

VANESSA DE QUEIROZ

**REGENERAÇÃO, MATURAÇÃO E GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE  
EMBRIÕES SOMÁTICOS EM PALMA DE ÓLEO (*Elaeis guineenses* Jacq)**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2017

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

T

Q3r  
2017

Queiroz, Vanessa de, 1986-

Regeneração, maturação e germinação in vitro de embriões somáticos em palma de óleo (*Elaeis guineenses Jacq.*) / Vanessa de Queiroz. – Viçosa, MG, 2017.

x, 33f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Sérgio Yoshimitsu Motoike.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Palmeira oleaginosa. 2. Aminoácidos. 3. Plantas - Meios de cultivo. 4. Plantas - Reprodução. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Fitotecnia. Programa de Pós-graduação em Fitotecnia. II. Título.

CDD 22 ed. 633.851

VANESSA DE QUEIROZ

**REGENERAÇÃO, MATURAÇÃO E GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE  
EMBRIÕES SOMÁTICOS EM PALMA DE ÓLEO (*Elaeis guineenses* Jacq)**

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

APROVADA: 8 de março de 2017.

---

Rachel Soares Ramos  
(Coorientadora)

---

Edgard Augusto de Toledo Picoli  
(Coorientador)

---

Luciana Domiciano Silva Rosado

---

Sérgio Yoshimitsu Motoike  
(Orientador)

À Deus,  
Por iluminar meus caminhos.

Aos meus pais Rafael e Luzia,  
e irmãos

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

À Deus, que sempre me deu forças e me proporcionou e proporciona tantas oportunidades e realizações.

Aos meus pais, Rafael e Luzia, pelo amor incondicional e por serem as pessoas mais importantes da minha vida.

Aos meus irmãos, Valéria, Valdeney, Vanderson e Rafael; aos meus sobrinhos Matheus e Gabriela; a minha avó Anastácia; tios e primos que sempre confiaram e torceram por mim, obrigada.

Ao meu orientador Sérgio Yoshimitsu Motoike, pela paciência, ensinamentos, confiança, incentivo e oportunidades proporcionadas.

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

A minha coorientadora Rachel Soares Ramos, pela dedicação, apoio e sugestões.

A pesquisadora D.Sc. Kacilda Naomi Kuki pelas valiosas sugestões e contribuições em todas as etapas do meu mestrado.

A técnica Elaine Rocha, obrigada por sua dedicação, incentivo e apoio nestes bons anos de convivência.

Ao técnico Francisco Assis, sempre disposto a ajudar, em todos os momentos que precisei.

Thais Corrêa, pela disponibilidade e sugestões.

Thaís Cristina, pela ajuda incondicional nos meus experimentos e pelos momentos de descontração.

Agradeço imensamente aos amigos: Ana Paula, Luciana Rosado, Elizete, Francielle, Maiara, Geís, Michelle, Stefânia, Sebastián, Roberto (Bebeto), Romário, Andrea Lanna, Sílvia por terem me ajudado com tão boa vontade, que Deus possa retribuir a vocês.

Aos amigos da graduação, pelas risadas.

Aos professores, alunos e funcionários dos Laboratórios de Cultura de Tecidos e Células Vegetais e de Anatomia Vegetal da UFV.

A todos que contribuíram de alguma forma para que este sonho se realizasse.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro.

À Universidade Federal de Viçosa e ao curso de pós-graduação em Fitotecnia  
pela oportunidade concedida.

## **BIOGRAFIA**

Vanessa de Queiroz, filha de Rafael Silvério de Queiroz e Luzia Estevão de Queiroz, nasceu em 14 de maio de 1986, em Viçosa, Minas Gerais-Brasil.

Cursou o ensino básico na Escola Estadual Padre Álvaro Corrêa Borges em Viçosa-MG e o ensino médio no Colégio Anglo de Viçosa, Viçosa-MG.

Em 2007 iniciou o curso de agronomia na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

Em 2015 ingressou no curso de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	vii
<b>ABSTRACT</b> .....	ix
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	3
<b>2.1 Material Vegetal</b> .....	3
<b>2.2 Regeneração e Maturação de embriões somáticos</b> .....	4
<b>2.3 Germinação dos embriões somáticos e obtenção de plântulas completas</b> .....	6
<b>2.4 Microscopia de luz</b> .....	6
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	7
<b>3.1 Regeneração e maturação dos embriões somáticos</b> .....	7
<b>3.1.1 Efeito da interação entre AA e PEG</b> .....	7
<b>3.1.2 Efeito das interações entre AA x ABA e do PEG x ABA</b> .....	11
<b>3.2 Germinação dos embriões somáticos</b> .....	20
<b>4. CONCLUSÕES</b> .....	24
<b>5. AGRADECIMENTOS</b> .....	24
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	24
<b>7. APÊNDICES</b> .....	33

## RESUMO

QUEIROZ, Vanessa de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2017. **Regeneração, Maturação e Germinação in vitro de embriões somáticos em palma de óleo (*Elaeis guineenses* Jacq)**. Orientador: Sérgio Yoshimitsu Motoike. Coorientadores: Edgard Augusto de Toledo Picoli e Rachel Soares Ramos.

A palma de óleo (*Elaeis guineenses* Jacq.) é uma palmeira oleaginosa de importância econômica mundial. O desenvolvimento de plantios comerciais desta palmeira a partir da propagação *in vitro* de plantas elites oferece vantagens, como a padronização do crescimento das plantas e da produção de frutos, facilitando as práticas de manejo. A embriogênese somática pode contribuir para a propagação da palma de óleo, onde as etapas de regeneração e maturação de embriões somáticos e sua posterior conversão em plântulas, são essenciais para a obtenção de clones em longa escala. Entretanto, fatores intrínsecos e extrínsecos podem interferir no sucesso destas etapas. O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito da combinação dos níveis do fitormônio ácido abscísico (ABA), do regulador osmótico polietilenoglicol (PEG) e dos aminoácidos (AA) - asparagina, arginina e glutamina, na maturação de embriões somáticos em meio de cultura de regeneração/maturação. Adicionalmente, analisou-se a formação de plântulas (quantitativa e qualitativamente) em meio de germinação. Para tanto, estes componentes foram adicionados ao meio de maturação, sendo este composto pelos sais e vitaminas Y3 (Eeuwens, 1978), suplementado com 60 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 1 g L<sup>-1</sup> de caseína hidrolisada, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 0,1 µM de ácido beta-naftoxiacético (BNOA) e 1000µM de putrescina, acrescido de 3 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado. O meio de germinação, também foi composto por sais e vitaminas Y3, suplementados com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 1 g L<sup>-1</sup> de caseína hidrolisada, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 330 mg L<sup>-1</sup> de arginina, 330 mg L<sup>-1</sup> de asparagina, 330 mg L<sup>-1</sup> de glutamina, 0,54 µM de ANA e 1000 µM de putrescina. Foram utilizados calos embriogênicos do genótipo AM 21, preestabelecidos em meio de cultura de multiplicação. O experimento foi montado em um Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), no esquema fatorial 2x2x5; sendo, dois níveis de AA em mg L<sup>-1</sup> (AA100 e AA330), dois níveis de PEG em g L<sup>-1</sup> (PEG0 e PEG50) e cinco níveis de ABA em µM (ABA0, ABA3, ABA6, ABA12 e ABA24) totalizando 20 tratamentos e 4 repetições por tratamento. Os resultados da ANOVA apontam que a utilização do PEG, combinado com as doses 3, 6, 12 e 24 µM de ABA reduziram o número de embriões somáticos e posteriormente o número de plântulas em meio de

germinação. Porém, a redução do potencial osmótico proporcionada pela adição de PEG, associado ao ABA, acelerou a maturação dos embriões somáticos. Os resultados histológicos e histoquímicos apontam que os embriões tratados com ABA e PEG apresentavam-se mais desenvolvidos e maduros, e tiveram respostas positivas para a presença de grãos de proteínas, lipídeos e amidos. Além disso, os embriões somáticos, oriundos de meio com menor potencial osmótico (PEG50) formaram plântulas em menor período de tempo.

## ABSTRACT

QUEIROZ, Vanessa de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2017. **Regeneration, Maturation and Germination in vitro of somatic embryos in oil palm (*Elaeis guineenses* Jacq).** Advisor: Sergio Yoshimitsu Motoike. Co-advisors: Edgard Augusto de Toledo Picoli and Rachel Soares Ramos.

The oil palm (*Elaeis guineenses* Jacq.) is an oleaginous palm of global economic importance. The development of commercial plantations of this palm from the *in vitro* propagation of elite plants offers advantages such as the standardization of plant growth and fruit production, facilitating management practices. Somatic embryogenesis may contribute to the propagation of oil palm, where the stages of regeneration and maturation of somatic embryos and their subsequent conversion to seedlings are essential for obtaining large scale clones. However, intrinsic and extrinsic factors may interfere with the success of these steps. The objective of this work was to verify the effect of the combination of the levels of the abscisic acid phormium (ABA), osmotic regulator polyethylene glycol (PEG) and amino acids (asparagine, arginine and glutamine) on the maturation of somatic embryos in culture medium Regeneration/maturation. In addition, seedling formation was (quantitatively and qualitatively) analyzed in germination medium. In order to achieve this, these components were added to the medium, which was composed of the salts and vitamins Y3 (Eeuwens, 1978), supplemented with 60 g L<sup>-1</sup> sucrose, 1 g L<sup>-1</sup> hydrolyzed casein, 100 mg L<sup>-1</sup> of myo-inositol, 0,1 µM of beta-naphthoxyacetic acid (BNOA) and 1000 µM putrescine, plus 3 g L<sup>-1</sup> of activated carbon. The germination medium was also composed of salts and vitamins Y3 supplemented with 30 g L<sup>-1</sup> sucrose, 1 g L<sup>-1</sup> hydrolyzed casein, 100 mg L<sup>-1</sup> myo-inositol, 330 mg L<sup>-1</sup> arginine, 330 mg L<sup>-1</sup> asparagine, 330 mg L<sup>-1</sup> glutamine, 0,54 µM ANA and 1000 µM putrescine. Embryogenic calluses of the AM 21 genotype were used, pre-established in a multiplication culture medium. The experiment was set up in a Completely Randomized Design, in the 2x2x5 factorial scheme; two levels of PEG in g L<sup>-1</sup> (PEG0 and PEG50) and five levels of ABA in µM (ABA0, ABA3, ABA6, ABA12 and ABA24) and two levels of AA in mg L<sup>-1</sup> (AA100 and AA330), totaling 20 treatments, 4 replicates were made per treatment. The results of ANOVA indicate that the use of PEG, combined with doses 3, 6, 12 and 24 µM of ABA reduced the number of somatic embryos and later the number of seedlings in germination medium. However, the reduction of the osmotic potential afforded by the addition of

PEG, associated with ABA, accelerated the maturation of somatic embryos. The histological and histochemical results indicate that embryos treated with ABA and PEG were more developed and mature, and had positive responses to the presence of protein, lipid and starch grains. In addition, somatic embryos from medium with lower osmotic potential (PEG50) formed seedlings in a shorter period of time.

## 1. INTRODUÇÃO

A palma de óleo, *Elaeis guineenses* Jacq. (Arecaceae), é uma palmeira oleaginosa de origem africana com grande importância econômica, devido aos óleos extraídos de seu fruto: o óleo de palma (da polpa) e o de palmiste (da amêndoa) (KONAN et al., 2006; BOARI, 2008). No Brasil, o cultivo ocorre principalmente no Pará, Amazônia e sul da Bahia (TEIXEIRA, 2005; VENTURIERI et al., 2009). Somente o estado do Pará contabiliza cerca de 164.443 hectares plantados (FAEPA, 2014), panorama que se encontra em franca expansão. O óleo de palma é empregado em diversos setores da indústria alimentícia. Já o óleo de palmiste é valorizado nas indústrias farmacêutica, cosmética e de perfumaria (FURLAN et al., 2003; KONAN et al., 2006; BOARI, 2008 GAN & LI, 2014).

Devido à dificuldade de usar a propagação via sementes, fato que contribui, em grande parte, para que os plantios comerciais apresentem crescimento e produção desuniformes, ainda que sejam originários de sementes híbridas certificadas (JUAN et al., 1989). A cultura de tecidos surge como uma excelente alternativa para a multiplicação clonal de espécies selecionadas (SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2007). A técnica de clonagem *in vitro* de plantas tornou-se possível, fundamentando-se na totipotência das células vegetais, por meio da regeneração *in vitro*, (CARVALHO et al., 2006). A embriogênese somática tem sido o principal método utilizado (OOI et al., 2013; PALANYANDY et al., 2013; KONAN et al., 2006),

A embriogênese somática é o processo pelo qual células haplóides ou somáticas multiplicam-se e passam por diferentes estádios embriogênicos originando uma planta sem ocorrer à fusão de gametas. Existem duas vias para induzir a embriogênese somática: a direta e a indireta. A última passa pela fase intermediária de calos, que posteriormente originam embriões somáticos (GUERRA et al., 1999). O modelo indireto da embriogênese somática tem sido o principal método descrito para a propagação clonal da palma de óleo (KONAN et al., 2006; OOI et al., 2013; PALANYANDY et al., 2013).

Um dos principais esforços para a otimização do sistema de embriogênese somática em muitas espécies concentra-se principalmente, nas fases de maturação e germinação dos embriões somáticos, sendo que os meios de cultura são manipulados quanto aos tipos e concentrações de reguladores de crescimento vegetal e agentes que possam promover o sucesso da embriogênese somática, como por exemplo, pela

adição de nitrogênio com adição de aminoácidos (AA) ao sistema e de agentes de maturação, como: ácido abscísico (ABA); agentes osmóticos como polietilenoglicol (PEG), (THORPE, 1995; LAKSHMANAN, 2006).

A maturação é considerada uma etapa fundamental do desenvolvimento do embrião, e para a subsequente germinação e desenvolvimento da plântula (PERÁN-QUESADA et al., 2004). Na embriogênese somática, a incorporação do ABA ao meio de cultura é amplamente utilizada para estimular o processo de maturação, provocando mudanças na morfologia, no padrão de expressão gênica e no metabolismo de substâncias de reserva (SALAJOVA et al., 1999). O ABA também detém um papel fundamental na histodiferenciação dos embriões somáticos durante a maturação (GUTMANN et al., 1996). A ação do ABA é reconhecida, favorecendo a maturação e inibindo a germinação (FINKELSTEIN et al., 2002; KOORNNEEF et al., 2002).

A presença de AA no meio de cultura (qualitativa e quantitativamente) interfere de forma direta na formação de embriões somáticos. Os AA tem se mostrado também como reguladores morfogenéticos (TUPY et al., 1983; KOBAYASHI et al., 1999). O nitrogênio, constituinte básico dos AA e proteínas, é um fator essencial para o desenvolvimento da planta. Em cultura de tecidos, estes elementos tem efeitos significativos na divisão, crescimento e morfologia celular (BEHREND & MATELES, 1975; KIRBY et al., 1987). Segundo Lea (1993), o nitrogênio originado a partir de AA é assimilado mais rapidamente pelos esqueletos carbônicos durante o metabolismo e síntese de proteínas, quando comparados a outras fontes de N inorgânico. Pesquisadores com frequência têm suplementado os meios de cultura com AA ou proteínas hidrolisadas com intuito de favorecer o desenvolvimento das culturas *in vitro* (GAMBORG, 1970).

Vários estudos têm sido desenvolvidos visando a obtenção de embriões somáticos com maior viabilidade, utilizando baixo potencial osmótico no meio que induz a maturação (ATTREE & FOWKE, 1993). Esta condição mimetiza o efeito do estresse hídrico, que naturalmente ocorre nas sementes, durante os estádios finais da maturação, permitindo que os embriões sobrevivam ao processo de desidratação (BEWLEY & BLACK, 1994). O PEG é um agente osmótico não plasmolizante, que não adentra nas células vegetais, e quando adicionado ao meio de cultura gera redução no potencial osmótico intracelular consequentemente conduzindo à

dessecação (TAUTORUS et al., 1990; ATTREE & FOWKE, 1993; MISRA et al., 1993; STASOLLA & YEUNG, 2003; STASOLLA et al., 2003).

A adição de agentes osmóticos, como o PEG, ao meio de cultura reduz a disponibilidade de água, simulando as condições do desenvolvimento do embrião zigótico (SILVEIRA, 2004). Embora embriões somáticos não passem por dessecação ou tornem-se dormentes, vários genes que são preferencialmente expressos durante a dessecação do embrião zigótico, como os genes *lea*, também são expressos durante a embriogênese somática (LINACERO et al., 2001; ZIMMERMAN, 1993).

O acompanhamento do processo de embriogênese somática por técnicas histológicas tem se mostrado essencial para o entendimento da embriogênese oferecendo respaldo aos protocolos em várias espécies vegetais. No processo de regeneração *in vitro* pode-se observar a presença ou ausência de sincronia dos embriões somáticos e a identificação de falhas na formação do embrião somático a fim de prevenir a obtenção de plantas anormais (FILIPPI et al., 2001; NOGUEIRA, 2006). Em palma de óleo, o estudo histológico do processo embriogênico foi realizado quando folhas imaturas (SCHWENDIMANN et al., 1988) e também embriões zigóticos (KANCHANAPOOM & DOMYOAS, 1999) foram utilizados como fonte de explante.

Pelo exposto, o objetivo deste trabalho foi verificar o efeito da combinação dos níveis do fitormônio ácido abscísico (ABA), do regulador osmótico polietilenoglicol (PEG) e dos aminoácidos (AA) - asparagina, arginina e glutamina, na maturação de embriões somáticos em meio de cultura de regeneração/maturação. Adicionalmente, analisou-se a formação de plântulas (quantitativa e qualitativamente) em meio de germinação.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Material Vegetal**

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Células e Tecidos Vegetais do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa. Para a execução do experimento, foram utilizados como explantes calos embriogênicos mantidos em meio de multiplicação, segundo técnica descrita por Corrêa et al. (2015), foi utilizado o genótipo AM 21, híbrido Tenera, do grupo Kigoma.

Os calos embriogênicos advêm de folhas imaturas de plantas adultas selecionadas no plantio comercial da empresa Agropalma S. A., localizada no município de Tailândia no estado do Pará/Brasil. O genótipo é considerado “material elite” por apresentar alta produtividade e resistência ao amarelecimento fatal.

## **2.2 Regeneração e Maturação de embriões somáticos**

Os calos embriogênicos foram transferidos para o meio de regeneração /maturação. O meio básico foi composto por sais e vitaminas Y3 (EEUWENS, 1978), 60 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 1 g L<sup>-1</sup> de caseína hidrolisada, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 0,1μM de ácido beta-naftoxiacético (BNOA), 2,5 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado (Sigma, USA), 1000μM de putrescina e 2,5 g L<sup>-1</sup> de Phytigel® (Sigma, USA), pH 5,7 ± 0,1 e autoclavado por 20 minutos a 121 °C a 1,5 atm. Foram acrescentados ao meio AA (asparagina, arginina e glutamina), PEG e ABA em diferentes níveis, compondo 20 tratamentos no total (Tabela 1). Após a inoculação das linhagens embriogênicas em placas, as mesmas 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.

O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado (DIC) em um esquema de fatorial triplo 2x2x5, com 2 níveis de AA em mg L<sup>-1</sup> (AA100 e AA330), 2 níveis de PEG (massa molecular: 3350) em g L<sup>-1</sup> (PEG0 e PEG50) e 5 níveis de ABA em μM (ABA0, ABA3, ABA6, ABA12 e ABA24), constituído de 4 repetições por tratamento, representado por uma placa de Petri de poliestireno com 90 x 15 mm de dimensão, contendo em cada placa 30 ml de meio básico acrescentado dos fatores descritos conforme (Tabela 1), totalizando 80 unidades experimentais. Para análise dos dados foi utilizado o software R.

**Tabela 1:** Distribuição dos Tratamentos

AMINOÁCIDOS	Polietilenoglicol PEG (50g L <sup>-1</sup> )	Concentração de Ácido Absísico ABA ( $\mu$ M)	TRATAMENTOS	Siglas
GLUTAMINA ASPARAGINA ARGININA (100mg L <sup>-1</sup> ) AA <sub>100</sub>	AUSÊNCIA PEG <sub>0</sub>	0	AA <sub>100</sub> XPEG <sub>0</sub> XABA <sub>0</sub>	T1
		3	AA <sub>100</sub> XPEG <sub>0</sub> XABA <sub>3</sub>	T2
		6	AA <sub>100</sub> XPEG <sub>0</sub> XABA <sub>6</sub>	T3
		12	AA <sub>100</sub> XPEG <sub>0</sub> XABA <sub>12</sub>	T4
		24	AA <sub>100</sub> XPEG <sub>0</sub> XABA <sub>24</sub>	T5
	PRESENÇA PEG <sub>50</sub>	0	AA <sub>100</sub> XPEG <sub>50</sub> XABA <sub>0</sub>	T6
		3	AA <sub>100</sub> XPEG <sub>50</sub> XABA <sub>3</sub>	T7
		6	AA <sub>100</sub> XPEG <sub>50</sub> XABA <sub>6</sub>	T8
		12	AA <sub>100</sub> XPEG <sub>50</sub> XABA <sub>12</sub>	T9
		24	AA <sub>100</sub> XPEG <sub>50</sub> XABA <sub>24</sub>	T10
GLUTAMINA ASPARAGINA ARGININA (330mg L <sup>-1</sup> ) AA <sub>330</sub>	AUSÊNCIA PEG <sub>0</sub>	0	AA <sub>330</sub> XPEG <sub>0</sub> XABA <sub>0</sub>	T11
		3	AA <sub>330</sub> XPEG <sub>0</sub> XABA <sub>3</sub>	T12
		6	AA <sub>330</sub> XPEG <sub>0</sub> XABA <sub>6</sub>	T13
		12	AA <sub>330</sub> XPEG <sub>0</sub> XABA <sub>12</sub>	T14
		24	AA <sub>330</sub> XPEG <sub>0</sub> XABA <sub>24</sub>	T15
	PRESENÇA PEG <sub>50</sub>	0	AA <sub>330</sub> XPEG <sub>50</sub> XABA <sub>0</sub>	T16
		3	AA <sub>330</sub> XPEG <sub>50</sub> XABA <sub>3</sub>	T17
		6	AA <sub>330</sub> XPEG <sub>50</sub> XABA <sub>6</sub>	T18
		12	AA <sub>330</sub> XPEG <sub>50</sub> XABA <sub>12</sub>	T19
		24	AA <sub>330</sub> XPEG <sub>50</sub> XABA <sub>24</sub>	T20

O potencial osmótico ( $\Psi_s$ ) do meio foi estimado através da determinação do ponto de congelamento (PC) das amostras pelo método crioscópico, utilizando-se o crioscópico (ITR modelo MK540). Este aparelho realiza as leituras do PC em graus Hortvet ( $^{\circ}$  H), e os cálculos de conversão são realizados com a seguinte fórmula, segundo Szijarto & van de VooRT (1983).

$$^{\circ}\text{C} = ((0,1915 * (^{\circ}\text{H}) - (-0,0004785)) / 0,199)$$

Este método permite determinar, com muita precisão, o PC de uma solução. O PC de uma solução aquosa contendo solutos não voláteis dissolvidos é menor do que  $0^{\circ}\text{C}$ . A magnitude da depressão do PC abaixo de  $0^{\circ}\text{C}$  é diretamente proporcional ao número de partículas do soluto dissolvido (Lei de BLADGEN). Uma solução 1,0 osmolal de um soluto não ionizável congela a  $-1,858^{\circ}\text{C}$  (Lei da depressão constante de RAOULT) relação descrita por RAOULT (KRAMER & BOYER, 1995). Tal solução possui um  $\Psi_s$  de  $-2,27$  MPa. Esta relação quantitativa entre o PC de uma solução de concentração conhecida e seu  $\Psi_s$ , permite determinar o  $\Psi_s$  de uma amostra baseado no seu PC, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\frac{-2,27 \text{ MPa}}{1,86^{\circ}\text{C}} = \frac{\Psi_s}{\Delta_f}$$

Sendo,  $\Psi_s = 1,22 \times \Delta f$

$\Delta f$  = ponto de congelamento, em °C

Baseado no método supracitado foi estimado o potencial osmótico dos tratamentos.

### **2.3 Germinação dos embriões somáticos e obtenção de plântulas completas**

Com o intuito de verificar a eficiência da germinação e o posterior desenvolvimento de plântulas, os embriões somáticos obtidos na etapa anterior foram transferidos para frascos de vidro de 300 ml, contendo 30 ml de meio de germinação, composto por sais e vitaminas Y3 (EEUWENS, 1978), 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 1 g L<sup>-1</sup> de caseína hidrolisada, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 330 mg L<sup>-1</sup> de arginina, 330 mg L<sup>-1</sup> de asparagina, 330 mg L<sup>-1</sup> de glutamina, 0,54 μM de ANA e 1000 μM de putrescina, 2,5 g L<sup>-1</sup> de Phytigel® (Sigma, USA), pH 5,7 ± 0,1. Os meios foram autoclavados por 20 minutos a 121 °C a 1,5 atm (CARVALHO, 2008).

Após a inoculação dos embriões os frascos foram mantidos em sala de crescimento à 27 ± 2 °C com fotoperíodo de 16 horas/dia e irradiância de ± 40 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> provida por lâmpadas tubulares de LED (18 W, Arapeva Iluminação LED). Após 60 dias da inoculação foi realizado a contagem do número de plântulas completas obtidas no processo.

O experimento foi constituído de 4 repetições - por origem do tratamento da etapa anterior - representado por um frasco com 15 embriões, em delineamento inteiramente casualizado (DIC).

### **2.4 Microscopia de luz**

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa e consistiu do estudo anatômico dos embriões obtidos na etapa de maturação desse trabalho.

Para os estudos histológicos, aos 60 dias após inoculação em meio de regeneração/maturação foram coletados dez embriões de cada tratamento. As amostras foram fixadas em FAA (formaldeído, ácido acético glacial, etanol 50%, 1:1:18, volume:volume) por 48 horas e conservadas em etanol 70% (JOHANSEN, 1940), posteriormente foram desidratadas em série etanólica e incluídas em 2-hidroxietil-metacrilato (Historesin, Leica, Heidelberg, Alemanha). As secções transversais e longitudinais (5 μm de espessura) foram obtidas em micrótomo rotativo

de avanço automático (RM2155, Leica Microsystems Inc., Deerfield, EUA), coradas com azul de toluidina 0,05% pH 4,4 (O'BRIEN et al., 1964) e montadas com resina sintética (Permount, Fisher Scientific, Pittsburgh, EUA).

Para os estudos histoquímicos foram utilizadas amostras frescas ou fixadas. As amostras frescas foram seccionadas em criomicrotomo. As amostras fixadas em FAA foram incluídas em 2-hidroxietil-metacrilato. As seções foram submetidas aos seguintes reagentes: Sudan Black (PEARSE, 1972) para lipídios; Lugol (JOHANSEN, 1940) para amido e Xilidine Ponceau (VIDAL, 1970) para proteínas. O controle foi conduzido simultaneamente para cada teste, de acordo com o método proposto pelos autores.

As imagens das análises histológicas e histoquímica foram obtidas em câmera fotográfica digital (AxioCam HRc, Zeiss, Göttinger, Alemanha) e microcomputador com o programa de captura de imagens Axion Vision acoplados a um microscópio de luz (AX-70 TRF, Olympus Optical, Tokyo, Japão).

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1 Regeneração e maturação dos embriões somáticos**

Após 60 dias em meio de cultura de regeneração os calos embriogênicos diferenciaram-se, formando embriões somáticos que, eventualmente, completaram o seu desenvolvimento e maturação. Contudo, houve uma redução da quantidade de embriões somáticos obtidos e a maturação desses embriões variaram entre os tratamentos. Verificou-se pela análise de variância que houve interação dupla entre os fatores (Apêndice I).

##### **3.1.1 Efeito da interação entre AA e PEG**

Na interação AAxPEG, o aumento na concentração dos aminoácidos (AA330) em relação ao PEG não foi significativo para o número de embriões (Tabela 2). Por outro lado, em meio contendo AA100 a presença de PEG50 acarretou em redução de aproximadamente 52,83% de embriões, em relação a PEG0. A tabela 3, mostra essa redução significativa do número de embriões no tratamento AA100+PEG50.

**Tabela 2:** Resumo do quadro da ANOVA do desdobramento das interações AA\*PEG à 5% de probabilidade para o número de embriões.

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>
PEG/AA <sub>100</sub>	1	1548.65580	1548.65580	81.5580**
PEG/AA <sub>330</sub>	1	13.73584	13.73584	0.7233 <sup>n.s.</sup>
Resíduo	60	1139.37283	18.98955	

(\*\*)-significativo;  
n.s.-não significativo

**Tabela 3:** Diferença entre as médias do desdobramento de AA100 dentro de PEG0 e PEG50.

<b>AA<sub>100</sub>/PEG</b>	<b>Média de Embriões</b>
AA <sub>100</sub> /PEG <sub>0</sub>	72,00 a
AA <sub>100</sub> /PEG <sub>50</sub>	19,00 b

As médias seguidas por letras minúsculas diferentes, diferem entre si estatisticamente pelo teste F à 5% de probabilidade

Essa redução do número de embriões pode estar relacionada a redução do potencial osmótico (Tabela 4) proporcionado pela presença do PEG e a menor disponibilidade de AA, uma vez que os embriões em desenvolvimento utilizam rapidamente o nitrogênio disponibilizados pelos AA (NAYLOR, 1984). O maior fornecimento de AA (AA330) no meio de cultura, por sua vez, facilita a maturação de embriões somáticos (LAI & MC KERSIE, 1994, MORCILLO et al., 1999).

**Tabela 4:** Potencial Osmótico ( $\Psi_s$ ) do meio básico e dos Tratamentos.

<b>TRATAMENTOS</b>	<b><math>\Psi_s</math> em MPa</b>
AA <sub>100</sub> XPEG <sub>0</sub>	-0,712
AA <sub>100</sub> XPEG <sub>50</sub>	-0,878
AA <sub>330</sub> XPEG <sub>0</sub>	-0,721
AA <sub>330</sub> XPEG <sub>50</sub>	-0,905

Embora tenha ocorrido a redução do número de embriões somáticos com a adição do AA330, e este não diferir para o potencial osmótico PEG0 e PEG50 (Tabela 5).

**Tabela 5:** Diferença entre as médias do desdobraimento de AA330 dentro de PEG0 e PEG50.

<b>AA<sub>330</sub>/PEG</b>	<b>Média de Embriões</b>
AA <sub>330</sub> /PEG <sub>0</sub>	19,19 a
AA <sub>330</sub> /PEG <sub>50</sub>	18,02 a

As médias seguidas por letras minúsculas iguais, não diferem entre si estatisticamente pelo teste F à 5% de probabilidade

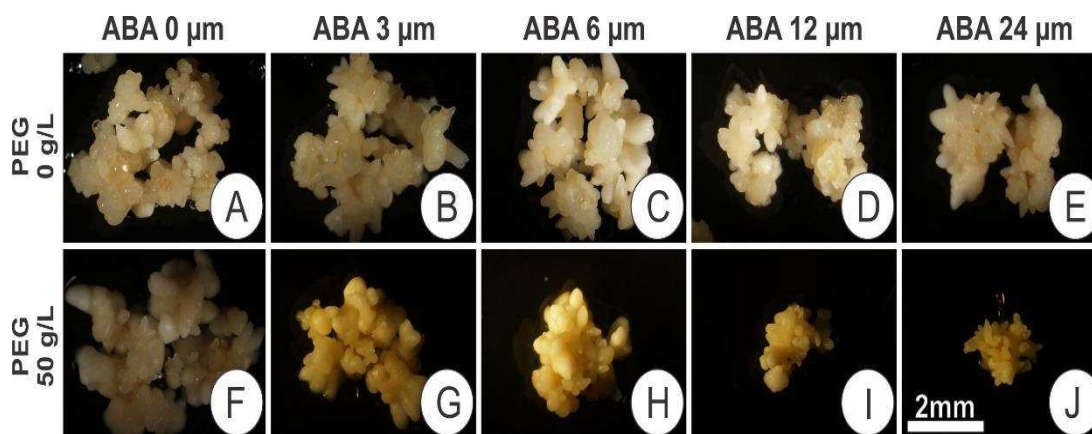
A adição dos AA exógenos, dentre eles glutamina, asparagina e arginina, favorecem um maior número de embriões somáticos, com melhor qualidade possivelmente porque durante o desenvolvimento do embrião, os aminoácidos são armazenados na forma de proteínas, sendo a sua taxa de síntese controlada, principalmente, pela disponibilidade desses aminoácidos: ácido glutâmico, glutamina, ácido aspártico, arginina e asparagina, ou pela taxa de conversão destes em outros aminoácidos nos tecidos de reserva (RONCHI et al., 1984, BEWLEY & BLACK 1994, SILVEIRA et al. 2004, SANTA-CATARINA et al. 2006).

Situações de estresse hídrico, como o proporcionado pela adição de PEG, podem estimular a síntese de diversas proteínas de proteção ao estresse, tais como as do grupo LEA (“late embryogenesis abundant”) e as chaperonas, relativas à manutenção da estrutura de outras proteínas (BEWLEY & BLACK, 1994; BERTOSSI et al., 2001; ZHU, 2001; STASOLLA et al., 2002; STASOLLA & YEUNG, 2003). A maior disponibilidade de AA no meio de cultura combinado com o agente osmótico PEG pode estar relacionado com a síntese destas proteínas na fase de maturação. As proteínas sintetizadas poderiam ser utilizadas pelos embriões como fonte de nitrogênio durante a germinação (FAIT et al., 2006).

A presença de embriões somáticos em formatos globulares com uma coloração esbranquiçada e aparência vitrea foi observado no material estudado tanto para a ausência de PEG nos tratamentos T1 e T2 (Figura 1 – A e B) quanto para presença de PEG (PEG50) com ausência de ABA no tratamento T6 (Figura 1 – F). Porém, esses embriões ainda estavam fortemente associados a calos embriogênicos, possivelmente nas fases iniciais de desenvolvimento (globular, codiforme) ou ainda imaturos e anormais (Figura 1 – A e B).

A medida que aumentou a concentração de ABA tanto na ausência quanto na presença de PEG, ocorreu uma redução do calejamento e os embriões apresentavam um aspecto mais alongado com coloração esbranquiçada e de tonalidade opaca,

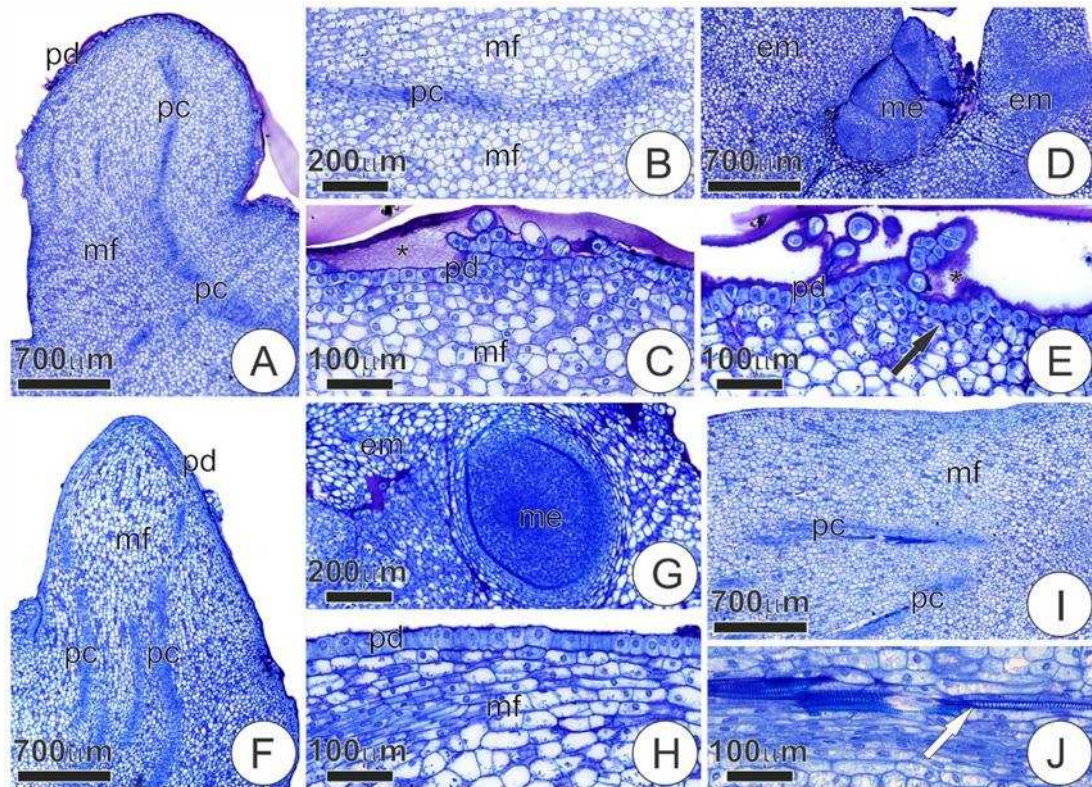
possivelmente em fase de desenvolvimento codiforme e iniciando a fase torpeda para os tratamentos T3, T4 e T5 (Figura 1 – C, D e E) e para T7, T8, T9 e T10 (Figura 1 – G, H, I e J) e além disso também foi observado uma redução de tamanho dos embriões que foi observado na Figura 1 – I e J.



**Figura 1:** Resposta morfológica de embriões somáticos de palma de óleo, submetidos ao tratamento de regeneração e maturação na presença de diferentes níveis de ABA e PEG, na presença de AA100. As figuras de A a J mostram a formação de embriões a partir de massas pró-embriogênicas, que correspondem aos Tratamentos (T1 a T10), respectivamente.

Embora tenha ocorrido um menor número de embriões nos tratamentos com a presença de PEG, os embriões apresentavam-se mais individualizados onde era possível observar maior alongamento do eixo embrionário, iniciando-se a fase de torpeda (Figura 1 - H, I e J).

Nas análises histológicas pode-se observar no tratamento T11 (AA330) intensa divisão celular no meristema fundamental (Figura 2 – F), pequena região de massa pró-embriogênica (Figura 2 – G), em comparação com o controle T1. A protoderme apresentava um espessamento nas paredes periclinais externas e região do meristema fundamental com células diferenciadas (Figura 2 – H).

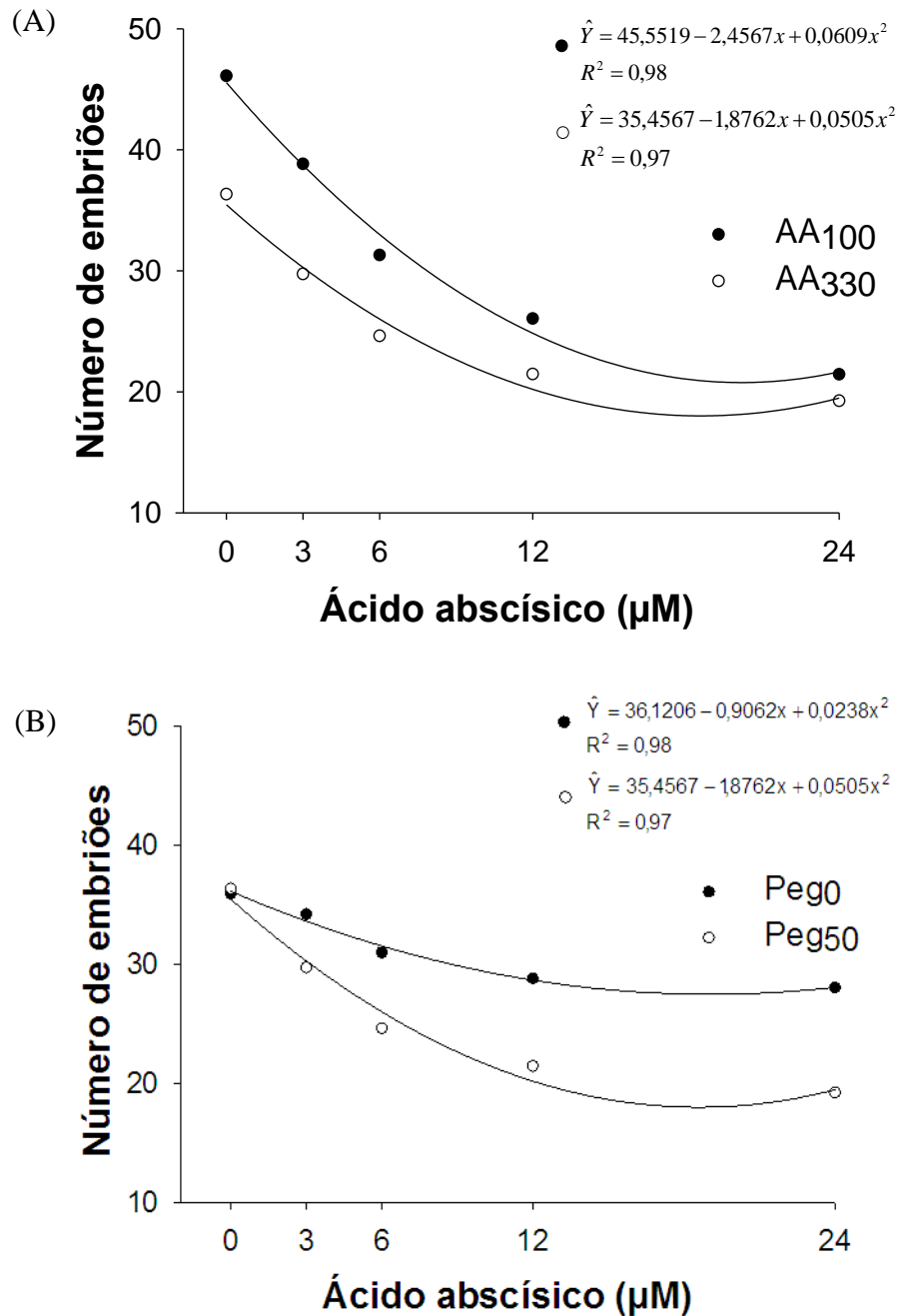


**Figura 2:** Caracterização anatômica de embriões somáticos de palma de óleo, após 60 dias em meio de regeneração/maturação. A) Secção longitudinal do embrião destacando o cordão de procâmbio diferenciado ao longo do eixo. B) Secção do embrião, evidenciando o procâmbio em processo de diferenciação e as células do meristema fundamental em divisão. C) Secção do embrião, destacando o espessamento da parede, desorganização das células da protoderme e maior presença de mucilagem na face externa do embrião mostrado pelo asterisco preto. D) Detalhe da região de massa pró-embriogênica. E) Detalhe do embrião, destacando a desorganização das células da protoderme, espessamento da parede periclinal interna das células da protoderme (seta preta) e maior presença de mucilagem na face externa do embrião (asterisco preto). F) Secção longitudinal do embrião destacando região do meristema fundamental. G) Secção da região de massa pró-embriogênica. H) Secção do embrião, com detalhe da protoderme destacando o espessamento nas paredes periclinais externas nas células da protoderme e região do meristema fundamental com células diferenciadas. I) Secção do embrião destacando a grande quantidade de células compondo o meristema fundamental. J) Secção do embrião mostrando a região do procâmbio com vários elementos de vaso helicoidais e escalariformes (seta branca). As imagens A, B e C, são referentes ao T6; D e E, são referentes ao T9; F, G e H, são referentes ao T11; I e J são referentes ao T14. embrião, em; massa pró-embriogênica, me; meristema fundamental, mf; procâmbio, pc; protoderme, pd.

### 3.1.2 Efeito das interações entre AA x ABA e do PEG x ABA

Na interação AA x ABA, as respostas foram de natureza quadrática, verifica-se que em todas as duas concentrações de AA, ocorre redução do número de embriões, a medida em que aumentou as concentrações de ABA, o que ocorreu de

maneira mais acentuada com o aumento de AA (AA330), (Figura 3 - A). Efeito semelhante foi observado em relação a presença ou ausência de PEG, que também apresentou uma resposta de natureza quadrática, onde, a presença do PEG50, acentuou a redução do número de embriões (Figura 3 - B).



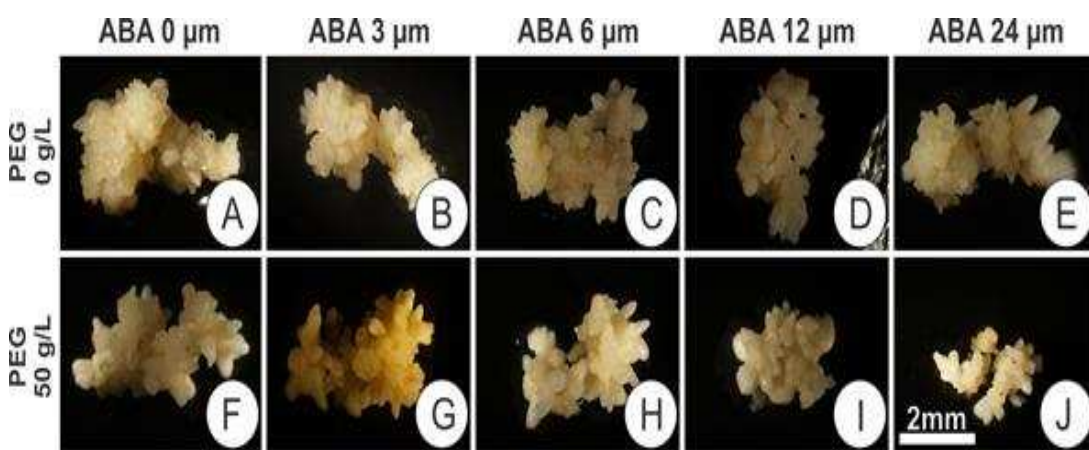
**Figura 3:** Os Gráficos (A e B) mostram a estimativa do número de embriões somáticos de palma de óleo obtidos após 60 dias em meio de cultura de maturação. A) Interação entre os níveis de AA (100 e 330 mg L<sup>-1</sup>) e os diferentes níveis de ABA. B) Interação entre os níveis de PEG (0 e 50 g L<sup>-1</sup>) e os diferentes níveis de ABA.

A adição de PEG nos meios de cultura tem como objetivo a redução do potencial osmótico, que por conseguinte acarreta menor disponibilidade de água aos embriões, ficando estes sujeitos a desidratação (VON ARNOLD et al., 2002). Essa redução no conteúdo de água das culturas embriogênicas é uma característica desejável para a obtenção de maturação dos embriões somáticos (ATTREE & FOWKE, 1993; VON ARNOLD et al., 2002). Essa alteração do potencial osmótico leva ao isolamento de grupos de calos embriogênicos, o que acaba favorecendo alguns grupos em detrimento de outros, e afeta diretamente a formação de embriões somáticos em meio de cultura. Resultados semelhantes foram observados por Luo et al. (1996) e Nakagawa et al. (2001).

Estudos indicam a importância do ABA na maturação de embriões somáticos, sendo que a sua adição no meio de maturação promove o desenvolvimento normal dos embriões e a sua conversão em plântulas em várias espécies como a palma de óleo (BERTOSSO et al., 2001) e coníferas (STASOLLA & YEUNG, 2003). Além disso a adição de ABA e agentes osmóticos como o PEG, promovem uma redução do potencial osmótico do meio de cultura, resultando na produção de embriões em estádios avançados de desenvolvimento, para várias espécies de coníferas (GUPTA & PULLMAN, 1991; SHOJI et al., 2006). Durante a etapa de maturação observa-se uma redução na atividade de divisão celular, e consequente evolução na diferenciação do embrião, onde diferentes tipos de agentes promotores de maturação atuam de forma individualizada (ATTREE & FOWKE, 1993).

Embora não tenha ocorrido diferença significativa no número de embriões somáticos de palma de óleo na presença de AA330 foi observado embriões somáticos em diferentes estágios de desenvolvimento. Embriões somáticos em formatos globulares de coloração esbranquiçada e aparência vitrea foram observados no material estudado, porém, esses embriões ainda estavam fortemente associados a calos embriogênicos, possivelmente nas fases iniciais de desenvolvimento de embriões (globulares, codiformes) ou ainda imaturos e anormais (Figura 4 – A e B). Com o aumento da concentração de ABA na ausência de PEG, ocorreu uma redução do calejamento e os embriões apresentavam um aspecto mais alongado com coloração esbranquiçada e de tonalidade opaca, possivelmente em fase de desenvolvimento codiforme e iniciando a fase torpedo (Figura 4 – C, D e E). Na presença do PEG50 e ausência de ABA também foi observado embriões somáticos em formatos globulares com uma coloração esbranquiçada e aparência vitrea,

fortemente associados aos calos embriogênicos, possivelmente nas fases iniciais de desenvolvimento (globular, codiforme) ou ainda imaturos e anormais (Figura 4 – F). A adição de ABA e o aumento da sua concentração, reduziu o calejamento de maneira mais acentuada em relação a ausência de PEG e o embriões também se apresentavam com um aspecto mais alongado, coloração esbranquiçada e de tonalidade opaca, iniciando a fase torpedo (Figura 4 – G, H, I e J) e além disso também foi observado uma redução de tamanho dos embriões (Figura 4 – I e J).

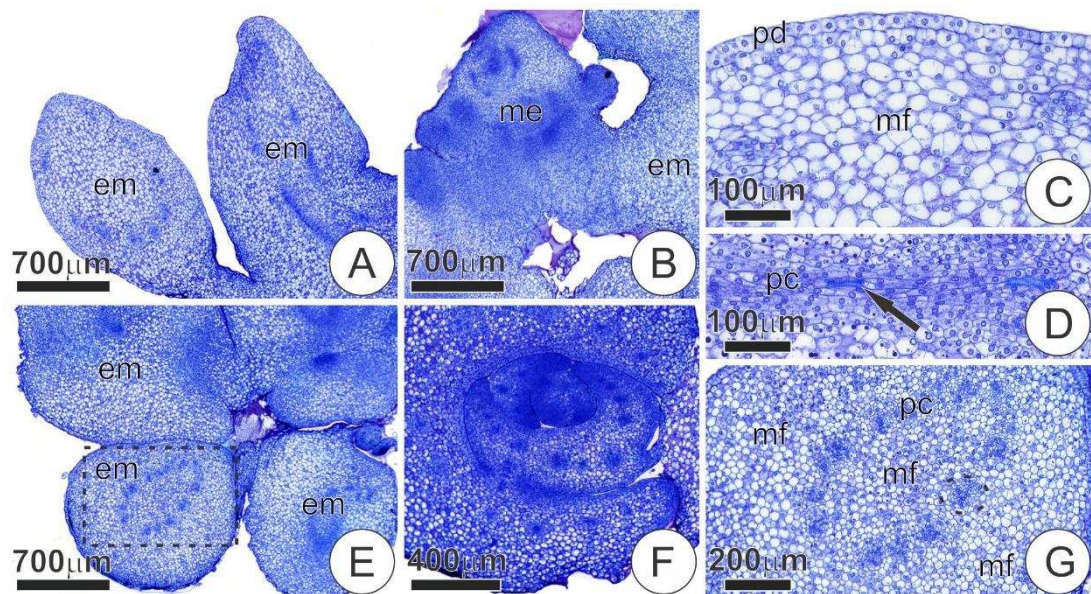


**Figura 4:** Resposta morfológica dos embriões somáticos de palma de óleo, submetidos ao tratamento de regeneração e maturação na presença de diferentes níveis de ABA e PEG, na presença de AA330. As imagens de A-J mostram a formação de embriões a partir de massas pró-embriogênicas que correspondem aos Tratamentos T11 a T20, respectivamente.

No presente trabalho os embriões maturados em meio com PEG (50 g L<sup>-1</sup>) e ABA nas concentrações 6, 12 e 24μM, apresentavam-se mais definidos e individualizados. Podendo-se observa um alongamento do eixo embrionário (Figura 1 - H, I e J) e (Figura 4 - H, I e J). A redução do potencial osmótico, causada pela adição de PEG e aumento das concentrações de ABA, foram importantes para acelerar o desenvolvimento de embriões somáticos de coníferas (STASOLLA & YEUNG, 2003). Neste trabalho os promotores de maturação ABA e PEG também contribuíram para acelerar o desenvolvimento de embriões somáticos de palma de óleo.

Na análise histológica dos embriões (Figura 5 - A), foi possível observar que na ausência de ABA e PEG, as células dos embriões se diferenciaram e se desenvolveram de forma assíncrona e a formação desses embriões ocorreu via origem multicelular, já as massas pró-embriogênicas apresentavam células menores,

com citoplasma denso (Figura 5 - B). Foi possível observar a protoderme bem definida, delimitando a massa homogênea de células correspondentes ao meristema fundamental com citoplasma pouco denso, vacuoladas e o núcleo e nucléolos aparentes (Figura 5 - C), entremeada pela região de procâmbio com presença de elementos de vaso helicoidais (Figura 5 - D). Moura et al. (2009) também constataram a presença de elementos traqueais em estágios avançados de determinação celular, na fase de maturação de embriões somáticos de macaúba. Com a presença do ABA observou-se a formação de primórdios foliares, fase avançada de desenvolvimento do embrião (Figura 5 - F), e uma distribuição bem definida do procâmbio em feixes formando um círculo (Figura 5 – E e G). Essa região do procâmbio posteriormente dará origem ao caule.



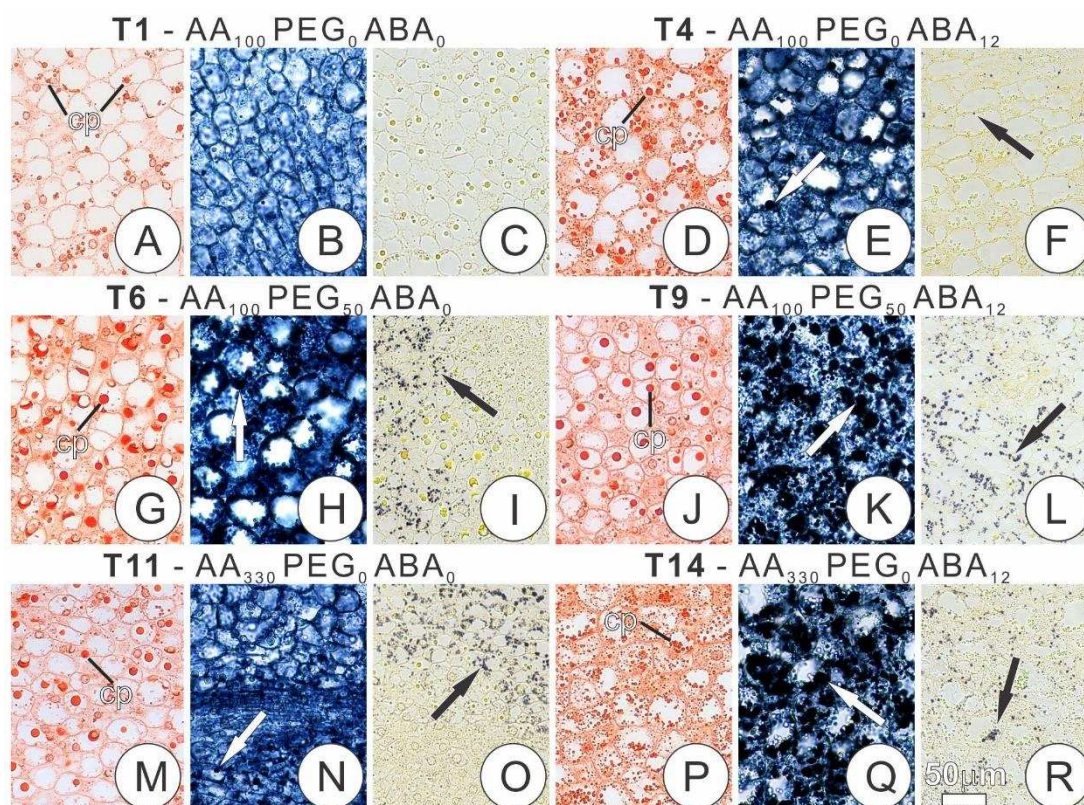
**Figura 5:** Caracterização anatômica dos embriões somáticos de palma de óleo. A) Secção longitudinal de embriões somáticos. B) Secção da região de massa pró-embriogênica evidenciando células menores, com citoplasma denso e região do embrião apresentando maior volume e vacúolo central. C) Secção do embrião, destacando região de protoderme e meristema fundamental. D) Secção do embrião, destacando região de procâmbio e presença de elementos de vaso helicoidais, indicados pela seta preta. E) Secção transversal de embriões somáticos. F) Secção que mostra a presença de primórdios foliares. G) Secção do embrião que evidencia a distribuição do procâmbio em feixes formando um círculo (região que dará origem ao caule). As imagens (A, B, C e D), são referentes ao T1; (E, F e G) são referentes ao T4. embrião, em; massa pró-embriogênica, me; meristema fundamental, mf; procâmbio, pc; protoderme, pd.

Na presença do PEG, os embriões somáticos mostraram cordões de procâmbio diferenciados ao longo do eixo em processo de diferenciação e as células do meristema fundamental mais densas (Figura 2 – A e B). Em algumas regiões dos embriões, verificou-se a ocorrência da desorganização das células da protoderme com o descolamento da mesma, e uma maior presença de mucilagem na face externa do embrião (Figura 2 – C). Almeida et al. (2012) e Graner (2013), também observaram a presença de mucilagem na superfície das células e nos espaços intercelulares, durante o desenvolvimento de embriões de pêssogo e ressaltam que o isolamento entre as células favorece a reprogramação de funções genômicas e celulares, fenômenos fundamentais para a aquisição de competência embriogênica. Para Dubois et al. (1990) e Verdeil et al. (2001) o isolamento pode ocorrer fisicamente através do espessamento da parede celular, fechamento do plasmodesma, mucilagem e por deposição de calose.

A presença de ABA e PEG, demonstrado no presente trabalho pelo tratamento T9, mostra uma pequena região de massa pró-embriogênica (Figura 2 – D), em comparação aos tratamentos com a presença de ABA (T4), ou PEG (T6), ou ausência dos dois (T1). Também pode ser observado a desorganização e descolamento em algumas regiões das células da protoderme, espessamento da parede periclinal interna das células da protoderme e maior presença de mucilagem na face externa do embrião (Figura 2 – E). Embora tenha ocorrido o descolamento da protoderme em algumas regiões, os embriões somáticos mais desenvolvidos na presença de ABA e PEG (T9), apresentavam protoderme definida caracterizada por uma camada de células justapostas. As células procambiais estavam diferenciando em elementos traqueais, certamente a partir de células predeterminadas para a formação do xilema. Provavelmente, essas células já se encontravam em um estágio mais avançado de determinação celular, e o PEG e o ABA contribuíram para sua maturação.

No tratamento T11, foi observado células mais alongadas diferenciadas e parede mais espessa compondo o meristema fundamental (Figura 2 – H), indicando maior tamanho do embrião principalmente em comparação ao tratamento controle T1 (Figura 5 – D). O aumento da concentração de AA (AA330) combinado com ABA (T14) mostra a região do procâmbio com vários elementos de vaso helicoidais e escalariformes (Figura 2 – J), com um sistema vascular mais diferenciado e desenvolvido principalmente em comparação ao tratamento T1 (Figura 5 – D).

Para análise histoquímica foi observado reação positiva para a presença de grãos de proteínas, lipídeos e amidos de reserva no embrião. Os tratamentos T4, T6, T9, T11 e T14 foram comparados ao T1. Os embriões somáticos apresentavam corpos proteicos, com formatos arredondados e tamanhos variados, corados em vermelho intenso, pelo reagente, Xilidine Ponceau (Figura 6 - A, D, G, J, M e P).



**Figura 6:** Caracterização histoquímica de embriões somáticos de palma de óleo após 60 dias em meio de maturação. Todas as figuras evidenciam a região do meristema fundamental. As figuras A, B e C (T1); D, E e F (T4); G, H e I (T6); J, K e L (T9); M, N e O (T11); P, Q e R (T14) são referentes aos testes para proteína, lipídeo e amido, respectivamente. As figuras A, D, G, J, M e P mostram resultado positivo para presença de proteína pelo reagente xilidine ponceau, as setas pretas indicam os corpos proteicos corados em vermelho intenso. As figuras B, E, H, K, N e Q mostram os resultados para verificar presença de lipídeos realizados com o reagente sudan black b, resultado positivo gotas lipídicas coradas em preto indicado pelas setas brancas, na figura B, resultado negativo. As figuras C, F, I, L, O e R mostram os resultados para verificar presença de amido realizado com o reagente lugol, resultado positivo grãos de amidos corados de roxo indicado pelas setas pretas, na imagem C, resultado negativo.

Os compostos de reserva exercem um importante papel na morfogênese *in vitro* (CANGAHUALA-INOCENTE et al., 2004). A combinação de PEG e ABA melhora a tolerância à dessecação, fator comum na fase de maturação de embriões somáticos aumentando a biossíntese de proteínas e acúmulo de substâncias de

reservas (ATTREE et al.1992; BERTOSSI et al. 2001; STASOLLA et al. 2002). As proteínas estão envolvidas na regulação da expansão celular e criação de características biofísicas necessárias para a morfogênese (JIMÉNEZ, 2001), e seu consumo é comumente registrado durante a indução e o desenvolvimento embriogênico, servindo como fonte de energia para a rediferenciação das células somáticas (CANGAHUALA-INOCENTE et al., 2009). O acúmulo de proteínas tem um efeito positivo na embriogênese somática de palmáceas e outras espécies como o arroz (TAKAIWA et al., 1999).

Para o teste Sudan black B, as gotas lipídicas coradas de preto com formato arredondado/ovalado e tamanho variado (Figura 6 - E, H, K, N e Q) foram observados na região do meristema fundamental o que não foi observado no T1 (Figura 6 - B). Nos tratamentos T9 e T14 houve resultado positivo mais intenso indicando maior concentração de lipídios de reserva nos embriões somáticos submetidos tanto a presença de PEG e ABA, quanto aos tratamentos submetidos aos aumentos de AA (AA330) associados ao ABA. Há relatos na literatura que embriões somáticos tratados com ABA ou com o PEG, foram a maturados (DODEMAN et al., 1997; VON ARNOLD et al., 2002; ROSE et al., 2010).

As análises histológicas de amostras desses tratamentos T9 e T14 mostram que grande parte do volume celular é preenchida por corpos lipídicos. Em muitas espécies, durante o desenvolvimento do embrião zigótico, também ocorre o acúmulo de lipídeos como compostos de reserva nas células embrionárias durante a fase de maturação (BEWLEY & BLACK, 1994). Estes lipídeos são posteriormente mobilizados durante as fases iniciais da germinação e da conversão dos embriões em plântulas. Esta acumulação de lipídeos pode estar relacionada com um controle hormonal exercido pelo ABA (THOMAS & JIMÉNEZ, 2005).

Observou-se resultado positivo para presença de amido de reserva nos embriões somáticos, realizados com reagente de Lugol nos tratamentos T4, T6, T9, T11 e T14, os grãos de amido aparecem corados de roxo (Figura 6 - F, I, L, O e R). Não foi observado a presença do amido para o T1 (Figura 6 - C) e pequena quantidade foi observada no T4 (Figura 6 - F). No presente estudo a maior parte do amido acumulado foi observado no setor embriogênico em particular região do meristema fundamental. Entretanto, na região de massa pró-embriogênica o amido não foi observado.

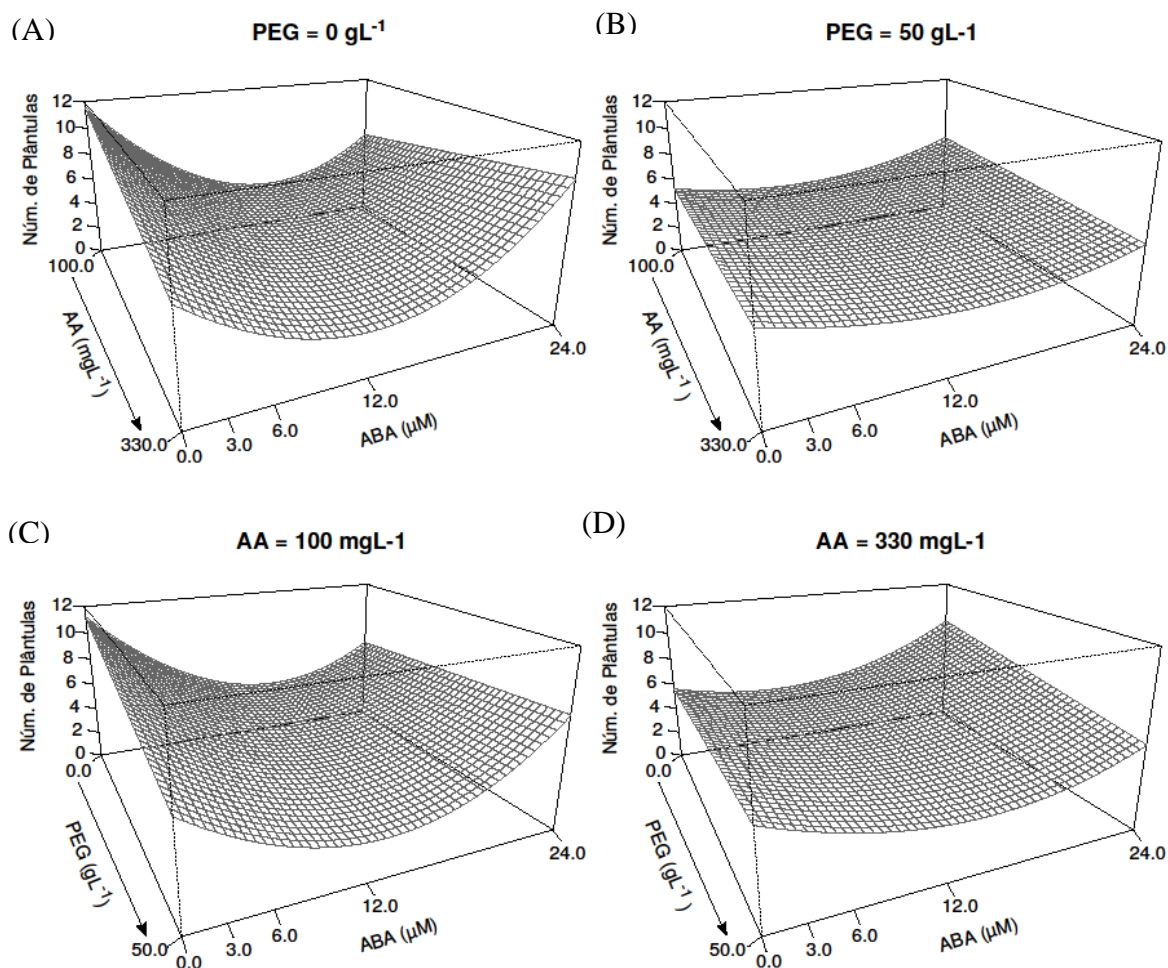
O amido é considerado uma fonte primária de energia para o crescimento e proliferação celular, fornecendo energia para o desenvolvimento de embriões somáticos (STAMP, 1987; MARTIN et al., 2000). O acúmulo de amido é considerado um marcador para capacidade embriogênica em vários sistemas, incluindo a palma de óleo (SCHWENDIMAN et al., 1988, VERDEIL et al., 2001). Esse acúmulo de amido em células embriogênicas parece estar ligado à aquisição de competência embriogênica (MOURA, 2007). Altas quantidades de amido foram observados durante o processo de formação de embriões somáticos de espécies como castanheiro-da-índia (PROFUMO & GASTALDO, 1995) e noqueira-pecan (RODRIGUEZ & WETZSTEIN, 1998). Análises histoquímicas de jabuticaba-branca (*Myrciaria* sp.) comprovou que o material de reserva dos embriões somáticos e zigóticos era o amido, todavia, os embriões somáticos apresentavam quantidade menor dessa reserva comparado com os embriões zigóticos (MOTOIKE et al., 2007).

Em várias espécies cultivadas *in vitro* o processo de maturação, que promove o desenvolvimento normal dos embriões e posteriormente a conversão em plântulas, está na dependência da presença de ABA e/ou PEG (GAWRONSKA et al., 2000; BERTOSSI et al., 2001; STASSOLA & YEUNG, 2003). A maturação é uma etapa crítica no desenvolvimento do embrião somático. Esta fase é caracterizada pela expansão, diferenciação e acúmulo de substância de reserva do embrião, sendo determinante na germinação e conversão em plântulas saudáveis, normais e vigorosas a partir dos embriões somáticos (MISHRA et al., 2010).

No presente trabalho possivelmente a redução do potencial osmótico do meio promovida pela adição do PEG, combinada com a suplementação de ABA, tenha provocado uma redução na taxa de divisão celular e favorecido o acúmulo de reserva no final do desenvolvimento embrionário. De fato, observou-se que em embriões oriundos dos tratamentos T6, T9, T11 e T14, ocorreu um diferencial de acúmulo de reserva de amido e lipídios. Nestes embriões a maturação foi mais acelerada. Os resultados do presente trabalho submetido a estes tratamentos mostram maior acúmulo de compostos de reserva nos embriões somáticos, que certamente ajuda a explicar as maiores taxas de obtenção de plântulas completas.

### 3.2 Germinação dos embriões somáticos

Aos 60 dias em meio de germinação, os embriões somáticos converteram-se em plântulas. Verificou-se pela análise de variância que houve interação tripla entre os fatores AAxPEGxABA (Apêndice II). Os resultados apontam redução do número de plântulas regeneradas de embriões somáticos vindas de meio de cultura de maturação, tanto para a presença de PEG (PEG50) e aumento da quantidade de AA (AA330), quanto para o aumento dos níveis de ABA (ABA0, ABA3, ABA6, ABA12 e ABA24) (Figura – 7).



**Figura 7:** Os gráficos A, B, C e D mostram as interações AA\*PEG\*ABA. A) Número de plântulas obtidos da interação PEG0 nos diferentes níveis de AA e ABA. B) Número de plântulas obtidos da interação PEG50 nos diferentes níveis de AA e ABA. C) Número de plântulas obtidos da interação AA100 nos diferentes níveis de PEG e ABA. D) Número de plântulas obtidos da interação AA330 nos diferentes níveis de PEG e ABA. Os modelos de superfície de resposta ajustado para os gráficos:

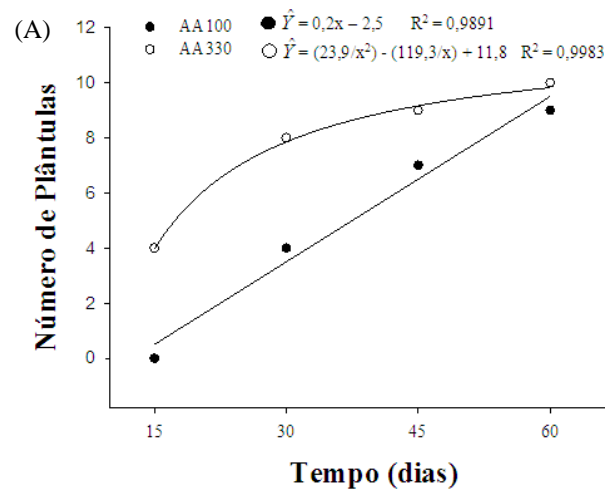
$$A) y = 11,5611 - 4,5375aa - 1,0846aba + 0,3042aa \times aba + 0,0373aba^2 \quad (R^2 = 0,58).$$

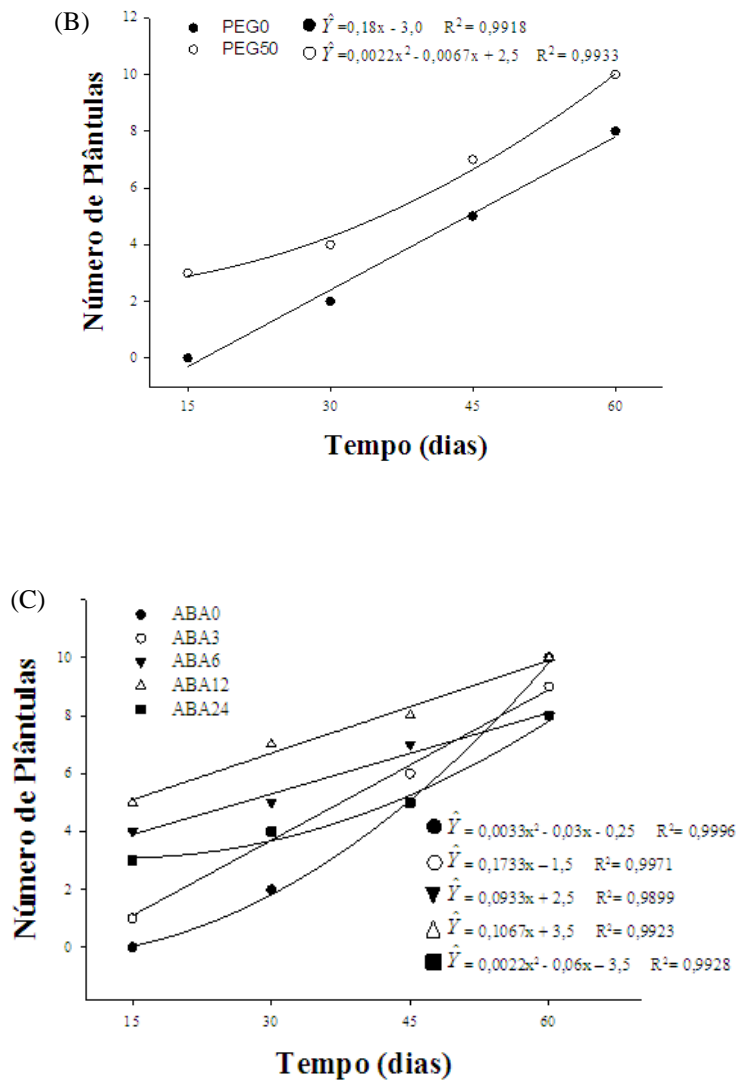
$$B) y = 5,2142 + 0,6063aa - 0,2136aba - 0,0729aa \times aba + 0,0115aba^2 \quad (R^2 = 0,15).$$

$$C) y = 11,1981 - 4,5500peg - 0,9558aba + 0,2333peg \times aba + 0,0320aba^2 \quad (R^2 = 0,54).$$

$$D) y = 5,5897 + 0,5938peg - 0,2716aba - 0,1438peg \times aba + 0,0167aba^2 \quad (R^2 = 0,29).$$

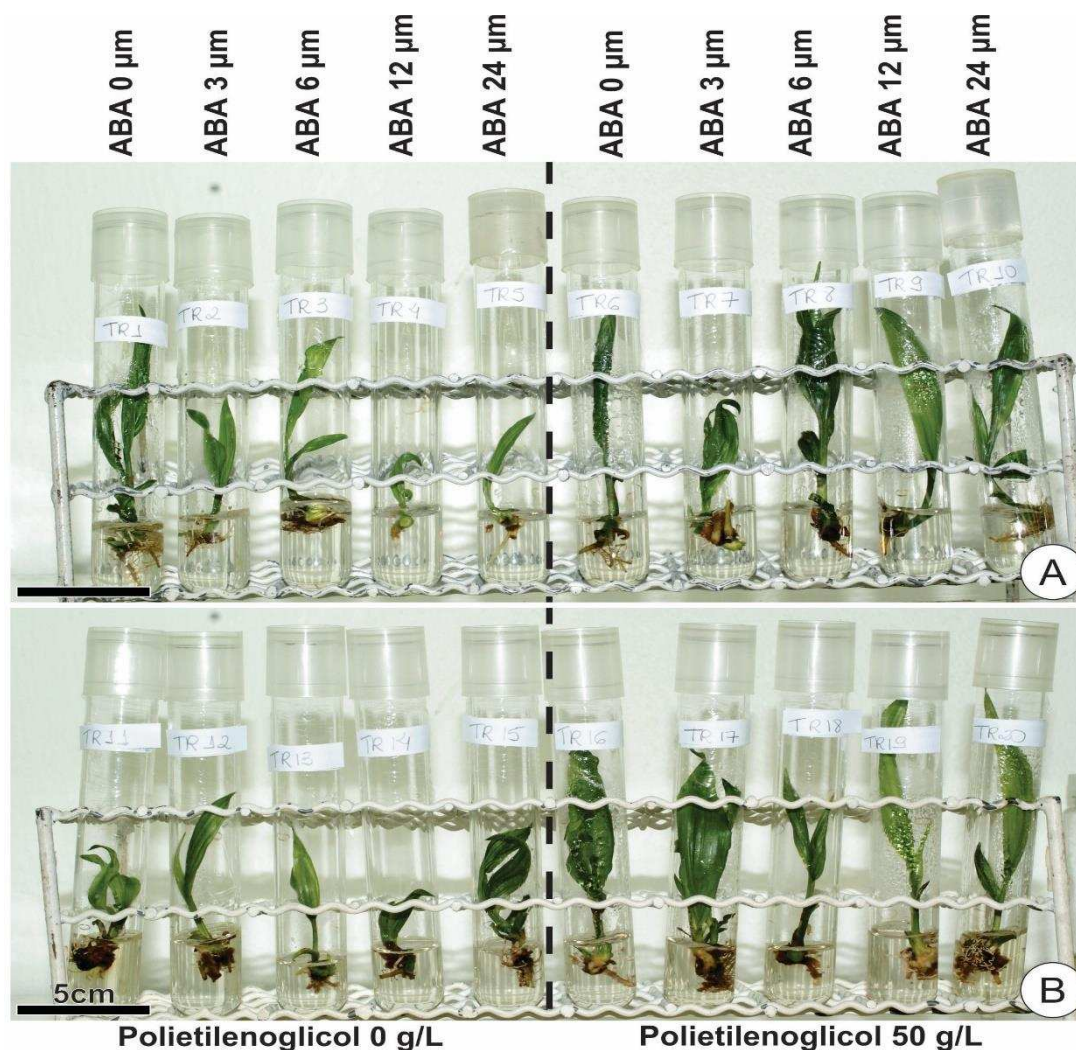
Embora tenha ocorrido a redução no número de plântulas, houve uma conversão de embriões somáticos a plântulas mais rápido com a presença dos mesmos, 15 dias após inoculação em meio de germinação, o que pode ser observado tanto pela emissão da radícula e parte aérea, advindas dos tratamentos com ABA e PEG (Figura – 8).





**Figura 8:** Os Gráficos A, B e C apresentam as estimativas do número de plântulas 60 dias após inoculação em meio de cultura de germinação. A) Estimativa do número de plântulas para o fator AA. B) Estimativa do número de plântulas para o fator PEG. C) Estimativa do número de plântulas para o fator ABA.

Certamente isso ocorre devido ao fato dos embriões se apresentarem mais desenvolvidos na presença desses agentes. As plântulas advindas de embriões cultivados na presença de ABA e PEG, após os 60 dias no meio de germinação estavam maiores e apresentavam um aspecto mais vigoroso como mostra a Figura – 9.



**Figura 9:** Plântulas obtidas 60 dias após cultivo *in vitro* em meio de germinação. A) Tratamentos com o efeito do AA100 nos diferentes níveis de PEG e ABA (T1 ao T10). B) Tratamentos com o efeito do AA330 nos diferentes níveis de PEG e ABA (T11 ao T20).

Assim pode-se assumir que o agente de maturação ABA, no meio de cultura de regeneração/maturação de embriões somáticos aumentou a frequência de conversão de embriões somáticos em plântulas, o que também foi observado em batata doce por Zheng et al. (1996). Em algumas espécies como em pinheiro-do-canadá (*Picea glauca*) (STASOLLA et al., 2003; BELMONTE et al., 2005) e *Aesculus hippocastanum* (TROCH et al., 2009) a presença de PEG no meio de regeneração/maturação, foi essencial para a conversão dos embriões somáticos em plântulas, que só teve início com a indução do estresse hídrico proporcionado pelo PEG.

Outro aspecto relevante é o rápido influxo de água para o interior dos embriões, quando estes são transferidos para o meio de germinação (BOZHKOV &

ARNOLD, 1998), que por não conter PEG não apresenta uma restrição hídrica em relação ao meio de maturação. A hidratação mais rápida do embrião somático possivelmente representa um aspecto positivo para que o mesmo germine e desenvolva-se em plântulas.

As plântulas bem desenvolvidas são melhores aclimatadas por apresentarem um bom desenvolvimento no comprimento de sistema radicular e parte aérea. Este processo de aclimação representa uma etapa importante dentro de um programa de propagação *in vitro* de plantas elite. Em alguns casos, chega a ser um fator limitante no processo de micropropagação (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990).

#### **4. CONCLUSÕES**

A adição do PEG, combinada com ABA nas concentrações (3, 6, 12 e 24 $\mu$ M) reduziram o número de embriões somáticos.

A redução do potencial osmótico proporcionada pela adição de PEG, associado ao ABA promoveu a aceleração da maturação de embriões somáticos o que pode ser comprovado pelas análises histológicas.

A utilização do regulador osmótico PEG (50 g L<sup>-1</sup>) combinado com maior dose de AA (330 mg L<sup>-1</sup>) e maiores doses de ABA (3, 6, 12 e 24 $\mu$ M), na maturação, reduziram o número de plântulas na germinação.

As plântulas regeneradas de embriões somáticos em meio com ABA e PEG, desenvolveram-se mais rápido e apresentavam aspecto mais vigoroso e sadio.

#### **5. AGRADECIMENTOS**

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro.

#### **6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ALMEIDA, M.; ALMEIDA, C. V.; GRANER, E. M.; BRONDANI, G. C.; ABREU-TARAZI, M. F. Pre-procambial cells are niches for pluripotent and totipotent stem-like cells for organogenesis and somatic embryogenesis in the peach palm: a histological study. *Plant Cell Reports*. Heidelberg, v.31, n.8, p. 1495-1515. 2012.

ATTREE, S. M.; FOWKE, L. C. Embryogeny of gymnosperms: advance in synthetic seed technology of conifers. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* v.35, p.1-35. 1993.

ATTREE, S. M.; BUDIMIR, S.; FOWKE, L. C. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured shoots and cotyledons of seedlings from stored seeds of black and white spruce (*Picea mariana* and *Picea glauca*). Can. J. Bot. v.68, p.30-34. 1992.

BEHREND, J.; MATELES, R.I. Nitrogen metabolism in plant cell suspension cultures. II. Role of inorganic acids during growth on ammonia. Plant Physiology, v.58, p.510-512. 1975.

BELMONTE, M. F.; DONALD, G.; REID, D. M.; YEUNG, E. C.; STASOLLA, C. Alterations of the glutathione redox state improve apical meristem structure and somatic embryo quality in white spruce (*Picea glauca*). Journal of Experimental Botany v.56, p.2355-64. 2005.

BERTOSSI, F.A.; CHABRILLANGE, N.; DUVAL, Y. Abscisic acid and desiccation tolerance in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryos. Genet Select Evol. v.33, p.75- 84. 2001.

BEWLEY, J. D; BLACK, M. Seeds – Physiology of Development and Germination (2nd Ed.). Plenum Press, New York. 1994.

BOARI, A. de J. Estudos realizados sobre o amarelecimento fatal do dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.). Belém: EMBRAPA. 59 p. (Documentos, 348). 2008.

BOZHKOVA, P.V.; ARNOLD, S. VON. Polyethylene glycol promotes maturation but inhibits further development of *Picea abies* somatic embryos. Physiologia Plantarum, v.104, p.211-224. 1998.

CANGAHUALA-INOCENTE, G.C.; STEINER, N.; SANTOS, M.; GUERRA, M.P. Morphological analysis and histochemistry of Feijoa sellowiana somatic embryogenesis. Protoplasma, v.224, p.33-40, 2004.

CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; VILLARINO, A.; SEIXAS, D.; DUMAS-GAUDOT, E.; TERENCEZI, H.; GUERRA, M. P. Differential proteomic analysis of developmental stages of *Acca sellowiana* somatic embryos. Acta Physiologiae Plantarum, v.3, p.501-514, 2009.

CARVALHO, J.; LIMA, M.; AIRES, P.; VIDAL, M.; PIMENTEL, N. Embriogênese Somática. Campina Grande. (Embrapa Algodão. Documentos, 152). v.35, p. 2006.

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

CORRÊA, T. R.; MOTOIKE, S. Y.; COSER, S. M. ; SILVEIRA, G. ; RESENDE, M.D.V. ; CHIA, G.S. Estimation of genetic parameters for *in vitro* oil palm characteristics (*Elaeis guineensis* Jacq.) and selection of genotypes for cloning

capacity and oil yield. *Industrial Crops and Products (Print)*, v. 77, p. 1033-1038. 2015.

DODEMAN, V.L.; DUCREUX, G.; KREIS, M. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *Journal of Experimental Botany* 48:1493-1509. 1997.

DUBOIS, T.; GUEDIRA, M.; DUBOIS, J.; VASSEUR, J. Direct somatic embryogenesis in roots of *Cichorium* – Is callose an early marker? *Annals of Botany* v.6, p.539–545. 1990.

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

FAEPA: ‘O Brasil ainda precisa valorizar o potencial do óleo de palma’. Rio de Janeiro: Sociedade Nacional da Agricultura, 2014. Disponível em: <[http://sna.agr.br/faepa-brasilainda-precisa-valorizar-o-potencial-do-oleo-de-palma-  
assim-como-eua-e-europa/](http://sna.agr.br/faepa-brasilainda-precisa-valorizar-o-potencial-do-oleo-de-palma-assim-como-eua-e-europa/)>. Acesso em: 10 set. 2015.

FAIT, A.; ANGELOVICI, R.; LESS, H.; OHAD, I.; URBANCZYK-WOCHNIAK, E. FERNIE, A.R.; GALILI, G. Arabidopsis seed development and germination is associated with temporally distinct metabolic switches. *Plant Physiology*, v. 142, p. 839-854, 2006.

FILIPPI, S. B.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; RODRIGUEZ, A. P. M. Variações morfológicas de embriões somáticos obtidos a partir de inflorescências de bananeira. *Scientia Agrícola*, Piracicaba, v. 58, n. 4, p. 711- 716. 2001.

FINKELSTEIN, R.R.; GAMPALA, S.S.L.; ROCK, C.D. Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell*, v.14, p. S15–S45, 2002.

FURLAN, L. F.; GROSSO, F. S. B.; RODRIGUES, F. S.; LIMA, I. A.; GOMES, E.M. S.; IANK, O.; LIMA, J. N. S. Potencialidades regionais estudo de viabilidade econômica dendê. Boa Vista: SUFRAMA. 12 p. 2003.

GAMBORG, O. L. The effects of amino acids and ammonium on the growth of plant cells in suspension culture *Plant Physiology*, v. 45, p. 372–375. 1970.

GAN, P.Y.; LI, Z.D. Econometric study Malaysia’s palm oil position in the world market to 2035. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. v.39, p.740-747. 2014.

GAWRONSKA, H.; BURZA, W.; BOLESTA, E.; MALEPSZY, S. Zygotic and somatic embryos of cucumber (*Cucumis sativus L.*) substantially differ in their levels of abscisic acid. *Plant Sci*, v.157, p.129-137. 2000.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília: ABCTP/ EMBRAPA- CNPH, p.99-160. 1990.

GRANER, E.M.; OBERSCHELP, G.P.J.; BRONDANI, G.E.; BATAGIN-PIOTTO, K.D.; ALMEIDA, C. V.; ALMEIDA, M. TDZ pulsing evaluation on the *in vitro* morphogenesis of peach palm. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, Lucknow, v.19, n.2, p. 283-288. 2013.

GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. Embriogênese somática e semente sintética. In *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Volume 2 (A.C. Torres, L.S. Caldas & J.A. Buso, eds.). Embrapa-SPI/CNPH, Brasília, p.533-568. 1999.

GUPTA, P.K.; PULLMAN, G.S. Method for reproducing coniferous plants by somatic embryogenesis using abscisic acid and osmotic potential variation. US patent 5,036,007. 1991.

GUTMANN, M.; VON ADERKAS, P.; LABEL, P.; LELU, M.A. Effects of abscisic acid on somatic embryo maturation of hybrid larch. *Journal of Experimental Botany*, v. 47, n. 305, p. 1905-1917, 1996.

JIMÉNEZ, V. M. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v.13, p.196-223, 2001.

JOHANSEN, D. A. *Plant microtechnique*. New York: McGraw-Hill Book Co. Inc. 523p. 1940.

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

KANCHANAPOOM, K.; DOMYOAS, P. The origin and development of embryoids in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) embryo culture. *ScienceAsia, Bancoc*, v. 25, p. 195-202. 1999.

KIRBY, E.G.; LEUSTEK, T.; LEE, M.S. Nitrogen nutrition. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. (Eds). *Cell and Tissue Culture in Forestry I. General Principles and Biotechnology*. Dordrecht: Martinus Nijhoff. p. 67-88. 1987.

KOBAYASHI, M. *Plant Journal of Cellular and Molecular Biology*, v. 18, p. 185–193. 1999.

KONAN, K.E.; DURAN-GASSELIN, T.; KOUADIO, Y.J.; RIVAL, A. A modeling approach of the *in vitro* of palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryos. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. v.84, p.99–112. 2006.

KOORNNEEF, M; BENTSINK, L; HILHORST, H. Seed dormancy and germination. *Curr. Opin. Plant Biol.*, v. 5, p. 33-36, 2002.

KRAMER, P. J.; BOYER, J. S. *Water Relations of Plants and Soils*. Academic Press, San Diego. 495 P. 1995.

LAI, F.M.; MCKERSIE, B.D. Regulation of starch and protein accumulation in alfalfa (*Medicago sativa* L.) somatic embryos. *Plant Science*, v.100, p.211-219. 1994.

LAKSHMANAN, P. Invited review addendum: Somatic embryogenesis in sugarcane – an addendum to the invited review “Sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities,” *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 41(4): 345–363; 2005. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, v. 42, p. 201-205, 2006.

LEA, P.J. Nitrogen Metabolism. In: LEA, P.J. & LEEGOOD, R.C. (eds) *Plant Biochemistry and Molecular Biology*, Wiley & Sons, New York, p. 155-180. 1993.

LINACERO, R.; LÓPEZ-BILBAO, M.G.; VÁSQUEZ, A.M. Expression of different abscisic acid-responsive genes during somatic embryogenesis (*Saccharum officinarum*). *Protoplasma*, v. 1, p. 199-204, 2001.

LUO, H.; OBARA-OKEYO, P.; TAMAKI, M.; KAKO, S. Influence of sucrose concentration on *in vitro* morphogenesis in cultured cucumber cotyledon explant. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* v.71, p.497–502. 1996.

MARTIN, A.B.; CUADRADO, Y.; GUERRA, H.; GALLEGO, P.; HITTA, O.; MARTIN, L.; DORADO, A.; VILLALOBOS, N. Differences in the contents of total sugars, starch and sucrose in embryogenesis and non-embryogenic calli from *Medicago arborea* L. *Plant Science*, v.154: p.143-151, 2000.

MISHRA, M.; SHUKLA, N.; CHANDRA, R. Role of polyethylene glycol in maturation and germination of transformed somatic embryos of papaya (*Carica papaya* L.). *Acta Horticulturae* v.851, p.227-230. 2010.

MISRA, S.; ATREE, S.; LEAL, I.; FOWKE, L. Effect of abscisic acid, osmoticum and desiccation on synthesis of storage proteins during the development of white spruce somatic embryos. *Annals of Botany*, v. 71, p. 11–22. 1993.

MORCILLO, F.; ABERLENC-BERTOSSI, F.; NOIROT, M.; HAMON, S.; DUVAL, Y. EgAP2-1, an Aintegumenta-like (AIL) gene expressed in meristematic and proliferating tissues of embryos in oil palm. *Planta*, Berlin, v. 226, n. 6, p. 1353-1362. 1999.

MOTOIKE, S. Y.; SARAIVA, E. S.; VENTRELLA, M. C.; SILVA, C. V.; SALOMÃO, L. C. C. Somatic embryogenesis of *Myrciaria aureana* (Brazilian grape tree). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 89:75-81. Doi:10.1007/s11240-007-9210-y. 2007.

MOURA, E. F. Embriogênese somática em macaúba: indução, regeneração e caracterização anatômica. 2007. 83 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, MG, 2007.

MOURA, E. F.; MOTOIKE, S. Y.; VENTRELLA, M. C.; SÁ JÚNIOR, A. Q.; CARVALHO, M. Somatic embryogenesis in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from zygotic embryos. *Scientia Horticulturae*, v.119, p.447-454, 2009.

NAKAGAWA, H.; SAIJYO, T.; YAMAUCHI, N.; SHIGYO, M.; KAKO, S.; ITO, A. Effect of sugars and abscisic acid on somatic embryogenesis from melon (*Cucumis melo L.*) expanded cotyledon. *Scientia Hort.*, v.90, p.85–92. 2001.

NAYLOR, A.W. Functions of hormones at the organ level of organization. In: Pirson A, Zimmermann MH (eds) *Encyclopedia of Plant Physiology*, Vol 10, Scott K (ed): *Hormonal Regulation of Development II – The Functions of Hormones from the Level of the Cell to the Whole Plant*. Springer-Verlag, Berlin pp 172–218. 1984.

NOGUEIRA, R. C. Caracterização de calos embriogênicos de murici- pequeno (*Byrsonima intermedia A. Juss.*). 2006. 41 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2006.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M.E. Pyloric staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59:368-373. 1964.

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. 2013.

PALANYANDY, S.R.; SURANTHRAN, P.; GANTAIT, S.; SINNIHAH, U.R.; SUBRAMANIAM, S.; ABDUL AZIZ, M.; ALWEE, S.S.R.A.; ROOWI, S.A. In vitro developmental study of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) polyembryoids from cell suspension using scanning electron microscopy. *Acta Physiology Plant Journal*, v.35, p.1727 – 1733. 2013.

PEARSE, A.G.E. *Histochemistry: theoretical and applied*. Vol. 2<sup>a</sup> ed. The Williams & Wilkins Company: Baltimore. 1972.

PERÁN-QUESADA, R.; SANCEZ-ROMERO, C.; BARCELÓ, A.; PLIEGO-ALFARO, F. Factors affecting maturation of avocado somatic embryos. *Sci. Hort.*, v. 102, p. 61-73, 2004.

PROFUMO, P.; GASTALDO, P. Somatic embryogenesis in horsechestnut (*Aesculus hippocastanum L.*). In: Bajaj YPS (ed) *Biotechnology in agriculture and forestry 30: somatic embryogenesis and synthetic seed I*. Springer-Verlag, Berlin, pp 233–245. 1995.

RODRIGUEZ, A.P.M. & WETZSTEIN H.Y. A morphological and histological comparison of the initiation and development of pecan (*Carya illinoensis*) somatic embryogenic cultures induced with naphthaleneacetic acid or 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Protoplasma*, v. 204, n. 1-2 (March 1998), pp. 71-83, ISSN 0033-183X. 1998.

RONCHI, V. N., CALIGO, M. A., NOZZOLINI, M.; UCCARINI, G. Stimulated of carrot somatic embryogenesis by proline and serine. *Plant Cell Report*, v. 3, p. 210-214. 1984.

ROSE, R. J.; MANTIRI, F. R.; KURDYUKOV, S.; CHEN, S-K.; WANG, X.-D.; NOLAN, K. E.; SHEAHAN, M. B. Developmental biology of somatic embryogenesis. In: Pua, E.-C. & Davey, M. R. (Eds.), *Plant Developmental Biology – Biotechnological perspectives*, v. 2. Springer, Berlin, pp. 3-26. 2010.

SALAJOVA, T.; SALAJ, J.; KORMUTAK, A. Initiation of embryogenic tissues and plantlet regeneration from somatic embryos of *Pinus nigra* Arn. **Plant Science**, v. 145, n. 1, p. 34-40, 1999.

SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V.; BALBUENA, T.S.; MARANHÃO, M.E. E.; HANDRO, W.E. Floheis. IAA, ABA, polyamines and free amino acids associated with zygotic embryo development of *Ocotea catharinensis*. *Plant Growth Reg* v.49, p.237–247. 2006.

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

SCHWENDIMAN, J.; PANNETIER, C.; MICHAUX-FERRIERE, N. Histology of somatic embryogenesis from leaf explants of the oil palm *Elaeis guineensis*. *Annals of Botany* v.62, p.43-52. 1988.

SHOJI, M.; SATO, H.; NAKAGAWA, R.; FUNADA, R.; KUBO, T.; OGITA, S. Influence of osmotic pressure on somatic embryo maturation in *Pinus densiflora*. *J For Res*; v.11, p.449-453. 2006.

SILVEIRA, V. Aspectos fisiológicos e bioquímicos da embriogênese zigótica e somática em *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. e em *Pinus taeda* L. 106 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2004.

SILVEIRA, V; BALBUENA, T.S.; SANTA-CATARINA, C.; FLOH, E.I.S; GUERRA, M.P.; HANDRO, W. Biochemical changes during zygotic embryogenesis in *Pinus taeda* L. *Plant Grow Reg* v.44, n.2, p.147-156. 2004.

STAMP, J.A. Somatic embryogenesis in cassava: The anatomy and morphology of the regeneration process. *Annals of Botany*, v.57, p.451-459. 1987.

STASOLLA, C.; YEUNG, E.C. Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, v. 74, p. 15-35, 2003.

STASOLLA, C.; KONG, L.; YEUNG, C.; THORPE, T.A. Maturation of somatic embryos in conifers morphogenesis, physiology, biochemistry and molecular biology. *In Vitro Cell Dev Biol. Plant*, v.38, p. 93-105. 2002.

STASOLLA, C.; ZIL, L.; EGERTSDOTTER, U.; CRAIG, D., LIU, W.; SEDEROFF, R.R. The effects of polyethylene glycol on gene expression of developing white spruce somatic embryos. *Plant Physiology*, v. 131, p. 49-60. 2003.

SZIJARTO, L.; van de VOORT, F. R. Determination of Added Water and Bovine Milk to Caprine Milk. TECHNICAL NOTES. *Journal of Dairy Science*, v. 66, n. 3, 1983.

TAKAIWA, F.; OGAWA, M.; OKITA, T.W. Rice glutelins. In PR Shewry, R Casey, eds, *Seed Proteins*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 401–425. 1999.

TAUTORUS, T.E.; ATTREE, S.M.; FOWKE, L.C.; DUNSTA, D.1. Somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos, and embryo regeneration from protoplasts in black spruce (*Picea mariana* Mill.). *Plant Sci. (Limerick, Irel.)*, v.67, p.115-124. 1990.

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

THOMAS, C.; JIMÉNEZ, V. M. Mode of action of plant hormones and plant growth regulators during induction of somatic embryogenesis: molecular aspects. In: Mujib, A. & Samaj, J. (Eds.), *Somatic embryogenesis*. Springer, Berlin, pp. 157-176. 2005.

THORPE, T. A. *In Vitro embryogenesis in plants*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 557 p. 1995.

TROCH, V.; WERBROUCK, S.; GEELLEN, D.; VAN LABEKE, M.C. Optimization of horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) somatic embryo conversion. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v.98, p.115-123. 2009.

TUPY, J.; HRABETOVA, E. A.; CAPKOVA, V., *Plant Science Letters*, 1983, v. 30, p.91–98, 1983.

VENTURIERI, A.; FERNANDES, W. R.; BOARI, A. de J.; VASCONCELOS, M. A. Relação entre ocorrência do amarelecimento fatal do dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) e variáveis ambientais no estado do Pará. In: *Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, Natal, INPE*, p.523-530. 2009.

VERDEIL, J. L; HOCHER, V.; HUET, C. Ultrastructural changes in coconut calli associated with the acquisition of embryogenic competence. *Annals of Botany*, v.88, p.9–18. 2001.

VIDAL, B. C. Dichroism in collagen bundles stained with Xylidine-Ponceau 2R. *Annales d'Histochimie*, v.15; p.289–296. 1970.

VON ARNOLD, S.; SABALA, I.; BOZHOKOV, P.; DYACHOK, J.; FILONOVA, L. Developmental pathways of somatic embryogenesis. *plant cell, tissue and organ Culture*, v.69, p.233–249. 2002.

ZHENG, Q.; DESSAI, A.P.; PRAKASH, C.S. Rapid and repetitive regeneration in sweetpotato via somatic embryogenesis. *PLANT Cell Rep. Heidelberg*, 15, n.6, p. 381-385. 1996.

ZHU, J.K. Cell signaling under salt, water and cold stresses. *Current Opinion in Plant Biology*, v.4, p.401-406. 2001.

ZIMMERMAN, J.L. Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. *The Plant Cell*, v. 5, p. 1411-1423, 1993.

## 7. APÊNDICES

### APÊNDICE I

ANÁLISE DE VARIÂNCIA – Regeneração e Maturação dos embriões somáticos.

<b>FV</b>	<b>gl</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>	<b>Significância</b>
AA	1	927.0454	927.0454	48.8187	0.0000
PEG	1	11127.1672	11127.1672	585.9628	0.0000
ABA	4	9824.5830	2456.1457	129.3420	0.0000
AA*PEG	1	635.3463	635.3463	33.4577	0.0000
AA*ABA	4	379.4224	94.8556	4.9951	0.0015
PEG*ABA	4	972.3833	243.0958	12.8016	0.0000
AA*PEG*ABA	4	88.1465	22.0366	1.1605	0.3373
Resíduo	60	1139.3728	18.9895		

Número de dados = 80

Média geral = 30,3958

Coeficiente de Variação = 14,336

### APÊNDICE II

ANÁLISE DE VARIÂNCIA – Germinação dos embriões somáticos.

<b>FV</b>	<b>gl</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>	<b>Significância</b>
AA	1	17.1125	17.1125	3.6967	0.0593
<b>PEG</b>	1	49.6125	49.6125	10.7174	0.0018
ABA	4	162.3750	40.5937	8.7691	0.0000
AA*PEG	1	15.3125	15.3125	3.3078	0.0739
AA*ABA	4	39.8250	9.9562	2.1508	0.0855
PEG*ABA	4	51.5750	12.8937	2.7853	0.0344
AA*PEG*ABA	4	82.6250	20.6562	4.4622	0.0032
Resíduo	60	277.7500	4.6292		

Número de dados = 80

Média geral = 5,8125

Coeficiente de Variação = 37,015