 2 - Classificação dos calos em relação ao padrão de cor e aspecto morfológico. Classificação da coloração dos calos (A-C), onde 0 – branco (A), 50 – creme(B) e 100 – Amarelo (C), e, classificação do aspecto dos calos em escala de 0 a 100, onde 0 – nodulares (D), 50 – intermediários (E) e 100 – friáveis (F). Escala = 1 mm34

Figura 3 - Taxa de oxidação (A), formação (B), número de embriões (C) e diâmetro dos calos (D), para linhagens embriogênicas do genótipo PL-06 de *Elaeis guineensis* cultivadas *in vitro* em função de concentrações de 2,4-D e AIA. Letras minúsculas iguais não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey em nível de 95% de probabilidade para concentrações de 2,4-D, enquanto letras maiúsculas iguais não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey em nível de 95% de probabilidade para concentrações de AIA.....36

Figura 4 - Coloração (A), taxa de calos nodulares amarelos (B), creme friável (C), número de embriões (D), diâmetro dos calos (E), taxa de oxidação (F), aspecto dos calos (G), formação de embriões (H) e, calos amorfos (I) para linhagens embriogênicas do genótipo PL-06 de *Elaeis guineensis* cultivadas *in vitro* em função de concentrações de 2,4-D e AIA. Letras minúsculas iguais não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey em nível de 95% de probabilidade para concentrações de 2,4-D, enquanto letras maiúsculas iguais não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey em nível de 95% de probabilidade para concentrações de AIA.....39

Figura 5 - Agregados mistos com formações de calos friáveis a partir de nodulares do genótipo PL-06 de *Elaeis guineensis* cultivadas *in vitro*, em função de concentrações de 2,4-D e AIA. Escala = 1mm. 39

Figura 6 - Caracterização morfoanatômica dos agregados: calos friáveis (A – C), calos nodulares (D – F), embriões fusionados (G – I), calos amorfos (J – L) e calos oxidados (M – O). Escala: A e G = 2mm; D, J e M = 1mm; H = 1000 µm; B, K e N = 100µm; E, I, L e O = 50µm; C e F = 20µm. ZM: Zona meristemática; ZP: Zona periférica; CV: Conexões vasculares; CF: Compostos fenólicos.44

CAPÍTULO 2: Influência do material genético e do carvão ativado no alongamento *in vitro* e estabelecimento de mudas clonais de *Elaeis guineensis*

Figura 1 - Efeito do genótipo no alongamento de plântulas de *Elaeis guineensis*, aos 60 dias de cultivo *in vitro*. Morfologia dos genótipos AM-05, AM-21, AM-29 e AM-33 em 2 g. L⁻¹ de carvão ativado, em ordem crescente da esquerda para direita (A), Vigor (B), Altura (C), Diâmetro de colo (D), Clorofila *a* (E), Clorofila *b* (F), Clorofila total (G), Massa seca aérea (H), Formação radicular (I), e Índice de qualidade de Dickson – transformado em log (J). Barra = 3 cm. Letras iguais não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey em nível de 95% de significância. 59

Figura 2 - Efeito do carvão ativado no sistema aéreo do alongamento de plântulas de *Elaeis guineensis*, aos 60 dias de cultivo *in vitro*, Morfologia do genótipo AM-05 em função do carvão ativado em concentração crescente de 0 a 4 g. L⁻¹ da esquerda para direita (A), Número de plantas (B), Clorofila *a* (C), Clorofila *b* (D), Clorofila total (E), Carotenoides (F), Diâmetro de colo (G), e Índice de qualidade de Dickson (H). Barra = 3 cm. 61

Figura 3 - Efeito do carvão ativado no sistema radicular durante o alongamento de plântulas de *Elaeis guineensis*, aos 60 dias de cultivo *in vitro*. Morfologia radicular do genótipo AM-05 em função carvão ativado em concentração crescente de 0 a 4 g. L⁻¹ da esquerda para direita (A), Formação (B), Diâmetro (C), Comprimento (D), Volume (F), e Massa seca radicular (F). Barra = 1,13 cm. 62

Figura 4 - Efeito do carvão ativado na aclimatização de mudas clonais de *Elaeis guineensis*, aos 60 dias de cultivo, Morfologia do genótipo AM-05 em função do carvão ativado, em ordem crescente da direita para a esquerda (A), Altura (B), Vigor (C), Diâmetro do colo (D), Formação radicular (E), e Massa seca aérea (F). Escala = 3 cm 64

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1 - Estudos recentes de embriogênese somática de *Elaeis guineensis*. 21

CAPÍTULO 1: Efeito de auxinas na multiplicação e diferenciação de calos embriogênicos de *Elaeis guineensis* Jacq. (Arecaeae)

Tabela 1 - Resultado da análise de variância para coloração, oxidação, formação e número de embriões e diâmetro dos calos das linhagens embriogênicas do genótipo PL-06 de *Elaeis guineensis* em função das concentrações de AIA e 2,4-D, cultivadas *in vitro*, aos 45 dias de cultivo. 36

Tabela 2 - Resultado da análise de variância para coloração, oxidação, formação e número de embriões, aspecto dos calos, taxa de calos nodulares amarelo, friáveis creme e amorfos e diâmetro dos calos das linhagens embriogênicas do genótipo PL-06 de *Elaeis guineensis* em função dos explantes oriundos de diferentes concentrações de AIA e 2,4-D, cultivadas *in vitro*, aos 45 dias de cultivo.....37

Tabela 3 - Resultado da análise de histoquímica das estruturas obtidas das linhagens embriogênicas do genótipo PL-06 de *Elaeis guineensis* em função das concentrações de AIA e 2,4-D, cultivadas *in vitro*, aos 45 dias de cultivo *in vitro*. 42

CAPÍTULO 2: Influência do material genético e do carvão ativado no alongamento *in vitro* e estabelecimento de mudas clonais de *Elaeis guineensis*

Tabela 1 - Caracterização morfológica dos genótipos de *Elaeis guineensis*, contendo: código do genótipo, parentais, altura da planta, número e peso médio dos cachos, número de frutos, taxa de mesocarpo, matéria seca e fibra dos frutos, potencial de óleo por fruto e planta, e a idade das matrizes.....53

Tabela 2 - Resultado da análise de variância para as variáveis: taxa de sobrevivência, vigor, altura, diâmetro do colo, número de plantas, clorofila a, clorofila b, clorofila total, carotenoides, formação radicular, diâmetro médio radicular, comprimento radicular (diâmetro > 2,0mm), volume radicular (diâmetro > 2,0mm), massa seca aérea e radicular e índice de qualidade de Dickson, a partir de plantas clonais de *Elaeis guineensis* alongadas *in vitro*, aos 60 dias de cultivo.....57

Tabela 3 - Resultado da análise de variância para a taxa de sobrevivência, vigor, altura, diâmetro do colo, número de plantas, formação radicular, diâmetro médio radicular, comprimento radicular (diâmetro > 2,0mm), volume radicular (diâmetro > 2,0mm), massa seca aérea e radicular e índice de qualidade de Dickson, a partir de mudas clonais de *Elaeis guineensis* em aclimatização, aos 60 dias de cultivo.63

Tabela 4 – Valores médios para taxa de sobrevivência e diâmetro médio radicular em função de concentrações de carvão ativado a partir de mudas clonais de *Elaeis guineensis* em aclimatização, aos 60 dias de cultivo. 65

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenóxiacético
AIA	Ácido índol-acético
ANA	Ácido naftaleno-acético
CA	Carvão ativado
ES	Embriogênese somática
ESS	Embriogênese somática secundária

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1. <i>Elaeis guineensis</i>	16
2.2. Propagação assexuada	18
2.3. Embriogênese somática de <i>E. guineensis</i>	20
3. REFERÊNCIAS	22
CAPÍTULO 1	28
Efeito das auxinas na multiplicação e diferenciação de calos embriogênicos de <i>Elaeis guineensis</i> Jacq. (Arecaecae)	28
RESUMO	29
ABSTRACT	29
1. INTRODUÇÃO	30
2. MATERIAIS E MÉTODOS	32
2.1. Material vegetal.....	32
2.2. Auxinas	33
2.3. Efeito residual	33
2.4. Coleta e análise de dados.....	34
2.5. Caracterização morfoanatômica	35
3. RESULTADOS	36
3.1. Auxinas	36
3.2. Efeito residual	37
3.3. Caracterização morfoanatômica	40
4. DISCUSSÃO	42
5. CONCLUSÕES	44
6. REFERÊNCIAS	45
CAPÍTULO 2	49
Influência do material genético e do carvão ativado no alongamento <i>in vitro</i> e estabelecimento de mudas clonais de <i>Elaeis guineensis</i> jacq.	49
RESUMO	50
ABSTRACT	50

1.	INTRODUÇÃO	51
2.	MATERIAIS E MÉTODOS	53
2.1.	Material vegetal.....	53
2.2.	Alongamento <i>in vitro</i>	53
2.3.	Aclimatização.....	54
2.4.	Coleta e análise de dados.....	55
3.	RESULTADOS	56
3.1.	Alongamento <i>in vitro</i>	56
3.2.	Aclimatização.....	63
4.	DISCUSSÃO	66
5.	CONCLUSÕES	68
6.	REFERÊNCIAS	69

1. INTRODUÇÃO GERAL

Elaeis guineensis é uma palmeira oleaginosa, nativa do continente africano, conhecido popularmente como Palma de óleo ou Dendê (Bakewell-Stone, 2022). Possui grande importância econômica, utilizada nas indústrias de cosméticos, alimentícia, farmacêutica e para a produção de biocombustíveis (Agele *et al.*, 2022; Bakewell-Stone, 2022).

Todavia, muitas vezes, apresenta plantios com baixa produtividade devido a origem seminífera e de materiais genéticos pouco produtivos (Karyanti *et al.*, 2021). É uma espécie monocotiledônea, apresenta domínio persistente do ápice vegetativo, de caule único com 35 a 60 cm de folhas pinadas não produzindo perfilhos ou brotações (Karyanti *et al.*, 2021; Nair, 2021). Assim a cultura de tecidos via embriogênese somática, é essencial para o desenvolvimento da indústria da palma de óleo, especialmente para a geração de materiais de plantio com maior qualidade e uniformes (Karyanti *et al.*, 2021; Saptari *et al.*, 2024).

A embriogênese somática (ES) é o processo pelo qual células somáticas, em condições adequadas, se diferenciam de maneira direta ou indireta em embriões somáticos e, posteriormente, resultam na formação de uma planta completa, e sem fertilização (Hazubska-Przybył *et al.*, 2020; Ferrari *et al.*, 2021). É uma técnica ideal para propagação clonal em massa associada ao melhoramento genético (Karyanti *et al.*, 2021).

No entanto, o processo de embriogênese somática pode ser afetado por reguladores de crescimento e pela composição do meio de cultura, mas também pelo material genético (Arimarsetiowati *et al.*, 2023). É um fator limitante na aplicação de tecnologias em muitos materiais, como a multiplicação massal e a transformação genética, além de restringir a capacidade de obtenção de plantas regeneradas a uma faixa limitada de genótipos (Wang *et al.*, 2023).

Os reguladores de crescimento de plantas, são compostos orgânicos que atuam como mensageiros químicos, desempenham um papel primordial na determinação das vias de desenvolvimento das células e tecidos vegetais (Hakim *et al.*, 2022; Amoanimaa-Dede *et al.*, 2022; Arli, Noli e Idris, 2023). Em pequenas concentrações, estimulam, inibem ou regulam processos fisiológicos nas plantas, de forma que possibilita o aumento da divisão, expansão e diferenciação celular (Amoanimaa-Dede *et al.*, 2022; Pasternak e Steinmacher, 2024). São fundamentais

na indução, multiplicação ou regeneração de brotações, raízes e linhagens embriogênicas (Sidik *et al.*, 2024; Pasternak e Steinmacher, 2024). As auxinas e as citocininas são os reguladores de crescimento mais utilizados na cultura de tecidos vegetais, seu tipo e concentração determinam a estrutura a ser desenvolvida ou regenerada (Hakim *et al.*, 2022).

Os carvões ativados (CA) são componentes que possuem uma estrutura densamente porosa e alta área superficial, destacam-se por seu potencial de adsorção de diferentes componentes (Sharma *et al.*, 2022; Mamatha, 2023). Amplamente utilizado na cultura de tecidos vegetais, auxilia no estabelecimento e germinação de mudas clonais. Um dos seus maiores impactos está associado a adsorção de reguladores de crescimento, suplementos orgânicos e substâncias inibitórias do meio ou liberada pelo material vegetal. Permite a estabilização do pH ao longo do cultivo e melhor aproveitamento dos nutrientes pelas plantas (Paulino *et al.*, 2021; Sharma *et al.*, 2022; Martins *et al.*, 2024). Além disso, permite a redução da incidência de luz na zona de crescimento das raízes, e uma melhor indução e desenvolvimento do sistema radicular das plantas (Máximo *et al.*, 2020; Martins *et al.*, 2024).

Desta forma, a técnica apresenta algumas limitações em função do material genético, das condições de cultivo, da maturação, conversão e aclimatização das plântulas, entre outros fatores que comprometem o uso sistemático da embriogênese somática para fins comerciais (Pais *et al.*, 2019). Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo geral a otimização do protocolo para a micropropagação de mudas clonais de diferentes materiais genéticos de *E. guineensis*. E, objetivos específicos: (I) avaliar o efeito de concentrações de auxinas (2,4-D e AIA), na multiplicação e diferenciação de calos embriogênicos de *Elaeis guineensis*; (II) Estimar o desempenho de quatro materiais genéticos em função de concentrações de carvão ativado no alongamento *in vitro* e estabelecimento de mudas clonais de *E. guineensis*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Elaeis guineensis*

Elaeis guineensis é uma palmeira oleaginosa perene, conhecida popularmente como Palma de óleo ou Dendê, pertencente à família Arecaceae, nativa

do continente africano majoritariamente da costa ocidental, estendendo-se do Senegal a Angola (Corley e Tinker, 2003). Espécie monoica, ereta, de caule único, de internódios curtos, com 35 a 60 folhas pinadas dispostas em caule vascular (Nair, 2021; Bakewell-Stone, 2022).

A Palma de óleo é uma espécie de grande importância econômica, utilizada nas indústrias de cosméticos, alimentícia, farmacêutica e para a produção de biocombustíveis (Nair, 2021; Bakewell-Stone, 2022). Considerada mundialmente uma das espécies mais importantes para a indústria de óleo vegetal comestível mundialmente (Bakewell-Stone, 2022).

Amplamente utilizada na alimentação tradicional, como ingrediente de pratos típicos em diversas regiões, essencialmente nos continentes africano e sul-americano, inclusive Brasil (Okolo *et al.*, 2019). Contém elevado valor nutricional, o óleo de palma possui alto teor de α - e β -caroteno e das vitaminas A e E, oferece inúmeros benefícios à saúde (Sommerburg *et al.*, 2015). Além disso, *E. guineensis* apresenta diferentes usos etnomedicinais, possui bioativos essenciais no tratamento de diversas enfermidades, como problemas neurológicos, gastrointestinais, respiratórios e cicatriciais (Reddy *et al.*, 2019; Okolo *et al.*, 2019). Possui um relevante papel econômico e sociocultural.

A palma de óleo é considerada a cultura oleaginosa mais produtiva (Corley *et al.*, 2015), em 2017 produziu 34% do óleo vegetal mundial, com apenas 0,36% das terras agrícolas (Mayes, 2020). A América do Sul e Central são consideradas áreas favoráveis para o desenvolvimento da palma de óleo devido à sua capacidade de produção (Murphy, Goggin e Paterson, 2021). O Brasil apresenta um papel de destaque, sendo 9º país com maior produção em 2022, com 581.009 toneladas (FAOSTAT, 2023).

Apesar de seu alto potencial, a maioria dos plantios de Dendê é de baixa produtividade, principalmente nas áreas de pequenos produtores, pois são de origem seminífera e oriundos de materiais genéticos pouco produtivos (Karyanti *et al.*, 2021). Neste contexto, a propagação vegetativa via embriogênese somática permite a multiplicação de genótipos de interesse e alta produtividade (Santos *et al.*, 2021; Karyanti *et al.*, 2021).

Devido às suas características biológicas, incluindo a existência de um único meristema apical do caule monocotiledonar, o único método viável para sua multiplicação massal é através da cultura de tecidos vegetais (Lin *et al.*, 2009).

2.2. Propagação assexuada

A propagação assexuada, também conhecida como propagação vegetativa, consiste na produção vegetal a partir de partes da planta, como exemplos os ramos, as folhas e as raízes. Fundamenta-se em um processo com ausência de recombinação gênica na produção de mudas clonais, que permite a produção de plantas geneticamente selecionadas em escala massal e homogêneas (Ruscitti, 2023; Islam, Hui e Wei, 2023). Através de mecanismos de divisão e diferenciação celular ocorre um processo de multiplicação vegetativa por meio da regeneração de partes da planta matriz (Fachinello; Hoffmann; Nachtigal, 2005).

As técnicas de multiplicação clonal *in vitro* são um dos principais processos de produção de mudas, pois perpetua importantes ganhos genéticos obtidos em programas de melhoramento (Dias *et al.*, 2005; Ruscitti, 2023). Há muitos benefícios decorrentes desses métodos, como a obtenção de plantas homogêneas (uniformidade de plantios), o controle de qualidade dos produtos, e o maior aproveitamento de combinações genéticas (Islam, Hui e Wei, 2023).

A cultura de tecidos vegetais é uma importante técnica que permite o cultivo e a multiplicação de células, tecidos e órgãos vegetais, em condições controladas e assépticas, em escala massal, de forma rápida e homogênea (Rai *et al.*, 2022; Ruscitti, 2023). É uma ferramenta biotecnológica que pode agregar valor e contribuir para a expansão e valorização das plantas, através da propagação massal de genótipos superiores (Ahn *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2021). Apresentam como vantagens a propagação de plantas com dificuldades ou impossibilidade de se propagarem pelos métodos convencionais, permite a produção contínua ao longo do tempo e em larga escala de indivíduos com patrimônio genético idêntico e livres de patógenos (Ruscitti, 2023). Destacando-se a embriogênese somática como uma importante via da cultura de tecidos aplicada à multiplicação de palmeiras.

A embriogênese somática (ES) é uma rota da morfogênese vegetal pelo qual células somáticas, em condições adequadas, se diferenciam de maneira direta ou indireta em embriões somáticos e posteriormente conduzem a formação de uma planta completa (Ferrari *et al.*, 2021). Ou seja, a formação de estruturas denominadas embriões somáticos, a partir de células não reprodutivas e sem fertilização, por meio de uma série ordenada de estágios morfo-fisiológicos característicos, que resultam na

obtenção de estruturas vegetais equivalentes a embriões zigóticos presentes nas sementes (Ruscitti, 2023; Hazubska-Przybył *et al.*, 2020).

Os embriões obtidos possuem o mesmo material genético das células de origem e, se devidamente desenvolvidos, apresentam uma estrutura bipolar típica, com ápices de broto e raiz, que germinam e crescem formando plântulas convencionais. (Hazubska-Przybył *et al.*, 2020). A ES envolve a totipotência celular, ou seja, a capacidade de uma célula somática nucleada de iniciar uma nova via morfológica rumo ao desenvolvimento de embriões e depende da plasticidade celular para reprogramar a expressão gênica e os processos celulares que levam ao desenvolvimento de embriões somáticos, através de uma série de estágios de desenvolvimento semelhantes aos que ocorrem na embriogênese zigótica (Feher *et al.*, 2003; Ferrari *et al.*, 2021).

Esta expressão morfogênica pode ocorrer de forma direta ou indireta. Na embriogênese somática direta, os embriões somáticos se desenvolvem diretamente no tecido do explante. A embriogênese somática indireta ocorre a partir de células que necessitam de rediferenciação antes de poderem expressar competência e, como consequência, a formação de calos precede a formação dos embriões (Vasic *et al.*, 2001; Ramírez-Mosqueda, 2022).

A ES é reconhecida por ter uma abordagem ideal para propagação clonal em massa associada ao melhoramento genético, para espécies perenes e de ciclo muito longo (Karyanti *et al.*, 2021). A submissão de células, tecidos ou órgãos vegetais às condições de estresse bióticos, abióticos, bem como à incorporação de auxinas sintéticas constituem procedimentos que permitem a indução de competência, levando à embriogênese somática (Pais *et al.*, 2019).

Todavia, a ES apresenta algumas limitações para a maioria das espécies, especialmente em função do genótipo, das condições de indução, do número de embriões produzidos, da maturação e da conversão, entre outros fatores que comprometem o uso sistemático da embriogênese somática para fins comerciais (Pais *et al.*, 2019). A definição de protocolos eficientes, capazes de gerar um grande número de plantas normais, com alta taxa de sobrevivência e qualidade até sua implantação no campo, ainda representa uma lacuna para muitas espécies ou genótipos.

2.3. Embriogênese somática de *E. guineensis*

A embriogênese somática é considerada uma técnica promissora e eficiente para a multiplicação de genótipos elite de *E. guineensis* (Sulaksono *et al.*, 2024; Saptari *et al.*, 2024). Além disso, tem sido reconhecida como uma abordagem ideal para a propagação clonal em massa associada ao melhoramento genético, particularmente para espécies perenes e de ciclo longo (Pais, 2019).

Nessa espécie o processo de embriogênese somática ocorre indiretamente, através da formação de uma massa proembriogênica, seguida por sua multiplicação, que se diferencia para formar embriões somáticos (Carvalho, 2009). No dendê, a indução à embriogênese somática pode ser obtida a partir de diferentes estruturas vegetais, como segmentos de raiz, folhas imaturas e inflorescências imaturas (Vilela *et al.*, 2019; Pádua *et al.*, 2013; Jayanthi *et al.*, 2015).

Os reguladores de crescimento vegetal, particularmente o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e o picloram, são essenciais nesse processo (Pádua *et al.*, 2013; Yusnita; Hapsoro, 2011). Outros reguladores de crescimento, como o ácido naftalenoacético (ANA), o ácido giberélico (GA₃) e a benzilaminopurina (BA), também são utilizados nas diferentes fases da embriogênese somática nessa planta (Sulaksono *et al.*, 2024; Aberlenc-Bertossi; Noiro; Duval, 1999; Saptari *et al.*, 2024). Além disso, poliaminas têm sido comumente empregadas na embriogênese somática da espécie, com ênfase especial na putrescina (Corrêa *et al.*, 2015; Rajesh *et al.*, 2003).

Os meios de cultura direcionados para a indução da embriogênese somática são suplementados com altas concentrações de auxina. A posterior multiplicação de calos e regeneração de embriões somáticos é alcançada mediante a redução dos níveis de auxina ou sua completa remoção, bem como pelo acréscimo de outros reguladores de crescimento, tais quais as citocininas, o ácido abscísico e as poliaminas (Corrêa *et al.*, 2015; Parthasarathy, U.; Parthasarathy, A.; Karun, 2001). Apesar da vastidão de protocolos disponíveis em revistas e artigos publicados (Tabela 1), vários fatores podem interferir nos mecanismos envolvidos na embriogênese somática do dendê, tornando a reprodutibilidade dos protocolos desafiadora, portanto permanecendo incertezas quanto aos melhores procedimentos.

Tabela 1 - Estudos recentes de embriogênese somática de *Elaeis guineensis*.

Fase	Explante	Meio de cultura	Resposta	Referência
Indução	Primórdio foliar	Meio Y3 + Picloram ou 2,4-D	1,0 mg L ⁻¹ de picloram permite a formação de calos com maior potencial embriogênico.	Pádua <i>et al.</i> , 2013.
Indução	Primórdio radicular	Meio Y3 + diferentes reguladores	1,0 mg L ⁻¹ de picloram permite melhores resultados.	Vilela <i>et al.</i> , 2019.
Indução	Primórdio foliar	Meio MS + 2,4-D + Carvão ativado	Maiores concentrações de 2,4-D (450 µM) + carvão ativado permite melhores respostas.	Yusnita e Hapsoro, 2011.
Indução	Primórdio foliar	Meio MS + ANA + 2,4-D	Melhores respostas encontradas utilizando 6 mg L ⁻¹ de ANA + 0,5 mg L ⁻¹ de 2,4-D.	Sulaksono <i>et al.</i> , 2024.
Indução e multiplicação	Primórdio foliar de 32 genótipos superiores	Meio Y3	Ocorrência de controle genético na formação e multiplicação de linhagens embriogênicas, sendo genótipo-dependentes.	Corrêa <i>et al.</i> , 2015.
Indução a aclimatização	De primórdios foliares a mudas clonais	Meio Y3 modificado + Putrescina	Putrescina pode ser uma alternativa ao uso de citocininas, reduzindo variações somaclonais. Além disso, a resposta a embriogênese somática é genótipo-dependente.	Corrêa <i>et al.</i> , 2016.

3. REFERÊNCIAS

- ABERLENC-BERTOSSI F.; NOIROT M.; DUVAL Y. BA enhances the germination of oil palm somatic embryos derived from embryogenic suspension cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v. 56, n. 1, p. 53–57, 1999. DOI: 10.1023/A:1006241215717
- AGELE, S. O. *et al.* Oil palm-based cropping systems of the humid tropics: Addressing production sustainability, resource efficiency, food security and livelihood challenges. In: ***Elaeis guineensis***. IntechOpen, 2022. DOI: 10.5772/intechopen.98257
- AHN, C. H. *et al.* A clonal propagation system for Atlantic white cedar (*Chamaecyparis thyoides*) via somatic embryogenesis without the use of plant growth regulators. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 130, p. 91-101, 2017. DOI: 10.1007/s11240-017-1206-7
- AMOANIMAA-DEDE, H. *et al.* Growth regulators promote soybean productivity: a review. **PeerJ**, v. 10, p. e12556, 2022. DOI: 10.7717/peerj.12556
- ARIMARSETIOWATI, R. *et al.* Regeneration and development of *Coffea arabica* L. plants through indirect somatic embryogenesis. **Coffee Science-ISSN 1984-3909**, v. 18, p. e182078-e182078, 2023. DOI: 10.25186/v18i.2078
- ARLI, N. M.; NOLI, Z. A.; IDRIS, M. The application of plant growth regulators in propagation of dendrobium orchid with thin cell layer (TCL) technique: a review. **Int J Prog Sci Technol**, v. 39, n. 2, p. 416, 2023. DOI: 10.52155/ijpsat.v39.2.5505
- BAKEWELL-STONE, P. *Elaeis guineensis* (African oil palm). **PlantwisePlus Knowledge Bank, Species Pa**, 2022. DOI: 10.1079/cabicompendium.20295
- CARVALHO M. **Embriogênese Somática a Partir de Folhas Imaturas e Flores Desenvolvidas *in vitro* de Dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.)**. Tese de doutorado em Fitotecnia. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2009.
- CORLEY R. H. V.; TINKER P. B. **The oil palm**, 4th edn. Blackwell Science, Oxford, 2003. DOI: 10.1002/9780470750971

CORLEY, R.H.V.; TINKER, P. B. **The oil palm** 5th ed. Oxford: Wiley Blackwell, 2015. 692p. DOI: 10.1002/9781118953297

CORRÊA T. R. *et al.* Accelerated in vitro propagation of elite oil palm genotypes (*Elaeis guineensis* Jacq.) by substituting cytokinin with putrescine. **African Journal of Biotechnology**. v. 15, n. 50, p. 2767-2775, 2016. DOI: 10.5897/AJB2016.15670

CORRÊA T. R. *et al.* Estimation of genetic parameters for in vitro oil palm characteristics (*Elaeis guineensis* Jacq.) and selection of genotypes for cloning capacity and oil yield. **Industrial Crops and Products**. v. 77, p. 1033-1038, 2015. DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.09.066

DIAS, J. M. M. *et al.* Propagação da mangueira. In: ROZANE, D. E. *et al.* **Manga – Produção Integrada, Industrialização e Comercialização**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. p. 79-134, 2005.

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C. **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005, 221 p.

FAO Database FAOSTAT. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data>. (aceso em 01 de maio de 2025).

FEHER, A.; PASTERNAK, T. P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant cell, tissue and organ culture**, v. 74, p. 201-228, 2003. DOI: 10.1023/A:1024033216561

FERRARI, I. F. *et al.* Comparative ontogenesis of *Coffea arabica* L. somatic embryos reveals the efficiency of regeneration modulated by the explant source and the embryogenesis pathway. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 57, p. 796-810, 2021. DOI: 10.1007/s11627-021-10200-5

HAKIM, L. *et al.* Season, basal media and plant growth regulators effect in wood plant *in vitro* propagation: a comprehensive review. In: **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. IOP Publishing, 2022. p. 012051. DOI: 10.1088/1755-1315/1115/1/012051

HAZUBSKA-PRZYBYŁ, T. *et al.* Different roles of auxins in somatic embryogenesis efficiency in two *Picea* species. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 9, p. 3394, 2020. DOI: 10.3390/ijms21093394

ISLAM, Saiful; HUI, Ma; WEI, Hunag. Mechanisms of Plant Reproduction: A Comparative Analysis of Sexual and Asexual Methods in Various Plant Species. **Australian Herbal Insight**, v. 6, n. 1, p. 1-5, 2023. DOI: 10.25163/ahi.619953

JAYANTHI M. *et al.* *In vitro* somatic embryogenesis and plantlet regeneration from immature male inflorescence of adult dura and tenera palms of *Elaeis guineensis* (Jacq.). **Springer Plus**. 2015;4:1-7. DOI: 10.1186/s40064-015-1025-4

KARYANTI, K. *et al.* Proliferation of oil palm (*Elaeis Guineensis* Jacq.) embryogenic callus with repeated subcultures in liquid medium. **Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia (JBBI)**, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2021. DOI: 10.29122/jbbi.v8i1.4715

LIN, H. C. *et al.* Transcriptome analysis during somatic embryogenesis of the tropical monocot *Elaeis guineensis*: evidence for conserved gene functions in early development. **Plant Molecular Biology**, v. 70, p. 173-192, 2009. DOI: 10.1007/s11103-009-9464-3

MAMATHA, M. Activated Carbon as an Adsorbent: A Review. **International Journal For Multidisciplinary Research**, v. 5, n. 4, 18 ago. 2023. DOI: 10.36948/ijfmr.2023.v05i04.5478

MARTINS, J. P. R. *et al.* *In vitro* rooting of *Quercus robur*, activated charcoal vs. exogenous auxin: a morphophysiological approach. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 156, n. 1, p. 24, 2024. DOI: 10.1007/s11240-023-02656-7

MÁXIMO, W. P. F. *et al.* Multiplication and *in vitro* rooting of *Handroanthus impetiginosus* (Mart. Ex DC.) Mattos. **Ciência Florestal**, v. 30, n. 3, p. 658-668, 2020. DOI: 10.5902/1980509827012

MAYES, S. The history and economic importance of the oil palm. In: ITHNIN, M., KUSHAIRI, A. **The Oil Palm Genome**. Compendium of Plant Genomes **The Oil Palm Genome**, Springer, p. 1-8, 2020. DOI: 10.1007/978-3-030-22549-0_1

MURPHY, D. J.; GOGGIN, K.; PATERSON, R. R. M. Oil palm in the 2020s and beyond: challenges and solutions. **CABI agriculture and bioscience**, v. 2, p. 1-22, 2021. DOI: 10.1186/s43170-021-00058-3

NAIR, K. P. Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacquin). In: **Tree Crops: Harvesting Cash from the World's Important Cash Crops**, p. 249-285, 2021. DOI: 10.1007/978-3-030-62140-7_7

OKOLO, C. C. *et al.* The oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq): nature's ecological endowment to eastern Nigeria. **Agro-Science**, v. 18, n. 3, p. 48-57, 2019. DOI: 10.4314/as.v18i3.9

PÁDUA M. S. *et al.* Induction and characterization of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) pro-embryogenic masses. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**. v. 85, p. 1545-1556, 2013. DOI: 10.1590/0001-37652013107912

PAIS, M. S. Somatic embryogenesis induction in woody species: the future after OMICs data assessment. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 1-18, 2019. DOI: 10.3389/fpls.2019.00240

PARTHASARATHY U.; PARTHASARATHY V. A.; KARUN A. Oil palm. **Biotechnology of Horticultural Crops**. v. 1, p. 595-608, 2001.

PASTERNAK, T. P.; STEINMACHER, D. Plant growth regulation in cell and tissue culture *in vitro*. **Plants**, v. 13, n. 2, p. 327, 2024. DOI: 10.3390/plants13020327

PAULINO, M. A. P. *et al.* Desenvolvimento *in vitro* de *Cyrtopodium Cachimboense* I. C. Menezes em diferentes níveis de sacarose. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 2, p. 18844-18860, 2021. DOI: 10.34117/bjdv7n2-500

RAI, A. C. *et al.* (Ed.). **Advances in Plant Tissue Culture: Current Developments and Future Trends**. Academic Press, 2022.

RAJESH M. K. *et al.* Plant regeneration from embryo-derived callus of oil palm—the effect of exogenous polyamines. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v. 75, p. 41-47, 2003. DOI: 10.1023/A:1024679910085

RAMÍREZ-MOSQUEDA, M. A. Overview of somatic embryogenesis. **Somatic Embryogenesis: Methods and Protocols**, p. 1-8, 2022. DOI: 10.1007/978-1-0716-2485-2_1

REDDY, M. T. *et al.* Indigenous traditional knowledge on health and equitable benefits of oil palm (*Elaeis spp.*). **Open Access Library Journal**, v. 6, n. 1, p. 1-25, 2019. DOI: 10.4236/oalib.1105103

RUSCITTI, M. F. Fundamentos de la micropropagación en plantas. In: GERGOFF, G. E. G.; RUSCITTI, M. F.; GIMENEZ, D. O. **Introducción a la propagación vegetal**. Libros de Cátedra, 2023, cap. 10, p. 241 – 261.

SANTOS, M. Á. S. dos *et al.* Aplicações da cultura de tecidos vegetais em plantas medicinais da Amazônia: uma revisão. **Ciências ambientais na Amazônia**, p. 77. 2021. DOI: 10.29327/546273.1-6

SAPTARI, R. T. *et al.* Enhancing the regeneration of TIS-derived somatic embryos of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) with CaCl₂ and GA₃. In: **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. IOP Publishing, 2024. p. 012005. DOI: 10.1088/1755-1315/1308/1/012005

SHARMA, G. *et al.* Activated carbon as superadsorbent and sustainable material for diverse applications. **Adsorption Science & Technology**, v. 2022, p. 4184809, 2022. DOI: 10.1155/2022/41848

SIDIK, N. J. *et al.* A Mini Review of Plant Tissue Culture: The Role of Media Optimization, Growth Regulators in Modern Agriculture, Callus Induction and the Applications. **AUIQ Complementary Biological System**, v. 1, n. 2, p. 96-109, 2024. DOI: 10.70176/3007-973X.1019

SOMMERBURG, O. *et al.* Supplementation with red palm oil increases β -carotene and vitamin A blood levels in patients with cystic fibrosis. **Mediators of inflammation**, v. 2015, n. 1, p. 817127, 2015. DOI: 10.1155/2015/817127

SULAKSONO G. *et al.* Effect of media and plant growth regulator on proliferation of somatic embryogenic callus of oil palm (*Elaeis gueneensis* Jacq.). **Agrivita: Journal of**

Agricultural Science. v. 46, n. 2, p. 367-379, 2024. DOI: 10.17503/agrivita.v46i2.4234

VASIC, D.; ALIBERT, G.; SKORIC, D. Protocols for efficient repetitive and secondary somatic embryogenesis in *Helianthus maximiliani* (Schrader). **Plant Cell Reports**, v. 20, p. 121-125, 2001. DOI: 10.1007/s002990000291

VILELA M. S. P. *et al.* Histological analysis of indirect somatic embryogenesis induced from root explants of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq). **Revista árvore**. v. 43, p. e430106, 2019. DOI: 10.1590/1806 90882019000100006

WANG, X. *et al.* Current achievements and future challenges of genotype-dependent somatic embryogenesis techniques in *Hevea brasiliensis*. **Forests**, v. 14, n. 9, p. 1891, 2023. DOI: 10.3390/f14091891

YUSNITA Y.; HAPSORO D.W. I. In vitro callus induction and embryogenesis of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) from leaf explants. **HAYATI Journal of Biosciences**. v. 18, n. 2, p. 61-65, 2011. DOI: 10.4308/hjb.18.2.61

CAPÍTULO 1

**Efeito das auxinas na multiplicação e diferenciação de calos embriogênicos de
Elaeis guineensis Jacq. (Arecaecae)**

RESUMO

Elaeis guineensis Jacq. é uma palmeira oleaginosa perene, com importância econômica, considerada uma das espécies mais importantes para a indústria de óleo vegetal comestível. Em ciclos sucessivos de multiplicação tem-se uma redução da capacidade de divisão celular, portanto se faz necessário a busca por alternativas que promovam o prolongamento da competência embriogênica, sendo as auxinas primordiais nesta função. Este estudo teve como objetivo avaliar a influência de diferentes concentrações das auxinas ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e ácido indol-3-acético (AIA) na capacidade de multiplicação e diferenciação de linhagens embriogênicas de *E. guineensis*. Calos friáveis foram inoculados em placas de Petri contendo 30 mL de meio de cultura Y3 modificado, acrescidos de 2,4-D (0, 9 e 18 μM) e AIA (0, 28,43 e 56,86 μM). Para a multiplicação de calos embriogênicos, a presença de 2,4-D é fundamental, enquanto sua ausência é necessária para formação de embriões somáticos. A presença de 2,4-D, está diretamente associada à sinalização para divisão celular e sua retirada potencializa a diferenciação em embriões somáticos. A multiplicação nas condições convencionais, com a utilização de 9 μmol de 2,4-D + 28,43 μmol de AIA, possibilitou a obtenção de calos embriogênicos de maior qualidade.

Palavras-chave: ácido indol-3-acético, 2,4-diclorofenoxiacético, Embriogênese somática, Palma de óleo, calogênese.

ABSTRACT

Elaeis guineensis Jacq. is a perennial oilseed palm of great economic importance, considered one of the most important species for the edible vegetable oil industry. In successive multiplication cycles, there is a reduction in cell division capacity; therefore, it is necessary to seek alternatives that promote the prolongation of embryogenic competence, with auxins being essential for this capacity. The present study aimed to evaluate the influence of different concentrations of the auxins indole-3-acetic acid (IAA) and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) on the multiplication and differentiation capacity of embryogenic lines of *E. guineensis*. Friable calli were inoculated in Petri dishes containing 30 mL of modified Y3 culture medium

supplemented with 2,4-D and IAA at concentrations of 0, 9, and 18 μM and 0, 28.43, and 56.86 μM , respectively. For the multiplication of embryogenic calli, the presence of 2,4-D is essential, whereas its absence is required for somatic embryo formation. The use of 9 μmol 2,4-D + 28.43 μmol IAA enabled the production of embryogenic calli of superior quality. The presence of 2,4-D is directly associated with signaling for cell division, while its removal enhances differentiation into somatic embryos.

Keywords: Indole-3-acetic acid, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, Somatic embryogenesis, Oil palm, Callogenesis.

1. INTRODUÇÃO

Elaeis guineensis é uma palmeira oleaginosa perene, conhecida popularmente como Palma de óleo ou Dendê, é pertencente à família Arecaceae nativa do continente africano (Nair, 2021; Bakewell-Stone, 2022). Possui grande importância econômica, utilizada nas indústrias de cosméticos, alimentícia, farmacêutica e para a produção de biocombustíveis (Agele *et al.*, 2022; Bakewell-Stone, 2022). Considerada mundialmente uma das espécies mais importantes para a indústria de óleo vegetal comestível (Bakewell-Stone, 2022).

A cultura de tecidos vegetais destaca-se na biotecnologia agrícola, pois proporciona uma abordagem confiável e eficiente para a propagação e conservação de espécies vegetais (Sidik *et al.*, 2024). Permite, sob condições assépticas, uma produção massal de plantas geneticamente estáveis, idênticas e superiores, isenta de patógenos, de forma uniforme e independentes das condições ambientais ou sazonais (Sidik *et al.*, 2024). Diferentes fatores são fundamentais para o desenvolvimento *in vitro* das plantas, como a utilização de sais e reguladores de crescimento.

Os reguladores de crescimento de plantas são compostos orgânicos que atuam como mensageiros químicos e desempenham um papel primordial na determinação das vias de desenvolvimento das células e tecidos vegetais (Hakim *et al.*, 2022; Amoanimaa-Dede *et al.*, 2022; Arli, Noli e Idris, 2023). Em pequenas concentrações estimulam, inibem ou regulam processos fisiológicos nas plantas, como na morfogênese e no crescimento nos cultivos de células, tecidos e órgãos. De forma que controlam a estrutura e função celular, resultando no aumento da divisão,

expansão e diferenciação celular (Amoanimaa-Dede *et al.*, 2022; Arli, Noli e Idris, 2023; Pasternak e Steinmacher, 2024).

A multiplicação de linhagens embriogênicas de *E. guineensis* é altamente eficiente, sendo possível com a utilização do meio de cultura Y3 (Eeuwens, 1976) modificado de multiplicação, adicionado de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e Ácido Indol-3-Acético (AIA). Todavia, em ciclos sucessivos de multiplicação tem-se uma redução da competência embriogênica, portanto se faz necessário a busca por alternativas que promovam o seu prolongamento.

Testes pilotos, demonstraram que a retirada de 2,4-D e AIA por um subcultivo (meio de cultura Y3 de regeneração), pode potencializar a taxa de multiplicação das linhagens embriogênicas, desde que recuperados os agregados que ainda não iniciaram o processo de diferenciação em embriões somáticos. Todavia, o aumento das concentrações das auxinas está associado a multiplicação de calos embriogênicos, enquanto sua redução ou ausência iniciam importantes rotas de diferenciação celular (Guleria *et al.*, 2021).

As auxinas, consideradas fatores chave na regulação do processo de morfogênese vegetal *in vitro*, estimulam a divisão, alongamento e diferenciação celular; e assim, controlam o desenvolvimento de brotações e sistema radicular, bem como na formação e na multiplicação de linhagens embriogênicas (Arli, Noli e Idris, 2023; Pasternak e Steinmacher, 2024).

O 2,4-D é uma pequena molécula sintética, considerada importante herbicida, amplamente utilizado na agricultura mundial. Pode atuar como uma auxina sintética, estrutural e funcionalmente análogo à auxina natural AIA, ou seja, biologicamente ativo como auxina nas plantas (Song, 2014; Costa *et al.*, 2020). Todavia as plantas não conseguem metabolizar esse herbicida fenoxiacético da mesma forma, que pode prejudicar materiais sensíveis, além disso possuem alta resistência a degradação natural (Song, 2014; Muselikova e Muralova, 2024). Desta forma, em altas concentrações, atua como herbicida; entretanto em menores concentrações, é capaz de imitar a auxina para promover a divisão e o alongamento celular permitindo importantes respostas na cultura de tecidos vegetais, como a formação de calos (Astutik *et al.*, 2022; Muselikova e Muralova, 2024).

O AIA, é o hormônio vegetal prevalente da classe das auxinas, regula importantes aspectos do crescimento e do desenvolvimento das plantas, naturalmente produzido pelas plantas e presente em maior abundância na natureza, reconhecido

por estimular diferentes processos de alongamento, expansão e divisão celular (Lien *et al.*, 2022; Dhale, Ankita e Rathod, 2023; Khong *et al.*, 2024). Permite a formação radicular, bem como a calogênese em elevadas concentrações (Souza *et al.*, 2022; Dhale, Ankita e Rathod, 2023).

Embora as auxinas sejam fundamentais na promoção da formação e multiplicação de linhagens embriogênicas, os resultados específicos podem variar de acordo com o tipo e concentração de auxina, bem como as condições do material vegetal (Hakim *et al.*, 2022). Visto que já existem protocolos para a multiplicação e diferenciação de linhagens embriogênicas de *E. guineensis*, que ainda não contemplam resultados satisfatórios em materiais submetidos a ciclos sucessivos de multiplicação, faz-se necessário a melhoria desses protocolos com o entendimento das auxinas nessas etapas. Diante disso, o presente trabalho, teve como objetivo avaliar a influência de diferentes concentrações das auxinas (2,4-D e AIA) na capacidade da multiplicação e diferenciação de linhagens embriogênicas de *Elaeis guineensis*, em calos friáveis de 8ª geração de multiplicação.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Material vegetal

O genótipo PL-06 é uma Progênie oriunda do cruzamento entre os materiais genéticos Deli e Lamé. Aos 9 anos de cultivo pode atingir uma altura média de 2,50 metros, com uma produção média de 11 cachos por planta pesando cerca de 19,35 kg cada, com um total de 281 frutos. Apresenta uma proporção de 88,85% de mesocarpo por fruto, 71,23% de matéria seca, 12,80% de fibra, potencial de óleo de 38,39 ml / kg.fruto⁻¹ e 7,70 L . planta⁻¹ (Acervo institucional). Para a obtenção e multiplicação dos explantes, calos friáveis do genótipo PL-06 foram inoculados em placas de Petri contendo 30 mL de meio de cultura Y3 modificado (Eeuwens, 1976), acrescido de 100 mg L⁻¹ de inositol, 100 mg L⁻¹ de arginina, 100 mg L⁻¹ de asparagina, 100 mg L⁻¹ de glutamina, 1.000 mg L⁻¹ de caseína, 30 g L⁻¹ de sacarose, , 9 µM de 2,4-D e 2,5 g L⁻¹ de phytigel, com pH ajustado para 5,7 ± 0,02. Após a autoclavagem por 20 minutos a 120°C, foram acrescidos ao meio de cultura, em capela de fluxo laminar, 1000 µM de putrescina e 28,43 µM de AIA.

2.2. Auxinas

Aos 60 dias de cultivo *in vitro*, calos friáveis do genótipo PL-06 de 8ª geração de multiplicação, oriundos de explantes foliares, foram utilizados como explantes. Em câmara de fluxo laminar, agregados de calos embriogênicos, contendo aproximadamente 0,3 cm de diâmetro (Figura 2), foram inoculados em placas de Petri contendo 30 mL de meio de cultura Y3 modificado (Eeuwens, 1976), previamente preparado e autoclavado, acrescido de 100 mg L⁻¹ de inositol, 100 mg L⁻¹ de asparagina, 100 mg L⁻¹ de arginina, 100 mg L⁻¹ de glutamina, 1.000 mg L⁻¹ de caseína, 30 g L⁻¹ de sacarose, 1000 µM de putrescina, 2,5 g L⁻¹ de phytigel, com pH ajustado para 5,7 ± 0,02 antes da autoclavagem. As auxinas 2,4-D (0, 9 e 18 µM) e AIA (0, 28,43 e 56,86 µM), foram adicionadas ao meio de cultura.

Foi adotado o delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 3², sendo 3 concentrações de 2,4-D e 3 concentrações de AIA, com 5 repetições, com 2 placas por unidade experimento e 6 grupos de agregados por placa de Petri, totalizando 60 agregados por tratamento.

2.3. Efeito residual

A designação efeito residual refere-se a avaliação da influência dos tratamentos realizados nos explantes iniciais, após retornar ao meio de cultura convencional para a multiplicação das linhagens embriogênicas de *E. guineensis*.

Para avaliar o efeito das concentrações de auxinas na otimização da multiplicação das linhagens embriogênicas, materiais vegetativos multiplicados *in vitro* nas condições descritas anteriormente foram utilizados como explantes (Figura 1).

Foi adotado o delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 3², sendo calos embriogênicos oriundos de 3 concentrações de 2,4-D e 3 concentrações de AIA, com 5 repetições e 2 placas por unidade experimental, contendo 6 agregados de calos embriogênicos por placa de Petri.

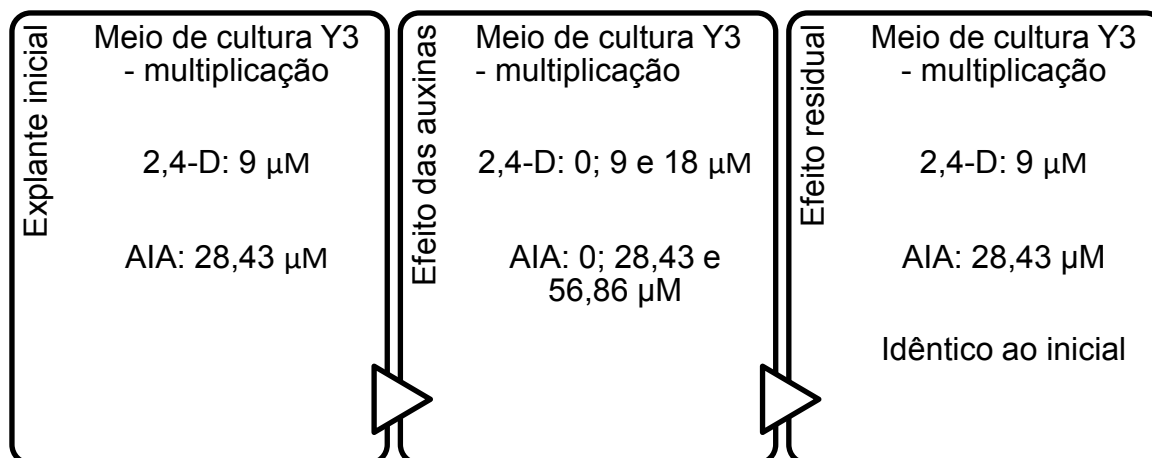


Figura 1 - Fluxograma do experimento de auxinas, em ordem cronológica da esquerda para direita, contendo: explante inicial, efeito das auxinas e efeito residual.

2.4. Coleta e análise de dados

Aos 45 dias de cultivo, foram avaliadas a taxa de multiplicação, através do diâmetro dos agregados, a coloração dos calos em escala de 0 a 100, onde 0 – branco, 50 – creme e 100 – amarelo (Figura 2A-C), aspecto dos calos em escala de 0 a 100, onde 0 – nodulares, 50 – intermediários e 100 – friáveis (Figura 2D-F), a oxidação em escala de 0 a 100, onde 0 – ausência de oxidação e 100 – presença de oxidação, percentual de calos friáveis, nodulares, amorfos e embriões somáticos.


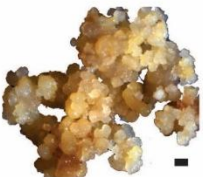
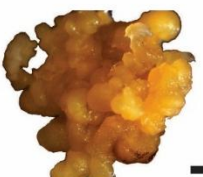
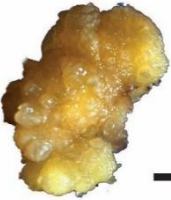


Classe	0: Branco/Nodulares	50: Creme/Intermediário	100: Amarelo/Friáveis
Coloração	(A) 	(B) 	(C) 
Aspecto	(D) 	(E) 	(F) 

Figura 2 - Classificação dos calos em relação ao padrão de cor e aspecto morfológico. Classificação da coloração dos calos (A-C), onde 0 – branco (A), 50 – creme (B) e 100 – Amarelo (C), e, classificação

do aspecto dos calos em escala de 0 a 100, onde 0 – nodulares (D), 50 – intermediários (E) e 100 – friáveis (F). Escala = 1 mm

Devido à grande uniformidade das estruturas produzidas no 1º subcultivo do experimento (Auxinas), fase contendo diferentes concentrações de 2,4-D e AIA acrescidos ao meio de cultura, variáveis como aspecto dos calos e percentual de calos friáveis e nodulares foram coletadas apenas na fase do efeito residual.

Para a análise de variância foi avaliada a normalidade dos resíduos pelo teste Shapiro-Wilk e a homogeneidade de variâncias pelo teste Bartlett. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância e de regressão polinomial utilizando o software R versão 4.2.3 (R Core Team, 2023) e o pacote ExpDes (Ferreira *et al.*, 2014). Para as variáveis coloração, formação e número de embriões somáticos do subcultivo de auxinas, foi utilizado, para a análise de variância, o modelo Kruskal-wallis, para posterior teste de Tukey.

2.5. Caracterização morfoanatômica

Para a caracterização estrutural, foram coletados agregados de todas as condições. As amostras foram fixadas em solução de formaldeído, ácido acético e álcool 50% (FAA50). Posteriormente, as amostras foram desidratadas em série etílica crescente e incluídas em resina acrílica (Historesin, Leica Instruments, Alemanha). Secções transversais com 5 µm de espessura foram obtidas em Micrótopo rotativo (Yidi, YD315), montadas em lâminas de vidro e coradas com azul de Toluidina (O'Brien e McCully 1981). As imagens foram capturadas utilizando um microscópio de luz (AX70TRF, Olympus Optical, Japão) equipado com sistema de captura de imagens (Axion Cam, Zeiss, Alemanha).

Para caracterização histoquímica, as lâminas foram coradas em xylydine ponceau (XP) para detecção de proteínas totais (Vidal, 1970), reagente lugol para detecção de grãos de amido (Johansen, 1940) e vermelho de rutênio para mucilagem ou pectina (Johansen, 1940). Todas as imagens foram capturadas com auxílio de câmera digital (Axion Cam, Zeiss, Alemanha) acoplada a fotomicroscópio (AX70TRF, Olympus Optical, Japão).

3. RESULTADOS

3.1. Auxinas

A variável diâmetro de calos, foi influenciada pela interação entre os reguladores de crescimento. Todavia, a taxa de oxidação, formação e número de embriões foram influenciadas pela concentração de 2,4-D. Enquanto a coloração dos agregados não diferiu significativamente para os fatores testados (Tabela 1).

Tabela 1 - Resultado da análise de variância para coloração, oxidação, formação e número de embriões e diâmetro dos calos das linhagens embriogênicas do genótipo PL-06 de *Elaeis guineensis* em função das concentrações de AIA e 2,4-D, cultivadas *in vitro*, aos 45 dias de cultivo.

Variável	Valor P			CV (%)
	2,4-D	AIA	2,4-D * AIA	
Coloração	0,1806 ^{ns}	0,0530 ^{ns}	0,1957 ^{ns}	10,24
Oxidação	1,7 x 10 ^{-6*}	0,7282 ^{ns}	0,4686 ^{ns}	36,03
Formação de embriões	6,2 x 10 ^{-5*}	0,6075 ^{ns}	0,0528 ^{ns}	56,32
Número de embriões	0,0017*	0,4325 ^{ns}	0,2491 ^{ns}	52,55
Diâmetro dos calos	7,9 x 10 ^{-11*}	0,1684 ^{ns}	0,04687*	10,43

CV: Coeficiente de variação; P: Probabilidade do valor P; *: P<0,05; ns: P≥0,05.

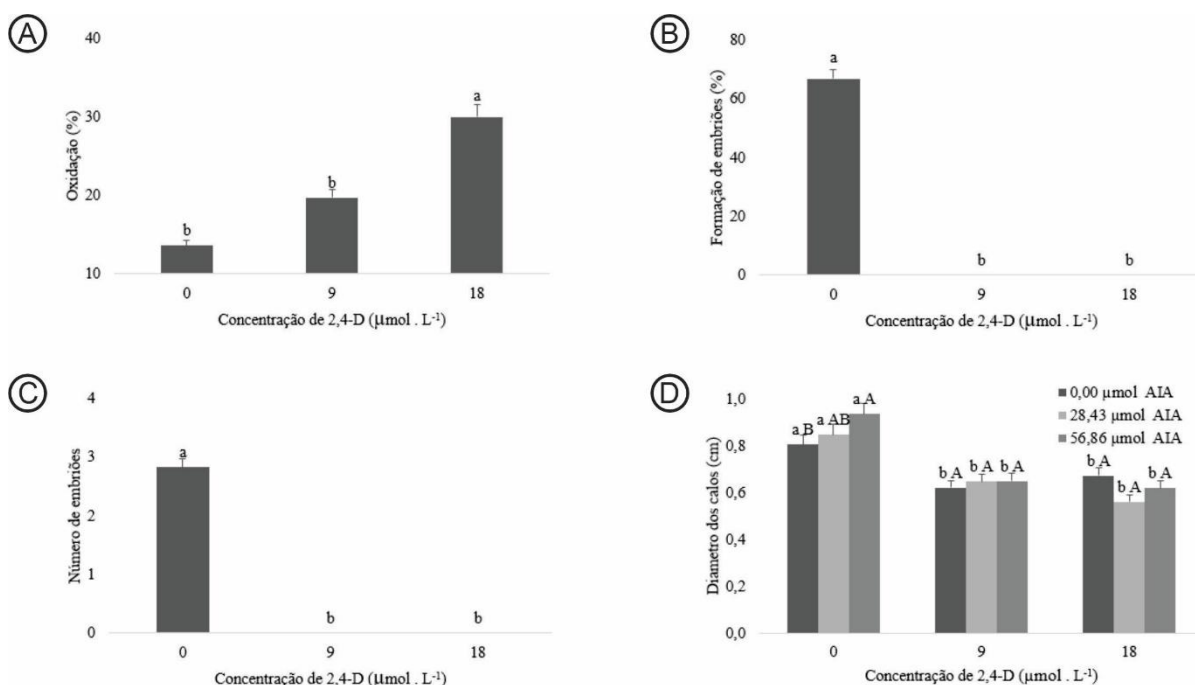


Figura 3 - Taxa de oxidação (A), formação (B), número de embriões (C) e diâmetro dos calos (D), para linhagens embriogênicas do genótipo PL-06 de *Elaeis guineensis* cultivadas *in vitro* em função de concentrações de 2,4-D e AIA. Letras minúsculas iguais não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey em nível de 95% de probabilidade para concentrações de 2,4-D, enquanto letras maiúsculas

iguais não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey em nível de 95% de probabilidade para concentrações de AIA.

Para a taxa de oxidação, maiores concentrações de 2,4-D proporcionaram seu aumento, com valores superiores em 18 μmol (Fig. 3A). Apenas na ausência de 2,4-D, obteve-se as respostas em formação e número de embriões (Fig. 3B-C). Já para o diâmetro dos agregados, em ausência de 2,4-D, a utilização de 56,86 μmol de AIA permitiu o maior aumento, todavia em 28,43 μmol não houve diferenças dos demais tratamentos (Fig. 3D). Ausência de 2,4-D foi possível a obtenção de agregados maiores (Fig. 3D).

3.2. Efeito residual

As variáveis oxidação, formação de embriões e aspecto dos calos, foram influenciadas pela interação entre os reguladores de crescimento. Entretanto, coloração, número de embriões, taxa de calos nodulares amarelo, friável creme, calos amorfos e diâmetro dos agregados foram influenciados apenas pela concentração de 2,4-D (Tabela 2).

Tabela 2 - Resultado da análise de variância para coloração, oxidação, formação e número de embriões, aspecto dos calos, taxa de calos nodulares amarelo, friáveis creme e amorfos e diâmetro dos calos das linhagens embriogênicas do genótipo PL-06 de *Elaeis guineensis* em função dos explantes oriundos de diferentes concentrações de AIA e 2,4-D, cultivadas *in vitro*, aos 45 dias de cultivo.

Variável	Valor P			CV (%)
	2,4-D	AIA	2,4-D * AIA	
Coloração	$4,4 \times 10^{-10*}$	0,0715 ^{ns}	0,1408 ^{ns}	11,11
Oxidação	$3,0 \times 10^{-5*}$	0,9427 ^{ns}	0,0003*	27,38
Formação de embriões	$5,3 \times 10^{-5*}$	0,2900 ^{ns}	0,0424*	25,60
Número de embriões	0,0026*	0,6277 ^{ns}	0,3134 ^{ns}	49,75
Aspectos dos calos	$3,4 \times 10^{-9*}$	0,5421 ^{ns}	0,0395*	50,66
Nodular amarelo	0,0036*	0,1032 ^{ns}	0,1643 ^{ns}	39,53
Friável creme	$4,3 \times 10^{-12*}$	0,9946 ^{ns}	0,1214 ^{ns}	32,78
Calos amorfos	0,0021*	0,1035 ^{ns}	0,0966 ^{ns}	73,85
Diâmetro dos calos	$3,2 \times 10^{-14*}$	0,2443 ^{ns}	0,4755 ^{ns}	8,82

CV: Coeficiente de variação; P: Probabilidade do valor P; *: $P < 0,05$; ns: $P \geq 0,05$.

Para coloração a adição de 2,4-D favoreceu, com maior proporção de agregados de coloração creme a amarela intensa, não havendo diferenças significativas entre 9 ou 18 μmol (Figura 4A). As taxas de calos nodulares amarelos e

friáveis creme, apresentaram respostas similares entre si, com ocorrência superior em presença de 2,4-D, independente das concentrações (Figura 4B-C). Por outro lado, para número de embriões houve aumento na ausência de 2,4-D (Figura 4D). Quanto ao diâmetro dos agregados, sua redução foi acompanhada do aumento das concentrações de 2,4-D (Figura 4E).

Para taxa de oxidação, as concentrações 9 μmol de 2,4-D favoreceram menores valores, independente da dose de AIA. Ausência de 2,4-D, concentrações 56,86 μmol de AIA, permitem menores valores de oxidação, enquanto em maiores concentrações de 2,4-D (18 μmol), tem-se o inverso, menor taxa de oxidação em ausência de AIA (Figura 4F). No entanto, para aspecto dos calos, teve-se efeito do AIA apenas em 9 μmol de 2,4-D. Em altas concentrações de AIA, como 56,86 μmol , houve maior formação de estruturas mais nodulares. Por outro lado, a utilização de 2,4-D (9 ou 18 μmol) promoveu maior formação de calos embriogênicos, ou seja, agregados nodulares e friáveis (Figura 4G)

Para formação de embriões somáticos, a presença da auxina 2,4-D teve efeito antagônico, independente da presença de AIA. Em ausência de 2,4-D, altas concentrações de AIA (56,86 μmol), promovem uma menor formação de embriões (Figura 4H). A formação de calos amorfos, ocorreu apenas na ausência de 2,4-D, independente da concentração de AIA. Quanto ao efeito do AIA em ausência de 2,4-D, houve maior formação de estruturas amorfas no tratamento controle, ou seja, isento de reguladores de crescimento (Figura 4I).

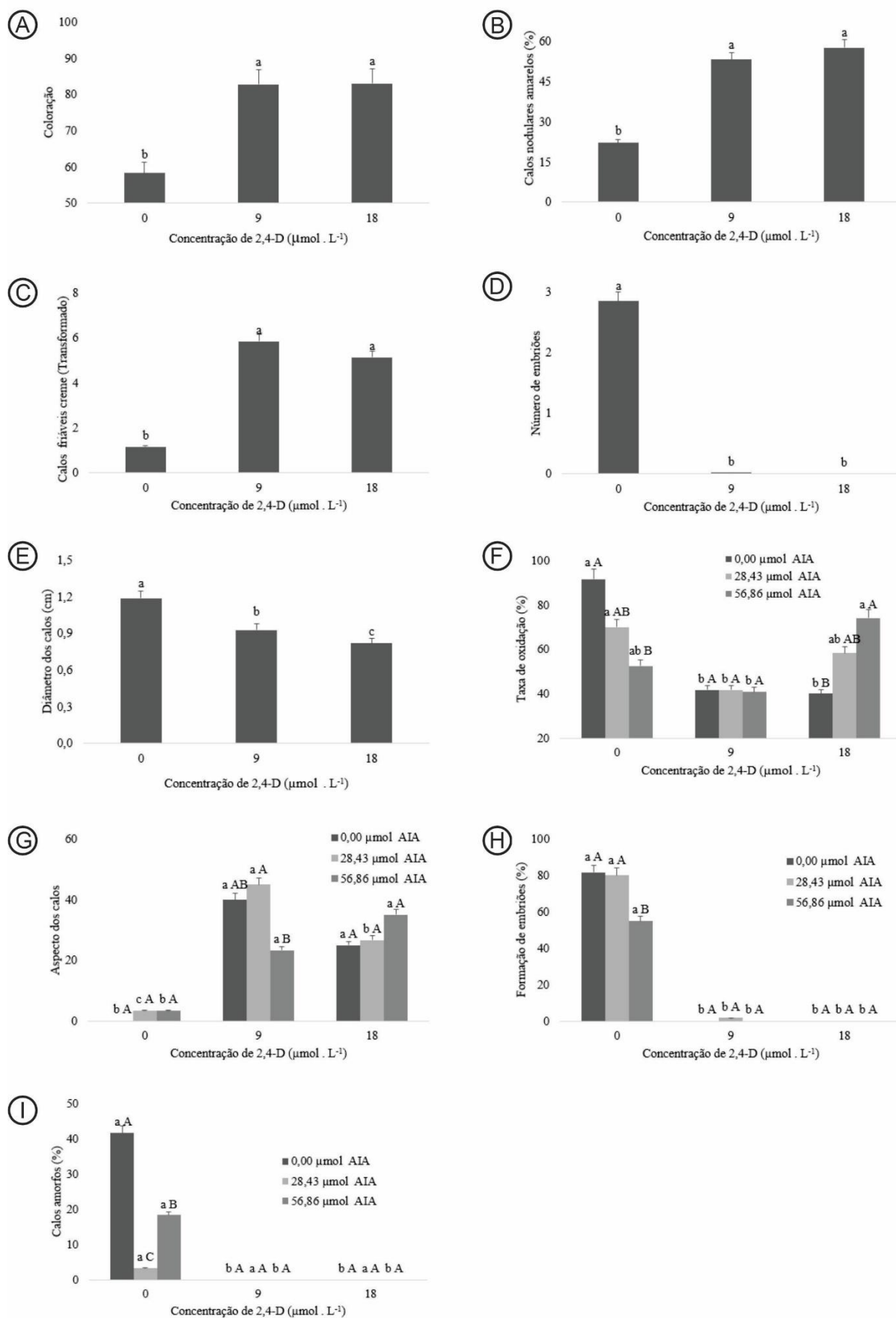


Figura 4 - Coloração (A), taxa de calos nodulares amarelos (B), creme friável (C), número de embriões (D), diâmetro dos calos (E), taxa de oxidação (F), aspecto dos calos (G), formação de embriões (H) e,

calos amorfos (I) para linhagens embriogênicas do genótipo PL-06 de *Elaeis guineensis* cultivadas *in vitro* em função de concentrações de 2,4-D e AIA. Letras minúsculas iguais não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey em nível de 95% de probabilidade para concentrações de 2,4-D, enquanto letras maiúsculas iguais não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey em nível de 95% de probabilidade para concentrações de AIA.

Além disso, em *E. guineensis* foi possível observar a formação de calos mistos, bem como a variação de aspecto dos calos em mesma condição e tratamento (Figura 5), demonstrando a versatilidade das estruturas com potencial embriogênico.

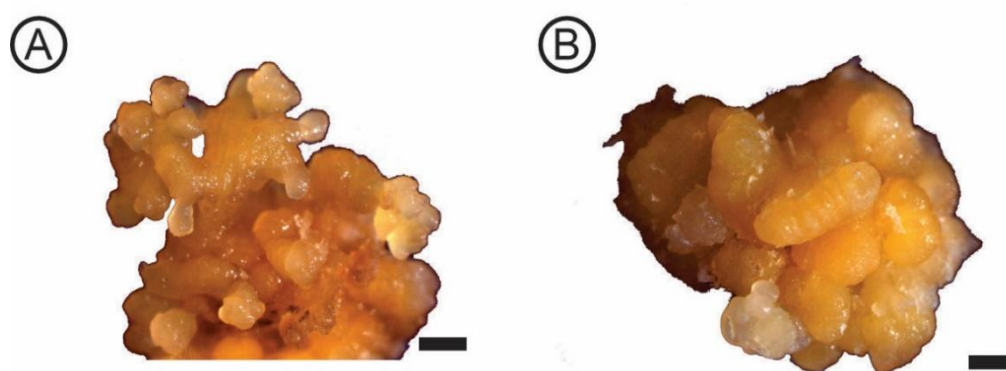


Figura 5 - Agregados mistos com formações de calos friáveis a partir de nodulares do genótipo PL-06 de *Elaeis guineensis* cultivadas *in vitro*, em função de concentrações de 2,4-D e AIA. Escala = 1mm.

3.3. Caracterização morfoanatômica

Os calos friáveis encontrados em *Elaeis guineensis*, são aglomerados celulares de coloração creme, encontrados em grupos soltos ou facilmente destacáveis, com células predominantemente homogêneas, pequenas e esféricas, de aspecto granuloso, com citoplasma denso, núcleo volumoso, acúmulo de reservas e com elevado espaço intercelular. Sugere-se que a reprogramação celular seguiu uma rota diferente, não havendo as mesmas características citológicas dos demais (Figura 6A-C e tabela 3).

Por outro lado, os calos compactos ou nodulares, são estruturas mais organizadas, de coloração amarelada, em grupos densos e de difícil separação, com células de formato alongado à esférico com baixa taxa de divisão celular e menor espaço intercelular. Possuem evidentes zonações com histodiferenciação, com centros meristemáticos evidentes com corpos proteicos, e zonas periféricas mais vacuolizadas e com acúmulo de reservas (Figura 6D-F e tabela 3).

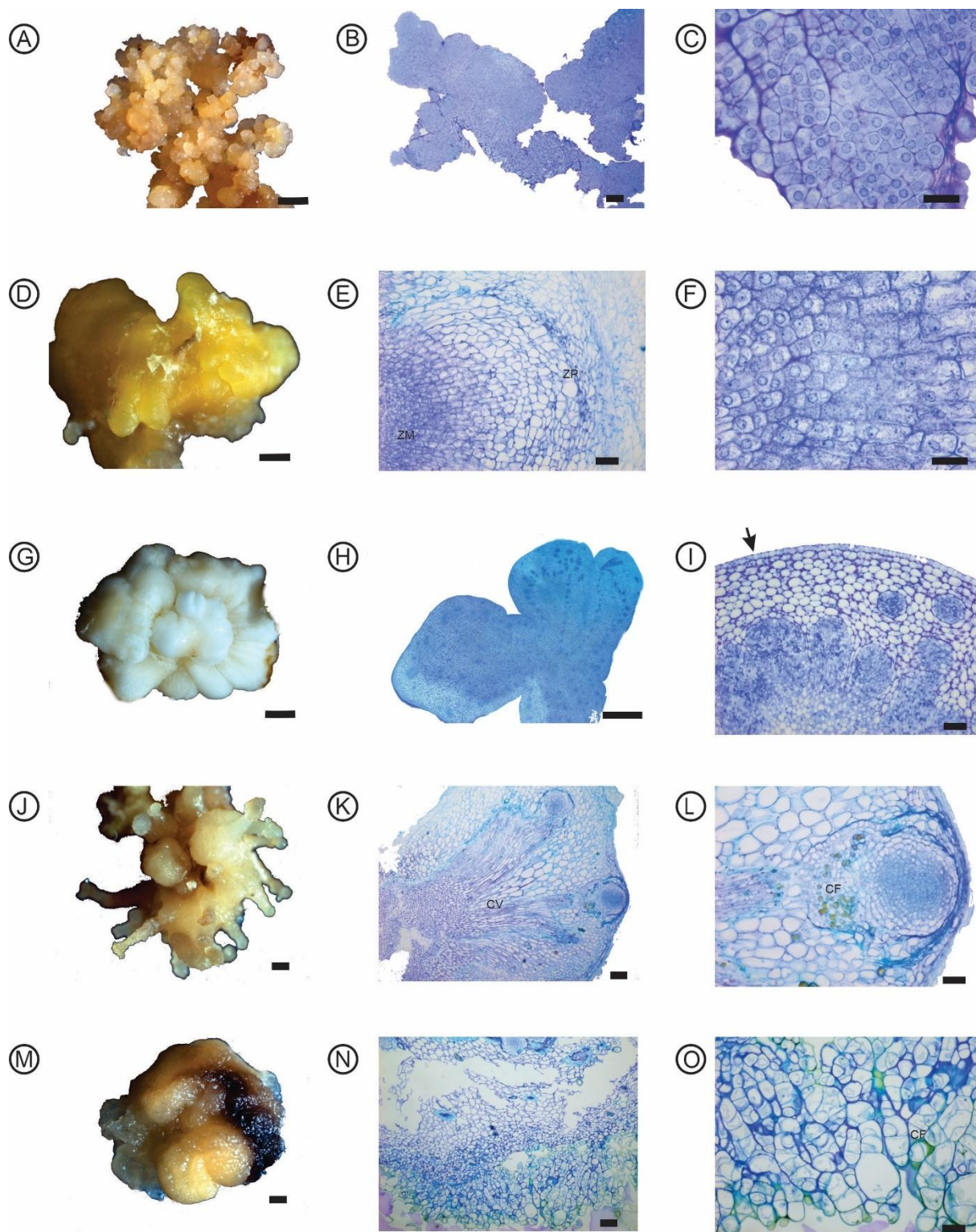


Figura 6 - Caracterização morfoanatômica dos agregados: calos friáveis (A – C), calos nodulares (D – F), embriões fusionados (G – I), calos amorfos (J – L) e calos oxidados (M – O). Escala: A e G = 2mm; D, J e M = 1mm; H = 1000 μ m; B, K e N = 100 μ m; E, I, L e O = 50 μ m; C e F = 20 μ m. ZM: Zona meristemática; ZP: Zona periférica; CV: Conexões vasculares; CF: Compostos fenólicos.

Os embriões formados são estruturas embriogênicas disformes e fusionadas de coloração branca, interconectadas ao explante, com acúmulo de reservas de amido, sem a presença de corpos proteicos e com formação de protoderme bem definida com células alongadas (Figura 6G-I e tabela 3).

Enquanto, os calos denominados como amorfos referem-se à formação de estruturas que apresentaram células mais alongadas, com processos similares à formação de raízes adventícias, com conexões vasculares entre os agregados e as estruturas em formação, além de acúmulo de compostos fenólicos e corpos protéicos (Figura 6J-L e tabela 3). Destaca-se uma possível rota organogênica, devido à continuidade vascular em todo o material, característica ausente em calos ou embriões somáticos. Já os materiais oxidados, apresentam ausência de características meristemáticas e elevado acúmulo de compostos fenólicos, além de alta plasticidade celular (Figura 5M-O e tabela 3).

Tabela 3 - Resultado da análise de histoquímica das estruturas obtidas das linhagens embriogênicas do genótipo PL-06 de *Elaeis guineensis* em função das concentrações de AIA e 2,4-D, cultivadas *in vitro*, aos 45 dias de cultivo *in vitro*.

Estrutura	Proteínas (XP)	Amido (Lugol)	Pectina (Vermelho de rutênio)
Calo friável	-	+	-
Calo nodular	+	+	-
Embrião disforme	-	+	-
Calo amorfo	+	-	-
Calo oxidado	-	-	-

(+) Reação positiva; (-) Reação negativa

4. DISCUSSÃO

A utilização de 2,4-D, é fundamental à obtenção de agregados embriogênicos (nodulares e friáveis), não diferindo quanto a concentração. Por outro lado, o efeito do AIA é dependente da concentração de 2,4-D, em 9 μmol da auxina sintética, a utilização de 28,43 μmol de AIA, favoreceu a maior obtenção de calos friáveis, entretanto, ao dobrar esta concentração obteve-se estruturas predominantemente nodulares.

Calos embriogênicos convencionalmente são classificados como compactos ou friáveis, sendo a capacidade de regeneração celular variada para estas estruturas a

depender do material genético (Lysenko *et al.*, 2023; Talitha *et al.*, 2023). A cor e a textura do calo são importantes indicadores de qualidade dos agregados, bem como de sua capacidade de divisão e diferenciação (Lysenko *et al.*, 2023; Ardhani, Maharijaya e Rahayu, 2024).

Os calos compactos possuem aparência nodular, organizada e coloração amarela, com pouco espaço intracelular, massas densas de difícil separação (Silva, Luis e Scherwinski-Pereira, 2012; Lysenko *et al.*, 2023; Talitha *et al.*, 2023). São compostos por células arredondadas a alongadas, que contém uma fina camada de citoplasma, membrana vacuolar frequentemente com rupturas, delaminação do citoplasma da parede celular, possuem direcionamento de organelas (incluindo cloroplastos), com um número reduzido ou ausência de mitocôndrias (Lysenko *et al.*, 2023; Bisht *et al.*, 2024).

Enquanto os calos friáveis, são estruturas macias de coloração creme e maior espaço intracelular, de fácil separação (Silva, Luis e Scherwinski-Pereira, 2012; Talitha *et al.*, 2023). São compostos por células de formato esférico, que possuem uma espessa camada de citoplasma separada do vacúolo por uma membrana, contendo um número significativo de mitocôndrias, sem organelas direcionadas ou cloroplastos (Lysenko *et al.*, 2023; Bisht *et al.*, 2024). Enquanto calos amorfos, são estruturas arredondadas com projeções celulares alongadas e maior taxa de oxidação.

Importante destacar a interação entre os diferentes tipos de calos embriogênicos (compactos e friáveis), no qual em resposta ao estresse, tem-se a transição entre suas morfologias (Figura 5). Em soja, calos compactos apresentaram-se dispostos em uma camada concêntrica ao redor do núcleo de calo friável (Lysenko *et al.*, 2023).

Como observado, na ausência de 2,4-D, ocorreu a formação de maiores calos agregados. Estes calos, além de ocuparem uma área maior da placa de Petri, geralmente se diferenciam em embriões somáticos e calos amorfos.

A obtenção de calos amorfos, está associada a geração de embriões somáticos em baixas concentrações de auxinas no 1º subcultivo, seguido de inoculação em concentrações médias de auxina no 2º subcultivo (9 µmol de 2,4-D e 28,43 µmol de AIA), desta forma tem-se nova diferenciação, com formação de alongamentos celulares e estagnação do processo de desenvolvimento dos embriões somáticos.

As auxinas possuem um importante papel para aquisição de competência e determinação de destino celular, necessário para a especificação, diferenciação e iniciação de células e estruturas vegetais (Chandler, 2011; Guleria *et al.*, 2021). Atua como um estímulo na divisão e alongamento celular, permite o desenvolvimento de gemas, raízes adventícias e formação de calos (Ma *et al.*, 2022; Sosnowski, Truba e Vasileva, 2023). Desempenha papéis críticos na determinação dos destinos regenerativos das células vegetais.

Na cultura de tecidos, o 2,4-D pode substituir o AIA como suplemento hormonal para o desenvolvimento celular normal em meios de cultura de células vegetais. (Costa *et al.*, 2022; Muselikova e Mouralova, 2024). Neste contexto, apresenta um papel essencial na formação e multiplicação de linhagens embriogênicas a partir de explantes foliares ou inflorescências imaturas (Ribeiro *et al.*, 2020; Astutik *et al.*, 2022). Em *Cocos nucifera* L. a adição de 300 μM 2,4-D permite a obtenção de calos embriogênicos a partir de inflorescências femininas imaturas (Jayarathna *et al.*, 2023).

Desta forma, a utilização de 9 μmol de 2,4-D, promove a obtenção de agregados predominantemente friáveis de coloração amarela, menor taxa de oxidação e pouca diferenciação em embriões ou calos amorfos. Com a adição de 18 μmol de 2,4-D, observou-se maior presença de estruturas nodulares amarelas, com maior taxa de oxidação e baixa multiplicação. Enquanto, o AIA promoveu maiores diferenças no aspecto dos calos e formação de embriões, sendo associada a concentração de 2,4-D, em 9 μmol da auxina sintética, a utilização de 28,43 μmol de AIA, favoreceu a obtenção de calos friáveis, porém ao dobrar a concentração de AIA houve a formação de estruturas majoritariamente nodulares.

5. CONCLUSÕES

A utilização de 9 μmol de 2,4-D + 28,43 μmol de AIA, possibilitaram a obtenção de calos embriogênicos de maior qualidade, com baixa taxa oxidativa, maior multiplicação, bem como com aspecto e coloração que indicam alta divisão e potencial de diferenciação em embriões. Desta forma, os resultados obtidos reforçam a importância da utilização destas auxinas independente do ciclo de multiplicação.

A presença de 2,4-D, está diretamente associada a sinalização para divisão celular, e sua retirada potencializou a diferenciação e regeneração em embriões somáticos de *E. guineensis*.

6. REFERÊNCIAS

AGELE, S. O. *et al.* Oil palm-based cropping systems of the humid tropics: Addressing production sustainability, resource efficiency, food security and livelihood challenges. In: ***Elaeis guineensis***. IntechOpen, 2022. DOI: 10.5772/intechopen.98257

AMOANIMAA-DEDE, H. *et al.* Growth regulators promote soybean productivity: a review. **PeerJ**, v. 10, p. e12556, 2022. DOI: 10.7717/peerj.12556

ARDHANI, D. N.; MAHARIJAYA, A.; RAHAYU, M. S. Callus formation response from immature male flower explant of plantain banana (*Musa acuminata* x *Musa balbisiana* cv. Kepok) treated by 2,4-D and BAP. **Jurnal Agronomi Indonesia (Indonesian Journal of Agronomy)**, v. 52, n. 1, p. 101-109, 2024. DOI: 10.24831/jai.v52i1.49008

ARLI, N. M.; NOLI, Z. A.; IDRIS, M. The application of plant growth regulators in propagation of dendrobium orchid with thin cell layer (TCL) technique: a review. **Int J Prog Sci Technol**, v. 39, n. 2, p. 416, 2023. DOI: 10.52155/ijpsat.v39.2.5505

ASTUTIK, M. *et al.* Auxin and cytokinin effect on *in vitro* callus induction of maize (*Zea mays* L.) Srikandi Putih. In: 6th International Seminar of Animal Nutrition and Feed Science (ISANFS 2021). **Atlantis Press**, 2022. p. 1-5. DOI: 10.2991/absr.k.220401.001

BAKEWELL-STONE, P. *Elaeis guineensis* (African oil palm). **PlantwisePlus Knowledge Bank, Species Pa**, 2022. DOI: 10.1079/cabicompendium.20295

BISHT, T. S. *et al.* Scanning electron microscopic and morphological studies on in-vitro derived callus of low-chill peach (*Prunus persica* L. Batsch). **Trends in Horticulture**. 2024; 7 (2): 5530. 2024. DOI: 10.24294/th.v7i2.5530

CHANDLER, J. W. Founder cell specification. **Trends in Plant Science**, v. 16, n. 11, p. 607-613, 2011. DOI: 10.1016/j.tplants.2011.08.005

COSTA, D. S. *et al.* *In vitro* development of green manures: phytotoxicity and remediation of 2,4-D. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 5, p. 40551-40568, 2022. DOI: 10.34117/bjdv8n5-507

COSTA, D. S. *et al.* Residual 2, 4-D in plant tissue culture discarded media: a neglected source of environmental pollution. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 5, p. 30046-30059, 2020. DOI: 10.34117/bjdv6n5-457

DHALE, D. A.; ANKITA, P.; RATHOD, M. C. Production of IAA by Endophytic Fungi as *Phyllanthus emblica* Linn. **Current Agriculture Research Journal**, v. 11, n. 3, 2023. DOI: 10.12944/CARJ.11.3.17

EEUWENS, C. J. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera*) and cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, v.36, p.23-28, 1976. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1976.tb05022.x

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI P. P.; NOGUEIRA, D. A. ExpDes: An R package for ANOVA and experimental designs. **Appl. Math.** v. 5, n. 19, p. 2952–2958, 2014. DOI: 10.4236/am.2014.519280

GULERIA, S. *et al.* Plant hormones physiological role, effect on human health and its analysis. **Journal of microbiology, biotechnology and food sciences**, v. 11, n. 1, p. e1147-e1147, 2021. DOI: 10.15414/jmbfs.1147

HAKIM, L. *et al.* Season, basal media and plant growth regulators effect in wood plant *in vitro* propagation: a comprehensive review. In: **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. IOP Publishing, 2022. p. 012051. DOI: 10.1088/1755-1315/1115/1/012051

JAYARATHNA, S. P. N. C. *et al.* Enhanced Coconut Somatic Embryogenesis of Unfertilized Ovary Derived Callus through Improved Media Composition. **COCOS**, v. 24, n. 1, p. 13-21, 2023. DOI: 10.4038/cocos.v24i1.5825

JOHANSEN, D. A. Plant microtechnique, **Nature**, 222, 1940. DOI: 10.1038/147222b0

KHONG, D. T. *et al.* A Near Infrared Fluorescent Nanosensor for Spatial and Dynamic Measurements of Auxin, Indole-3-Acetic Acid, in Planta. **bioRxiv**, p. 2024.05.23.595494, 2024. DOI: 10.1101/2024.05.23.595494

LIEN, N. T. T. *et al.* ; The plant growth promotor auxin (iaa) production ability in *Arthrospira massartii* – ARH strain isolated from vietnam and its potential applications. **Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology**, v. 23, n. 1-2, p. 101–110, 2022. DOI: 10.56557/pcbmb/2022/v23i1-27385.

LYSENKO, V. *et al.* Ultrastructure, CO₂ Assimilation and Chlorophyll Fluorescence Kinetics in Photosynthesizing Glycine max Callus and Leaf Mesophyll Tissues. **Horticulturae**, v. 9, n. 11, p. 1211, 2023. DOI: 10.3390/horticulturae9111211

MA, J. *et al.* High auxin stimulates callus through SDG8-mediated histone H3K36 methylation in Arabidopsis. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 64, n. 12, p. 2425-2437, 2022. DOI: 10.1111/jipb.13387

MUSELIKOVA, K.; MOURALOVA, K. Synthetic auxin herbicide 2, 4-D and its influence on a model BY-2 suspension. **Molecular Biology Reports**, v. 51, n. 1, p. 444, 2024. DOI: 10.1007/s11033-024-09392-x

NAIR, K. P. Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacquin). In: **Tree Crops: Harvesting Cash from the World's Important Cash Crops**, p. 249-285, 2021. DOI: 10.1007/978-3-030-62140-7_7

O'BRIEN, T. P.; MCCULLY, M. E. The study of plant structure: principles and selected methods. **Blackwell Scientific Publications**, Oxford, 1981.

PASTERNAK, T. P.; STEINMACHER, D. Plant growth regulation in cell and tissue culture *in vitro*. **Plants**, v. 13, n. 2, p. 327, 2024. DOI: 10.3390/plants13020327

R CORE TEAM. R: **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2023. Disponível em: <https://www.R-project.org/>

RIBEIRO, J. M. *et al.* *In vitro* response of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) inflorescence explants to high 2iP and 2, 4-D concentrations. **Australian Journal of Crop Science**, v. 14, n. 5, p. 831-835, 2020. DOI: 10.21475/ajcs.20.14.05.p2317

SANTOS, M. Á. S. dos *et al.* Aplicações da cultura de tecidos vegetais em plantas medicinais da Amazônia: uma revisão. **Ciências ambientais na Amazônia**, p. 77. 2021. DOI: 10.29327/546273.1-6

SIDIK, N. J. *et al.* A Mini Review of Plant Tissue Culture: The Role of Media Optimization, Growth Regulators in Modern Agriculture, Callus Induction and the Applications. **AUIQ Complementary Biological System**, v. 1, n. 2, p. 96-109, 2024. DOI: 10.70176/3007-973X.1019

SILVA, R. C.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Differential responses to somatic embryogenesis of different genotypes of Brazilian oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 111, p. 59-67, 2012. DOI: 10.1007/s11240-012-0170-5

SONG, Y. Insight into the mode of action of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) as an herbicide. **Journal of integrative plant biology**, v. 56, n. 2, p. 106-113, 2014. DOI: 10.1111/jipb.12131

SOSNOWSKI, J.; TRUBA, M.; VASILEVA, V. The impact of auxin and cytokinin on the growth and development of selected crops. **Agriculture**, v. 13, n. 3, p. 724, 2023. DOI: 10.3390/agriculture13030724

SOUZA, J. A. *et al.* 3-IAA on *in vitro* rooting and acclimatization of apple rootstock. **Communications**, v. 12, p. 016-023, 2022. DOI: 10.26814/cps2022003

TALITHA, O. *et al.* Application of BAP and IBA for *In Vitro* Callus Formation of Biduri (*Calotropis gigantea*). In: **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. IOP Publishing, 2023. p. 012012. DOI: 10.1088/1755-1315/1246/1/012012

VIDAL, B. C. Dichroism in collagen bundles stained with Xylidine-Ponceau 2R. In: **Annales d'histochemie**. p. 289-296, 1970.

CAPÍTULO 2

Influência do material genético e do carvão ativado no alongamento *in vitro* e estabelecimento de mudas clonais de *Elaeis guineensis* jacq.

RESUMO

Elaeis guineensis conhecido popularmente como Dendezeiro ou Palma de óleo, é uma importante palmeira da família Arecaceae, considerada uma importante oleaginosa, com ampla utilização nos setores alimentício, de cosméticos e biocombustíveis. Apesar da alta eficiência no estabelecimento de mudas clonais, tem-se uma resposta diferencial entre os materiais genéticos e muitos genótipos apresentam dificuldades de enraizamento e estabelecimento. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o desempenho de mudas clonais de diferentes genótipos em função de concentrações de carvão ativado no alongamento *in vitro* de *Elaeis guineensis*. Foram avaliados 4 genótipos (AM-05, AM-21, AM-29 e AM-33) em função de cinco (5) concentrações de carvão ativado (0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 g. L⁻¹). Foi possível a obtenção de mudas clonais viáveis de todos os materiais genéticos avaliados, salvo a necessidade de maiores ajustes a materiais pouco responsivos. Genótipos aparentados apresentaram desenvolvimento superior ao longo do estudo, o que sugere um efeito da genética dos parentais. Houve melhor estabelecimento de mudas clonais de *E. guineensis*, provenientes dos cultivos em ausência do carvão ativado. Todavia o uso de 2,8 g. L⁻¹ de carvão ativado promoveu a otimização de embriogênese somática secundária, resultando em maior número de plantas nesta condição.

Palavras chaves: Palma de óleo. Genótipo. Embriogênese somática secundária. Cultura de tecidos. Micropropagação.

ABSTRACT

Elaeis guineensis Jacq., commonly known as African oil palm, is an important palm species of the Arecaceae family, considered a major oilseed crop with wide applications in the food, cosmetic, and biofuel industries. Despite the high efficiency in the establishment of clonal plantlets, differential responses are observed among genetic materials, and many genotypes exhibit difficulties in rooting and establishment. The present study aimed to evaluate the performance of clonal plantlets from different genotypes in response to activated charcoal concentrations during the *in vitro*

elongation of *E. guineensis*. Four genotypes (AM-05, AM-21, AM-29, and AM-33) were tested under five concentrations of activated charcoal (0, 1.0, 2.0, 3.0, and 4.0 g L⁻¹). Viable clonal plantlets were obtained from all evaluated genetic materials, although further adjustments are required for less responsive genotypes. Related genotypes showed superior development throughout the study, suggesting a parental genetic effect. Better establishment of clonal plantlets of *E. guineensis* was observed in cultures without activated charcoal. However, the use of 2.8 g L⁻¹ of activated charcoal optimized secondary somatic embryogenesis, resulting in a greater number of plantlets under this condition.

Keywords: Oil palm. Genotype. Secondary somatic embryogenesis. Tissue culture. Micropropagation.

1. INTRODUÇÃO

Elaeis guineensis é uma palmeira oleaginosa, conhecida popularmente como Palma de óleo ou Dendê, é nativa do continente africano, de caule único, com 35 a 60 folhas pinadas (Nair, 2021; Bakewell-Stone, 2022). Possui grande importância econômica, utilizada nas indústrias de cosméticos, alimentícia, farmacêutica e como alternativa para a produção de biocombustíveis (Agele *et al.*, 2022; Bakewell-Stone, 2022).

A cultura de tecidos vegetais constitui uma ferramenta essencial para o cultivo e a multiplicação de células, tecidos e órgãos de plantas em ambiente controlado e asséptico, possibilitando a produção em larga escala de forma rápida e uniforme (Rai *et al.*, 2022; Ruscitti, 2023). Nesse contexto, a embriogênese somática (ES) é definida como uma rota morfogênica na qual células somáticas, em condições adequadas, diferenciam-se direta ou indiretamente em embriões somáticos, que posteriormente originam plantas completas. Ou seja, a geração de mudas clonais a partir de células não reprodutivas e sem fertilização (Vasic *et al.*, 2001; Hazubska-Przybył *et al.*, 2020; Ferrari *et al.*, 2021). É uma abordagem ideal para propagação clonal em massa associada ao melhoramento genético, para espécies perenes e de ciclo muito longo (Karyanti *et al.*, 2021; Saptari *et al.*, 2024).

Entretanto, a técnica pode apresentar algumas limitações em função do material genético, das condições de cultivo, da maturação, conversão e aclimatização das plântulas, entre outros fatores que comprometem o uso sistemático da embriogênese somática para fins comerciais (Wang *et al.*, 2023; Saptari *et al.*, 2024). O processo de embriogênese somática não é afetado apenas por reguladores de crescimento e composição do meio de cultura, mas também pelo material genético (Arimarsetiowati *et al.*, 2023). Este é um fator limitante na aplicação de tecnologias em muitas espécies, como a multiplicação massal e transformação genética, além de restringir a capacidade de obtenção de plantas regeneradas a uma faixa limitada de genótipos (Wang *et al.*, 2023).

Apesar da alta eficiência no estabelecimento de mudas clonais de *E. guineensis*, tem-se uma resposta diferencial entre os materiais genéticos regenerados, os quais muitos apresentam uma dificuldade natural de enraizamento e estabelecimento dos clones. Sendo necessário, a avaliação de diferentes componentes que permitam a obtenção de plântulas com alta qualidade e quantidade. Experimentos pilotos, demonstram que a utilização de carvão ativado pode auxiliar no processo de estabelecimento de mudas clonais de *E. guineensis*, todavia tal benefício parece restringir-se a alguns materiais genéticos.

Os carvões ativados (CA) são componentes que possuem uma estrutura densamente porosa e alta área superficial, destaca-se por seu potencial de adsorção de diferentes componentes (Sharma *et al.*, 2022; Mamatha, 2023). Amplamente utilizado na cultura de tecidos vegetais, auxilia no estabelecimento e germinação de mudas clonais. Um dos seus maiores impactos está associado a adsorção de reguladores de crescimento, suplementos orgânicos e substâncias inibitórias do meio ou liberada pelo material vegetal. Permite a estabilização do pH ao longo do cultivo e melhor aproveitamento dos nutrientes pelas plantas (Paulino *et al.*, 2021; Sharma *et al.*, 2022; Martins *et al.*, 2024). Além disso, seu uso promove a redução da incidência de luz na zona de crescimento das raízes, e uma melhor indução e desenvolvimento do sistema radicular das plantas (Máximo *et al.*, 2020; Martins *et al.*, 2024).

Todavia, seu mecanismo promotor ou inibitório ainda não é bem esclarecido, podendo estar relacionado a diversos fatores, alguns pesquisadores sugerem a ocorrência de absorção não seletiva de substâncias, especialmente reguladores de crescimento vegetal (Danova *et al.*, 2023; Martins *et al.*, 2024). Neste sentido, o presente trabalho teve como avaliar o desempenho de diferentes materiais genéticos

em função de concentrações de carvão ativado no alongamento *in vitro* e estabelecimento das mudas clonais de *Elaeis guineensis*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Material vegetal

Para a germinação dos explantes, embriões somáticos dos diferentes genótipos (Tabela 1), foram inoculados em frascos contendo 30 mL de meio de cultura C4, proposto por Oliveira *et al.* (2024), acrescido de 300 mg L⁻¹ de inositol, 139 mg L⁻¹ de arginina, 186 mg L⁻¹ de glutamina, 169 mg L⁻¹ de metionina, 294 mg L⁻¹ de prolina, 1000 mg L⁻¹ de caseína, 60 g L⁻¹ de sacarose, carvão ativado nas concentrações de 0, 1, 2, 3 e 4 g L⁻¹, além de 1000 µM de putrescina e 2,5 g L⁻¹ de phytigel, com pH ajustado para 5,7 ± 0,02. Após a autoclavagem por 20 minutos a 120°C, foi acrescido ao meio de cultura, em capela de fluxo laminar, 1000 µM de putrescina.

Tabela 1 - Caracterização morfológica dos genótipos de *Elaeis guineensis*, contendo: código do genótipo, parentais, altura da planta, número e peso médio dos cachos, número de frutos, taxa de mesocarpo, matéria seca e fibra dos frutos, potencial de óleo por fruto e planta, e a idade das matrizes.

Genótipo	AM-05	AM-21	AM-29	AM-33
Cruzamento	Deli x Ekona	Kigoma	Deli x Yangambi	Deli x Ghana
Altura (m)	2,86	6,45	5,30	4,10
Nº de cachos	12	11	9	8
Peso cachos	14,30	27,85	13,55	29,30
Nº de frutos	240	376	254	391
Mesocarpo (%)	93,42	95,19	86,64	99,45
Matéria seca (%)	68,30	78,10	57,00	68,23
Fibra (%)	12,38	17,01	11,64	14,82
Óleo / fruto (mL)	43,00	40,14	30,12	31,99
Óleo / planta (L)	6,89	12,39	3,36	7,43
Idade (anos)	9	13	10	11

2.2. Alongamento *in vitro*

Em câmara de fluxo laminar, plântulas de 60 dias de cultivo *in vitro*, apresentando, em média, 5 cm de altura, foram introduzidas, isoladamente, em tubos de ensaio contendo 20 mL de meio de cultura C4 (Oliveira *et al.*, 2024), acrescido de

300 mg L⁻¹ de inositol, 139 mg L⁻¹ de arginina, 186 mg L⁻¹ de glutamina, 169 mg L⁻¹ de metionina, 294 mg L⁻¹ de prolina, 1.000 mg L⁻¹ de caseína, 60 g L⁻¹ de sacarose, além de 1.000 µM de putrescina e 2,5 g L⁻¹ de phytigel, com pH ajustado para 5,7 ± 0,02 antes da autoclavagem. Foi adicionado carvão ativado nas concentrações de 0, 1, 2, 3 e 4 g L⁻¹.

O meio de cultura foi esterilizado por meio de autoclavagem em 121°C por 20 minutos. Mantidos em sala cultivo com temperatura de 28 ± 2 °C, fotoperíodo de 16h, sob luz LED branca nas intensidades de 60 µmol m⁻² s⁻¹, por 60 dias de subcultivo. Empregou-se um delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 5 x 4, sendo 5 concentrações de carvão ativado e 4 genótipos (AM-05, AM-21, AM-29 e AM-33), com 5 repetições, sendo cada unidade experimental composta por 4 tubos contendo 1 plântula cada, totalizando 80 plantas por tratamento.

2.3. Aclimatização

Para a aclimatização, as plântulas obtidas *in vitro* tiveram suas raízes lavadas em água corrente, para retirada do excesso de meio de cultura. Em seguida foram plantadas em tubetes de 63 mm de diâmetro e 130 mm de altura, contendo 180 cm³ de substrato composto por 50% de substrato Plantimax[®] (composto por casca de pinus e vermiculita) + 50% de areia lavada fina, acrescido de 3,0 kg m⁻³ (superfosfato simples no substrato). As plântulas foram acondicionadas em casa de vegetação e mantidas em câmara úmida intermitente, controlada por sensores de temperatura e umidade.

Na primeira semana a programação de nebulização foi de 28 °C e 95% de umidade, com redução de 5% de umidade a cada 5 dias de cultivo, até atingir a umidade média de 60%. Após este período, foram transferidas para casa de vegetação convencional, com irrigação diária. O sombreamento da câmara úmida e da casa de vegetação foi realizado utilizando manta termo refletora (Aluminet[®]) com 50% de restrição de luz. As mudas foram fertilizadas semanalmente com 10 mL de solução nutritiva de sais MS ½ (Murashige e Skoog, 1962). Depois de 60 dias de aclimatização as mudas clonais foram avaliadas.

Utilizou-se um delineamento experimental em blocos casualizados (DBC), em esquema fatorial 5 x 4, sendo 5 concentrações de carvão ativado e 4 genótipos (AM-

05, AM-21, AM-29 e AM-33), com 4 blocos, sendo cada unidade experimental composta por 5 tubetes contendo 1 plântula cada.

2.4. Coleta e análise de dados

Aos 60 dias de cultivo avaliou-se o alongamento *in vitro*, por meio da classificação de vigor das plântulas em escala de 0 a 3, onde 0 – morto, 1 – ruim, 2 – bom e 3 – ótimo. E ainda, a altura, massa seca e número de plântulas, formação, massa seca e diâmetro médio radicular, taxa de sobrevivência, diâmetro do colo, comprimento e volume radicular (diâmetro > 2,0mm), quantificação de clorofilas e carotenoides, bem como a caracterização anatômica das folhas e raízes expandidas. Na aclimatização, foram avaliadas as mesmas variáveis morfológicas, após 60 dias de cultivo *ex vitro*.

Além disso, também foi avaliado o índice de qualidade vegetal (Dickson *et al.*, 1960), para inferir a qualidade geral dos tratamentos em função do desenvolvimento vegetal, levando em consideração a proporção de biomassa por volume vegetal, através da seguinte equação:

$$IQD = \frac{MST}{\frac{H}{D} + \frac{MSA}{MSR}}$$

Sendo:

IQD = Índice de qualidade de Dickson

MST = Massa seca total (g)

H = altura (cm)

D = Diâmetro do colo (mm)

MSA = Massa seca aérea (g)

MSR = Massa seca radicular (g)

Para quantificação de clorofilas e carotenoides, cinco discos foliares com 5 mm de diâmetro foram coletadas do primeiro ou segundo par de folhas, e acondicionados por 48 horas no escuro em 5 mL de solução de dimetilsulfóxido (DMSO) saturado com carbonato de cálcio, seguindo metodologia de Santos *et al.* (2008). Para determinar a absorbância das amostras foi utilizado o leitor de microplacas ELISA, nos comprimentos de onda 665, 649 e 480 nm. O cálculo das concentrações de clorofilas e carotenoides totais foram realizados a partir do método descrito por Wellburn (1994).

Para avaliar o sistema radicular, as raízes foram lavadas e separadas da parte aérea, na altura do colo e armazenadas em água deionizada, para evitar sua desidratação. Para a análise da morfologia do sistema radicular: utilizou-se o sistema WinRHIZO Pro 2023a (Régent Instr. Inc.), acoplado a um scanner profissional Epson XL 10000 equipado com unidade de luz adicional (TPU).

Para caracterização estrutural, foram coletados fragmentos foliares e radiculares. As amostras foram fixadas em solução de formaldeído, ácido acético e álcool 50% (FAA50). Após, foram desidratadas em série de concentração crescente de etanol e incluídas em resina acrílica (Historesin, Leica Instruments, Alemanha). Secções transversais com 5 µm de espessura foram obtidas em Micrótomo rotativo (Yidi, YD315), montadas em lâminas de vidro e coradas com azul de toluidina (O'Brien e McCully, 1981). As imagens foram capturadas utilizando um microscópio de luz (AX70TRF, Olympus Optical, Japão) equipado com sistema de captura de imagens (Axion Cam, Zeiss, Alemanha).

A análise de variância foi testada a partir da normalidade dos resíduos pelo teste Shapiro-Wilk e da homogeneidade de variâncias, pelo teste Bartlett. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de significância, e de regressão polinomial utilizando o software R versão 4.2.3 (R Core Team, 2023) e o pacote ExpDes (Ferreira *et al.*, 2014).

Para as variáveis comprimento, volume, diâmetro e massa seca radicular, bem como índice de qualidade de Dickson no desenvolvimento *in vitro*, realizou-se a transformação para $\text{Log}(x)$, para posterior análise de variância e teste de Tukey. Os valores dos gráficos de teste de Tukey apresentados para estas variáveis representam valores não transformados, e acima destes são apresentados os valores ajustados em parênteses. Além disso, para a aclimatização foram transformadas as variáveis massa seca aérea e diâmetro radicular.

3. RESULTADOS

3.1. Alongamento *in vitro*

As variáveis diâmetro do colo, formação radicular, teor de clorofila *a*, *b* e total e o índice de qualidade das plantas, foram influenciadas pela concentração de carvão ativado e material genético utilizado, não havendo interações entre os fatores

testados. Já vigor, altura das plantas e massa seca aérea, diferiram significativamente apenas para o fator genético. Enquanto o número de plantas, teor de carotenoides, diâmetro médio radicular, comprimento e volume de raízes grossas, massa seca radicular, diferiram apenas para a concentração de carvão ativado. A taxa de sobrevivência, comprimento e volume radicular total, área radicular superficial e projetada, comprimento e volume de raízes finas e médias e o teor de umidade das plantas, não diferiram significativamente para os fatores testados (Tabela 2).

E. guineensis não apresenta perfilhamento ou ramificações em condições naturais. Contudo, em cultivos *in vitro* de mudas clonais obtidas por embriogênese somática, foi observada a formação de novos embriões somáticos na região basal das plântulas recém-germinadas, fenômeno denominado embriogênese somática secundária. Vale ressaltar que, embora apenas uma plântula tenha sido inoculada por tubo de ensaio, ocorreu aumento no número de plântulas por unidade experimental em razão da germinação contínua dos embriões em desenvolvimento. Dessa forma, foi possível realizar a contabilização do número total de plântulas.

Tabela 2 - Resultado da análise de variância para as variáveis: taxa de sobrevivência, vigor, altura, diâmetro do colo, número de plantas, clorofila a, clorofila b, clorofila total, carotenoides, formação radicular, diâmetro médio radicular, comprimento radicular (diâmetro > 2,0mm), volume radicular (diâmetro > 2,0mm), massa seca aérea e radicular e índice de qualidade de Dickson, a partir de plantas clonais de *Elaeis guineensis* alongadas *in vitro*, aos 60 dias de cultivo.

Variável	Valor P			CV (%)
	Carvão	Genó-tipo	Carvão * Genó-tipo	
Taxa de sobrevivência	0,4126 ^{ns}	0,3973 ^{ns}	0,4568 ^{ns}	2,51
Vigor	0,9487 ^{ns}	4,5 x 10 ^{-4*}	0,1980 ^{ns}	16,20
Altura	0,2326 ^{ns}	0,0019*	0,7948 ^{ns}	26,28
Diâmetro do colo	0,0073*	3,9 x 10 ^{-7*}	0,8912 ^{ns}	22,65
Número de plantas	0,0400*	0,3898 ^{ns}	0,1353 ^{ns}	27,56
Clorofila a	0,0323*	0,0213*	0,4772 ^{ns}	26,82
Clorofila b	0,0256*	0,0014*	0,4363 ^{ns}	18,29
Carotenoides	0,0297*	0,0589 ^{ns}	0,3773 ^{ns}	27,36
Clorofila total	0,0289*	0,0094*	0,4752 ^{ns}	23,36
Formação radicular	1,0 x 10 ^{-5*}	3,0 x 10 ^{-5*}	0,5341 ^{ns}	39,47
Diâmetro radicular	9,2 x 10 ^{-3*}	0,0717 ^{ns}	0,1141 ^{ns}	52,36
Comprimento radicular	0,0073*	0,5324 ^{ns}	0,0567 ^{ns}	54,79
Volume radicular	0,0085*	0,7507 ^{ns}	0,0548 ^{ns}	19,75
Massa seca aérea	0,4136 ^{ns}	1,0 x 10 ^{-5*}	0,0605 ^{ns}	3,77
Massa seca radicular	0,0012*	0,1073 ^{ns}	0,5662 ^{ns}	18,55
Índice de qualidade	0,0174*	0,0192*	0,0692 ^{ns}	9,21

CV: Coeficiente de variação; P: Probabilidade do valor P; *: P<0,05; ns: P≥0,05.

3.1.1. Influência do material genético

Quanto ao desenvolvimento aéreo em função do material genético, para as variáveis vigor e altura das plantas, os genótipos AM-05 e AM-29, foram significativamente superiores (Figura 1B-C). Por outro lado, para diâmetro de colo, teores de clorofila (*a*, *b* e total), massa seca aérea, os materiais genéticos AM-05 e AM-21, apresentaram maiores valores (Figura 1D-H).

Quanto ao sistema radicular, para sua formação apenas o genótipo AM-21 apresentou menores taxas, não apresentando diferenças significativas em relação ao AM-33. (Figura 1I). Já para o índice de qualidade de Dickson, o genótipo AM-05 foi significativamente maior apenas em relação ao AM-29. (Figura 1J).

No alongamento *in vitro* das plantas, houve destaque do genótipo AM-21 apenas em relação ao teor de clorofila (*a*, *b* e total), massa seca aérea e diâmetro do colo. Tal fato, deve-se a menor expansão dos tecidos, proporcionando uma atrofia e concentração de material vegetal, resultando em um espessamento do diâmetro do colo, aumento de clorofila por área foliar e alta densidade do material vegetal. Em relação ao enraizamento, o genótipo AM-21, apresentou maior dificuldade natural durante o enraizamento, sendo necessário maior atenção para o seu estabelecimento.

Adicionalmente pode-se fazer a caracterização geral do desenvolvimento dos materiais genéticos em estudo. Destaca-se o genótipo AM-05, com possível aquisição de plantas vigorosas, com elevada qualidade, mais altas e com diâmetro de colo espesso, com altos teores de clorofila e formação radicular, além de grande produção de biomassa aérea. Ou seja, a obtenção de plantas superiores para todas as variáveis avaliadas e influências pelo material genético.

As plantas do genótipo AM-21 foram plantas baixas e pouco vigorosas *in vitro*, todavia com maior diâmetro de colo e teor de clorofila, além de maior massa seca aérea e baixa formação radicular. Assim, houve a produção de plantas menores e com alta concentração de biomassa, condições com elevado potencial caso se perpetuem em campo.

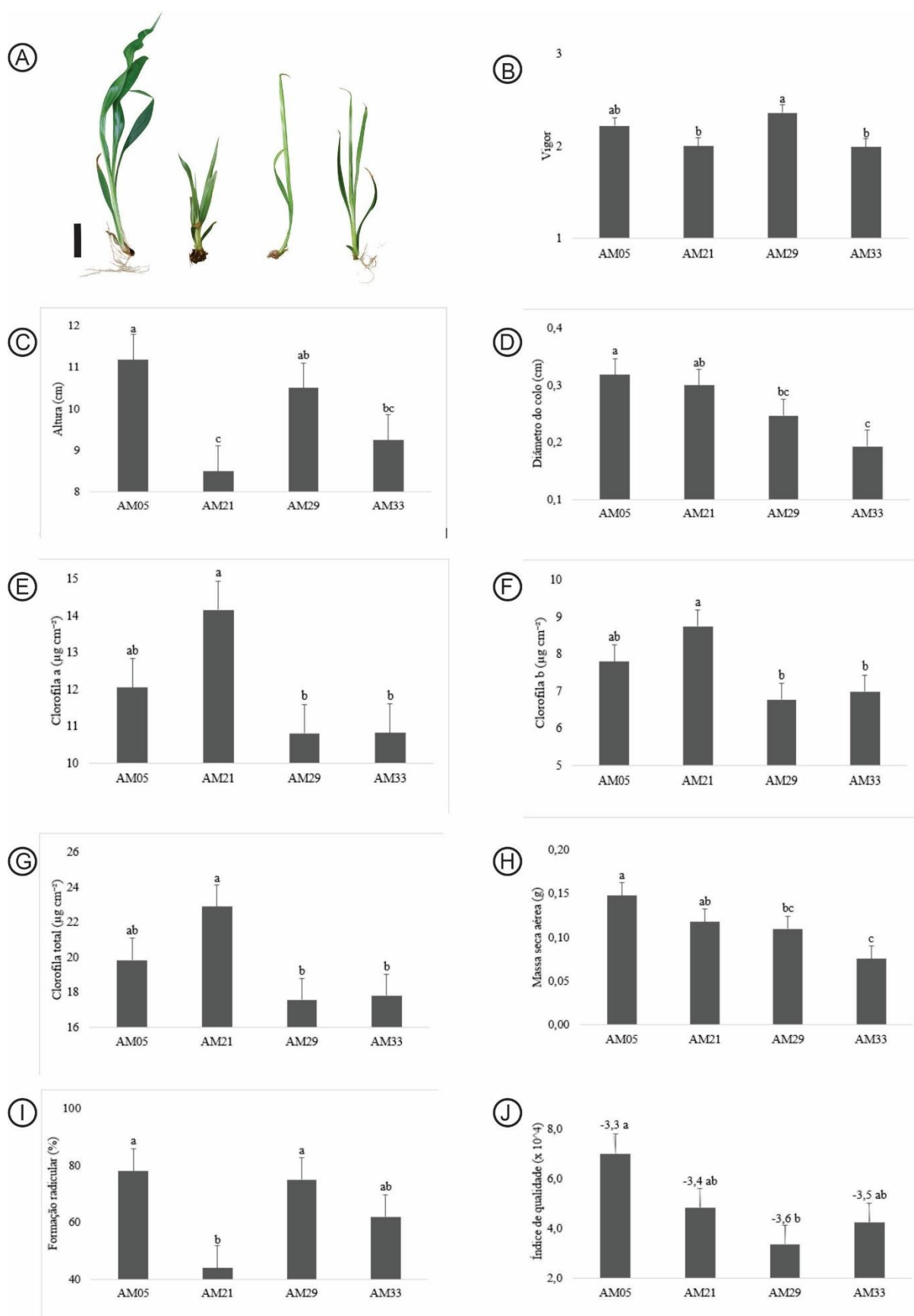


Figura 1 - Efeito do genótipo no alongamento de plântulas de *Elaeis guineensis*, aos 60 dias de cultivo *in vitro*. Morfologia dos genótipos AM-05, AM-21, AM-29 e AM-33 em 2 g L^{-1} de carvão ativado, em ordem crescente da esquerda para direita (A), Vigor (B), Altura (C), Diâmetro de colo (D), Clorofila a (E), Clorofila b (F), Clorofila total (G), Massa seca aérea (H), Formação radicular (I), e Índice de

qualidade de Dickson – transformado em log (J). Barra = 3 cm. Letras iguais não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey em nível de 95% de significância.

Em relação ao genótipo AM-29, observou-se a formação de plantas mais desenvolvidas em vigor e altura, com médias inferiores para diâmetro, teor de clorofila e massa seca aérea, todavia com maior formação radicular. Tem-se plantas altamente vigorosas e altas, mas consideravelmente delgadas e com baixa concentração de clorofilas e produção de matéria vegetal. O menor desenvolvimento do AM-29 para qualidade das plantas, deve-se a obtenção de plantas consideravelmente maiores e pouco desenvolvidas em espessura e massa seca, apresentando um elevado estiolamento de suas estruturas vegetativas.

As plantas do genótipo AM-33 foram pouco vigorosas, menores e delgadas, com baixo teor de clorofilas e com formação radicular média, não diferindo dos demais genótipos, e com baixa produção de matéria aérea. Proporcionando a obtenção de indivíduos com taxa média de enraizamento e de qualidade, com pouco desenvolvimento para as demais variáveis avaliadas e influenciadas pelo material genético.

3.1.2. Carvão ativado

O carvão ativado gerou um efeito positivo na taxa de pigmentos (Clorofila *a*, *b*, total e carotenoides) e no número das plantas. Para a propagação vegetal, o acréscimo do reagente é proporcional ao aumento do número de plantas, com ponto crítico em aproximadamente 2,8 g. L⁻¹ (Figura 2B). Os pigmentos apresentam maiores valores entre as concentrações 2,5 a 2,7 g. L⁻¹ de carvão ativado no meio de cultura (Figura 2C-F).

Por outro lado, o uso do CA para diâmetro do colo e índice de qualidade das plantas de Dickson proporcionou um efeito inversamente proporcional. O diâmetro do colo das plantas tem redução de suas dimensões em função da presença do reagente, com ponto mínimo, em aproximadamente 2,2 g. L⁻¹ de carvão ativado (Figura 2G). No que se refere ao Índice de qualidade das plantas de Dickson, a adição do carvão ativado também representou um prejuízo ao desenvolvimento, com redução até 2,0 g. L⁻¹ de carvão ativado (Figura 2H).

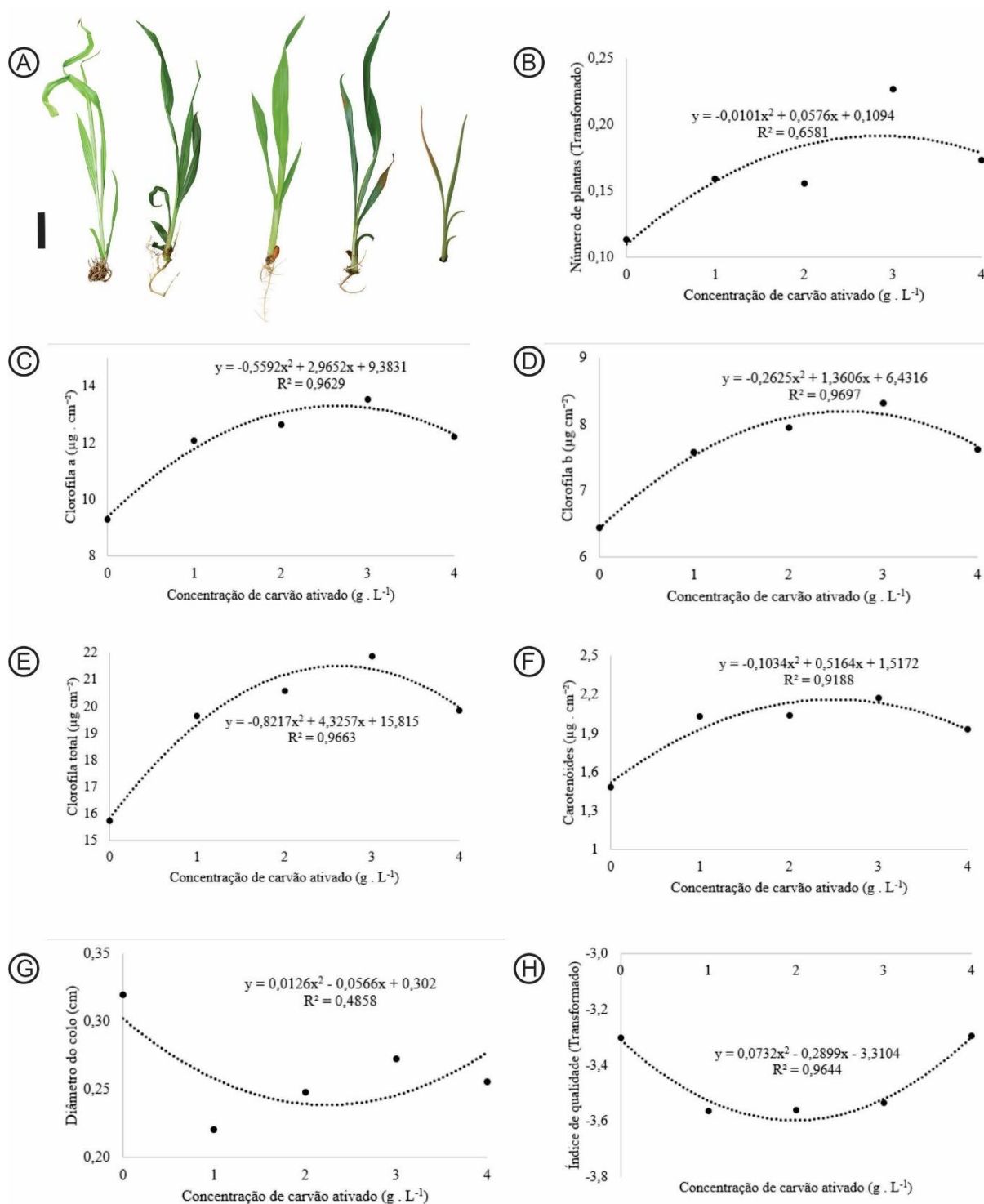


Figura 1 - Efeito do carvão ativado no sistema aéreo do alongamento de plântulas de *Elaeis guineensis*, aos 60 dias de cultivo *in vitro*, Morfologia do genótipo AM-05 em função do carvão ativado em concentração crescente de 0 a 4 g . L⁻¹ da esquerda para direita (A), Número de plantas (B), Clorofila a (C), Clorofila b (D), Clorofila total (E), Carotenóides (F), Diâmetro de colo (G), e Índice de qualidade de Dickson (H). Barra = 3 cm.

Para o sistema radicular, a presença do componente ocasionou uma resposta prejudicial para a maioria das variáveis significativas. Na formação radicular, o carvão

ativado ocasionou sua inibição, com redução progressiva ao acréscimo do reagente, com mínimo em 3,0 g. L⁻¹ (Figura 3B). O diâmetro médio radicular apresentou menores dimensões com acréscimo de 2,1 g. L⁻¹ de carvão ativado (Figura 3C). E, para comprimento e volume de raízes os pontos críticos, em aproximadamente 2,5 g L⁻¹ (Figura 3D-E), bem como para massa seca radicular, entre 2,5 a 2,7 g. L⁻¹ de adição de carvão no meio de cultura, foram prejudiciais (Figura 3F).

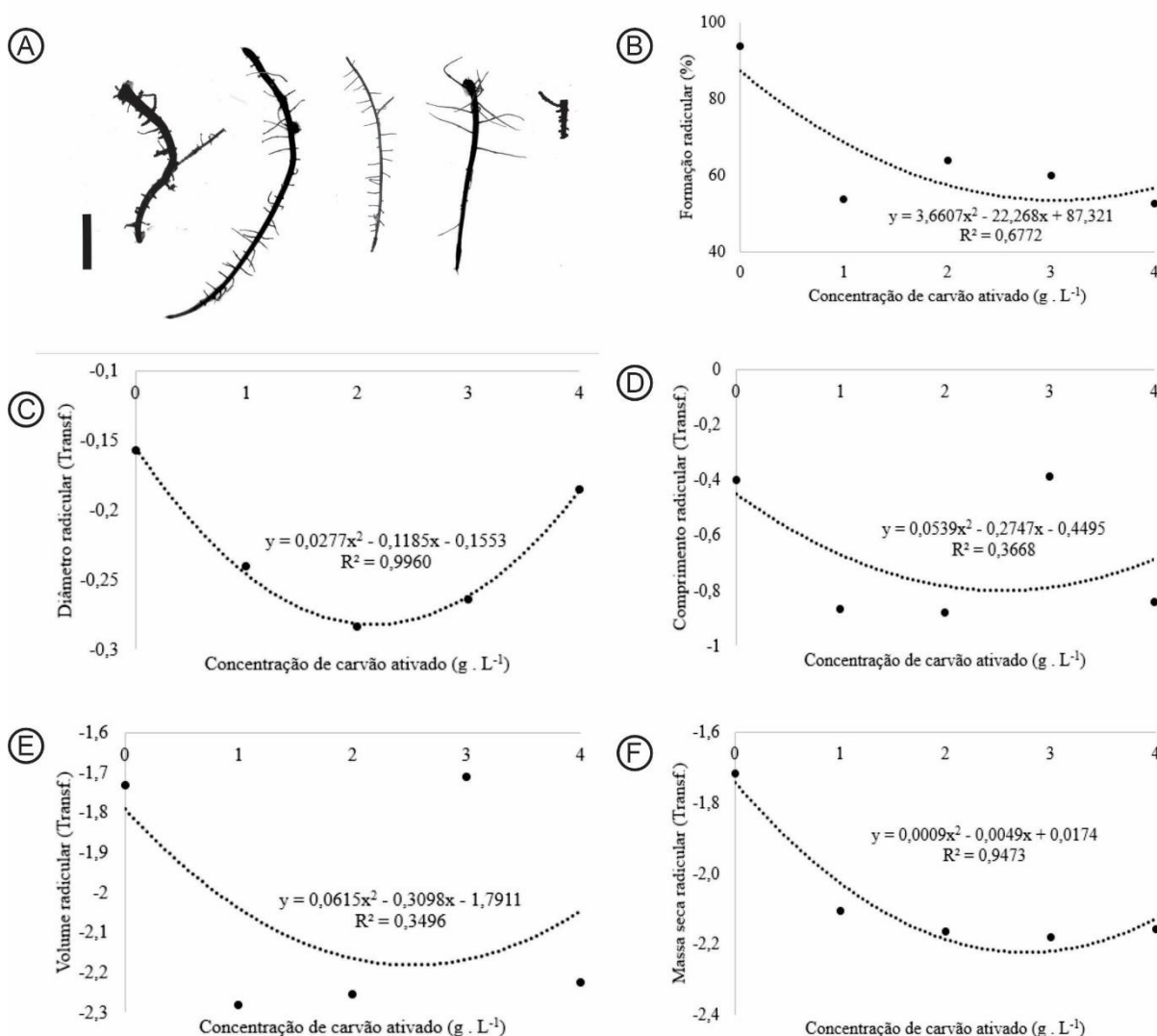


Figura 3 - Efeito do carvão ativado no sistema radicular durante o alongamento de plântulas de *Elaeis guineensis*, aos 60 dias de cultivo *in vitro*. Morfologia radicular do genótipo AM-05 em função carvão ativado em concentração crescente de 0 a 4 g. L⁻¹ da esquerda para direita (A), Formação (B), Diâmetro (C), Comprimento (D), Volume (E), e Massa seca radicular (F). Barra = 1,13 cm.

Pode-se destacar, que em ausência ou em baixas concentrações de carvão ativado, de 0 a 1,0 g. L⁻¹, é possível obter plantas com sistema radicular mais

desenvolvido e colo mais espesso, porém em menor número de plantas e baixa taxa fotossintética. Concentrações médias, entre 2,0 a 3,0 g . L⁻¹, promoveram os pontos críticos de todos as variáveis significativas, além de um antagonismo no desenvolvimento das plantas, com a otimização da embriogênese somática secundária, resultando em aumento da quantidade de mudas clonais, além de uma alta atividade fotossintética, todavia com sistema radicular mais enfraquecido, acompanhado de menor diâmetro do colo das plantas. Já, em maiores concentrações, tem-se um subdesenvolvimento e atrofiamento da planta em geral.

3.2. Aclimatização

As variáveis taxa de sobrevivência, vigor, altura, diâmetro do colo, formação radicular e massa seca aérea, foram influenciadas pela concentração de carvão ativado e material genético utilizado, não havendo interações entre os fatores testados. Já o diâmetro médio radicular diferiu apenas para a concentração média de carvão ativado. Enquanto o número de plantas, comprimento e volume radicular, bem como o índice de qualidade das plantas de Dickson não diferiram significativamente para os fatores testados (Tabela 3).

Tabela 3 - Resultado da análise de variância para a taxa de sobrevivência, vigor, altura, diâmetro do colo, número de plantas, formação radicular, diâmetro médio radicular, comprimento radicular (diâmetro > 2,0mm), volume radicular (diâmetro > 2,0mm), massa seca aérea e radicular e índice de qualidade de Dickson, a partir de mudas clonais de *Elaeis guineensis* em aclimatização, aos 60 dias de cultivo.

Variável	Valor P				CV (%)
	Bloco	Carvão	Genótipo	Carv. * Gen.	
Taxa de sobrevivência	0,0722 ^{ns}	0,0121 [*]	0,0498 [*]	0,0521 ^{ns}	33,74
Vigor	0,1310 ^{ns}	1,8 x 10 ^{-5*}	1,8 x 10 ^{-5*}	0,2701 ^{ns}	26,05
Altura	0,3432 ^{ns}	1,0 x 10 ^{-4*}	4,8 x 10 ^{-7*}	0,6763 ^{ns}	26,76
Diâmetro do colo	0,8200 ^{ns}	0,0039 [*]	2,0 x 10 ^{-5*}	0,6199 ^{ns}	40,51
Número de plantas	0,4496 ^{ns}	0,2284 ^{ns}	0,7914 ^{ns}	0,7063 ^{ns}	13,30
Formação radicular	0,0120 [*]	1,0 x 10 ^{-5*}	8,8 x 10 ^{-6*}	0,5968 ^{ns}	41,07
Diâmetro radicular	0,6787 ^{ns}	0,0429 [*]	0,9758 ^{ns}	0,1497 ^{ns}	26,56
Comprimento radicular	0,2656 ^{ns}	0,6898 ^{ns}	0,7413 ^{ns}	0,4104 ^{ns}	65,16
Volume radicular	0,3348 ^{ns}	0,3630 ^{ns}	0,4887 ^{ns}	0,2959 ^{ns}	16,03
Massa seca aérea	0,4858 ^{ns}	0,0191 [*]	0,0017 [*]	0,1019 ^{ns}	45,83
Massa seca radicular	0,5582 ^{ns}	0,4459 ^{ns}	0,5354 ^{ns}	0,1810 ^{ns}	89,37
Índice de qualidade	0,2868 ^{ns}	0,4259 ^{ns}	0,8321 ^{ns}	0,3433 ^{ns}	55,14

CV: Coeficiente de variação; P: Probabilidade do valor P; *: P<0,05; ns: P≥0,05.

Quanto ao efeito do material genético na aclimatização, as variáveis taxa de sobrevivência e formação radicular, apenas o genótipo AM-21 foi significativamente inferior aos demais. Para altura, diâmetro do colo, massa seca aérea e vigor, o AM-05 apresentou valores superiores (16,03 cm; 0,42 cm; 0,34 g; e 2,30 de vigor, respectivamente), enquanto o material genético AM-21, também foi significativamente inferior (7,81 cm; 0,23 cm; 0,14 g; e 1,49 de vigor, respectivamente), todavia para as três últimas variáveis os demais genótipos não diferiram destes, sendo intermediários.

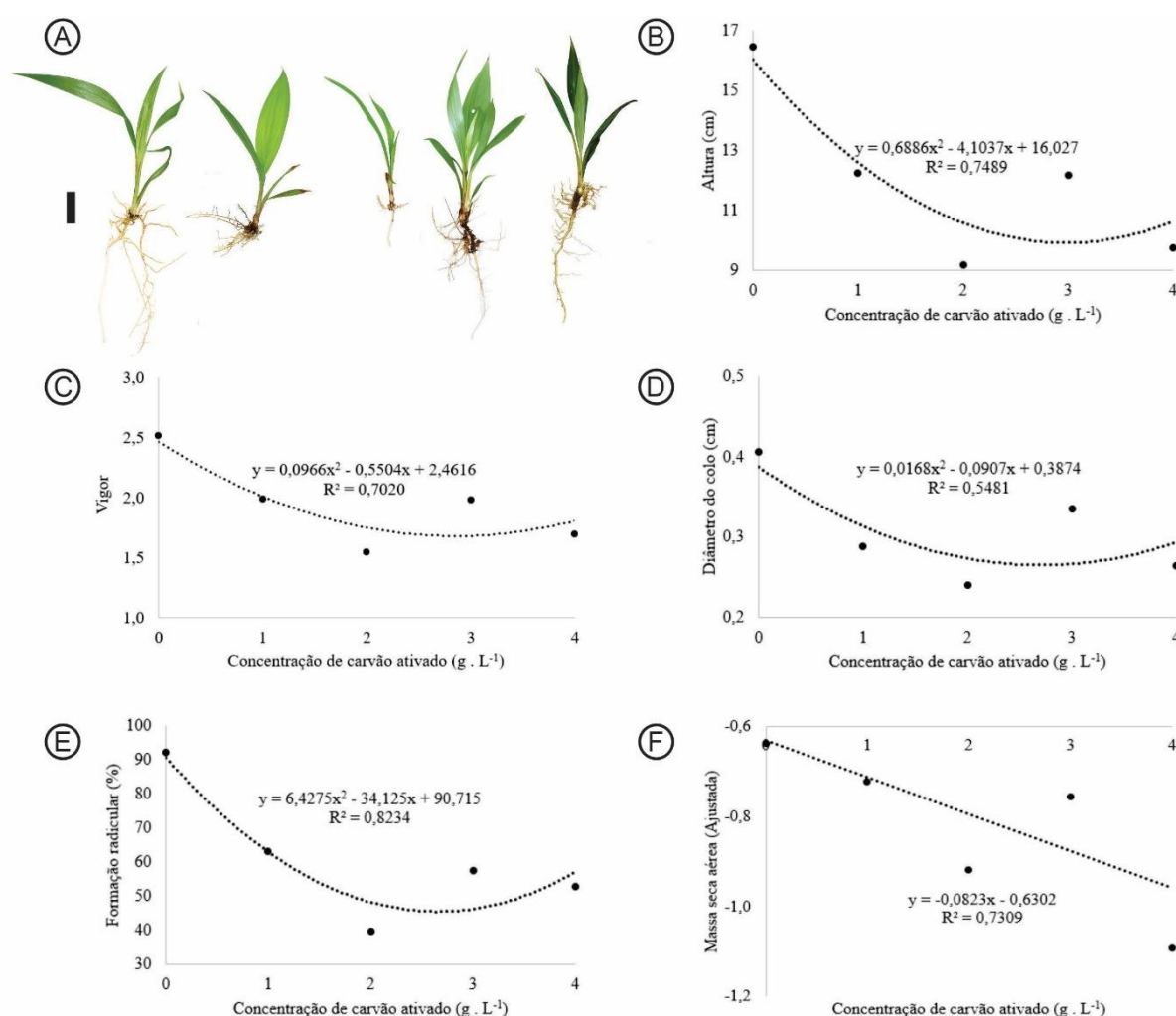


Figura 4 - Efeito do carvão ativado na aclimatização de mudas clonais de *Elaeis guineensis*, aos 60 dias de cultivo, Morfologia do genótipo AM-05 em função do carvão ativado, em ordem crescente da direita para a esquerda (A), Altura (B), Vigor (C), Diâmetro do colo (D), Formação radicular (E), e Massa seca aérea (F). Escala = 3 cm.

É fundamental destacar que houve uma consequência direta do cultivo *in vitro*, reforçando a importância de uma produção de mudas clonais com alta qualidade e

vigor. Para o genótipo AM-05 foi possível a obtenção de plantas vigorosas, altas, espessas e com maior formação radicular, além de grande produção de biomassa aérea e maior sobrevivência. Ou seja, a obtenção de plantas superiores em relação as demais. Em contraposição, AM-21 produziu plantas baixas e pouco vigorosas, além de subdesenvolvidas para as demais características. Já a utilização dos materiais genéticos AM-29 e AM-33, formaram plantas intermediárias, com alta taxa de sobrevivência, emissão radicular e vigor.

Quanto a influência do carvão ativado, para a altura, vigor, diâmetro do colo, formação radicular e massa seca aérea apresentou uma resposta negativa, com redução do crescimento da planta concomitante ao acréscimo do reagente, com ponto mínimo aos 3,0 g. L⁻¹ (Figura 4B), e, para o vigor das plantas, diâmetro do colo e formação radicular entre 2,7 a 2,8 g. L⁻¹ de carvão ativado (Figura 4C-E). Igualmente, para massa seca aérea, a ausência do carvão ativado promoveu maiores valores (Figura 4F).

As variáveis taxa de sobrevivência e diâmetro médio radicular, apesar de sofrerem um efeito negativo na presença do reagente, não se ajustam aos modelos polinomiais (Tabela 4).

Tabela 4 – Valores médios para taxa de sobrevivência e diâmetro médio radicular em função de concentrações de carvão ativado a partir de mudas clonais de *Elaeis guineensis* em aclimatização, aos 60 dias de cultivo.

Carvão ativado (g. L ⁻¹)	0	1	2	3	4
Sobrevivência (%)	68,0	72,5	56,2	78,7	74,8
Diâmetro médio radicular (cm)	0,56	0,50	0,68	0,47	0,49

A influência do carvão nas variáveis altura e massa seca apenas durante a fase de aclimatização, deve-se ao atrofiamento do sistema radicular em maiores concentrações do reagente, em consequência tem-se o subdesenvolvimento das mudas oriundas dessas condições. É importante ressaltar que foi possível o estabelecimento de mudas clonais de *Elaeis guineensis* para todos os genótipos e, em todas as condições avaliadas.

4. DISCUSSÃO

O material genético desempenha um papel crucial nas diferentes fases do cultivo *in vitro*, e o sucesso depende da origem genética em diversas espécies vegetais (Wang *et al.*, 2023; Astari *et al.* 2024), como exemplo *Elaeis guineensis*, *Hevea brasiliensis* e *Matricaria chamomilla* (Astari *et al.*, 2024; Wang *et al.*, 2023; Ahmad *et al.*, 2021). Sendo necessário o estabelecimento de tecnologias independentes do material genético, para a ampla aplicação de protocolos de micropropagação de plantas (Wang *et al.*, 2023). No presente trabalho foi encontrado um forte efeito do material genético no desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Elaeis guineensis*.

Os materiais com menor diversidade genética entre si (Tabela 1), como AM-05, AM-29 e AM-33, apresentaram melhor desenvolvimento ao longo do estudo, ressaltando o efeito genotípico, bem como a influência dos parentais no sucesso ao longo do estabelecimento de mudas clonais de *E. guineensis*. Todavia foi possível a obtenção de mudas clonais de todos os genótipos avaliados, corroborando com os resultados encontrados por Astari *et al.* (2024) para a mesma espécie.

O Carvão ativado apresenta uma grande importância no processo de embriogênese somática, atuando na estimulação da expressão de importantes genes associados à diferenciação celular e ao crescimento das plantas, bem como de resistência a estresses e doenças (Dong *et al.*, 2020). Auxilia na indução, maturação e germinação de linhagens e embriões somáticos (Dehestani-Ardakani, Hejazi e Aliabad, 2020; Wiszniewska *et al.*, 2023).

Para *Elaeis guineensis* sua adição ocasionou um efeito positivo no desenvolvimento aéreo, resultando em ganhos no teor de pigmentos, além disso permitiu o aumento do número de mudas clonais através da embriogênese somática secundária. Diferentemente, foi prejudicial ao sistema radicular. Em *Echinacea purpurea*, a utilização de carvão ativado foi necessária para indução e regeneração de plantas, através da embriogênese somática a partir de explantes foliares (Dehestani-Ardakani, Hejazi e Aliabad, 2020). Já na germinação e estabelecimento de mudas clonais via embriogênese somática de Tamareira (*Phoenix dactylifera*), a utilização de carvão ativado possibilitou, ganhos no comprimento radicular, no desenvolvimento das plantas e nos teores de clorofilas e proteínas (Abdellatif *et al.*,

2022), similar as respostas encontradas no presente trabalho, principalmente para o desenvolvimento aéreo de *E. guineensis*.

A inversão do desenvolvimento dos sistemas aéreo e radicular ao longo das concentrações de carvão ativado em *E. guineensis*, pode ser explicada pela alta adsorção de componentes essenciais ao enraizamento, tais como auxinas e suplementos orgânicos presentes no meio de cultura (Sharma *et al.*, 2022; Martins *et al.*, 2024). Visto que, em resposta ao aumento do componente, observou-se ganho em quantidade de plantas e taxa fotossintética, concomitante a uma redução de diâmetro do colo e desenvolvimento radicular.

A embriogênese somática secundária (ESS) ou adventícia refere-se à formação de novos embriões somáticos a partir de seus iguais previamente diferenciados ou recém germinados, permitindo a alta taxa de multiplicação, independência da fonte de explantes, uniformidade e boa repetibilidade (Bogdanović *et al.*, 2021; Bustami e Werbrouck, 2023). Além de possibilitar o aumento, prolongamento e restauração da competência embriogênica das linhagens por meio do estabelecimento de culturas cíclicas (Mazri, Naciri e Belkoura, 2020; Bogdanović *et al.*, 2021; Bustami e Werbrouck, 2023). E ainda, viabiliza o aumento do número de mudas clonais estabelecidas ao final do processo de embriogênese somática (Bustami e Werbrouck, 2023). Esse comportamento foi observado em diferentes espécies, como *Olea europaea L.*, *Centaurium erythraea* e *Theobroma cacao L.* (Mazri, Naciri e Belkoura, 2020; Bogdanović *et al.*, 2021; Bustami e Werbrouck, 2023).

Similar aos resultados encontrados por Bogdanović *et al.* (2021), foi observado a ocorrência da embriogênese somática secundária, resultando em um aumento do número de plantas por explante. Neste contexto, a adição de carvão ativado pode apresentar um papel fundamental, visto que no presente trabalho sua presença favoreceu a ESS, permitindo a otimização na concentração de 2,8 g L⁻¹.

O carvão ativado também permite o aumento do teor de pigmentos em muitas espécies ou genótipos. A concentração de clorofilas e carotenoides, reflete uma resposta de crescimento melhorada, condicionada pela alta atividade fotossintética e qualidade nutricional (Wiszniewska *et al.*, 2023). Em *Daphne tangutica*, a utilização de diferentes fontes de carvão ativado, possibilitou o aumento da concentração de clorofila (Wiszniewska *et al.*, 2023). Para *Quercus robur*, a utilização na concentração de 2 g L⁻¹ de carvão ativado gerou melhor desempenho, com ganhos em biomassa e desenvolvimento radicular, além do teor de pigmentos (Martins *et al.*, 2024). Em

Echinacea purpúrea, a presença de carvão ativado também estimulou o acúmulo de clorofila em mudas clonais estabelecidas via embriogênese somática (Dehestani-Ardakani, Hejazi e Aliabad, 2020). Corroborando com esses trabalhos, para *Elaeis guineensis*, o carvão ativado estimulou a atividade fotossintética, resultando em maior acúmulo de clorofilas e carotenoides.

Por outro lado, também existem efeitos negativos, dependente da espécie, do meio de cultura, do tipo de explante e do material genético. O CA também pode atuar como um inibidor do desenvolvimento vegetal, atuando negativamente, principalmente no sistema radicular, devido a adsorção não seletiva de importantes elementos do cultivo *in vitro*, como reguladores de crescimento, inibindo a formação de raízes em sua presença (Martins *et al.*, 2024; Selvaskanthan e Eeswara, 2024). Para a micropropagação de *Gyrinops walla*, sua presença promoveu a supressão do sistema radicular (Selvaskanthan e Eeswara, 2024). Para diferentes materiais genéticos de *Daucus carota* L., a formação e volume radicular apresentou resultados superiores na presença do reagente (Ozsan, Vural e Onus, 2024). Similar aos resultados de Selvaskanthan e Eeswara (2024), a adição de carvão ativado, atuou como supressor para o sistema radicular de mudas clonais *Elaeis guineensis*.

Os resultados de aclimatização corroboram com os valores obtidos durante o desenvolvimento *in vitro* de *Elaeis guineensis*, sendo necessário a garantia de qualidade e vigor ao longo do processo produtivo, caso contrário tem-se a obtenção de mudas limitadas em número e qualidade, bem como a baixa viabilidade para o campo.

5. CONCLUSÕES

O material genético tem uma influência direta no desenvolvimento *in vitro* de mudas clonais de *E. guineensis* e conseqüentemente no sucesso final da técnica, através do estabelecimento de mudas geneticamente superiores. É possível a obtenção de mudas clonais viáveis de todos os materiais genéticos avaliados, sendo necessário maior atenção e ajuste a materiais pouco responsivos, como o genótipo AM-21.

Coincidentemente os genótipos aparentados ao material genético denominado Deli e com maior parentesco entre si, apresentaram melhor desenvolvimento vegetativo ao longo do estudo, sugere-se um efeito da genética dos parentais no sucesso ao longo do estabelecimento de mudas clonais dos genótipos. Todavia é

necessário maiores estudos quanto ao grau de diversidade dos materiais, bem como sua correlação no estabelecimento de clones de *Elaeis guineensis*.

Para a obtenção de mudas clonais de maior qualidade, a ausência do carvão ativado foi melhor, com sistema radicular mais estruturado e conseqüentemente maior sucesso no estabelecimento de *Elaeis guineensis*.

O uso de 2,8 g. L⁻¹ de carvão ativado otimiza a embriogênese somática secundária de *Elaeis guineensis* e permite o aumento do número de mudas clonais ao final do processo, podendo ser utilizado como ferramenta para o prolongamento da competência embriogênica através do estabelecimento de culturas cíclicas de embriões somáticos. Fundamental para muitas espécies ou genótipos com maior dificuldade de multiplicação.

Todavia, recomenda-se maiores estudos quanto ao efeito da oscilação da concentração do componente ao longo do processo de morfogênese das plantas, visando atingir um desenvolvimento superior tanto do sistema aéreo como radicular, para uma maior qualidade e quantidade de mudas clonais ao final do processo.

6. REFERÊNCIAS

ABDELLATIF, Y. M. R. *et al.* Zinc oxide nanoparticles and Fe-modified activated carbon affecting the *in vitro* growth of date palm plantlets cv. Medjool. **Horticulturae**, v. 8, n. 12, p. 1179, 2022. DOI: 10.3390/horticulturae8121179

AGELE, S. O. *et al.* Oil palm-based cropping systems of the humid tropics: Addressing production sustainability, resource efficiency, food security and livelihood challenges. In: ***Elaeis guineensis***. IntechOpen, 2022. DOI: 10.5772/intechopen.98257

AHMAD, A. *et al.* The effects of genotypes and media composition on callogenesis, regeneration and cell suspension culture of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). **PeerJ**, v. 9, p. e11464, 2021. DOI: 10.7717/peerj.11464

ARIMARSETIOWATI, R. *et al.* Regeneration and development of *Coffea arabica* L. plants through indirect somatic embryogenesis. **Coffee Science-ISSN 1984-3909**, v. 18, p. e182078-e182078, 2023. DOI: 10.25186/.v18i.2078

ASTARI, R. P. *et al.* Genotypic effects on accelerated propagation of oil palm breeding materials selected (*Elaeis guineensis* Jacq.) using somatic embryogenesis. **Oil Crop Science**, v. 9, n. 2, p. 111-120, 2024. DOI: 10.1016/j.ocsci.2024.03.005

BAKEWELL-STONE, P. *Elaeis guineensis* (African oil palm). **PlantwisePlus Knowledge Bank, Species Pa**, 2022. DOI: 10.1079/cabicompendium.20295

BOGDANOVIĆ, M. D. *et al.* Secondary somatic embryogenesis in *Centaurium erythraea* Rafn. **Plants**, v. 10, n. 2, p. 199, 2021. DOI: 10.3390/plants10020199

BUSTAMI, M. U.; WERBROUCK, S. P. O. Cyclic Somatic Embryogenesis in Indonesian Elite *Theobroma cacao* L. Clones. **Horticulturae**, v. 10, n. 1, p. 24, 2023. DOI: 10.3390/horticulturae10010024

DANOVA, K. *et al.* Plant Growth Regulators and Activated Charcoal Selectively Affect Phenylethanoid and Flavone Glycoside Accumulation in *Sideritis scardica* Griseb. Tissue Culture. **Plants**, v. 12, n. 13, p. 2541, 2023. DOI: 10.3390/plants12132541

DEHESTANI-ARDAKANI, M.; HEJAZI, M.; ALIABAD, K. K. Indirect somatic embryogenesis of purple coneflower (*Echinacea purpurea* (L.) Moench): a medicinal-ornamental plant: evaluation of antioxidant enzymes activity and histological study. **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 9, p. 6621-6633, 2020. DOI: 10.1007/s11033-020-05713-y

DICKSON, A.; LEAF, A. L.; HOSNER, J. F. Quality appraisal of white spruce and white pine seedling stock in nurseries. **The Forestry Chronicle**, v. 36, n. 1, p. 10-13, 1960. DOI: 10.5558/tfc36010-1

DONG, F. S. *et al.* Transcriptome analysis of activated charcoal-induced growth promotion of wheat seedlings in tissue culture. **BMC genetics**, v. 21, p. 1-11, 2020. DOI: 10.1186/s12863-020-00877-9

FERRARI, I. F. *et al.* Comparative ontogenesis of *Coffea arabica* L. somatic embryos reveals the efficiency of regeneration modulated by the explant source and the embryogenesis pathway. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 57, p. 796-810, 2021. DOI: 10.1007/s11627-021-10200-5

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI P. P.; NOGUEIRA, D. A. ExpDes: An R package for ANOVA and experimental designs. **Appl. Math.** v. 5, n. 19, p. 2952–2958, 2014. DOI: 10.4236/am.2014.519280

HAZUBSKA-PRZYBYŁ, T. *et al.* Different roles of auxins in somatic embryogenesis efficiency in two *Picea* species. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 9, p. 3394, 2020. DOI: 10.3390/ijms21093394

KARYANTI, K. *et al.* Proliferation of oil palm (*Elaeis Guineensis* Jacq.) embryogenic callus with repeated subcultures in liquid medium. **Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia (JBBI)**, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2021. DOI: 10.29122/jbbi.v8i1.4715

MAMATHA, M. Activated Carbon as an Adsorbent: A Review. **International Journal For Multidisciplinary Research**, v. 5, n. 4, 18 ago. 2023. DOI: 10.36948/ijfmr.2023.v05i04.5478

MARTINS, J. P. R. *et al.* *In vitro* rooting of *Quercus robur*, activated charcoal vs. exogenous auxin: a morphophysiological approach. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 156, n. 1, p. 24, 2024. DOI: 10.1007/s11240-023-02656-7

MÁXIMO, W. P. F. *et al.* Multiplication and *in vitro* rooting of *Handroanthus impetiginosus* (Mart. Ex DC.) Mattos. **Ciência Florestal**, v. 30, n. 3, p. 658-668, 2020. DOI: 10.5902/1980509827012

MAZRI, M. A.; NACIRI, R.; BELKOURA, I. Maturation and conversion of somatic embryos derived from seeds of olive (*Olea europaea* L.) cv. Dahbia: occurrence of secondary embryogenesis and adventitious bud formation. **Plants**, v. 9, n. 11, p. 1489, 2020. DOI: 10.3390/plants9111489

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

NAIR, K. P. Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacquin). In: **Tree Crops: Harvesting Cash from the World's Important Cash Crops**, p. 249-285, 2021. DOI: 10.1007/978-3-030-62140-7_7

O'BRIEN, T. P.; MCCULLY, M. E. The study of plant structure: principles and selected methods. **Blackwell Scientific Publications**, Oxford, 1981.

OLIVEIRA, L. B. *et al.* Suplementação do silício aumenta a regeneração *in vitro* de embriões somáticos de palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 48, p. e019223, 2024. DOI: 10.1590/1413-7054202448019223

OZSAN, T.; VURAL, E. G.; ONUS, A. N. Do jasmonic acid and activated charcoal increase the *in vitro* development of orange carrot (*Daucus carota* L.) and purple carrot (*Daucus carota* L. ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.)?. **Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus**, v. 19, n. 5, p. 115-127, 2020. DOI: 10.24326/asphc.2020.5.12

PAULINO, M. A. P. *et al.* Desenvolvimento *in vitro* de *Cyrtopodium Cachimboense* I. C. Menezes em diferentes níveis de sacarose. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 2, p. 18844-18860, 2021. DOI: 10.34117/bjdv7n2-500

R CORE TEAM. R: **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2023. Disponível em: <https://www.R-project.org/>

RAI, A. C. *et al.* (Ed.). **Advances in Plant Tissue Culture: Current Developments and Future Trends**. Academic Press, 2022.

RUSCITTI, M. F. Fundamentos de la micropropagación en plantas. In: GERGOFF, G. E. G.; RUSCITTI, M. F.; GIMENEZ, D. O. **Introducción a la propagación vegetal**. Libros de Cátedra, 2023, cap. 10, p. 241 – 261.

SANTOS, P. R. *et al.* Protocolo para extração de pigmentos foliares em porta-enxertos de videira micropropagados. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 55, n. 4, p. 356-364, 2008.

SAPTARI, R. T. *et al.* Enhancing the regeneration of TIS-derived somatic embryos of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) with CaCl₂ and GA₃. In: **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. IOP Publishing, 2024. p. 012005. DOI: 10.1088/1755-1315/1308/1/012005

SELVASKANTHAN, S.; EESWARA, J. P. *In vitro* rooting of *Gyrinops walla* in activated charcoal-containing semi-solid culture and filter paper-bridged liquid culture systems. **Tropical Agricultural Research**, v. 35, n. 4, 2024. DOI: 10.4038/tar.v35i4.8846

SHARMA, G. *et al.* Activated carbon as superadsorbent and sustainable material for diverse applications. **Adsorption Science & Technology**, v. 2022, p. 4184809, 2022. DOI: 10.1155/2022/41848

VASIC, D.; ALIBERT, G.; SKORIC, D. Protocols for efficient repetitive and secondary somatic embryogenesis in *Helianthus maximiliani* (Schradler). **Plant Cell Reports**, v. 20, p. 121-125, 2001. DOI: 10.1007/s002990000291

WANG, X. *et al.* Current achievements and future challenges of genotype-dependent somatic embryogenesis techniques in *Hevea brasiliensis*. **Forests**, v. 14, n. 9, p. 1891, 2023. DOI: 10.3390/f14091891

WELLBURN, A. R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of plant physiology**, Jena, v. 144, n. 3, p. 307-313, 1994. DOI: 10.1016/S0176-1617(11)81192-2

WISZNIEWSKA, A. *et al.* Biochars as culture medium additives influence organogenic potential of plant explants through changes in endogenous phytohormone and carbohydrate contents in *Daphne* species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 152, n. 1, p. 45-66, 2023. DOI: 10.1007/s11240-022-02387-1