

THAIS ROSELI CORRÊA

**CLONAGEM E CONTROLE GENÉTICO DA EMBRIOGÊNESE
SOMÁTICA EM PALMA DE ÓLEO (*Elaeis guineensis* Jacq.)**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

C824c
2014
Corrêa, Thais Roseli, 1985-
Clonagem e controle genético da embriogênese
somática em palma de óleo (*Elaeis guineensis* (Jacq.) / Thais
Roseli Corrêa. - Viçosa, MG, 2014.
xi, 57f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador : Sérgio Yoshimitsu Motoike.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Dendê - Melhoramento genético. 2. Genética vegetal.
3. Tecidos vegetais - Cultura. 4. Poliaminas. 5. Parâmetros
genéticos. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento
de Fitotecnia. Programa de Pós-graduação em Genética e
Melhoramento. II. Título.

CDD 22. ed. 581.35

THAIS ROSELI CORRÊA

**CLONAGEM E CONTROLE GENÉTICO DA EMBRIOGÊNESE
SOMÁTICA EM PALMA DE ÓLEO (*Elaeis guineensis* Jacq.)**

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

APROVADA: 29 de outubro de 2014.

Edson Barcelos da Silva

Wagner Campos Otoni

Marcos Deon Vilela de Resende

Edgard Augusto de Toledo Picoli

Sérgio Yoshimitsu Motoike
(Orientador)

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2014

AGRADECIMENTOS

A Deus, que atendeu minhas preces todas as noites quando pedia força e sabedoria para concretizar meus objetivos.

A minha pequena e amada família, que mesmo tão distante sempre me colocaram em suas orações, e me motivaram com gestos e palavras, obrigada por me fazerem substituir a tristeza pela alegria, as incertezas pela segurança, a ver o lado positivo de tudo e todos e por se alegrarem com minhas conquistas.

Ao meu orientador Sérgio Yoshimitsu Motoike, pela confiança, apoio, paciência, palavras de incentivo e determinação ao longo destes anos, enfim, obrigada por todos os ensinamentos proporcionados.

A pesquisadora D.Sc. Kacilda Naomi Kuki por suas valiosas sugestões e contribuições em todas as etapas do meu doutorado.

Ao meu coorientador, Marcos Deon Vilela de Resende, por seus ensinamentos e contribuições, pela confiança em me coorientar e sua disposição em transmitir tantos conhecimentos na área de genética e biometria.

Ao meu coorientador, Edgard Augusto Toledo Picoli pela ajuda, disponibilidade, dedicação e valiosas contribuições.

A pesquisadora D.Sc. Mychelle Carvalho, que deu início a este trabalho com sua tese de doutorado, e sempre se mostrou disposta a contribuir em tudo que foi preciso, obrigada também pelas palavras de incentivo e amizade.

A Agropalma S.A. pelo apoio financeiro ao projeto, e por todas as informações e sugestões concedidas, obrigada também por sempre nos receberem tão bem no complexo da empresa, em especial aos colegas Ricardo, Hugo e Filipe, que participaram do projeto, meu agradecimento especial ao D.Sc. Gilson Sanchez Chia, pelas inúmeras trocas de conhecimento, artigos, informações e muito bom humor nestes anos de convivência.

As minhas companheiras e amigas do laboratório, Ana Paula Andrade, Manuela Granja, Vanessa Queiroz, Maria Clara Martino e Débora Durso, que não mediram esforços nos experimentos, sempre com dedicação, alegria e amizade acima de tudo, vocês foram fundamentais neste trabalho.

A técnica Elaine Rocha, obrigada por sua dedicação, seriedade e compromisso com este projeto, você é um exemplo de profissional, e é claro, obrigada por nossa amizade construída.

Ao técnico Francisco Assis, sempre disposto a ajudar, em todos os momentos, nunca disse “não”, sem medir esforços ajudou desde a introdução dos materiais até a aclimatização das plantas, obrigada Francisco!

A Rachel Ramos, pela ajuda nos experimentos, troca de conhecimento e principalmente pela nossa amizade desde os tempos de “genética quantitativa”.

A todos os colegas que estão e já passaram pelo Laboratório de Cultura de Tecidos, obrigada por tornarem nosso ambiente de trabalho um local agradável e divertido.

Ao pesquisador e colega D.Sc. Gustavo Silveira, por suas inúmeras contribuições e pela amizade durante o seu pós-doutorado no grupo REMAPE.

A minha “família em Viçosa”, companheiras de todos os momentos, as que deixaram nossa república e as que ainda permanecem, Aquidauana, Rebeca, Heloísa e Ana Francisca, obrigada pela paciência, amizade, carinho e por me ensinarem o verdadeiro valor da palavra AMIZADE, vocês são irmãs que Viçosa me presenteou.

A todos os meus amigos e colegas do grupo REMAPE, por tantos momentos compartilhados, tantos conhecimentos, congressos, almoços, jantas, confraternizações e cafezinhos, vocês tornaram meus anos de doutorado melhores.

A minha amiga Sara Coser, por suas inúmeras contribuições neste trabalho, por tantos momentos de estudo, seja para concurso, aula em Florestal, cursos, e principalmente pela amizade construída nesta importante etapa das nossas vidas.

Aos meus amigos Sebastian Montoya e Thiago Pires, pelos momentos compartilhados, por nossa amizade e por sempre elevarem minha “autoestima” quando eu mais precisei.

A Universidade Federal de Viçosa em especial ao Programa de Pós - Graduação em Genética e Melhoramento, pela oportunidade de realização do doutorado.

Aos meus amigos e colegas que conheci nestes anos, em especial a Família “Nick”, Carlos, Fabiana e Malu, por serem exemplos de determinação e incentivo a sermos profissionais melhores sempre.

Ao CNPq e a CAPES pela concessão das bolsas de estudo.

A todos os Professores da Universidade Federal de Viçosa, que tive oportunidade de adquirir tantos conhecimentos, pelas inúmeras oportunidades de aprendizados e qualidade de ensino.

BIOGRAFIA

THAIS ROSELI CORRÊA, filha de Bráulio Corrêa e Iria Terezinha Corrêa, nasceu em Peixoto de Azevedo - MT, no dia 21 de março de 1985. Graduiu-se em Ciências Biológicas em janeiro de 2008, pela Universidade do Estado de Mato Grosso, em Alta Floresta - MT. Em dezembro de 2010, recebeu o título de mestre em Produção Vegetal, pela Universidade do Estado de Santa Catarina, em Lages - SC. Em agosto de 2011, iniciou o curso de doutorado em Genética e Melhoramento pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa - MG, submetendo - se a defesa de tese em 29 de outubro de 2014.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT.....	xi
INTRODUÇÃO GERAL.....	12
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	15
CAPÍTULO I	19
Propagação in vitro de genótipos elite de palma de óleo (<i>Elaeis guineensis</i> Jacq.) para aplicação comercial: embriogênese somática utilizando putrescina	19
RESUMO.....	20
ABSTRACT.....	21
1.1. - INTRODUÇÃO	22
1.2. - MATERIAL E MÉTODOS	24
1.2.1. - Retirada do palmito, obtenção e preparação dos explantes foliares	24
1.2.2. - Indução de calos	25
1.2.3. - Multiplicação dos calos e obtenção das masas embriogênicas.....	25
1.2.4. - Critérios para a avaliação das linhagens embriogênicas.....	26
1.2.5. - Obtenção dos embriões somáticos.....	26
1.2.6. - Germinação dos embriões somáticos.....	26
1.2.7. - Aclimatização de mudas clonais.....	27
1.3. - RESULTADOS	28
1.4. - DISCUSSÃO	31
1.5. - CONCLUSÃO.....	33
1.6. - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
Estimativa de parâmetros genéticos para características in vitro de palma de óleo (<i>Elaeis guineensis</i> Jacq.) e seleção de genótipos para capacidade de clonagem e produtividade em óleo.....	41
RESUMO.....	42
ABSTRACT.....	43
2.1. - INTRODUÇÃO	44
2.2. - MATERIAL E MÉTODOS	45
2.3. - RESULTADOS	47

2.4. - DISCUSSÃO	52
2.5. - CONCLUSÃO	55
2.6. - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	57

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Propagação in vitro de genótipos elite de palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.) para aplicação comercial: embriogênese somática utilizando putrescina

Figura 1. Procedimentos de referenciamento do meristema apical para a extração segura do palmito e obtenção de explantes foliares para indução da embriogênese somática em palma de óleo. A: Abate de uma planta adulta de palma de óleo para realização de corte longitudinal do estipe e medições, com o objetivo da extração segura do palmito sem o comprometimento do meristema apical. B: Referenciamento para o corte seguro do palmito, onde a seta indica a região do meristema apical. C: Extração do palmito com base nas medições realizadas, sendo feita por um profissional. D: Retirada das camadas foliares externas de proteção do palmito para preparação dos explantes foliares. E-F: Folíolos imaturos separados individualmente, para a indução da embriogênese somática em palma de óleo.....38

Figura 2. Embriogênese somática a partir de explantes foliares de palma de óleo. A: Calo com aspecto nodular, estruturas globulares definidas e coloração bege a amarelo claro, formado na extremidade do explante foliar, após 90 dias do cultivo in vitro em meio de indução. B: Linhagem embriogênica com aspecto nodular e coloração amarela após 60 dias do cultivo in vitro em meio de multiplicação. C: Embriões somáticos com coloração branca e aderidos uns aos outros, obtidos após 60 dias de cultivo in vitro das linhagens embriogênicas em meio de regeneração. D: Embriões somáticos em meio de germinação, apresentando alongamento e mudança de coloração. E: Plântulas obtidas após 60 dias do cultivo in vitro no meio de germinação. F: Primeiro clone brasileiro de palma de óleo obtido após 12 meses da indução da embriogênese somática em planta adulta de palma de óleo. G: Clones do genótipo A-02 estabelecido em plantio comercial. Barras: A, B e C equivalentes a 3 mm; D e E equivalentes a 1,5 cm.....39

Figura 3: Etapas e duração da embriogênese somática em palma de óleo.....40

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Propagação in vitro de genótipos elite de palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.) para aplicação comercial: embriogênese somática utilizando putrescina

Tabela 1. Híbridos ‘Tenera’ de palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.) utilizados na clonagem de plantas adultas de palma de óleo.....24

Tabela 2. Taxa de calogênese em 32 genótipos elite de palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.).....29

Tabela 3. Classificação de linhagens embriogênicas quanto à capacidade de multiplicação em 32 genótipos de palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.).....30

CAPÍTULO II

Estimativa de parâmetros genéticos para características in vitro de palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.) e seleção de genótipos para capacidade de clonagem e produtividade em óleo

Tabela 1. Híbridos ‘Tenera’ de palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.) utilizados na clonagem de plantas adultas.....45

Tabela 2. Estimativas de parâmetros genéticos obtidos da análise de 32 genótipos de palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.), após 90 dias de cultivo in vitro, em relação às características explantes calejados (CAL) e formação de linhagens embriogênicas (LIN).....48

Tabela 3. Ranking de 32 genótipos de palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.) com base nas médias genotípicas e fenotípicas para o caráter indução da calogênese, após 90 dias do cultivo in vitro.....49

Tabela 4. Classificação com base na soma de ranks em relação, produtividade de cacho fresco (PCF), potencial de óleo estimado (POE) e incremento médio anual (IMA) dos 21 genótipos de palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.) que formaram linhagens embriogênicas.....50

Tabela 5. Produtividade de cacho fresco, potencial de óleo estimado e incremento médio anual dos genótipos de palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.) que produziram linhagens embriogênicas.....51

RESUMO

CORRÊA, Thais Roseli, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2014. **Clonagem e controle genético da embriogênese somática em palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.)**. Orientador: Sérgio Yoshimitsu Motoike.

O trabalho teve como objetivos, aplicar um protocolo para clonagem através da embriogênese somática, em que a citocinina foi substituída pela putrescina, a 32 genótipos elite de palma de óleo, e estudar o controle genético das principais características relacionadas a esta técnica, calogênese e produção de linhagens embriogênicas, buscando selecionar aqueles superiores para a formação de um jardim clonal. Para a indução da embriogênese somática, os explantes utilizados foram folíolos imaturos da região do palmito. Após a indução da calogênese, os genótipos que formaram linhagens embriogênicas, foram classificados como responsivos a embriogênese somática, e as linhagens obtidas, possibilitaram a regeneração de embriões somáticos e germinação dos mesmos para a obtenção das plantas. As estimativas dos parâmetros genéticos das características, calogênese e formação de linhagens embriogênicas, foram obtidas pela metodologia de modelos mistos, procedimento REML (Máxima Verossimilhança restrita) /BLUP (Melhor Predição Linear não Viesada). Todos os genótipos testados responderam positivamente à indução da calogênese, contudo, as porcentagens de resposta foram diferenciadas, sendo que, 65,62% destes, produziram linhagens embriogênicas, e 40,62%, apresentaram linhagens com moderada e elevada capacidade de multiplicação, principal fator que permitiu a obtenção dos clones. A calogênese e a produção de linhagens embriogênicas, apresentaram controle genético, verificado através das estimativas de parâmetros genéticos: herdabilidade, coeficiente de variação relativa e acurácia seletiva, indicando também eficiência na seleção de genótipos superiores dentro do conjunto avaliado. Os genótipos A-13, A-14, A-18, A-20 e A-21 foram selecionados como genótipos superiores tanto para características relacionadas à produtividade de óleo, quanto ao desempenho in vitro. A embriogênese somática em palma de óleo é considerada uma técnica genótipo-dependente e a putrescina mostrou-se eficiente, sendo este protocolo aplicável em escala comercial, pois possibilita a obtenção de clones em até 360 dias. Este foi o primeiro estudo que demonstrou a eficiência da embriogênese somática a partir de plantas adultas, consideradas “materiais elites” de palma de óleo e investigou o

controle genético da capacidade de clonagem visando à seleção dos genótipos para a formação de um jardim clonal.

ABSTRACT

CORRÊA, Thais Roseli, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2014. **Cloning and genetic control of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.)**. Adviser: Sérgio Yoshimitsu Motoike.

This work had as objectives, to apply a cloning protocol through somatic embryogenesis, on which the cytokinin was replaced by putrescine, to 32 elite genotypes of oil palm, and to study the genetic control of the main characteristics related to this technique, calogenesis and production of embryogenic mass, aiming to select those superior ones to form a clonal garden. To induce somatic embryogenesis, the used explants were immature leaflets from the heart of palm. After calogenesis induction, the genotypes that formed embryogenic mass were classified as somatic embryogenesis responsive, and the obtained mass made possible the somatic embryos regeneration and their germination to obtain the plants. The estimations of the genetic parameters of the characteristics, calogenesis and formation of embryogenic mass were obtained by the methodology of REML (Restricted Maximum Likelihood) / BLUP (Best Linear Unbiased Prediction). All the tested genotypes responded positively to calogenesis induction, however, the response percentages were differentiate, being that 65,62% of these, produced embryogenic mass, and 40,62%, showed mass with moderate and high multiplication capacity, main factor that permitted the obtaining of clones. The calogenesis and the production of embryogenic mass presented genetic control, verified through the estimations of genetic parameters: heritability, variation coefficient and selective accuracy, also indicating efficiency in the selection of superior genotypes inside an evaluated group. The genotypes A-13, A-14, A-18, A-20 and A-21 were selected as superior genotypes for both characteristics related to oil productivity and in vitro performance. The somatic embryogenesis in oil palm is considered a technique genotype-dependent and the putrescine showed efficiency, being this protocol applicable in a commercial scale, since, it makes possible the obtaining of clones in up to 360 days. This was the first study that demonstrated the somatic embryogenesis efficiency from adult plants, considered “elite material” and investigated the genetic cloning capacity control for selection of genotypes to form a clonal garden.

INTRODUÇÃO GERAL

A palma de óleo, dendezeiro ou dendê (*Elaeis guineensis* Jacq.) é uma palmeira oleaginosa de origem africana cultivada em três principais áreas do Trópico Equatorial: África, Sudeste da Ásia e América (Central e do Sul) (Rios et al., 2012). O principal produto da palma de óleo é o óleo extraído da polpa do fruto, e atualmente é o óleo vegetal mais produzido e consumido no mundo, constituindo a principal matéria-prima para a indústria oleoquímica (Mielke, 2013).

O elevado consumo de óleo extraído desta palmeira deve-se ao alto rendimento de óleo, sendo considerada a planta com maior produtividade entre as oleaginosas, como a soja, o girassol e a colza (Gan & Li, 2014; Mielke, 2013; Lam et al., 2009). Em 2012, foram produzidos 56 milhões de toneladas de óleo e gordura a partir da palma de óleo e estima-se que em 2020, a demanda mundial de óleo desta planta será de aproximadamente 78 milhões de toneladas (Mielke, 2013).

Para suprir a demanda mundial por óleo extraído da palma, o melhoramento genético é fundamental, pois possibilita a introdução de cultivares superiores nos plantios comerciais, contribuindo assim para o aumento da produtividade. Contudo, o melhoramento genético da palma de óleo é limitado, devido ao longo período e custos de avaliação para chegar a cultivar desejada (Rance et al., 2001). O ciclo de seleção, que inclui avaliação e seleção fenotípica, e o cruzamento entre as famílias selecionadas para formar uma nova população, requer aproximadamente 19 anos (Wong e Bernardo, 2008).

Além do longo ciclo de seleção, a palma de óleo apresenta alta heterozigose, e a propagação seminífera, como ocorre atualmente, torna o plantio heterogêneo, promovendo a desuniformidade na produção e dificultando as práticas de manejo (Malike et al., 2012; Srisawat & Kanchanapoom, 2005).

Como alternativa para superar o longo ciclo de seleção da palma de óleo, promover a uniformidade nos plantios e facilidade nas práticas de manejo, os clones obtidos a partir de matrizes híbridas selecionadas podem ser de grande eficiência.

A cultura de tecidos por meio da propagação de clones elites contribui para o incremento da produção, pois os melhores genótipos podem ser propagados em grande escala, maximizando o rendimento de óleo em até 18 ton/ha (Nugroho et al., 2014), em um tempo relativamente curto.

A embriogênese somática tem sido o principal método utilizado para a propagação clonal da palma de óleo (Ooi et al., 2013; Palanyandy et al., 2013; Konan et al., 2006). Esta técnica já foi testada a partir de diferentes explantes nesta espécie (Balzon et al., 2013; Thuzar et al., 2011; Scherwinsky-Pereira et al., 2010; Rajesh et al., 2003). Contudo, é considerada laborosa e seu sucesso depende do genótipo em que é aplicada (Ooi et al., 2013). Ainda, os detalhes da multiplicação clonal da palma de óleo, não são publicados, pois as pesquisas são conduzidas por empresas com fins comerciais, não disponibilizando seus protocolos (Scherwinsky-Pereira et al., 2010).

Na micropropagação da palma de óleo, outro aspecto a ser considerado, é o surgimento do “mantled flower”, uma anomalia floral que se manifesta em plantas obtidas por cultivo *in vitro*, sendo caracterizada pela feminização do androceu em flores femininas e masculinas, em que os primórdios de estames rudimentares se desenvolvem em carpelos suplementares (Alwee et al., 2006). Esta anomalia é acompanhada pela produção de frutos partenocárpicos (Corley et al., 1986), afetando o potencial produtivo de óleo.

O “mantled” é considerado uma variação somaclonal, termo dado a toda variação que ocorre em linhagens de células somáticas após o cultivo *in vitro* e que resulta em novos fenótipos. Esta variação somaclonal está relacionada com alterações nos padrões de metilações de DNA em tecidos expostos a determinados reguladores de crescimento (Jaligot et al., 2002; Jaligot et al., 2011) e ainda, pode ser de origem epigenética, sendo frequentemente temporária e as plantas podem ter o fenótipo normal revertido (Smulders & Klerk, 2011).

As causas do “mantled” são pouco conhecidas, mas entre as principais apontadas têm-se o uso da citocinina (Roowi et al., 2010; Eeuwens et al., 2002; Jones et al., 1995) e a combinação de altas concentrações de citocininas e baixas de auxinas no meio de cultivo (Smulders & Klerk, 2011). Em tecidos expostos a citocininas exógenas, pode ocorrer uma alteração no padrão de metilação de DNA nos genótipos mais sensíveis ao “mantled”. Logo, devido aos possíveis efeitos negativos da citocinina na micropropagação da palma de óleo, modificações na composição do meio de cultura para reduzir a incidência do “mantled” têm sido testadas (Eeuwens et al., 2002), contudo, essas modificações levaram a redução do sucesso da técnica da embriogênese somática (Kushairi et al., 2010).

As poliaminas podem ser excelentes alternativas para a substituição da citocinina na propagação clonal da palma de óleo, em que se espera obter plantas

livres do “mantled”. Estas moléculas são de baixo peso molecular e apresentam cargas positivas, o que facilita interações eletrostáticas com macromoléculas, tais como DNA, RNA, fosfolipídios e componentes de parede celular (Wallace et al., 2003; Baron & Stassola, 2008). Como há uma correlação entre metilações de DNA em plantas afetadas pelo “mantled flower”, o uso de poliaminas pode minimizar a frequência destas metilações (Brooks et al., 2010), proporcionando plantas livres desta anormalidade.

Além disso, as poliaminas contribuem de forma positiva para o cultivo in vitro, pois apresentam enzimas em sua biossíntese com importante atividade no crescimento e desenvolvimento de plantas. Como exemplo, a enzima ornitina descarboxilase (ODC), responsável pela síntese de poliaminas, foi expressa em células de tomate com alta atividade mitótica e a enzima arginina descarboxilase (ADC), também mediadora da biossíntese de poliaminas, têm sua atividade relacionada com a alongação celular (Acosta et al., 2005; Baron & Stassola, 2008).

Apesar das poliaminas exibirem efeitos tão significativos quanto os reguladores de crescimento, estas ainda não se enquadram como tais, pois, a concentração celular de poliamina é elevada se comparada aos reguladores clássicos. É possível que as poliaminas sejam mensageiros secundários da sinalização de fitormônios e regulem processos fisiológicos específicos em plantas, tais como: divisão celular, organogênese, embriogênese, desenvolvimento floral, desenvolvimento de frutos, resposta a estresses, fotossíntese entre outros. As poliaminas também estão relacionadas à biossíntese de etileno apresentando um efeito antagonista em relação à ação deste regulador de crescimento, sendo que ambos apresentam um precursor comum, o SAM (S-Adenosil Metionina) (Baron & Stassola, 2008).

A utilização da poliamina substituindo a citocinina na embriogênese somática em palma de óleo foi descrita por Rajesh et al., (2003), contudo, estes autores utilizaram embriões zigóticos como explantes. Carvalho (2008) descreve o uso da poliamina na embriogênese somática em palma de óleo utilizando inflorescência e explantes foliares de plantas jovens. Todavia, não há registro do uso de poliaminas em trabalhos que utilizem folhas imaturas a partir de plantas adultas, como fonte de explantes, ou ainda, ou ainda trabalhos que visem à produção de clones para o estabelecimento de um plantio comercial não são de domínio público.

Além de um protocolo eficiente para a clonagem de palma de óleo por meio da embriogênese somática, é essencial que genótipos considerados “elite”, aqueles mais produtivos em óleo, respondam a este protocolo. Para tanto, é fundamental o estudo do controle genético através da estimativa de parâmetros genéticos, nas duas etapas primordiais da embriogênese somática, a calogênese e a produção de linhagens embriogênicas. Esses estudos podem auxiliar na seleção de genótipos que agreguem características superiores tanto para a resposta *in vitro*, quanto às características de produtividade, para o estabelecimento dos jardins clonais.

A maioria dos trabalhos que determinam parâmetros genéticos em palma de óleo visam apenas caracteres agrônômicos relacionados à produtividade de óleo (Lopes et al., 2012; Soh et al., 2003). Até o momento, não há registro na literatura de estudo de parâmetros genéticos com o objetivo de determinar os genótipos ideais, tanto em características de produtividade de óleo, como em desempenho *in vitro* para a clonagem.

Assim, os objetivos deste trabalho foram demonstrar a eficiência da poliamina putrescina na embriogênese somática em 32 genótipos elites de palma de óleo, bem como identificar o potencial destes para obtenção de clones. Além de estudar o controle genético da calogênese e da produção de linhagens embriogênicas, para classificar os genótipos superiores, dentro do conjunto avaliado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acosta, C.; Pérez-Amador, M. A.; Carbonell, J.; Granell, A. 2005. The two ways to produce putrescine in tomato are cell-specific during normal development. **Plant Science**. 168: 1053–1057.

Alwee, S.S.; Linder, V.; Schoot, J.V.T.; Folter, S.; Angent, G.C.; Cheach, S-C.; Smulders, M.J.M. 2006. Characterization of oil palm MADS box genes in relation to the mantled flower abnormality. **Plant Cell Tissue Organ Culture**. 85, 331-344.

Balzon, T.A.; Gomes Luis, Z.; Scherwinsky-Pereira, J.E. 2013. New approaches to improve the efficiency of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) from mature zygotic embryos. **In Vitro Cell Development Biology Plant**. 49, 41-50.

Baron, K.; Stasolla, C. 2008. The role of polyamine during *in vivo* and *in vitro* development. **In Vitro Cell Development Biology Plant**. 44, 384-395.

Carvalho, M. **Embriogênese somática a partir de folhas imaturas e flores desenvolvidas in vitro de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.)**. 86p. 2008. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

Corley, R.H.V.; Lee, C.H.; Law, I.H.; Wong, C.Y. 1986. Abnormal flower development in oil palm clones. **Planter**. 62:223-240.

Eeuwens, C.J.; Lord, S.; Donough, C.R.; Rao, V.; Vallejo, G.; Nelson, S. 2002. Effects of tissue culture conditions during embryoid multiplication on the incidence of “mantled” flowering in clonally propagated oil palm. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. 3, 311-323.

Gan, P.Y.; Li, Z.D. 2014. Econometric study Malaysia’s palm oil position in the word market to 2035. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. 39, 740-747.

Jaligot, E.; Beule, T.; Rival, A. 2002. Methylation-sensitive RFLPs: characterisation of two oil palm markers showing somaclonal variation-associated polymorphism. **Theoretical and Applied Genetics**. 104, 1263– 1269.

Jaligot, E.; Adler, S.; Debladis, E.; Beule, T.; Richaud, F.; Ilbert, P.; Jean Finnegan, E.; Rival, A. 2011. Epigenetic imbalance and the floral developmental abnormality of the in vitro-regenerated oil palm *Elaeis guineensis*. **Annals of Botany**. 108, 1453– 1462.

Jones, L.H.; Hanke, D.E.; Eeuwens, C.J. 1995. An evaluation of the role of cytokinins in the development of abnormal inflorescences in oil palms (*Elaeis guineensis* Jacq.) regenerated from tissue culture. **Journal of Plant Growth Regulation**. 14, 135-142.

Konan, K.E.; Duran-Gasselin, T.; Kouadio, Y.J.; Rival, A. 2006. A modeling approach of the in vitro of palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryos. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. 84, 99-112.

Kushairi, A.; Tarmizi, A.H.; Zamzuri, I.; Ong-Abdullah, M.; Samsul Kamal, R.; Ooi, S.E.; Rajanaidu, N. 2010. **Production, performance and advances in oil palm tissue culture**. Paper presented at the International Seminar on Advances in Oil Palm Tissue Culture, in Yogyakarta, Indonesia.

Lam, M.K.; Tan, K.T.; Lee, K.T.; Mohamed, A.R. 2009. Malaysian palm oil: Surviving the food versus fuel dispute for a sustainable future. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. 13, 1456-1464.

Lopes, R.; Cunha, R.N.V.; Resende, M.D.V. 2012. Produção de cachos e parâmetros genéticos de híbridos de caiaué com dendezeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 47, 1496-1503,

Malike, A.F.; Abdulah, N.; Amiruddin, M.D. 2012. **Selection of Oil Palm Clones with High Bunch Index for Recloning at Malaysian Palm Oil Board (MPOB)**. Paper presented at the International Annual Symposium on Sustainability Science and Management, in Terengganu, Malaysia.

- Mielke, T. 2013. **Palm Oil the leader in global oils and facts supply**. Paper presented at the Malaysia/Myanmar palm oil trade fair and seminar, Yangon, Myanmar, 28 June. Available at http://www.mpoc.org.my/upload/Plenary_Paper-Thomas-Mielke.pdf> Accessed: 11.09.2014.
- Nugroho, Y. A.; Sumertajaya, I. M.; Wiendi, N. M. A.; Toruan-Mathius, N. 2014. Estimation of genetic parameters for in vitro culture traits and selection best progenies for Tenera oil palm tissue culture. **Energy Procedia**. 4, 316- 322.
- Ooi, S.E.; Novak, O.; Dolezal, K.; Ishak, Z.; Ong-Abdullah, M.O. 2013. Cytokinin Differences in In Vitro Cultures and Inflorescences from Normal and Mantled oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Journal of Plant Growth Regulation**. 1-10.
- Palanyandy, S.R.; Suranthran, P.; Gantait, S.; Sinniah, U.R.; Subramaniam, S.; Abdul Aziz, M.; Alwee, S.S.R.A.; Roowi, S.A. 2013. In vitro developmental study of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) polyembryoids from cell suspension using scanning electron microscopy. **Acta Physiology Plant Journal**. 35, 1727 – 1733.
- Rajesh, M.K.; Radha, E.; Karun, A.; Parthasarathy, V.A. 2003. Plant regeneration from embryo-derived callus of oil palm-the effects of exogenous polyamines. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. 75, 41–47.
- Rance, K. A.; Mayes, S.; Price, Z.; Jack, P.L.; Corley, R. H. V. 2001. Quantitative trait loci for yield components in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Theoretical and Applied Genetics**. 103, 1302-1310.
- Rios, S.A.; Cunha, R.N.V. da; Lopes, R.; Barcelos, E. 2012. **Recursos genéticos de palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.) e caiaué (*Elaeis oleífera* (H.B.K.) Cortés)**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 39p (Embrapa Amazônia Ocidental, Documentos 96).
- Roowi, S.H; Ho, C.L.; Alwee, S.S.R.S.; Abdullah, M.O.; Napis S. 2010. Transcripts from the suspension cel of Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in response to different concentration of auxin. **Molecular Biotechnology**. 46, 1-19.
- Scherwinsky-Pereira, J.E.; Guedes, R.S.; Fermino, P.C.P.; Silva, T.L; Costa, F.H.S. 2010. Somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm using the thin cell layer technique. **In Vitro Cell Development Biology Plant**. 46, 378-385.
- Smulders, M.J.M.; Klerk, G.J. 2011. Epigenetic in plant tissue culture. **Journal of Plant Growth Regulation**. 63, 137-146.
- Soh, A.C.; Gan, H.H.; Wong, G. ; Hor, T.Y.; Tang, C.C. 2003. Estimates of within family genetic variability for clonal selection in oil palm. **Euphytica**. 133, 147-163.
- Srisawat, T.; Kanchanapom, K. 2005. The influence of physical conditions on embryo and protoplast culture in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Science Asia**. 31, 23-28.

Thuzar, M.; Vanavichit, A.; Tragoonrung, S.; Jantasuriyarati, C. 2011. Efficient and rapid plant regeneration of oil palm zygotic embryos cv. 'Tenera' through somatic embryogenesis. **Acta Physiology Plant Journal**. 33, 123-128.

Wallace, H. M.; Fraser, A. V.; Hughes, A. 2003. A perspective of polyamine metabolism. **Biochemical Journal**. 376: 1-14.

Wong, C.; Bernardo, R. 2008. Genome wide selection in oil palm: increasing selection gain per unit time and cost with small population. **Theoretical and Applied Genetics**. 116,815-824.

CAPÍTULO I

**Propagação in vitro de genótipos elite de palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.)
para aplicação comercial: embriogênese somática utilizando putrescina**

RESUMO

CORRÊA, Thais Roseli, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2014. **Propagação in vitro de genótipos elite de palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.) para aplicação comercial: embriogênese somática utilizando putrescina.** Orientador: Sérgio Yoshimitsu Motoike. Coorientadores: Marcos Deon Vilela de Resende e Edgard Augusto de Toledo Picoli.

A multiplicação clonal de palma de óleo permite a formação de plantios comerciais com maior produtividade, sendo possível através da embriogênese somática, porém, devido às modificações nos protocolos atuais para evitar o aparecimento do “mantled flower”, o sucesso desta técnica tem sido limitado. Desta maneira, este trabalho teve como objetivo aplicar um protocolo para clonagem através da embriogênese somática, em que a citocinina foi substituída pela putrescina, a 32 genótipos elite de palma de óleo, provenientes de um plantio comercial. Todos os genótipos testados responderam positivamente à indução da calogênese, contudo, as porcentagens de resposta foram diferenciadas, sendo que, 65,62% destes genótipos produziram linhagens embriogênicas, e 40,62% deste total, apresentaram linhagens com moderada e elevada capacidade de multiplicação, principal fator que permitiu a obtenção de clones para a formação de um plantio clonal comercial. A embriogênese somática em palma de óleo é considerada uma técnica genótipo-dependente e a putrescina mostrou-se eficiente, sendo este protocolo aplicável em escala comercial, pois, possibilita a obtenção de clones em até 360 dias, contudo, são necessárias avaliações futuras quanto ao aparecimento do “mantled flower” nestes clones.

Palavras-chave: “mantled flower”, plantas adultas, poliamina, clones, cultura de tecidos.

ABSTRACT

CORRÊA, Thais Roseli, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2014. **In vitro propagation of elite oil palm genotypes (*Elaeis guineensis* Jacq.) for commercial application: somatic embryogenesis using putrescine.** Adviser: Sérgio Yoshimitsu Motoike. Co-Advisers: Marcos Deon Vilela de Resende and Edgard Augusto de Toledo Picoli.

Clonal multiplication of oil palm allows formation of commercial crops with a bigger yield, being possible through somatic embryogenesis, however, due to the modification made to the current protocols to avoid the appearing of the “mantled flower”, the success of this technique has been limited. Thus, this work had as objective apply a cloning protocol through somatic embryogenesis, in which the cytokinin was substituted by putrescine, to 32 elite oil palm genotypes, coming from a commercial crop. All the tested genotypes responded positively to the calogenesis induction, still, the responding percentages were differentiated, 65,62% of these genotypes produced embryogenic mass, and 40,62% of this total, presented mass with moderate and high multiplication capacity, main factor that permitted the obtaining of clones for the formation of a commercial clonal plantation. Somatic embryogenesis in oil palm is considered a genotype-dependent technique and putrescine showed efficiency, being this protocol applicable in commercial scale, therefore enables clone obtaining in up to 360 days, all in all, future evaluations are needed regarding to the appearing of the “mantled flower” on these clones.

Key words: “mantled flower”, adult plants, polyamine, clones, tissue culture.

1.1. - INTRODUÇÃO

A palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.) é uma palmeira oleaginosa de origem africana com grande importância econômica, tanto para a indústria alimentícia como para a não alimentícia (Gan & Li, 2014). O óleo extraído desta palmeira é atualmente o mais produzido e consumido no mundo, respondendo por 30% ou 56 milhões de toneladas de óleo e gordura produzidos em 2012, substituindo o óleo de côco e o sebo, sendo a principal matéria-prima para a indústria oleoquímica (Mielke, 2013).

A dependência global da palma de óleo tende a aumentar nos próximos anos e antecipa-se que em 2020, pelo menos 78 milhões de toneladas de óleo extraído desta palmeira será exigido por consumidores no mundo inteiro (Mielke, 2013), pois, além do interesse por parte da indústria alimentícia, a palma de óleo está se tornando a matéria-prima mais importante para produção de biocombustíveis (Gan & Li, 2014).

O aumento dos preços do petróleo, bem com a intenção de reduzir a emissão de gases do efeito estufa, tem impulsionado a demanda por palma de óleo, devido aos rendimentos elevados desta planta se comparado a outros óleos vegetais, como a soja, o girassol e a colza (Gan & Li, 2014; Mielke, 2013; Lam et al., 2009).

Em 2013, 4,6 milhões de toneladas de óleo de palma foram utilizadas apenas para a produção de biocombustível, sendo responsável por 30% da matéria-prima no cenário mundial. Estudos indicam que até 2035 estes rendimentos precisam aumentar ainda mais, e isso só será possível graças aos esforços em melhorar a cadeia produtiva (Gan & Li, 2014).

Dentre estes esforços, o melhoramento genético é fundamental, pois possibilita a introdução de cultivares superiores nos plantios comerciais, contribuindo assim para o aumento da produtividade. Contudo, o melhoramento genético da palma de óleo é limitado, devido ao longo período e custos de avaliação para chegar a cultivar desejada (Rance et al., 2001). O ciclo de seleção, que inclui avaliação e seleção fenotípica e o cruzamento entre as famílias selecionadas para formar uma nova população requer aproximadamente 19 anos (Wong & Bernardo, 2008).

Além do longo período de seleção, a palma de óleo apresenta alta heterozigosidade, sendo a propagação dos plantios comerciais realizada por semente e isso tem resultado na formação de plantios heterogêneos, promovendo a desuniformidade na produção e dificuldade nas práticas de manejo (Srisawat & Kanchanapom, 2005). Como estratégia, o desenvolvimento de plantios comerciais de clones elites pode oferecer vantagens como a uniformidade na colheita, facilidade nas

práticas de manejo e maximização da produção de óleo (Malike et al., 2012), além da multiplicação dos genótipos superiores em um curto período de tempo. De acordo com Khaw et al. (1999), a produção de áreas cultivadas por clones elites é de 40 a 50 % superior do que áreas cultivadas por plantas formadas a partir de sementes.

Para a multiplicação clonal da palma de óleo, a embriogênese somática tem sido o principal método utilizado (Ooi et al., 2013; Palanyandy et al., 2013; Konan et al., 2006), e já foi testada a partir de diferentes explantes, como folhas imaturas de plantas jovens, inflorescências imaturas e embriões zigóticos (Balzon et al., 2013; Thuzar et al., 2011; Scherwinsky-Pereira et al., 2010; Rajesh et al., 2003). Contudo, esta técnica é considerada laborosa e seu sucesso depende do genótipo em que é aplicado (Ooi et al., 2013). Ainda, os detalhes da multiplicação clonal da palma de óleo não são publicados, pois as pesquisas são conduzidas por empresas com fins comerciais, não disponibilizando seus protocolos (Scherwinsky-Pereira et al., 2010).

Outro aspecto a ser considerado na micropropagação da palma de óleo é o surgimento do “mantled flower”, uma anomalia floral que se manifesta em plantas obtidas por cultivo *in vitro* (Alwee et al., 2006), afetando severamente o potencial produtivo. As causas do “mantled” são pouco conhecidas, mas o uso da citocinina (Roowi et al., 2010; Euweens et al., 2002; Jones et al., 1995) e a combinação de altas concentrações de citocininas e baixas de auxinas no meio de cultivo (Smulders & Klerk, 2011), têm sido apontadas como as principais causas desta anormalidade na micropropagação desta palmeira. Modificações na composição do meio de cultura para controlar o “mantled” têm sido bem sucedidas (Eeuwens et al., 2002), contudo, essas modificações levam a redução do sucesso da técnica de embriogênese somática (Kushairi et al., 2010).

Segundo Khan et al. (1992) e Galston & Kaur-Sawhney (1990), poliaminas podem substituir efetivamente as citocininas no cultivo *in vitro*. As poliaminas minimizam a frequência de metilações de DNA (Brooks et al., 2010) e também são essenciais em muitos processos celulares, desde a transcrição até fluidez de membranas (Baron & Stasolla, 2008). A utilização da poliamina substituindo a citocinina na embriogênese somática em palma de óleo foi descrita por Rajesh et al., (2003), contudo estes autores utilizaram embriões zigóticos como explantes. Todavia, trabalhos que utilizem folhas imaturas a partir de plantas adultas, como fonte de explantes, ou ainda trabalhos que visem à produção de clones para o estabelecimento de um plantio comercial não são de domínio público.

Este trabalho teve como objetivo demonstrar a eficiência da putrescina na embriogênese somática em 32 genótipos elites de palma de óleo, bem como identificar o potencial destes genótipos para obtenção de clones, visando um plantio comercial.

1.2. - MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Células e Tecidos Vegetais do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, conjuntamente com a empresa Agropalma S. A., localizada no município de Tailândia-PA.

Para a execução do experimento, 32 genótipos (matrizes) de palma de óleo, provenientes do plantio comercial da empresa Agropalma S.A., considerados “materiais elite”, oriundos de diferentes corporações mundiais, com idade entre 9 e 27 anos, foram selecionados para o processo de clonagem (Tabela 1).

Tabela 1: Híbridos ‘Tenera’ de palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.) utilizados na clonagem de plantas adultas.

Híbridos Tenera	Empresa fornecedora de sementes	Número de Matrizes acessadas	Idade (anos)
Deli x Ekona	ASD	2	9
Deli x Ghana	ASD	3	11
Deli x La Mé	Murrin Corporation	9	9-26
Deli x La Mé	Embrapa Manaus	4	11-13
Deli x Yangambi	Univanich Palm Oil	8	10-27
Deli x Avros	ASD	2	13
Kigoma	ASD	2	13
Deli x Dami	Dami Las Flores	2	14-15

1.2.1. - Referenciamento do meristema apical, retirada do palmito, obtenção e preparação dos explantes foliares

Para a indução do processo da embriogênese somática, os explantes utilizados foram folíolos imaturos da região do palmito, os quais foram extraídos da planta matriz doadora com auxílio de uma motosserra.

Para que a extração dos explantes não comprometesse o posterior crescimento da planta matriz, antes do processo de clonagem dos genótipos selecionados, foi determinada a região do estipe para o corte do palmito. Três plantas adultas foram

utilizadas no ensaio preliminar (Figura 1A), realizando um corte longitudinal no estipe e medições, para referenciar a região do meristema (Figura 1B), de modo que o mesmo pudesse ser preservado com segurança no momento da extração. A extração do palmito em todas as plantas matrizes elites foi baseada nesta referência de medição de altura (Figura 1C). Após a extração, cada palmito foi encaminhado ao Laboratório de Cultura de Células e Tecidos Vegetais da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa - MG.

Após 72 horas da retirada do material, no laboratório, os palmitos foram higienizados externamente com álcool 70 % e as camadas foliares externas cuidadosamente retiradas (Figura 1D), sendo as folhas imaturas separadas em sete camadas: folha -1 (mais externa) a folha -7 (mais interna) (Figura 1E e 1F) (Corley & Tinker, 2003). Em seguida, os folíolos de cada folha foram destacados da ráquis, sendo 1/3 da ápice do folíolo eliminados. Os folíolos foram então submetidos à desinfestação em solução asséptica de hipoclorito de sódio (1 % de cloro ativo) por 20 minutos e enxaguados sucessivamente por oito vezes em água deionizada estéril em câmara de fluxo laminar. Após a desinfestação, os folíolos foram seccionados transversalmente em segmentos de 1 cm de comprimento, os quais foram utilizados como explantes para indução da embriogênese somática.

1.2.2. - Indução de calos

O meio basal (MB) utilizado neste trabalho foi composto por sais e vitaminas Y3 (Eeuwens, 1978), 30 g L⁻¹ de sacarose, 1 g L⁻¹ de caseína hidrolisada, 1000 mg L⁻¹ de mio-inositol, 100 mg L⁻¹ de arginina, 100 mg L⁻¹ de asparagina, 100 mg L⁻¹ de glutamina e gelificados com 2,5 g L⁻¹ de Phytigel[®] (Sigma, USA). O pH foi de 5,7 ± 0,1 e os meios foram autoclavados por 20 minutos a 121 °C a 1,5 atm.

Para indução dos calos, o meio de cultura utilizado consistiu do MB, suplementado com 800 µM de ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) e 3 g L⁻¹ de carvão ativado (Sigma, USA) (Carvalho 2008). Os explantes foram inoculados em placas de Petri de poliestireno (90 x 15 mm) contendo 30 mL deste meio de cultura. Cinco explantes foliares foram inoculados por placa e 500 placas foram utilizadas por genótipo elite. Após a inoculação dos explantes, as placas foram seladas com filme de PVC (Rolopac[®]) e mantidas em sala de crescimento, à temperatura de 27 ± 1 °C na ausência de luz por 90 dias. Após o período de incubação, foi avaliada a porcentagem de explantes que formaram calos em cada genótipo.

1.2.3. - Multiplicação dos calos e obtenção das linhagens embriogênicas

Os calos obtidos de cada genótipo foram inoculados em meio de multiplicação, este meio consistiu do MB acrescido de $9\mu\text{M}$ de 2,4-D e $1000\mu\text{M}$ putrescina (Carvalho, 2008). Após a inoculação dos calos, as placas foram seladas com filme PVC (Rolopac[®]) e mantidas em sala de crescimento, à temperatura de 27 ± 1 °C na ausência de luz. Após 60 dias, os calos que formaram linhagens embriogênicas foram separados, estas foram subdivididas e subcultivadas no mesmo meio de multiplicação.

As linhagens consideradas embriogênicas apresentavam aspecto granular e coloração amarela, tendo a capacidade de multiplicação classificada como nula, baixa, moderada ou elevada.

1.2.4. - Critérios para a avaliação das linhagens embriogênicas

Os genótipos que não produziram linhagens embriogênicas tiveram como classificação “nula”.

As linhagens embriogênicas que aumentavam até duas vezes o tamanho original, tendo dificuldades de multiplicação, foram classificadas como “baixa”, sendo o genótipo que formou este tipo de linhagem classificado como um material que produz massa embriogênica com “baixa” capacidade de multiplicação.

Os genótipos que produziram massa embriogênicas com “moderada” capacidade de multiplicação foram aqueles em que as linhagens obtidas aumentavam em até três vezes o tamanho original, quando acondicionadas em meio de multiplicação.

Por fim, os genótipos que apresentavam linhagens embriogênicas com “elevada” capacidade de multiplicação foram aqueles em que suas linhagens aumentavam em cinco vezes ou mais, do tamanho inicial.

1.2.5. - Obtenção dos embriões somáticos

As linhagens embriogênicas, após passarem pela etapa de multiplicação, foram acondicionadas em meio de regeneração. O meio de regeneração foi constituído de MB acrescido de $0,1\mu\text{M}$ de 2,4-D, carvão ativado (Sigma, USA) e $1000\mu\text{M}$ de putrescina. Após a inoculação das linhagens embriogênicas neste meio, as placas foram seladas com filme PVC (Rolopac[®]) e mantidas em sala de crescimento, à temperatura de 27 ± 1 °C na ausência de luz por 60 dias.

1.2.6. - Germinação dos embriões somáticos

O meio de cultura para germinação consistiu do MB suplementado com 0,54 μ M de ANA e 1000 μ M de putrescina (Carvalho, 2008). Os embriões somáticos obtidos na etapa anterior foram individualizados e inoculados em tubo de ensaio (150 x 25 mm) contendo 10 mL do meio de germinação e depois de 30 dias foram colocados em frascos para completar a germinação. Os tubos de ensaio e/ou frascos foram mantidos em sala de crescimento mantida à 27 ± 2 °C com fotoperíodo de 16 horas/dia e irradiância de $\pm 40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ provida por lâmpadas tubulares de LED (18 W, Arapeva Iluminação LED). A partir de 60 dias foram realizadas contagens do número de plântulas obtidas no processo. Somente plântulas com parte aérea e raiz desenvolvida foram consideradas nessa contagem.

1.2.7. - Aclimatização de mudas clonais

Para a aclimatização, as raízes das plântulas foram enxaguadas em água corrente para retirar o excesso de meio de cultura. Em seguida, as plântulas foram estabelecidas em tubos de ensaio (150 x 25 mm) contendo 10 mL de solução nutritiva ½ força (macro e micronutrientes Y3 reduzida à metade) por um período de sete dias, sendo mantidas em sala de crescimento à $27^\circ \pm 2$ com fotoperíodo de 16 horas/dia irradiância de $\pm 40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ provida por lâmpadas tubulares de LED brancas (18 W, Arapeva Iluminação LED).

Após este período, as plântulas foram transferidas para tubetes de 63 mm de diâmetro e 130 mm de altura, preenchidos com 180 cm³ de substrato Plantimax[®], acrescido de 8,0 kg de superfosfato simples por metro cúbico de substrato. Em seguida, as plântulas foram transferidas para casa-de-vegetação e mantidas em câmara de nebulização intermitente, controlada por um temporizador com intervalo de rega fixo. A programação utilizada para nebulização foi com irrigação de 10 segundos a cada 20 minutos, nos primeiros 15 dias, após este período, a nebulização foi realizada de hora em hora, com irrigação de 20 segundos. O bico nebulizador empregado apresenta vazão de 120 mL/min. A temperatura máxima alcançada no interior deste sistema foi 35° C. O sombreamento da câmara de nebulização foi feito por uma manta termo-refletores (Aluminet[®]) com 50% de restrição de luz. As plântulas foram supridas semanalmente com 20 mL de solução nutritiva ½ força. Após 90 dias de aclimatização, as mudas clonais foram enviadas para a empresa Agropalma S.A.

Na empresa, as mudas foram transplantadas para sacolas plásticas com capacidade de 15 L, dimensão de 25 cm de diâmetro e 33 cm de altura, contendo

substrato composto de 60% de terra e 40% de compostagem (resíduo industrial de palma de óleo). As mudas foram mantidas em aclimação em pré-viveiro protegido com sombrite 50% por 30 dias. Após 30 dias, as mudas foram transferidas para o viveiro aberto para completar o seu desenvolvimento e, posteriormente, a implantação do jardim clonal.

1.3. - RESULTADOS

O estudo de referenciamento do meristema apical da palmeira adulta, realizado para a extração segura do palmito, indicou que o corte do palmito deve ser realizado no mínimo à 30 cm de altura da última inflorescência aberta, seja esta masculina ou feminina. Extraíndo-se a esta altura, o meristema apical é preservado e continua protegido, assegurando a retomada do crescimento da planta matriz.

O índice de contaminação em todos os genótipos foi menos que 5%, indicando que a utilização de folíolos imaturos da região do palmito como explantes, é uma excelente alternativa para a indução da embriogênese somática em palma de óleo, pois os tecidos estão protegidos por camadas foliares externas. Ademais, a metodologia de desinfestação também se mostrou eficiente, permitindo o sucesso do estabelecimento *in vitro* de todos os genótipos elite selecionados.

Aos 90 dias após a indução da embriogênese somática, foi possível observar que todos os 32 genótipos elite selecionados do grupo Agropalma S.A., responderam à indução da calogênese. As porcentagens de resposta dos genótipos foram variadas, alguns apresentaram apenas 1% de explantes com calos desenvolvidos e outros alcançaram até 52,05% (Tabela 2). A característica dos calos desenvolvidos foi semelhante em todos os genótipos, ocorrendo geralmente nas extremidades do explante foliar, na região onde o mesmo foi seccionado. Todos os calos desenvolvidos apresentavam aspecto nodular, com estruturas globulares definidas e coloração bege a amarelo claro (Figura 2A).

Tabela 2. Taxa de calogênese em 32 genótipos elite de palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.), após 90 dias do cultivo in vitro em meio de indução.

Genótipo	Background Genético	Calogênese (%)
A-01	Deli x Ekona	5,35
A-02	Deli x Ekona	7,15
A-03	Deli x La Mé	7,98
A-04	Deli x La Mé	52,05
A-05	Deli x La Mé	35,15
A-06	Deli x La Mé	21,76
A-07	Deli x Ghana	16,78
A-08	Deli x Ghana	4,77
A-09	Deli x Yangambi	5,68
A-10	Deli x Yangambi	3,91
A-11	Deli x Dami	4
A-12	Deli x Dami	1
A-13	Deli x La Mé	2,77
A-14	Deli x La Mé	4,12
A-15	Deli x Avros	6,2
A-16	Deli x Avros	5,88
A-17	Kigoma	9,53
A-18	Kigoma	2,92
A-19	Deli x La Mé (Embrapa)	1,61
A-20	Deli x La Mé (Embrapa)	1
A-21	Deli x La Mé	2,61
A-22	Deli x La Mé	3,47
A-23	Deli x Yangambi	6,09
A-24	Deli x Yangambi	0,62
A-25	Deli x Yangambi	6,18
A-26	Deli x Yangambi	1,11
A-27	Deli x Yangambi	0,28
A-28	Deli x Yangambi	10,04
A-29	Deli x La Mé (Embrapa)	1,14
A-30	Deli x Ghana	4,58
A-31	Deli x La Mé	17,21
A-32	Deli x La Mé (Embrapa)	4,62

A formação das linhagens embriogênicas, principal fator para garantir a produção de clones de palma de óleo através da embriogênese somática, ocorreu em 65,62% dos genótipos elite testados (Tabela 3). Observou-se que, até mesmo genótipos em que a porcentagem de resposta à calogênese foi baixa, como exemplo o genótipo A-

20 com 1% de calos formados, apresentou formação de linhagens embriogênicas (Tabela 2).

Embora a formação de linhagens embriogênicas tenha ocorrido em grande parte dos genótipos submetidos à indução da embriogênese somática, a capacidade contínua de proliferação destas apresentou respostas diferenciadas. Dentre os genótipos que formaram linhagens embriogênicas, 40,62% apresentaram estas estruturas com capacidade de multiplicação classificadas como moderadas e elevadas, os demais, tiveram a capacidade de multiplicação classificadas como, baixa ou nula (Tabela 3).

As linhagens embriogênicas puderam ser observadas entre o 30º e o 60º dia de cultivo dos calos em meio de multiplicação, podendo ser visualizadas sem o auxílio de lupa, pois apresentavam características diferenciadas em relação aos calos que as originaram.

Os calos que deram origem as linhagens embriogênicas apresentavam aspecto mucilaginoso, coloração marrom claro a bege e as linhagens eram friáveis, apresentavam aspecto granular e coloração amarela (Figura 2B). Mesmo após o 10º subcultivo consecutivo, todas as linhagens embriogênicas, até mesmo as com baixa capacidade de multiplicação, não perderam sua qualidade e potencial de regenerar plantas.

Tabela 3. Classificação de linhagens embriogênicas quanto à capacidade de multiplicação em 32 genótipos de palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.).

Capacidade de multiplicação de linhagens embriogênicas	Porcentagem de Genótipos (%)	Genótipos
Nula	34,37	A-01; A-03; A-06; A-11; A-12; A-19; A-23; A-24; A-25; A-27; A-32
Baixa	25	A-05; A-07; A-09; A-14; A-22; A-26; A-29; A-13
Moderada	12,5	A-04; A-18; A-30; A-31
Elevada	28,12	A-02; A-08; A-10; A-15; A-16; A-17; A-20; A-21; A-28

*Nula: genótipos que não formaram linhagens embriogênicas; Baixa: genótipos que formaram linhagens embriogênicas que aumentavam duas vezes o tamanho inicial; Moderada: genótipos que apresentaram linhagens embriogênicas que aumentavam até três vezes o tamanho inicial; Elevada: genótipos que formaram linhagens embriogênicas com capacidade de multiplicação em até cinco vezes o tamanho inicial.

Após 60 dias em meio de regeneração as linhagens embriogênicas diferenciaram-se, formando embriões somáticos que, eventualmente, completaram o seu desenvolvimento e maturação. Os embriões somáticos apresentavam coloração branca e estavam fortemente aderidos uns aos outros (Figura 2C), porém, com o auxílio de um bisturi, puderam ser separados, subdivididos e transferidos para o meio de germinação.

Aos 20 dias em meio de germinação, os embriões somáticos alongaram e mudaram de coloração para branco esverdeado (Figura 2D). Entre o 30º e 60º dia de cultivo neste meio, os embriões somáticos se converteram em plântulas completas, com parte aérea e radícula (Figura 2E).

Após 90 dias em meio de germinação, 92% das plântulas foram aclimatizadas com sucesso, demonstrando que o método utilizado para a aclimatização foi eficiente. O processo de aclimatização foi completado aos 90 dias, quando as plantas alcançavam a altura de aproximadamente 25 cm e 4 folhas expandidas.

Foram enviados para a empresa Agropalma S.A. 158 rametes (plantas) de cada genótipo elite, os quais foram estabelecidos em pré-viveiro (Figura 2F), sendo o plantio destas mudas em curso no corrente ano (Figura 2G).

O tempo necessário para a embriogênese somática em palma de óleo, utilizando os procedimentos propostos, desde a obtenção dos explantes foliares à aclimatização das plantas, foi de até 360 dia (Figura 3).

1.4. - DISCUSSÃO

A cultura de tecidos através da embriogênese somática é uma alternativa atrativa para a propagação em massa de genótipos elite de palma de óleo (Ooi et al., 2013), contudo, a eficiência da regeneração das plantas está fortemente associada a escolha do explante. Os explantes mais utilizados para a indução da embriogênese somática são folíolos imaturos, por serem mais responsivos e por oferecerem menores riscos de contaminação. Estas estruturas se encontram protegidas do contato de microrganismos, e estão envoltas por folhas mais velhas no interior do palmito, não requerendo assim, severas desinfestações que causam danos aos explantes (Corley & Tinker, 2003), o que foi comprovado pelo baixo índice de contaminação observada nos genótipos testados. A extração de folhas imaturas, ao contrário do que é descrito na literatura (Corley & Tinker, 2003), foi realizada sem causar danos permanentes à planta matriz, sendo as mesmas recuperadas alguns meses após a extração.

A dose de 2,4 D utilizada para a indução da embriogênese somática neste trabalho (800 μM) foi elevada, se comparada às doses descritas por outros autores, que recomendam concentrações de 2,4-D que variam de 113,12 à 450 μM (Rajesh et al., 2003; Scherwinski-Pereira et al., 2010; Silva et al., 2013). Contudo, esta concentração apresentou-se eficiente na indução da embriogênese em palma de óleo, levando à formação de calos em todos os genótipos testados.

A porcentagem de explantes que formaram calos variou entre grupos de cruzamento e mesmo entre genótipos do mesmo grupo. Silva et al. (2012) e Thawaro & Te-chato (2009) consideram que a resposta à indução da embriogênese somática em palma de óleo é uma característica dependente do genótipo. Essa resposta pode inclusive variar entre explantes do mesmo genótipo, sendo dependente do estado fisiológico dos tecidos envolvidos. Segundo Ooi et al. (2012), a sensibilidade dos tecidos à indução da embriogênese somática está intimamente relacionada com o nível endógeno de auxina presente nos explantes, sendo maior quanto mais alto for este nível. O nível endógeno de auxina pode ser aumentado a partir da aplicação exógena de 2,4 D, estimulando assim a totipotência das células (Gueye et al., 2009).

A formação de linhagens embriogênicas, garantiu a clonagem de 65,62% dos genótipos testados, e ainda, grande parte destes genótipos (40,62%), produziram linhagens com moderada e elevada capacidade de multiplicação, isto possibilita que este método seja utilizado para a clonagem em escala comercial desses genótipos. Comparado com relatos de Soh et al. (2011) e Kushairi et al. (2010), os quais mencionam baixa eficiência do processo de clonagem com sucesso entre 3% a 6%, o processo de clonagem adotado neste trabalho pode ser considerado eficiente. Kushairi et al. (2010) alegam que a taxa de embriogênese somática em palma de óleo é baixa em função das modificações pelos quais os protocolos de clonagem sofreram para evitar o aparecimento do “mantled flower”, uma anomalia floral que ocorre nas plantas oriundas do cultivo *in vitro*, afetando severamente o potencial produtivo, devido a produção de frutos partenocárpicos (Corley et al., 1986).

A principal modificação nos protocolos de micropropagação da palma de óleo adotados para o controle do “mantled flower” foi a redução ou até eliminação da citocinina como indutor de multiplicação em meio de cultura (Jaligot et al., 2002; Jaligot et al., 2011; Eewens et al., 2002), por acreditar-se que a citocinina estimule a hipometilação do DNA, o que resulta em uma transformação homeótica dos órgãos florais, tendo como consequência negativa, o aparecimento do “mantled flower” em plantas micropropagadas de palma de óleo (Eeuwens et al., 2002). No protocolo

utilizado neste trabalho, a citocinina foi substituída com sucesso por putrescina, uma poliamina envolvida em diversos processos fisiológico em plantas, incluindo embriogênese e organogênese (Alcázar et al., 2010), proteção do DNA contra danos causados por espécies reativas de oxigênio (ROS) (Chol Ha et al., 1998) e no controle da metilação do DNA (Brooks et al., 2010).

Além da utilização da putrescina em substituição a citocinina ter tido sucesso em todas as etapas da embriogênese somática na palma de óleo, o protocolo proposto foi eficiente em relação ao tempo necessário para a produção das mudas clonais (até 360 dias). Se comparados às descrições da literatura, este tempo é consideravelmente menor. Wong et al., (1999), descreve que doze meses é o tempo gasto apenas para obtenção dos calos. Em trabalhos mais recentes, Soh et al. (2011) relata que após as modificações dos protocolos atuais para evitar o aparecimento do “mantled flower”, estes tornaram-se ineficientes em relação ao tempo necessário para produção de clones. Para estes autores, o tempo gasto, desde a preparação do explante até a obtenção do clone, é de 29 meses, e quando o sistema líquido é utilizado, este tempo é reduzido para 18 meses, ainda um tempo maior do que o descrito no presente trabalho.

A partir dos resultados do presente trabalho, não é possível afirmar que a putrescina irá inibir o aparecimento do “mantled flower” nos clones obtidos, pois isto exige anos de avaliação em campo. Porém, é possível afirmar que a putrescina foi eficiente na substituição da citocinina, em função da multiplicação das linhagens embriogênicas, da regeneração dos embriões somáticos e da germinação e obtenção das plantas em um tempo relativamente curto. Nesse contexto, sugere-se a realização de análises fenotípicas quanto ao surgimento ou não do “mantled flower”, assim que os clones alcançarem a idade produtiva.

1.5. - CONCLUSÃO

O protocolo proposto é eficiente quanto ao procedimento de extração dos explantes foliares, não comprometendo o crescimento da planta matriz. A resposta à embriogênese somática em palma de óleo pode ser considerada genótipo-dependente, onde, grande parte dos genótipos testados apresentaram elevada responsividade à técnica utilizada.

A putrescina é uma alternativa promissora para substituição da citocinina e garante o sucesso na obtenção de clones de palma de óleo em tempo reduzido, sendo

então, este protocolo recomendável para a propagação de clones de palma de óleo em escala comercial.

Os primeiros clones brasileiros de palma de óleo a partir de plantas adultas foram obtidos com sucesso neste trabalho, contudo, é necessário avaliar o desempenho destes materiais em campo, quanto ao aparecimento do “mantled flower”, e ainda uma sugestão seria, formar reclones, utilizando estes clones como fontes de explantes.

1.6. - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alcázar, R.; Altabella, T.; Marco, F.; Bortolotti, C.; Reymond, M.; Koncz, C.; Carrasco, P.; Tiburcio, A.F. 2010. Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. **Planta**. 231, 1237-1249.

Alwee, S.S.; Linder, V.; Schoot, J.V.T.; Folter, S.; Angent, G.C.; Cheach, S-C.; Smulders, M.J.M. 2006. Characterization of oil palm MADS box genes in relation to the mantled flower abnormality. **Plant Cell Tissue Organ Culture**. Org. 85, 331-344.

Balzon, T.A.; Gomes Luis, Z.; Scherwinsky-Pereira, J.E. 2013. New approaches to improve the efficiency of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) from mature zygotic embryos. **In Vitro Cell Development Biology Plant**. 49, 41-50.

Baron, K.; Stasolla, C. 2008. The role of polyamine during in vivo and in vitro development. **In Vitro Cell Development Biology Plant**. 44, 384-395.

Brooks, W.H; Le Dantec, C.; Pers, J.O.; Youinou, P.; Renaudineau, Y. 2010. Epigenetics and autoimmunity. *J. Autoimmun.* 34, 207-219.

Carvalho, M. **Embriogênese somática a partir de folhas imaturas e flores desenvolvidas in vitro de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.)**. 86p. 2008. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

Chol Ha, H; Yanger, J.M.D.; Woster, P.A.; Casero, R.A. 1998. Structural specificity of polyamine analogues in the protection of DNA from strand breaks induced by reactive oxygen species. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. Res. Co. 244, 298-303.

Corley, R.H.V.; Lee, C.H.; Law, I.H.; Wong, C.Y. 1986. Abnormal flower development in oil palm clones. **Planter**. 62, 223-240.

Corley, R.H.V.; Tinker, P.B. 2003. **The oil palm**. fourth ed. Iowa, USA.

Eeuwens, C.J.; Lord, S.; Donough, C.R.; Rao, V.; Vallejo, G.; Nelson, S. 2002. Effects of tissue culture conditions during embryoid multiplication on the incidence of “mantled” flowering in clonally propagated oil palm. **Plant Cell Tissue Organ Culture**. 3, 311-323.

Eeuwens, C. J. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera*) and cultured in vitro. 1978. **Physiologia Plantarum**. 36, 23-28.

Galston, A.W.; Kaur-Sawhney, R. Polyamines as endogenous growth regulators. In: DAVIES, P.J. 1995. **Plant hormones physiology, biochemistry and molecular biology**. 158-178.

Gan, P.Y.; Li, Z.D. Econometric study Malaysia's palm oil position in the world market to 2035. 2014. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. 39, 740-747.

Gueye, B. Saïd-Ahmed, H.; Morcillo, F.; Borgel, A.; Sané, D.; Hilbert, J.L.; Verdeil, J.L.; Blervacq, A.S. 2009. Callongenesi and rhizogenesi in date palm leaf segments: are there similarities between two auxins induced pathways?. **Plant Cell Tissue Organ Culture**. 98, 47-58.

Jaligot, E.; Adler, S.; Debladis, E.; Beule, T.; Richaud, F.; Ilbert, P.; Jean Finnegan, E.; Rival, A. 2011. Epigenetic imbalance and the floral developmental abnormality of the in vitro-regenerated oil palm *Elaeis guineensis*. **Annals of Botany**. 108, 1453-1462.

Jones, L.H.; Hanke, D.E.; Eeuwens, C.J. 1995. An evaluation of the role of cytokinins in the development of abnormal inflorescences in oil palms (*Elaeis guineensis* Jacq.) regenerated from tissue culture. **Journal of Plant Growth Regulation** J. 14, 135-142.

Khan, A.U.; Mei, Y.H.; Wilson, T. 1992. **A proposed function for spermine and spermidine: protection of replicated DNA against damage by singlet oxygen**. Proceedings National Academic Science USA. 89, 1126-1127.

Khaw, C.H.; N.G. S.K.; Thong, K.C. **Commercial products of oil palm by tissue culture-pre requisites, constraints and issues**. In Proceedings of the 1999 PORIM International Palm Oil Congress - Agriculture. Emerging Technologies and Opportunities in the Next Millenium. Oil Palm Institute of Malaysia (PORIM), Kuala Lumpur, Malaysia 1-6 February, 1999.

Konan, K.E.; Duran-Gasselin, T.; Kouadio, Y.J.; Rival, A. 2006. A modeling approach of the in vitro of palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryos. **Plant Cell Tissue Organ Culture**. 84, 99-112.

Kushairi, A; Tarmizi, A.H; Zamzuri, I; Ong-Abdullah, M.; Samsul Kamal, R.; Ooi, S.E.; Rajanaidu, N. 2010. **Production, performance and advances in oil palm tissue culture**. Paper presented at the International Seminar on Advances in Oil Palm Tissue Culture, in Yogyakarta, Indonesia.

Lam, M.K.; Tan, K.T.; Lee, K.T.; Mohamed, A.R. 2009. Malaysian palm oil: Surviving the food versus fuel dispute for a sustainable future. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. 13, 1456-1464.

Malike, A.F.;Abdulah, N.;Amiruddin, M.D. 2012.**Selection of Oil Palm Clones with High Bunch Index for Recloning at Malaysian Palm Oil Board (MPOB)**. Paper presented at the International Annual Symposium on Sustainability Science and Management, in Terengganu, Malaysia.

Mielke, T. **Palm Oil the leader in global oils and facts supply**. Paper presented at the Malaysia/Myanmar palm oil trade fair and seminar, Yangon, Myanmar, 28 June 2013. Available at http://www.mpoc.org.my/upload/Plenary_Paper-Thomas-Mielke.pdf> Accessed: 11.09.2014.

Ooi, S.E.; Novak, O.; Dolezal, K.; Ishak, Z.; Ong-Abdullah, M.O. 2013. Cytokinin Differences in In Vitro Cultures and Inflorescences from Normal and Mantled oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Journal of Plant Growth Regulation**. 1-10.

Ooi, S.E.; Choo, C.N.; Ishak, Z.; Ong-Abdullah, M.O. 2012. A candidate auxin-responsive expression marker gene, EgIAA9, for somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Plant Cell Tissue Organ Culture**. 110, 201-212.

Palanyandy, S.R.; Suranthran, P.; Gantait, S.; Sinniah, U.R.; Subramaniam, S.; Abdul Aziz, M.; Alwee, S.S.R.A.; Roowi, S.A. 2013. In vitro developmental study of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) polyembryoids from cell suspension using scanning electron microscopy. **Acta Physiology Plant Journal**. 35, 1727 – 1733.

Rajesh, M.K.; Radha, E.; Karun, A.; Parthasarathy, V.A. 2003. Plant regeneration from embryo-derived callus of oil palm-the effects of exogenous polyamines. **Plant Cell Tissue Organ Culture**. 75, 41-47.

Rance, K. A.; Mayes, S.; Price, Z.; Jack, P.L.; Corley, R. H. V. 2001. Quantitative trait loci for yield components in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Theoretical and Applied Genetics**. 103, 1302-1310.

Resende, M.D.V. de. 2001. **Workshop: Melhoramento de espécies florestais e palmáceas no Brasil**. Curitiba-PR: Embrapa Florestas. Documentos 62, 245 p. ISSN 1517-536X,

Rios, S.A.; Cunha, R.N.V. da; Lopes, R.; Barcelos, E. **Recursos genéticos de palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.) e caiaué (*Elaeis oleífera* (H.B.K.) Cortés)**. Manaus: **Embrapa Amazônia Ocidental**, 2012. 39p (Embrapa Amazônia Ocidental, Documentos 96).

Roowi, S.H; Ho, C.L.; Alwee, S.S.R.S.; Abdullah, M.O.; Napis S. 2010. Transcripts from the suspension cel of Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in response to different concentration of auxin. **Molecular Biotechnology**. 46, 1-19.

Scherwinsky-Pereira, J.E.; Guedes, R.S.; Fermino, P.C.P.; Silva, T.L; Costa, F.H.S. 2010. Somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm using the thin cell layer technique. **In Vitro Cell Development Biology Plant**. 46, 378-385.

Silva, R.C.; Gomes Luis, Z.; Scherwinsky-Pereira, J.E. 2012. Differential responses to somatic embryogenesis of different genotypes of Brazilian oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Plant Cell Tissue Organ Culture**. 111, 59-67.

Smulders, M.J.M.; Klerk, G.J. 2011. Epigenetic in plant tissue culture. **Journal of Plant Growth Regulation**. 63, 137-146.

Soh, A.C.; Wong, G.; Tan, C.C.; Chew, P.S.; Chong, S.P.; Ho, Y.W.; Wong, C.K; Choo, C.N.; Nor Azura, H.; Kumar, K. 2011. Commercial-Scale Propagation and Planting of

Elite of Oil Palm Clones. Research and Development Towards Realization. **Journal of Plant Growth Regulation**. 23, 932-952.

Srisawat, T.; Kanchanapom, K. The influence of physical conditions on embryo and protoplast culture in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). 2005. **Science Asia**. 31, 23-28.

Thawaro, S.; Te-chato S. 2009. Effect of genotypes and auxins on callus formation from mature zygotic embryos of hybrid oil palms. **Journal of Agricultural Technology**. 5(1), 167-177.

Thuzar, M.; Vanavichit, A.; Tragoonrung, S.; Jantasuriyarati, C. 2011. Efficient and rapid plant regeneration of oil palm zygotic embryos cv. 'Tenera' through somatic embryogenesis. **Acta Physiology Plant Journal**. 33, 123-128.

Wong, C.; Bernardo, R. 2008. Genome wide selection in oil palm: increasing selection gain per unit time and cost with small population. **Theoretical and Applied Genetics**. 116: 815-824.

Wong, G.; Tan, C. C.; Soh, A. C.; Chong, S. P., 1999. Clonal propagation of oil palm through tissue culture. **Planter**. 75 (878): 221-230.

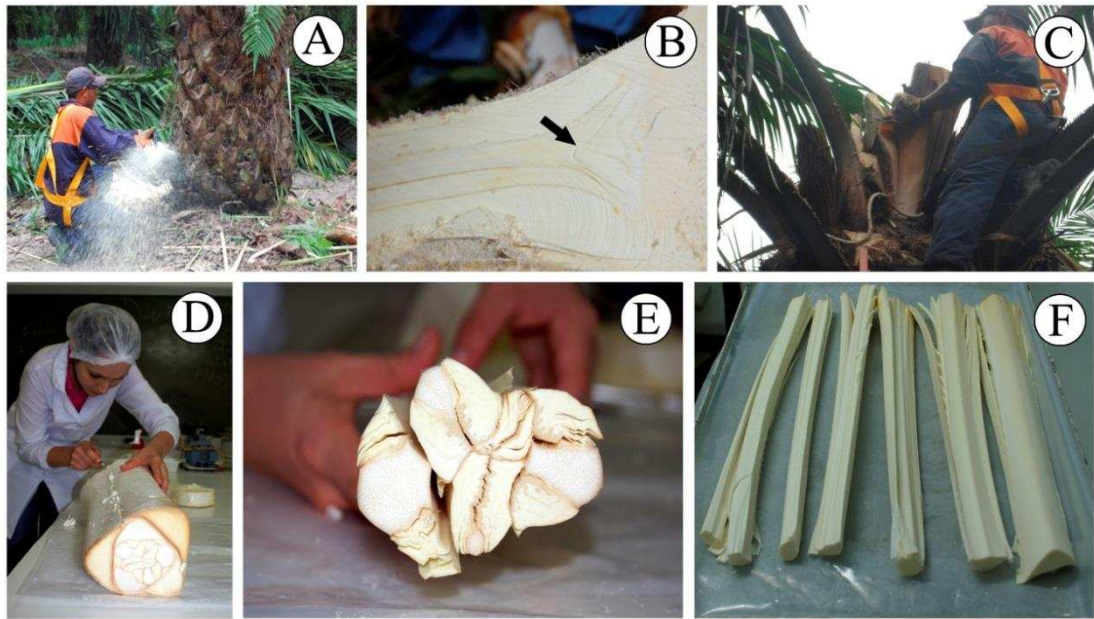


Figura 1: Procedimentos de referenciamento do meristema apical para a extração segura do palmito e obtenção de explantes foliares para indução da embriogênese somática em palma de óleo. **A:** Abate de uma planta adulta de palma de óleo para realização de corte longitudinal do estipe e medições, com o objetivo da extração segura do palmito sem o comprometimento do meristema apical. **B:** Referenciamento para o corte seguro do palmito, onde a seta indica a região do meristema apical. **C:** Extração do palmito com base nas medições realizadas, sendo feita por um profissional. **D:** Retirada das camadas foliares externas de proteção do palmito para preparação dos explantes foliares. **E- F:** Folíolos imaturos separados individualmente, para a indução da embriogênese somática em palma de óleo.

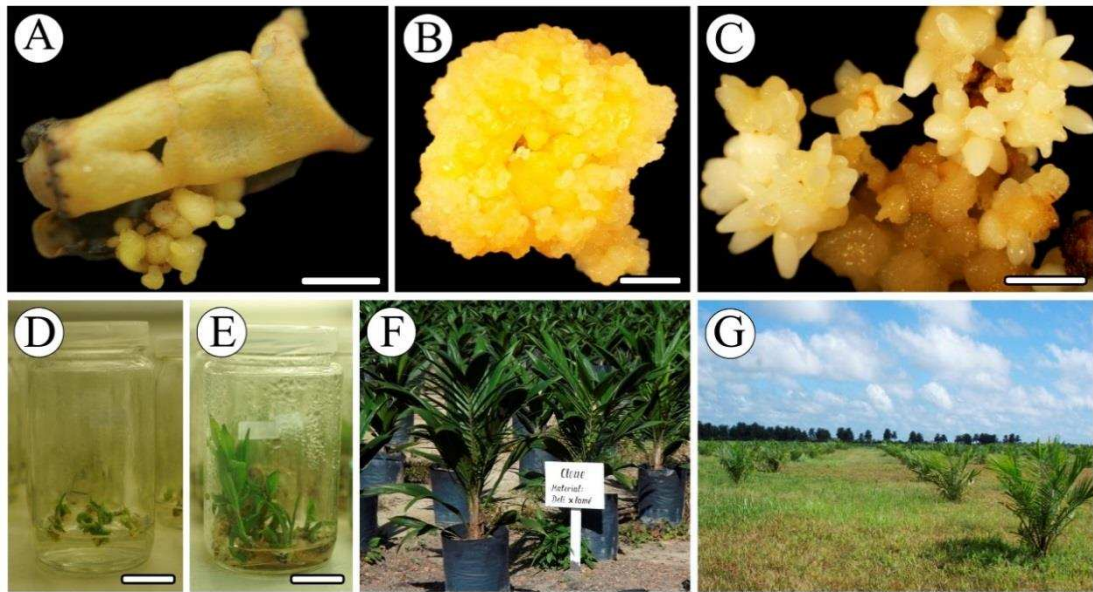
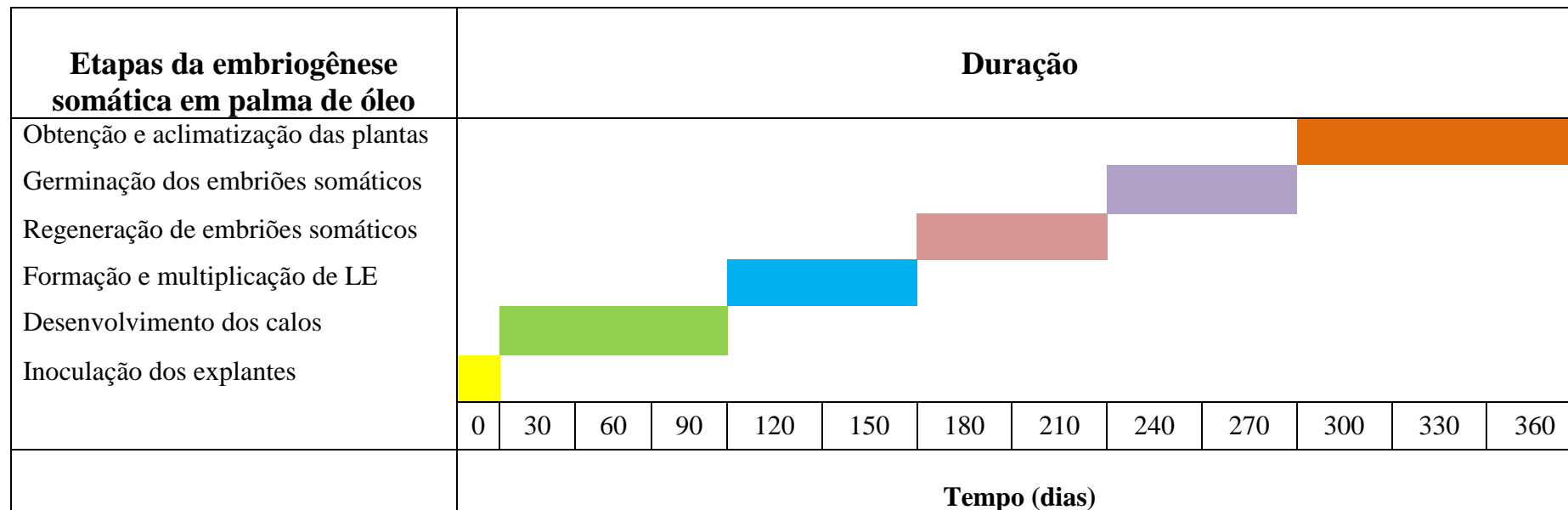


Figura 2: Embriogênese somática a partir de explantes foliares de palma de óleo. **A:** Calo com aspecto nodular, estruturas globulares definidas e coloração bege a amarelo claro, formado na extremidade do explante foliar, após 90 dias do cultivo in vitro em meio de indução. **B:** Linhagem embriogênica com aspecto nodular e coloração amarela após 60 dias do cultivo in vitro em meio de multiplicação. **C:** Embriões somáticos com coloração branca e aderidos uns aos outros, obtidos após 60 dias de cultivo in vitro das linhagens embriogênicas em meio de regeneração. **D:** Embriões somáticos em meio de germinação, apresentando alongamento e mudança de coloração. **E:** Plântulas obtidas após 60 dias do cultivo in vitro no meio de germinação. **F:** Primeiro clone brasileiro de palma de óleo obtido após 12 meses da indução da embriogênese somática em planta adulta de palma de óleo. **G:** Clones do genótipo A-02 estabelecido em plantio comercial. Barras: A, B e C equivalentes a 3 mm; D e E equivalentes a 1,5 cm.

Figura 3: Etapas e duração da embriogênese somática em palma de óleo. *LE: linhagem embriogênica.



CAPÍTULO II

Estimativa de parâmetros genéticos para características in vitro de palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.) e seleção de genótipos para capacidade de clonagem e produtividade em óleo

RESUMO

CORRÊA, Thais Roseli, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2014. **Estimativa de parâmetros genéticos para características in vitro de palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.) e seleção de genótipos para capacidade de clonagem e produtividade em óleo.** Orientador: Sérgio Yoshimitsu Motoike. Coorientadores: Marcos Deon Vilela de Resende e Edgard Augusto de Toledo Picoli.

A palma de óleo tem ganhado destaque entre as espécies promissoras para a produção de biocombustíveis, e o melhoramento genético de plantas, através da clonagem de indivíduos superiores, é a tecnologia que mais contribui para incremento da produção de óleo. No entanto, inexistem estudos sobre o comportamento de genótipos quanto ao desempenho in vitro e o potencial produtivo simultaneamente. Desta maneira, o objetivo deste trabalho foi estudar o controle genético das características relacionadas ao processo de clonagem da palma de óleo e identificar os genótipos responsivos, dentro de uma coleção de 32 materiais elites provenientes de um plantio comercial, a fim de selecionar aqueles superiores para a formação de um jardim clonal. A calogênese e a produção de linhagens embriogênicas, principais características relacionadas ao processo da clonagem, apresentaram controle genético, verificado através das estimativas de parâmetros genéticos: herdabilidade, coeficiente de variação relativa e acurácia seletiva, indicando também eficiência na seleção de genótipos superiores dentro do conjunto avaliado. Os genótipos A-13, A-14, A-18, A-20 e A-21 foram selecionados como genótipos superiores tanto para características relacionadas à produtividade de óleo, quanto ao desempenho in vitro devido à formação de linhagens embriogênicas. Este foi o primeiro estudo que investigou o controle genético da capacidade de clonagem visando a seleção dos genótipos para a formação de um jardim clonal.

Palavras-chave: melhoramento genético, embriogênese somática, controle genético, calogênese, linhagem embriogênica.

ABSTRACT

CORRÊA, Thais Roseli, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2014. **Estimation of genetic parameters for in vitro characteristics of Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) and selection of genotypes for cloning capacity and oil productivity.** Adviser: Sérgio Yoshimitsu Motoike.

The oil palm has gained prominence among promising species for biofuels production, and plant breeding, through cloning of superior individuals, is the technology that has contributed the most to increase the oil production. However, there are not studies about the behavior of the genotypes regarding to the performance in vitro and the productivity potential. This way, the objective of this work was to study the genetic control of the characteristics related to the cloning process of the oil palm and identify the responsive genotypes, among a collection of 32 elite materials coming from a commercial plantation, with the aim of selecting those superior to form a clonal garden. The calogenesis and the production of embryogenic mass, main characteristics related to the cloning process, presented genetic control, verified through the estimative of genetic parameters: heritability, relative variation coefficient and selective accuracy, also indicating efficiency in the selection of superior genotypes inside the evaluated group. The genotypes A-13, A-14, A-18, A-20 and A-21 were selected as superior genotypes for both characteristics related to oil productivity and in vitro performance due to the formation of embryogenic mass. This was the first study that researched the genetic control of cloning capacity for selection of genotypes to form a clonal garden.

Key words: plant breeding, somatic embryogenesis, genetic control, calogenesis, embryogenic mass.

2.1. - INTRODUÇÃO

O aumento dos preços do petróleo, bem como a intenção de reduzir a emissão de gases do efeito estufa, tem impulsionado a demanda por biocombustíveis (Gan & Li, 2014). Dentre as espécies potenciais para a produção de biocombustíveis, a palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.) tem se destacado, devido aos rendimentos elevados na produção de óleo desta planta, se comparado a outras a espécies vegetais, como a soja, o girassol e a colza (Gan & Li, 2014; Mielke, 2013; Lam et al., 2009). A dependência global por óleo extraído da palma de óleo tende a aumentar nos próximos anos: estima-se que até 2035 a produção deverá atender uma demanda de 26,6 milhões de toneladas, em decorrência dos investimentos tecnológicos (Gan & Li, 2014).

Uma das tecnologias que mais tem contribuído para o incremento real na produção de óleo é o melhoramento genético. Juntamente com o melhoramento genético, as ferramentas biotecnológicas podem auxiliar na maximização de rendimento de produção de óleo de até 18 ton/ha, melhorando tanto a qualidade quanto a quantidade da produção (Nugroho et al., 2014).

Dentre as ferramentas biotecnológicas, tem se destacado a propagação clonal, através da cultura de tecidos, onde o objetivo é selecionar vários genótipos elites que contenham características desejáveis, e então, propagá-los em massa, formando plantios comerciais uniformes (Nugroho et al., 2014).

A técnica utilizada para a propagação clonal da palma de óleo é a embriogênese somática, sendo as etapas da calogênese e produção de linhagens embriogênicas fundamentais para o sucesso da mesma. Entretanto, é importante um protocolo de clonagem que garanta eficiência nestas duas etapas e genótipos que respondam a este protocolo. Para tanto, é essencial estudar os parâmetros genéticos envolvidos na etapa de calogênese e produção de linhagens embriogênicas, a fim de selecionar genótipos que agreguem características de cultivo superiores para o estabelecimento dos campos clonais.

A maioria dos trabalhos que determinam parâmetros genéticos em palma de óleo visam apenas caracteres agrônômicos relacionados à produtividade de óleo (Lopes et al., 2012; Soh et al., 2003). Até o momento, inexistem trabalhos com o objetivo de determinar genótipos ideais, tanto em características de produtividade de

óleo, como em desempenho in vitro para a clonagem, através do estudo de parâmetros genéticos.

Desta maneira, este trabalho teve como objetivo estudar o controle genético das principais características relacionadas ao processo de clonagem da palma de óleo e identificar os genótipos responsivos, dentro de uma coleção de 32 materiais elites provenientes de um plantio comercial, a fim de selecionar aqueles superiores para a formação de um jardim clonal.

2.2. - MATERIAL E MÉTODOS

Para a execução do experimento, trinta e dois genótipos considerados “materiais elite” de palma de óleo (Tabela 1), oriundos de diferentes corporações mundiais, com idade entre 9 e 27 anos, foram selecionados.

Tabela 1: Híbridos ‘Tenera’ de palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.) utilizados na clonagem de plantas adultas.

Híbridos Tenera	Empresa fornecedora de sementes	Número de Matrizes acessadas	Idade (anos)
Deli x Ekona	ASD	2	9
Deli x Ghana	ASD	3	11
Deli x La Mé	Murrin Corporation	9	9-26
Deli x La Mé	Embrapa Manaus	4	11-13
Deli x Yangambi	Univanich Palm Oil	8	10-27
Deli x Avros	ASD	2	13
Kigoma	ASD	2	13
Deli x Dami	Dami Las Flores	2	14-15

Calogênese e Produção de Linhagens Embriogênicas

As folhas imaturas foram extraídas das plantas adultas selecionadas, sendo, os meristemas apicais contendo estas folhas, encaminhados ao Laboratório de Cultura de Células e Tecidos Vegetais da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa - MG para o processo de clonagem.

No Laboratório, todos os meristemas apicais foram submetidos ao processo de desinfestação. Em seguida, as folhas imaturas foram seccionadas transversalmente em segmentos de cinco milímetros (explantes foliares), e inoculadas em meio de cultura Y3, acrescido de 800 µM de 2,4-D, conforme protocolo estabelecido por Carvalho (2008).

Para cada genótipo foram inoculadas 500 placas de petri com cinco explantes foliares, por placa. Os explantes foram incubados por 90 dias, em sala mantida à $27^{\circ} \pm 2$. Após o período de incubação, foi avaliada a porcentagem de explantes que formaram calos em cada genótipo.

Os calos obtidos foram inoculados em meio de cultura Y3 acrescido de $9 \mu\text{M}$ de 2,4-D e $1000 \mu\text{M}$ putrescina, segundo o protocolo estabelecido por Carvalho (2008). As placas inoculadas com os calos foram mantidas em sala de cultivo à $27^{\circ} \pm 2$, no escuro. Após 60 dias, os calos que formaram linhagens embriogênicas, foram separados, e as linhagens foram subdivididas e colocadas novamente em meio de multiplicação.

Os genótipos classificados como responsivos, foram aqueles que tiveram desempenho in vitro quanto à formação de linhagens embriogênicas.

Estimação dos Parâmetros Genéticos

As estimativas dos parâmetros genéticos foram obtidas pela metodologia de modelos mistos, procedimento REML (Máxima Verossimilhança restrita) /BLUP (Melhor Predição Linear Não Viesada) (Resende, 2007), seguindo o seguinte modelo.

Modelo:

$$y = Xb + Zg + e, \text{ em que:}$$

y, b, g, e: vetores de dados, de efeitos fixos (média geral), de efeitos genotípicos totais (aleatórios) e de erros aleatórios, respectivamente.

X e Z: matrizes de incidência para b e g, respectivamente.

Equações de Modelo Misto:

$$\begin{bmatrix} \mathbf{X'X} & \mathbf{X'Z} \\ \mathbf{Z'X} & \mathbf{Z'Z} + \mathbf{A}^{-1}((1 - h^2)/h^2) \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \hat{\mathbf{b}} \\ \hat{\mathbf{g}} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{X'y} \\ \mathbf{Z'y} \end{bmatrix}$$

$h^2 = \hat{\sigma}_g^2 / (\hat{\sigma}_g^2 + \hat{\sigma}_e^2)$: herdabilidade individual no sentido amplo.

Estimadores dos Componentes de Variância via Algoritmo EM

$$\hat{\sigma}_e^2 = [y'y - \hat{\mathbf{b}}'X'y - \hat{\mathbf{g}}'Z'y] / [N - r(\mathbf{X})]$$

$$\hat{\sigma}_g^2 = \left[\hat{\mathbf{g}}' \mathbf{A}^{-1} \hat{\mathbf{g}} + \hat{\sigma}_e^2 \text{tr } \mathbf{C}^{22} \right] / N_g, \text{ em que:}$$

$r(X)$: posto ou número de colunas linearmente independentes de X .

$$C^{22} \text{ é da forma } \begin{bmatrix} C^{11} & C^{12} \\ C^{21} & C^{22} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} X'X & X'Z \\ Z'X & Z'Z + A^{-1}(\sigma_e^2 / \sigma_g^2) \end{bmatrix}^{-1}$$

N_g : número de elementos aleatórios (indivíduos).

A : matriz de parentesco genético aditivo.

tr : operador traço matricial, dado pela soma dos elementos da diagonal da matriz.

N : número total de dados.

Os valores genotípicos preditos foram usados para calcular o índice de seleção, com base na média de ranks (Mulamba e Mock, 1978) dos genótipos que formaram linhagens embriogênicas.

Para a seleção dos genótipos superiores, quanto à produtividade, foram avaliados a campo por no mínimo cinco anos de produção, as seguintes características: produtividade de cacho fresco (t/ha), potencial de óleo estimado (t/ha), taxa de extração industrial (t/ha), esta por sua vez é dada pela relação entre produtividade de cacho fresco e potencial de óleo estimado e o incremento médio anual em altura (m).

Foi utilizado o software Selegen-Reml/Blup (Resende, 2007) para realização das análises estatísticas.

2.3. - RESULTADOS

Parâmetros genéticos: calogênese e produção de linhagens embriogênicas

De acordo com Resende (2002) valores de herdabilidade entre 0,15 e 0,50 são consideradas “moderadas”. Neste estudo, as herdabilidades de plantas individuais no sentido amplo (h^2_g) foram consideradas ‘moderadas’ para CAL e LIN (Tabela 2), o que caracteriza um considerável controle genético destas características. As herdabilidades ao nível de médias de clone do presente estudo foram de altas magnitudes, equivalendo a 0.94, para CAL e LIN (Tabela 2). Esses altos valores são devidos ao elevado número de repetições (500 placas) empregado.

Quanto à acurácia seletiva, as características CAL e LIN enquadraram-se como “muito alta” (Tabela 2), de acordo com a classificação de Resende e Duarte

(2007). Esse resultado indica confiança nos valores genéticos estimados para tais características e, portanto, segurança na seleção.

O coeficiente de variação relativa (CVr) é o parâmetro que auxilia detectar variabilidade genética em uma população, obtido pela relação entre os coeficientes de variação genética e experimental, não influenciado, portanto, pela média do caráter. No presente trabalho, o CVr, para CAL e LIN foram 0,42 e 0,49, respectivamente. Segundo Resende e Duarte (2007), a qualidade do experimento é avaliada pela acurácia, que é função do CVr e do número de repetições, desta maneira, os valores encontrados, demonstraram alta qualidade experimental e confiabilidade para a prática da seleção, para as duas características.

Tabela 2. Estimativas de parâmetros genéticos obtidos da análise de 32 genótipos de palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.), após 90 dias de cultivo *in vitro*, em relação às características explantes calejados (CAL) e formação de linhagens embriogênicas (LIN).

Parâmetros	CAL	LIN
Vg	0.011	0.012
Ve	0.063	0.049
Vf	0.075	0.061
CVr	0.4231	0.4939
h²g	0.1518± 0.0098	0.1961 ± 0.01
Acurácia	0.97	0.97
h²mc	0.94	0.94
M	8.06	6.1

Vg: variância genotípica entre acessos; Ve: variância residual; Vf: variância fenotípica individual; CVr: coeficiente de variação relativa; h²g: herdabilidade de plantas individuais no sentido amplo; h²mc: herdabilidade no sentido amplo ao nível de médias de clones; M: média geral do experimento.

Devido à importância da variável CAL no processo da clonagem, obtiveram-se os valores genotípicos (u + g) para tal característica. Dos 32 genótipos avaliados, os oito primeiros apresentaram valores genotípicos superiores à média geral. Dentre esses, apenas dois não formaram linhagens embriogênicas. Os genótipos A-04 e A-05, ocuparam as posições 1 e 2 no ranking, os quais retratam porcentagens altas de calogênese. As duas últimas posições foram ocupadas pelos genótipos A-24 e A-27. Observa-se ainda que, os valores genotípicos são bem próximos dos valores das médias fenotípicas (Tabela 3). Isso é devido às altas estimativas (0,94) da herdabilidade ao nível de médias de clone, que foram próximas a 1.

Tabela 3. Ranking dos 32 genótipos de palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.) com base nas médias genotípicas e fenotípicas para o caráter indução da calogênese, após 90 dias do cultivo in vitro.

Ordem	Genótipo	u + g	Média Fenotípica	Linhagem embriogênica
1	A-04	51.47	52.11	Sim
2	A-05	34.95	35.27	Sim
3	A-06	21.36	21.56	Não
4	A-31	16.90	17.03	Sim
5	A-07	16.81	16.91	Sim
6	A-28	9.95	9.98	Sim
7	A-17	9.43	9.45	Sim
8	A-03	8.12	8.12	Não
9	A-02	7.07	7.06	Sim
10	A-25	6.63	6.57	Não
11	A-15	6.24	6.22	Sim
12	A-23	6.12	6.09	Não
13	A-16	5.91	5.88	Sim
14	A-09	5.84	5.80	Sim
15	A-01	5.49	5.44	Não
16	A-08	4.76	4.72	Sim
17	A-32	4.65	4.61	Não
18	A-30	4.60	4.53	Sim
19	A-14	4.12	4.07	Sim
20	A-11	3.91	3.85	Não
21	A-10	3.88	3.83	Sim
22	A-22	3.61	3.55	Sim
23	A-13	3.50	3.44	Sim
24	A-18	2.97	2.91	Sim
25	A-21	2.61	2.54	Sim
26	A-19	1.70	1.62	Não
27	A-26	1.32	1.11	Sim
28	A-20	1.08	0.99	Sim
29	A-29	0.99	0.90	Sim
30	A-12	0.98	0.89	Não
31	A-24	0.72	0.60	Não
32	A-27	0.47	0.33	Não

u + g = valor genotípico predito; u = 8,06: média geral

Potencial Produtivo dos 32 genótipos de palma de óleo

Utilizando o índice de média de ranks de Mulamba e Mock (1978), com base nos valores genotípicos, os genótipos que formaram linhagens embriogênicas foram

classificados quanto às características relacionadas à produtividade de óleo e incremento médio anual, em ordem favorável de melhoramento. O menor valor indica uma combinação mais favorável entre os caracteres estabelecidos e o maior valor uma combinação desfavorável. Dentre os genótipos que produziram linhagens embriogênicas, A-20, A-14, A-13, A-21 e A-18 ocuparam as cinco primeiras posições na média de ranks, sendo estes os indicados para seleção, pois reúnem as características ideais para a produção de óleo e para a clonagem (Tabela 4).

Tabela 4. Classificação com base na soma de ranks em relação, produtividade de cacho fresco (PCF), potencial de óleo estimado (POE) e incremento médio anual (IMA) dos 21 genótipos de palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.) que formaram linhagens embriogênicas.

Ordem	Genótipo	Rank-PCF	Rank-PO	Rank-IMA	Rank-Médio
1	A-20	1	2	3	2.00
2	A-14	5	3	5	4.33
3	A-13	7	4	4	5.00
4	A-21	3	5	11	6.33
5	A-18	2	1	20	7.67
6	A-15	4	7	12	7.67
7	A-04	11	10	2	7.67
8	A-16	8	9	10	9.00
9	A-30	6	8	15	9.67
10	A-02	13	11	6	10.00
11	A-05	12	6	13	10.33
12	A-07	9	17	9	11.67
13	A-29	20	18	1	13.00
14	A-28	10	12	19	13.67
15	A-08	16	13	14	14.33
16	A-10	14	15	17	15.33
17	A-22	19	19	8	15.33
18	A-17	17	14	16	15.67
19	A-31	21	20	7	16.00
20	A-09	15	16	18	16.33
21	A-26	18	21	21	20.00

Na tabela 5, estão os resultados das principais características alvos da seleção de genótipos potenciais, que formaram linhagens embriogênicas. São elas: produtividade de cacho fresco, potencial de óleo estimado e incremento médio anual. Com base na relação entre o potencial de óleo estimado e a produtividade de cacho

fresco, foi estimada a taxa de extração industrial de cada genótipo (Tabela 5). Os genótipos A-14, A-18 e A-20 apresentaram valores elevados para potencial de óleo estimado (acima de 10 t/ha). Para a característica produção de cacho fresco, os genótipos A-18, A-20 e A-21, tiveram os maiores valores (acima de 40 t/ha). Já, os genótipos A-04, A-20 e A-29 apresentaram os menores valores para incremento médio anual (menos que 0,25m). O genótipo A-20 destacou-se por apresentar bom desempenho para as características produtividade de cacho fresco, potencial de óleo estimado e incremento médio anual.

Tabela 5. Produtividade de cacho fresco (PCF), taxa de extração industrial (TEI), potencial de óleo estimado (POE) e incremento médio anual (ICA) dos genótipos de palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.) que produziram linhagens embriogênicas.

Genótipo	Background	PCF (t/ha)	TEI (t/ha)	POE (t/ha)	ICA (m)
A-02	Deli x Ekona	24,53	28,1	6,89	0,32
A-04	Deli x La Mé	26,25	27,2	7,14	0,26
A-05	Deli x La Mé	25,01	35,6	8,91	0,34
A-07	Deli x Ghana	27,51	17,8	4,89	0,33
A-08	Deli x Ghana	20,92	32,2	6,74	0,35
A-09	Deli x Yangambi	20,92	24,8	5,19	0,46
A-10	Deli x Yangambi	22,26	24,3	5,42	0,44
A-13	Deli x La Mé	32,71	30,4	9,96	0,30
A-14	Deli x La Mé	33,81	31,0	10,48	0,31
A-15	Deli x Avros	35,86	23,2	8,31	0,34
A-16	Deli x Avros	29,15	24,6	7,18	0,33
A-17	Kigoma	19,66	27,8	5,47	0,39
A-18	Kigoma	43,8	28,3	12,39	0,50
A-20	Deli x La Mé (Embrapa)	45,04	23,8	10,72	0,27
A-21	Deli x La Mé	40,89	23,5	9,61	0,33
A-22	Deli x La Mé	17,21	23,5	4,04	0,33
A-26	Deli x Yangambi	17,43	19,2	3,35	0,53
A-28	Deli x Yangambi	27,09	25,2	6,84	0,48
A-29	Deli x La Mé (Embrapa)	15,21	29,4	4,47	0,25
A-30	Deli x Ghana	33,51	22,2	7,43	0,37
A-31	Deli x La Mé	12,91	27,3	3,53	0,33

2.4. - DISCUSSÃO

O conhecimento do controle genético das principais características relacionadas à clonagem da palma de óleo é indispensável para a obtenção de ganhos com a seleção, quando o objetivo é o estabelecimento do jardim clonal com indivíduos superiores. No presente trabalho, foi possível confirmar o controle genético das características CAL e LIN, através dos valores de herdabilidade destas.

A herdabilidade é o parâmetro genético de maior importância e aplicação nos programas de melhoramento de plantas. A sua relevância está no fato de poder mostrar o quanto os efeitos genéticos estão presentes no fenótipo do indivíduo, pois é o valor genotípico que interessa e influenciará a próxima geração (Falconer & Mackay, 1996).

As estimativas de herdabilidade no sentido amplo, para os caracteres CAL e LIN, foram de 15 e 19%, respectivamente. Em pupunha, planta pertencente à família das Palmáceas, Farias Neto et al (2013), encontraram valores de herdabilidade, para produtividade de cacho, de 21,3%, e classificaram como de ‘média magnitude’. Para Resende (2002), a maioria dos caracteres quantitativos de importância econômica apresentam herdabilidade individual em torno de 20%.

Em palma de óleo, são escassas estimativas de herdabilidade para características *in vitro*, sendo mais comum, estudos para caracteres morfo-agronômicos. Soh et al., (2003) encontrou valores de herdabilidade variando de 22 a 36% para caracteres de produtividade. Soh (1994) relatou valores de herdabilidade individual no sentido restrito de 35% para número de cachos, 20% para peso de cacho e 15% para produção de óleo, em palma de óleo. No híbrido interespecífico ‘caiaué’, oriundo do cruzamento entre *Elaeis guineensis* e *Elaeis oleífera*, as herdabilidades para caracteres morfo-agronômicos, variam de 24,5 a 30,4% (Lopes et al., 2012). Farias Neto et al., (2008), em açazeiro, relatam herdabilidades variando de 12 a 44%. Estes resultados demonstram que em palmáceas, os valores de herdabilidade encontrados para a maioria dos caracteres variam de 12 a 44% e são considerados favoráveis a seleção.

A acurácia seletiva apresenta uma correlação entre os valores genéticos verdadeiros e preditos, e quanto maior o seu valor, mais pleno é a confiança na avaliação dos indivíduos. Esse parâmetro genético está intimamente ligado à herdabilidade do caráter (Resende 2002). De acordo com a classificação da

herdabilidade e acurácia em termos de magnitude e suas associações, proposta por Resende (1997), os valores encontrados no presente trabalho foram considerados de ‘alta’ magnitude, para CAL e LIN, o que indica vantagem em realizar seleção utilizando estas duas características.

Outro parâmetro genético de relevada importância nos estudos de melhoramento de plantas é o coeficiente de variação relativa (CV_r). Resende e Duarte (2007) sugerem que cada experimento tenha um valor particular, e não generalizado do CV_r. Fixando-se o número de repetições, a magnitude de CV_r pode ser utilizada para inferir sobre a acurácia e a precisão na avaliação genotípica. Logo, valores adequados de CV_r devem ser inferidos em conjunto com o número de repetições, pois valores inferiores a unidade também podem propiciar elevada acurácia e precisão. Os valores de CV_r encontrados neste experimento, em conjunto com um alto número de repetições (500), proporcionaram acurácia seletiva elevada, o que indicou boa precisão e qualidade experimental.

O valor genotípico predito é importante, pois revela o potencial genético do indivíduo na seleção sem o efeito do ambiente, resultando assim em confiabilidade e maior ganho genético. O rank dos valores genotípicos preditos demonstrou que oito genótipos apresentaram elevados valores para calogênese em relação à média geral do experimento (8,06%), indicando superioridade destes materiais, para esta característica.

A formação de calos é uma etapa importante para o sucesso da clonagem, porém, relacionado a isto, é essencial a formação de linhagens embriogênicas. Dentre os oito genótipos de destaque no rank, apenas dois não formaram linhagens embriogênicas. Para Silva et al. (2012) e Thawaro & Te-chato (2009), o sucesso da embriogênese somática, é dependente do genótipo em que a técnica é aplicada. Os resultados obtidos demonstraram que, estes oito genótipos são os mais eficientes em calogênese e ainda, em sua maioria, possibilitam a formação de linhagens embriogênicas.

Até o momento, não existem trabalhos em que a acurácia seletiva, o coeficiente de variação relativa e o valor genotípico predito foram descritos para características relacionadas à clonagem de palma de óleo.

O índice de média de ranks de Mulamba e Mock (1978) hierarquiza os genótipos, inicialmente, para cada característica, por meio da atribuição de valores absolutos menores àqueles de melhor desempenho. Por fim, os valores atribuídos a

cada característica são somados, obtendo-se a média dos “ranks”, que assinala a classificação dos genótipos.

Os genótipos que formaram linhagens embriogênicas foram selecionados em ordem favorável de melhoramento para as características relacionadas à produtividade de cachos, de óleo e incremento médio anual. Os genótipos A-20, A-14, A-13, A-21 e A-18 ocuparam as primeiras posições na média de ranks, sendo estes os indicados para seleção, pois reúnem as características ideais tanto para a produção de óleo quanto para a clonagem. As características mencionadas são as principais para o ideótipo proposto para palma de óleo.

Para a indústria, materiais genéticos de palma de óleo com alto rendimento em óleo, são aqueles que produzem acima de 8,6 t/ha/ano (Corley et al., 1976) e a previsão é de que genótipos selecionados produzam 12,2 t/ha/ano (Rajanaidu et al., 1990) e há hipótese de que produtividade em plantas selecionadas poderá ser de até 18,2 t/ha/ano (Corley, 1998). Aliada a este rendimento, a produtividade de cachos também deve ser considerada, pois esta correlacionada com o aumento do rendimento de produção por área. O incremento médio anual em altura indica a vida útil da planta, de maneira que, quanto menor o valor, maior a vida útil da planta. No entanto, mesmo que o genótipo apresente elevado incremento médio anual, como A-18 (0,5 m/ano), e o rendimento de óleo e a produtividade de cacho elevada sejam compensatórios, pode-se adotar uma estratégia de manejo que permita a exploração eficiente deste material.

Este foi o primeiro estudo que investigou a relação entre os parâmetros genéticos e a seleção dos genótipos elites para a formação de um jardim clonal de palma de óleo, avaliando características importantes para a clonagem e o seu potencial produtivo. Para a eficiência dos programas de melhoramento de palma de óleo é importante que tais estudos sejam considerados na etapa inicial no processo de clonagem. A seleção de genótipos superiores ao processo de clonagem, pode otimizar os programas de melhoramento, uma vez que gera economia de recurso, tempo e espaço.

2.5. - CONCLUSÃO

As características calogênese e formação de linhagens embriogênicas apresentaram controle genético que permite seleção dos genótipos responsivos a clonagem.

Todos os parâmetros genéticos avaliados: herdabilidade, coeficiente de variação relativa e acurácia, indicaram eficiência na seleção de genótipos superiores dentro do conjunto avaliado.

Os genótipos A-13, A-14, A-18, A-20 e A-21 foram selecionados como os genótipos superiores tanto para características relacionadas à produtividade de óleo, quanto ao desempenho in vitro, devido à formação de linhagens embriogênicas.

2.6. - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Carvalho, M. **Embriogênese somática a partir de folhas imaturas e flores desenvolvidas in vitro de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.)**. 86p. 2008. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

Corley, R.H.V. 1998. **What is the upper limit to oil extraction ratio?**. In Proc. Oil and Kernel Production in Oil Palm – A Global Perspective. Palm Oil Res. Inst. Malaysia: 256-269.

Corley, R.H.V.; Wood, B.J.; Hardon, J.J. 1976. **Future developments in oil palm cultivation**. Oil Palm Research. Ed. Elsevier. Amsterdam.

Falconer, D.S.; Mackay, T.F.C. 1996. **Introduction to quantitative genetic**. 4th ed. Essex: Longman. 464 p.

Farias Neto, J.T.; Clement, C.R.; Resende, M.D.V. 2013. Estimativas de parâmetros genéticos e ganho de seleção para produção de frutos em progênes de polinização aberta de pupunheira no estado do Pará, Brasil. **Bragantia**. 32(3), 122-126.

Farias Neto, J.T.; Resende, M.D.V.; Oliveira, M.S.P.; Nogueira, O.L.; Falcão, P.N.B.; Santos, N.S.A. 2008. Estimativas de parâmetros genéticos e ganhos de seleção em progênes de polinização aberta de açaizeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 30, 1051-1056.

Gan, P.Y.; Li, Z.D. 2014. Econometric study Malaysia's palm oil position in the world market to 2035. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. 39, 740-747.

Lam, M.K.; Tan, K.T.; Lee, K.T.; Mohamed, A.R. 2009. Malaysian palm oil: Surviving the food versus fuel dispute for a sustainable future. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. 13, 1456-1464.

Lopes, R.; Cunha, R.N.V.; Resende, M.D.V. 2012. Produção de cachos e parâmetros genéticos de híbridos de caiaué com dendezeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 47, 1496-1503.

Mielke, T. **Palm Oil the leader in global oils and facts supply**. 2013. Paper presented at the Malaysia/Myanmar palm oil trade fair and seminar, Yangon, Myanmar, 28 June Available at http://www.mpoc.org.my/upload/Plenary_Paper-Thomas-Mielke.pdf> Accessed: 11.09.2014.

Mulamba, N. N.; Mock, J. J. Improvement of yield potential of the Eto Blanco maize (*Zea mays* L.) population by breeding for plant traits. 1978. **Egyptian Journal of Genetics and Cytology**. 7, 40-51.

Nugroho, Y. A.; Sumertajaya, I. M.; Wiendi, N. M. A.; Toruan-Mathius, N. 2014. Estimation of genetic parameters for in vitro culture traits and selection best progenies for Tenera oil palm tissue culture. **Energy Procedia**. 4,316- 322.

Rajanaidu, N.; Rao, V.; Halim, A. H.; Ong, S.H. 1990. Genetic resources: New developments in oil palm breeding. **Elaeis**.1,1-10.

Resende, M.D.V. **Avanços da genética biométrica Florestal**. In: Encontro sobre temas de Genética e Melhoramento. 1997. Piracicaba. Anais. Piracicaba : ESALQ-USP.150-158.

Resende, M. D.V. **Genética Biométrica e Estatística no Melhoramento de Plantas Perenes**. 2002. Brasília, Embrapa, Informação Tecnológica, 975p.

Resende, M. D. V. **Matemática e estatística na análise de experimentos e no melhoramento genético**. 2007. Colombo: Embrapa Florestas, 435 p.

Resende, M. D. V.; Duarte, J. B. 2007. Precisão e controle de qualidade em experimentos de avaliação de cultivares. **Pesquisa Agropecuária Tropical**. 37,182-194.

Silva, R.C.; Gomes Luis, Z.; Scherwinsky-Pereira, J.E. 2012. Differential responses to somatic embryogenesis of different genotypes of Brazilian oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Plant Cell Tissue Organ Culture**. 111, 59-67.

Soh, A.C. 1994. Ranking parents by best linear unbiased prediction (BLUP) of breeding values in oil palm. **Euphytica**. v.76, p.13-21.

Soh, A.C.; Gan, H.H.; Wong, G. ; Hor, T.Y.; Tang, C.C. 2003. Estimates of within family genetic variability for clonal selection in oil palm. **Euphytica**. 133, 147-163,

Thawaro, S.; Te-chato S. 2009. Effect of genotypes and auxins on callus formation from mature zygotic embryos of hybrid oil palms. **Journal of Agricultural Technology** . 5(1), 167-177.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A resposta à embriogênese somática em palma de óleo é genótipo-dependente, mas a técnica utilizada foi eficiente, onde 65,62% dos genótipos testados foram responsivos.

A putrescina é uma alternativa promissora para substituição da citocinina e garante o sucesso na obtenção de clones de palma de óleo em tempo reduzido, sendo então, este protocolo recomendável para a propagação de clones de palma de óleo em escala comercial.

As principais características relacionadas à embriogênese somática: calogênese e formação de linhagens embriogênicas, apresentaram controle genético que permite seleção dos genótipos responsivos a clonagem.

Todos os parâmetros genéticos avaliados: herdabilidade, coeficiente de variação relativa e acurácia, indicaram eficiência na seleção de genótipos superiores dentro do conjunto de materiais genéticos avaliados.

Cinco genótipos foram selecionados como os superiores, tanto para características relacionadas à produtividade de óleo, quanto ao desempenho in vitro, devido à formação de linhagens embriogênicas.

Os primeiros clones brasileiros de palma de óleo a partir de plantas adultas foram obtidos com sucesso neste trabalho, contudo, é necessário avaliar o desempenho destes materiais em campo, quanto ao aparecimento do “mantled flower”, e ainda uma sugestão seria, formar reclones, utilizando estes clones como fontes de explantes.

Este também foi o primeiro estudo a investigar o controle genético da capacidade de clonagem visando a seleção dos genótipos para a formação de um jardim clonal de palma de óleo, avaliando características importantes para a clonagem e o seu potencial produtivo.

Para a eficiência dos programas de melhoramento de palma de óleo é importante que tais estudos sejam considerados na etapa inicial no processo de clonagem. A seleção de genótipos responsivos ao processo de clonagem, pode otimizar os programas de melhoramento, uma vez que gera economia de recurso, tempo e espaço.