



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**MARCÍLIA GABRIELLA TAVARES MONTEIRO**

**INDUÇÃO DE CALOS E FLORES IN VITRO NO HÍBRIDO INTERESPECÍFICO DE  
PALMA DE ÓLEO BRS MANICORÉ**

**BELÉM**  
**2021**

MARCÍLIA GABRIELLA TAVARES MONTEIRO

INDUÇÃO DE CALOS E FLORES IN VITRO NO HÍBRIDO INTERESPECÍFICO DE  
PALMA DE ÓLEO BRS MANICORÉ

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal Rural da Amazônia como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Área de concentração: Produção Vegetal

Orientador: Prof. Dr. Hugo Alves Pinheiro  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Joanne Moraes de Melo Souza

BELÉM  
2021

---

Monteiro, Marcília Gabriella Tavares

Indução de calos e flores in vitro no híbrido interespecífico de palma de óleo BRS Manicoré – Belém, 2021.  
51f. il.

Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal Rural da Amazônia, 2021.

Orientador: Hugo Alves Pinheiro

Coorientadora: Joanne Moraes de Melo Souza

1. HIE BRS Manicoré 2. *Elaeis guineensis* 3. *Elaeis oleifera* 4. Micropropagação 5. Inflorescência imatura 6. Calogênese. I. Pinheiro, Hugo Alves (Orient.) II. Souza, Joanne Moraes de Melo (Coorientadora) III. Monteiro, Marcília Gabriella Tavares Monteiro IV. Título.

CDD – XXX.XXX

---

MARCÍLIA GABRIELLA TAVARES MONTEIRO

INDUÇÃO DE CALOS E FLORES IN VITRO NO HÍBRIDO INTERESPECÍFICO DE  
PALMA DE ÓLEO BRS MANICORÉ

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal Rural da Amazônia, como requisito parcial para obtenção do título de doutor. Área de Concentração: Produção vegetal

---

Data da Aprovação

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dra. Joanne Moraes de Melo Souza – Presidente/Co-orientadora  
Universidade Federal Rural Da Amazônia

---

Prof. Dr. Diego Silva Batista – 1º examinador  
Universidade Federal Da Paraíba

---

Dr. Cecílio Frois Caldeira Júnior – 2º Examinador  
Instituto Tecnológico Vale

---

Dr. Oriel Filgueira de Lemos – 3º Examinador  
Embrapa Amazônia Oriental

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Hérica Santos de Oliveira – 4ª Examinadora  
Universidade Federal Rural Da Amazônia

*Ao Sr. Sebastião Tavares e Sra. Isa Gaia,  
meus pais queridos e maiores  
incentivadores, em gratidão à vida, amor,  
força e dedicação.*

*Ao meu esposo Jorge Monteiro, pela  
compreensão, apoio incondicional,  
companheirismo e amor...*

*Aos meus irmãos Hellem, Juçara e  
Estefan pelo apoio.*

*Sem vocês seria difícil ter dado tantos  
passos importantes em minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Jesus, por seu infinito amor, suas bênçãos e maravilhas em minha vida, pela força e fé que me concedeu, pois nos momentos mais difíceis dessa caminhada foi Ele o meu sustento, não permitindo que eu fraquejasse jamais.

Aos meus pais, Sebastião Tavares e Isa Gaia, por todas as oportunidades a mim concedidas e, principalmente pelo amor que me deram, e por serem pacientes e compreensivos nos momentos de ausência.

Ao meu esposo, Jorge Monteiro, por todo incentivo, paciência, apoio moral e financeiro, compreensão, amor e, principalmente, por estar ao meu lado, me ajudando em todos os momentos.

Aos meus irmãos Hellem Grasiella, Juçara Graciella e Estefan Gledston, pelo apoio e convívio.

Aos meus sobrinhos Hallyson, Wallace e Vinícius por todo amor e momentos de alegria vividos.

Aos meus pastores, Pr. Cláudio Pires e Ir. Heliana Pires, pelo incentivo, força e orações.

À minha avó Benedita Gaia, pelo seu amor e orações. E aos meus tios, primos e demais familiares que torcem e oram por mim.

À Universidade Federal Rural da Amazônia e à Embrapa Amazônia Oriental pela estrutura física.

Ao programa de pós-graduação em Agronomia pela oportunidade na realização deste curso e CAPES pelo apoio financeiro.

Ao meu orientador, Professor Dr. Hugo Alves Pinheiro, pela oportunidade, ensinamentos, orientação, incentivo e amizade.

À Professora Dra. Joanne Moraes de Melo Souza, por confiar a mim a execução deste projeto, pelos ensinamentos, parceria, força, incentivo, amizade e coorientação.

Ao Dr. Oriel Lemos por ter me acolhido no laboratório de biotecnologia vegetal e recursos genéticos da Embrapa Amazônia Oriental, pelos ensinamentos nos momentos de dúvidas e todo apoio necessário na condução deste trabalho.

Ao Dr. Rui pelo auxílio e disponibilidade nas coletas.

Ao pessoal do laboratório de botânica, Dra. Fernanda Ilkiu Borges de Souza, Bruno Barbosa, Ana Catarina Furtado e D. Marta, pelo auxílio nos cortes histológicos.

Ao M.e. Raimundo Parente (in memoriam) pelas valiosas contribuições e ensinamentos na análise estatística do capítulo 1.

Aos amigos e parceiros Sergio Heitor Felipe e Flávio Rodrigues e Gledson Castro, pela contribuição na execução do trabalho e análise estatística do capítulo 2.

Aos membros da banca, Dr. Diego Silva Batista, Dra. Hérica Santos de Oliveira, Dr. Oriel Filgueira de Lemos, Dr. Cecílio Frois Caldeira Júnior, pela colaboração na melhoria do trabalho.

Aos colegas do laboratório de Biotecnologia vegetal, pelo convívio, parceria, amizade e apoio.

Aos colegas do laboratório de Bioquímica da UFRA, pela amizade

As amigas da pós-graduação, Aline Noronha e Deborah Pires por todos os momentos de companheirismo.

A secretária do PGAgro, Nena, por toda contribuição a auxílio nos momentos críticos dessa caminhada.

A todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho, minha gratidão eterna.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT .....	10
LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	13
1. Contextualização .....	14
REFERÊNCIAS .....	17
2. Indução de calos e inflorescência em dendezeiros .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Resumo .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
2.1. Introdução.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
2.2. Material e Métodos.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
2.2.1 Material vegetal .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
2.2.2 Assepsia e condições de cultivo .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
2.2.3 Análises estatísticas .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
2.3. Resultados e Discussão.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
2.3.1 Oxidação.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
2.3.2 Indução de calos .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
2.3.3 Indução de flor.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4. Conclusões.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Referencias .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
3. Embriogênese somática em híbrido interespecífico BRS Manicoré a partir de flores e calos cultivadas <i>in vitro</i> . .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Resumo .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
3.1 Introdução.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
3.2 Material e métodos .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
3.2.1 Obtenção de calos e flores do HIE .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
3.2.2 Indução de embriogênese a partir de calos e flores <i>in vitro</i> usando 2iP, picloram e 2,4-D .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
3.2.3 Análises estatísticas .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
3.3 Resultados esperados.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Referencias .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>



## RESUMO

A palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.), conhecida também como dendê, é uma planta perene de origem africana, cujos principais produtos são o óleo de palma e de palmiste. A cultivar BRS Manicoré é o resultado da hibridação interespecífica (HIE) entre palma de óleo da espécie africana (*E. guineensis*) e a palma de óleo da espécie americana (*E. oleifera* (Kunth) Cortés), e é usada estrategicamente nas áreas que tem incidência do amarelecimento fatal (AF). Com o objetivo de verificar as respostas morfogênicas de inflorescências femininas imatura do HIE BRS Manicoré e de embriões zigóticos de três cultivares de palma de óleo (BRS Manicoré, BRS 2501, BRS 2528) cultivados *in vitro*, esse estudo foi dividido em dois capítulos. No capítulo 1, inflorescências femininas imaturas do HIE BRS Manicoré em diferentes estádios de desenvolvimento foram inoculadas em meio de cultura com diferentes composições para avaliar a eficiência de indução de calos e flores *in vitro*. Inicialmente, as inflorescências foram avaliadas em meio de cultura com sais estabelecido por Murashige e Skoog (1962) (MS) e com metade da concentração de sais MS (1/2MS) com diferentes concentrações de Picloram (0; 225 e 450  $\mu\text{M}$ ). Após 45 dias, observou-se que todos os explantes continuaram o desenvolvimento de estruturas florais e os estádios da inflorescência I12 e I15 obtiveram as maiores formações de calos e flor. A composição do meio e as concentrações de Picloram só interferiram na formação de calos na inflorescência I9, que teve menor indução de calos em seus explantes. A adição de Picloram ao meio de cultura reduziu a oxidação dos explantes, porém a oxidação não prejudicou a morfogênese. No capítulo 2, com o objetivo de avaliar a viabilidade de indução de calos a partir de flores produzidas *in vitro* e de embriões zigóticos de três híbridos de palma de óleo (BRS Manicoré, BRS 2501 e BRS 2528) em meios de cultura com sais MS e Y3 (Eeuwens, 1976) em combinação às auxinas Picloram e 2,4-D e citocinina 2ip. Para isso, dois experimentos independentes foram realizados, sendo o experimento 1 conduzido para verificar o potencial de indução de calos em flores produzidas *in vitro* do HIE BRS Manicoré, em dois meios de cultura (MS e Y3) combinados com auxina Picloram ou 2,4-D (9  $\mu\text{M}$ ) e citocina 2 iP (0; 6; 12  $\mu\text{M}$ ) totalizando 14 tratamentos; já o experimento 2 foi conduzido com o objetivo de verificar o potencial de indução de calos nos diferentes híbridos de palma de óleo (BRS Manicoré, BRS 2501 e BRS 2528) em meios de cultura MS ou Y3 combinados com Picloram ou 2,4-D (475  $\mu\text{M}$ ), compondo seis tratamentos. No experimento 1, verificou-se que a oxidação do explante não impede a diferenciação de calos e flores *in vitro*; a melhor composição de meio para indução de calos foi Y3 + 9  $\mu\text{M}$  Picloram + 12  $\mu\text{M}$  2iP; e os melhores meios para indução de flores *in vitro* não induziram a formação de calos e vice-versa. No experimento 2, a indução de calos a partir de embriões zigóticos foi muito limitada e variou em função do meio de cultura e do material vegetal utilizado. A indução de calos foi observada somente nos híbridos BRS 2501 e BRS 2528 e, somente, na presença de auxina.

Palavras-chave: HIE BRS Manicoré. *Elaeis guineensis*. *Elaeis oleifera*. Micropropagação. Inflorescência imatura. Embrião zigótico. Calogênese.

## ABSTRACT

Oil palm (*Elaeis guineensis*, Jacq), also known as oil palm, is a perennial plant of African origin, whose main product is oil (palm and palm kernel). Cultivar BRS Manicoré is the result of interspecific hybridization (HIE) between African oil palm (*E. guineensis*) and American oil palm (*E. oleifera* (Kunth) Cortés), and is used strategically in the areas that it has an incidence of fatal yellowing (FA). To verify the morphogenic responses of immature female inflorescences of HIE BRS Manicoré and zygotic embryos of three cultivars of oil palm (BRS Manicoré, BRS 2501, BRS 2528) cultivated in vitro, this study was divided into two chapters. In chapter 1, immature female inflorescences of HIE BRS Manicoré at different stages of development were inoculated in culture medium with different compositions to evaluate the efficiency of callus and flower induction in vitro. Initially, the inflorescences were evaluated in a culture medium with salts established by Murashige and Skoog (1962) (MS) and with half the concentration of MS salts (1/2MS) with different concentrations of Picloram (0, 225 and 450  $\mu\text{M}$ ). After 45 days, it was observed that all explants continued the development of floral structures and inflorescence stages I12 and I15 had the highest callus and flower formations. The composition of the medium and Picloram concentrations only interfered with callus formation in the I9 inflorescence, which had less callus induction in its explants. The addition of Picloram to the culture medium reduced the oxidation of explants, but the oxidation did not affect morphogenesis. In chapter 2, with the objective of evaluating the viability of callus induction from flowers produced in vitro and from zygotic embryos of three oil palm hybrids (BRS Manicoré, BRS 2501 and BRS 2528) in culture media with MS salts and Y3 (Eeuwens, 1976) in combination with Picloram and 2,4-D auxins and cytokinin 2ip. For this, two independent experiments were carried out, and experiment 1 was carried out to verify the potential of callus induction in flowers produced in vitro of HIE BRS Manicoré, in two culture media (MS and Y) combined with Picloram or 2,4-D auxin -D (9  $\mu\text{M}$ ) and cytokine 2 iP (0; 6; 12  $\mu\text{M}$ ) totaling 14 treatments; Experiment 2 was carried out with the objective of verifying the potential of callus induction in different oil palm hybrids (BRS Manicoré, BRS 2501 and BRS 2528) in MS or Y3 culture media combined with Picloram or 2,4-D (475  $\mu\text{M}$ ), comprising six treatments. In experiment 1, it was found that explant oxidation does not prevent the differentiation of calluses and flowers in vitro; the best composition of medium for callus induction was Y3 + 9  $\mu\text{M}$  Picloram + 12  $\mu\text{M}$  2iP; and the best means for in vitro flower induction did not induce callus formation and vice versa. In experiment 2, callus induction from zygotic embryos was extremely limited and varied depending on the culture medium and the plant material used. Callus induction was observed only in hybrids BRS 2501 and BRS 2528 and only in the presence of auxin.

Keywords: HIE BRS Manicoré. *Elaeis guineensis*. *Elaeis oleifera*. Micropropagation. Immature inflorescence. Zygotic embryo. callogenesis

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1. Morfogênese de inflorescências femininas imaturas do híbrido interespecífico (HIE) da palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineenses*) aos 45 dias de inoculação in vitro. A – Segmentos de ráquulas com calos; B - Segmentos de ráquulas com estruturas florais; C e D - Estruturas florais em segmentos de ráquulas oxidados. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 2.2. Estrutura floral desenvolvida in vitro a partir de inflorescências femininas imaturas do híbrido interespecífico (HIE) da palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineenses*) e secções histológicas. A – Flor com calos na base; B – Secção transversal da ponta da flor; C – Secção mediana da flor; D – Secção da base da flor com calos. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 2.3. Avaliação da oxidação de inflorescências femininas imaturas do híbrido interespecífico (HIE) da palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineenses*) em diferentes estádios de desenvolvimentos cultivadas in vitro em diferentes meios e concentrações de picloram. A – Comparação entre os estádios das inflorescências e a composição do meios MS e ½ MS; B – comparação entre os estádios das inflorescências e as diferentes concentrações de picloram (0; 225 e 450µM); C- Comparação entre a composição do meio e a concentração de picloram. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 2.4. Desenvolvimento in vitro de estruturas florais em explantes oxidados do híbrido interespecífico (HIE) da palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineenses*). A- I 12 em meio MS sem picloram; B- I15 em meio MS sem picloram. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 2.5. Formação de calos nas inflorescências femininas imaturas do híbrido interespecífico (HIE) da palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineenses*) em diferentes estádios de desenvolvimentos cultivadas in vitro em diferentes meios e concentrações de picloram. A – Comparação entre os estádios das inflorescências e a composição do meio; B – comparação entre os estádios das inflorescências e a concentração de picloram; C comparação entre a composição do meio e a concentração de picloram. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 2.6 – Desenvolvimento de flores do híbrido interespecífico (HIE) da palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineenses*) obtidas in vitro em diferentes meios de cultura a partir de inflorescências imaturas em diferentes estádios de desenvolvimento. A – Comparação entre os estádios das inflorescências e a composição do meio; B – comparação entre os estádios das inflorescências e a concentração de picloram; C comparação entre a composição do meio e a concentração de picloram ..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 2.7. Estrutura floral desenvolvida in vitro do híbrido interespecífico (HIE) da palma de óleo (*E. oleífera* x *E. guineenses*) com formação de calos em sua base. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 3.1 – Diagrama da filotaxia de *E. guineenses* Jacq. A representação diagramática do estipe mostra a porção superior do ápice (A) rodeado pelas folhas, com a flecha (SP) acima e as folhas maduras com inflorescência (INF) dispostas lateralmente. As bases das folhas estão numeradas em ordem cronológica de formação a partir da base. Na base do bulbo do dendezeiro (B), no nível do solo (SL), ocorrem raízes adventícias (AR). Adaptado de Henry (1955) e J.W.A.I.F.O.R. (1961). Fonte: FARIAS (2014). ..... **Erro! Indicador não definido.**

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ES – embriogênese somática

HIE - Híbrido interespecífico

MS - Meio de cultura proposto por Murashige & Skoog, 1962

½ MS – Metade dos sais de MS proposto por Murashige & Skoog, 1962

Y3 - Meio de cultura proposto por Eeuwens, 1976

Picloram - Ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico

2,4-D Ácido 2,4-diclofenolacético

2-iP - 2-isopenteniladenina

µM – Micromolar

EZ – Embrião Zigótico

pH – Potencial hidrogeniônico

DP – Desvio padrão

I0 – Inflorescência da folha 0

I1 – Inflorescência da folha 1

I2 – Inflorescência da folha 2

I3 – Inflorescência da folha 3

I4 – Inflorescência da folha 4

I5 – Inflorescência da folha 5

I6 – Inflorescência da folha 6

I7 – Inflorescência da folha 7

I8 – Inflorescência da folha 8

I9 – Inflorescência da folha 9

I12 – Inflorescência da folha 12

I15 – Inflorescência da folha 15

## 1. CONTEXTUALIZAÇÃO

A palma de óleo africana ou dendê (*Elaeis guineensis* Jacq.) e a palma de óleo americana ou caiaué (*E. oleifera* (Kunth) Cortés) são espécies pertencentes à família Arecaceae que podem ser cruzadas entre si, produzindo descendentes férteis. Essas duas espécies ofertam a variabilidade genética explorada pelos programas de melhoramento que objetivam incrementar a produção e qualidade de óleo de palma (RIOS, 2012). Um dos principais produtos desse cruzamento é o híbrido interespecífico (HIE) BRS Manicoré, que apresenta um excelente potencial de produção de frutos, elevada taxa de ácidos graxos insaturados e menor crescimento vertical do estipe, além da maior resistência a pragas e doenças e maior resistência ao amarelecimento fatal (AF) (CUNHA; LOPES, 2010).

A palma de óleo é uma palmeira de origem africana e do seu fruto é extraído dois tipos de óleo: o óleo de palma (polpa) e o óleo de palmiste (amêndoa), ambos com amplo emprego alimentar e industrial (MÜLLER, 1980). É a oleaginosa de maior produtividade conhecida no mundo, podendo fornecer anualmente de quatro a seis toneladas de óleo por hectare, o que corresponde a 1,5 vezes o rendimento do óleo de coco, o dobro do azeite de oliva e 10 vezes mais a produção do óleo de soja (MÜLLER, 1980; FURLAN et al., 2003; LIN et al., 2009).

A resistência do HIE BRS Manicoré ao AF foi demonstrada em condições de campo, em área com incidência prévia do AF, tendo sido observado que as plantas desse híbrido não foram afetadas por essa anomalia em comparação às plantas de palma de óleo da variedade tenera. Esses resultados indicam que o HIE BRS Manicoré é recomendado para áreas com incidência de AF (CUNHA; LOPES, 2010).

As sementes de palma de óleo africana, em condições adequadas, possuem baixas taxas de germinação em decorrência da dormência após a maturação fisiológica. Se a dormência não for quebrada artificialmente, a germinação que além de baixa e desuniforme, pode demorar anos (LIMA et al., 2013). No entanto, protocolos visando melhorar a germinação das sementes de palma de óleo tem sido objeto de pesquisa, tendo sido alcançadas taxas de germinação em torno de 85% (LIMA et al., 2014). Para as sementes do HIE, a taxa de germinação comumente observada é ainda menor, em torno de 30 a 35,6% (ANGELO et al., 2007; MAQUINÉ et al., 2012), fazendo com que a produção de sementes pré-germinadas não atenda a demanda de mudas de HIE para a implantação de novas lavouras (CUNHA et al., 2010).

Cultivares melhorados geneticamente de muitas espécies perenes têm sido multiplicados por meio de propagação vegetativa. No entanto, a palma de óleo é uma planta monopodial de fuste único que não permite a aplicação de técnicas convencionais de propagação vegetativa, como por exemplo a estaquia. Desta forma, a micropropagação ou propagação *in vitro* é uma alternativa viável de propagação vegetativa desta espécie com vistas a produção de mudas em larga escala (PLATA; REY, 2006).

A micropropagação tem sido aplicada com sucesso em várias palmeiras, como por exemplo em *Cocus nucifera* (GOMES et al., 2004), *Euterpe oleracea* (FERMINO JUNIOR et al., 2007; SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2012), *Bactris gasipaes* (STEINMACHER et al., 2007), *Acrocomia aculeata* (MOURA et al., 2009) e em *Elaeis guineensis* (CORRÊA et al., 2016). Porém, trabalhos de micropropagação específicos para HIE BRS Manicoré são, até o presente, incipientes.

Um dos métodos de micropropagação mais eficiente para a regeneração de plantas *in vitro* é a embriogênese somática, a qual se baseia na totipotência celular e é análoga à embriogênese zigótica, em que uma única célula ou um pequeno grupo de células somáticas são precursores da formação de um embrião somático (TAUTORUS et al., 1991). Na embriogênese somática, células somáticas se diferenciam em plantas completas, seguindo estádios de citodiferenciação embriogênicos característicos (WILLIAMS e MAHESWARAN, 1986; EMONS, 1994). Esse processo pode ser induzido por vários tipos de explantes, usualmente tratando-os com reguladores de crescimento, tais como as auxinas 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), Picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropiridina-2-carboxílico) e/ou tratamentos de estresse abiótico (FEHÉR, 2015; HORSTMAN et al., 2017).

Uma vez que os protocolos de micropropagação do HIE BRS Manicoré são incipientes e que a demanda de mudas deste híbrido tem crescido em face de suas características agrônômicas e resistência ao AF, este trabalho foi conduzido para testar a hipótese de que inflorescências imaturas e embriões zigóticos do HIE BRS Manicoré podem ser utilizados como explantes para a obtenção de calos embriogênicos deste híbrido. Assim, este trabalho teve o objetivo geral de avaliar a capacidade de inflorescências imaturas e embriões zigóticos do HIE BRS Manicoré em produzir calos embriogênicos mediados pelo de auxinas e/ou citocininas. Para isso, dois experimentos independentes foram conduzidos com os seguintes objetivos específicos:

Experimento 1 – Avaliar a habilidade de inflorescências imaturas do HIE BRS Manicoré em induzir a formação de calos e flores *in vitro* em função da concentração de sais no meio de cultura Murashige and Skoog (MS) combinadas a diferentes concentrações de Picloram.

Experimento 2 – Avaliar a viabilidade de indução de calos do HIE BRS Manicoré a partir de flores produzidas *in vitro* e de embriões zigóticos cultivados em diferentes meios de cultura combinados às auxinas Picloram e 2,4-D e à citocinina 2iP.



## REFERÊNCIAS

- ANGELO, P. C. S.; MORAES, L. A. C.; SOUSA, N. R.; LOPES, R.; CUNHA, R. N. V. **Resgate de embriões Híbridos de dendezeiro x caiaué**. Comunicado Técnico. Manaus, Embrapa. 2007.
- CORRÊA, T. R.; MOTOIKE S. Y.; ANDRADE, A. P. S.; COSER, S. M.; QUEIROZ, V.; GRANJA, M. M. C.; CAETANO, D. D. N.; PEÑA; C. N. M.; PICOLI, E. A. T. Accelerated in vitro propagation of elite oil palm genotypes (*Elaeis guineensis* Jacq.) by substituting cytokinin with putrescine. **African Journal of Biotechnology**. v. 15, 2767-2775, 2016. DOI: 10.5897/AJB2016.15670.
- CUNHA, R. N. V.; LOPES, R. **BRS Manicoré: Híbrido Interespecífico entre o caiaué e o dendezeiro africano recomendado para áreas de incidência de Amarelecimento-Fatal**. EMBRAPA, Comunicado técnico, n. 85. Manaus, AM, Set. 2010. 4p.
- CUNHA, R. N. V.; LOPES, R.; GOMES JUNIOR, R. A.; RODRIGUES, M. R. L.; TEIXEIRA, P. C.; ROCHA, R. N. C.; LIMA, W. A. A. Material genético utilizado para a produção sustentável da cultura do dendê na Amazônia. In: RAMALHO FILHO, A. et al. **Zoneamento agroecológico, produção e manejo da cultura do dendê na Amazônia**. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2010. 216 p.
- CUNHA, R. N. V.; LOPES, R.; ROCHA, R. N. C.; LIMA, W. A. A.; TEIXEIRA, P. C.; BARCELOS, E.; RODRIGUES, M. R. Domesticação e melhoramento do caiaué. In: BORÉM, A.; LOPES, M. T. G.; CLEMENT, C. R. (Ed.). **Domesticação e melhoramento: espécies amazônicas**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2009. p. 275-296.
- EMONS, A. M. C. Somatic embryogenesis: cell biological aspects. **Acta Botanica Neerlandica**. v.43, n.1, 1-14, 1994. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.1994.tb00729.x>
- FEHÉR, A. Somatic embryogenesis-stress-induced remodeling of plant cell fate. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms** 1849, v.4, 385-402. 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.07.005>
- FERMINO JUNIOR, P. C. P.; SILVA, R. A.; MACIEL, A. S.; GUEDES, R. S.; PEREIRA, J. E. S.; Análises morfo-histológicas da embriogênese somática de açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.). **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**. v. 1, 845-848, 2007. <https://doi.org/10.14295/oh.v13i0.1558>
- GOMES, K. K. P.; OLIVEIRA, V. C.; LEDO, A. S.; ANGELO, P. C. S.; COSTA, J. L. S. Indução de calo a partir de eixo embrionário de coqueiro (*Cocus nucifera* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 26, n.1, 124-126, 2004. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452004000100034>
- HORSTMAN, A.; BEMER, M.; BOUTILIER, K. A transcriptional view on somatic embryogenesis. **Regeneration** n.4, v.4, 201-216. 2017. <https://dx.doi.org/10.1002%2Freg.2.91>
- MAQUINÉ, T. M.; QUEIROZ, A. C.; ABREU, S. C.; LIMA, W.A.A. de.; GREEN, M.; RIOS, S. de A. Despolpa mecânica sobre a germinação de sementes do híbrido interespecífico BRS Manicoré (*Elaeis oelifera* x *Elaeis guineenses*). In: II Congresso Brasileiro de Recursos

Genéticos, 2012, Belém, PA. **Anais**. Belém, PA: Sociedade Brasileira de recursos genéticos, 2012. p. 664-667.

MOURA, E. F.; MOTOIKE S. Y.; VENTRELLA, M. C.; SÁ JUNIOR, A. Q.; CARVALHO, M.; Somatic embryogenesis in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from zygotic embryos. **Scientia Horticultrae**. v.119, 447-454. 2009. DOI: 10.1016/j.scienta.2008.08.033

MÜLLER, A. A. **A cultura do dendê**. EMBRAPA, Miscelânea n. 5. Belém, PA, 1980. 25 p.

RIOS, S. A.; CUNHA, R. N. V.; LOPES, R.; BARCELOS, E. **Recursos genéticos de palma de óleo (*Elaeis guineenses* Jacq.) e Caiaué (*Elaeis oleífera* H.B.K.) Cortés)**. EMBRAPA, Documentos, n. 96. Manaus, AM. 2012. 39p.

LIMA, W. A. A. de; CUNHA, R. N. V. da; LOPES, R.; GREEN, M.; ABREU, S. C.; SIMONETTI, R. **Produção de sementes germinadas de dendezeiro (*Elaeis guineenses*, Jacq.)** na Embrapa. Série Documentos, Manaus, Embrapa Amazônia Ocidental. n. 41, p. 16, 2013.

PLATA, A.; REY, L. Avances en la implementación de la metodología de embriogénesis somática en palma de aceite en el Campo Experimental el Palmar de La Vizcaína. **In: Ceniavances (Colombia)**, n. 138, p.1-4. 2006.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; GUEDES, R. S.; SILVA, R. A.; FERMINO-JR. P. C. P.; LUIS, Z. G.; FREITAS, E. O. Somatic embryogenesis and plant regeneration in açai palm (*Euterpe oleracea*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v. 109, 501–508. 2012. <https://www.researchgate.net/deref/http%3A%2F%2Fdx.doi.org%2F10.1007%2Fs112400120115-z>

STEINMACHER, D. A.; KROHN, N. G.; DANTAS, A. C. M.; STEFENON, V. M.; CLEMENT, C. R.; GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis in peach palm using the thin cell layer technique: induction, morpho-histological aspects and aflp analysis of somaclonal variation. **Annals of Botany**. v.100, n.4, 699–709. 2007. <https://dx.doi.org/10.1093%2Faob%2Fmcm153>

TAUTORUS, T.; FOWKE, L.; DUNSTAN, D. Somatic embryogenesis in conifers. **Canadian Journal of Botany**. v.69, n.9, 1873-1899. 1991. Doi:[10.1139/b91-237](https://doi.org/10.1139/b91-237)

WILLIAMS, E. G.; MAHESWARAN, G. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany**, v.57, n.4, 443-462, 1986. <https://www.jstor.org/stable/42757594>

## **2. CAPÍTULO 1: *In Vitro* Induction of Callus and Flowers in Immature Oil Palm Inflorescences\***

\* O capítulo encontra-se apresentado nas páginas seguintes exatamente como publicado em Journal of Agricultural Studies 8 (4): 712-725, 2020. doi:10.5296/jas.v8i4.16114.

## *In Vitro* Induction of Callus and Flowers in Immature Oil Palm Inflorescences

Marcília Gabriella Tavares Monteiro (Corresponding author)

Laboratório de Bioquímica, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, Pará, Brasil.  
E-mail: gabymonteiro@gmail.com

Joanne Moraes de Melo Souza

Laboratório de Biotecnologia, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, Pará, Brasil.

Hugo Alves Pinheiro

Laboratório de Bioquímica, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, Pará, Brasil.

Oriel Filgueira de Lemos

Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Embrapa Amazônia Oriental, Belém, Pará, Brasil.

Raimundo Parente de Oliveira

Embrapa Amazônia Oriental, Belém, Pará, Brasil.

Bruno Barbosa Boás

Laboratório de Botânica, Embrapa Amazônia Oriental, Belém, Pará, Brasil.

Fernanda Ilkin Borges de Souza

Laboratório de Botânica, Embrapa Amazônia Oriental, Belém, Pará, Brasil.

Received: Dec. 23, 2019

Accepted: Nov. 5, 2020

Published: Nov. 22, 2020

doi:10.5296/jas.v8i4.16114

URL: <https://doi.org/10.5296/jas.v8i4.16114>

## Abstract

This work aimed to investigate the effects of different combinations of auxin (0, 225 and 450  $\mu\text{M}$  Picloram) and Murashige and Skoog salts (50% and 100% MS salt concentrations, respectively named as  $\frac{1}{2}$  MS and MS) in mediate the induction of callus and flowers from immature inflorescences (developmental stages I-9, I-12 and I-15) of the oil palm BRS – Manicoré hybrid. In I-9 inflorescence explants, the rate of callus induction was 17% higher in  $\frac{1}{2}$  MS than in MS; while in both I-12 and I-15 inflorescence explants, callus induction was over than 95% regardless of the MS salt concentration. The higher rate of callus induction in I-9 inflorescences was mediated by 450  $\mu\text{M}$  Picloram, while the callus induction rates for either I-12 or I-15 inflorescences were higher than 92% regardless of Picloram concentration. Floral induction was lower in I-9 inflorescence explants (45% floral induction rate) than in both I-12 and I-15 inflorescence explants (floral induction rate higher than 90%). Our results suggest that Picloram (450  $\mu\text{M}$ ) and MS salts concentrations ( $\frac{1}{2}$  MS) led to the highest rates of calluses and flowers induction in younger inflorescence explants (I-9); however, the medium composition is indifferent on callus and flower induction in I-12 and I-15 inflorescences.

**Keywords:** auxin, *Elaeis oleifera* x *E. guineensis*, MS salts, Picloram

## 1. Introduction

African oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) cultivations in Brazil and Latin America have suffered from the occurrence of lethal yellowing (LY), an unknown-cause anomaly that already devastated thousands of hectares with oil palm. In Brazil, the LY has been affecting continuously several areas since the first reported case in the country (De Franqueville, 2003). Therefore, the development of LY - resistant oil palm cultivars has been addressed through crop breeding. In this context, the BRS - Manicoré hybrid, a result of interspecific hybridization between the African (*E. guineensis*) and American (*E. oleifera* (Kunth) Cortés) oil palm species, brings together desirable agronomic traits, such as high yield, pests resistance, LY resistance, high content of unsaturated fatty acids in fruits and short stipe growth (Cumha et al., 2009). In Brazil, the viability of planting oil palm hybrids (such as BRS – Manicoré) in areas previously devastated by LY has been observed, highlighting the resistance of this plant material to LY (Cumha and Lopes, 2010).

The natural vegetative propagation of oil palm occurs through seeds since this species does not produce axillary shoots - by having only one apex of growth - and, therefore, cannot be multiplied vegetatively by tillering (Rajesh et al., 2003). Concerning interspecific hybrids, a low seed germination rate around 30% and 36% is commonly observed (Angelo et al., 2007; Maquiné et al., 2012). Despite this, the seedlings of hybrids, including BRS - Manicoré, have been produced from pre-germinated seeds, a process that takes about 150 days from the fruit harvesting and processing to embryonic axis emergence (Lopes, 2013). Additionally, the generated plants present high genetic variability, and this is one of the main yields limiting factors in most of the commercial cultivated areas with oil palm (Viegas and Muller 2000).

Considering that oil palm presents highly heterozygous plants, heterogeneous populations, and monopodial growth, the *in vivo* clonal propagation raises as a suitable alternative to

produce oil palm hybrid seedling on a large-scale (Teixeira et al., 1995; Rajesh et al., 2003). Thus, one can expect that more uniform and healthy BRS - Manicoré seedlings can be produced from a single explant and in a lower timeframe as compared to the traditional nursery methods (Erig and Schuch, 2005).

Different plant tissues have been used on clonal propagation, including the inflorescences (Teixeira et al., 1994; Karim et al., 2004; Campos et al., 2007). In oil palm micro propagation, the explants commonly used are zygotic embryos (Teixeira et al., 1995), immature inflorescences (Teixeira et al., 1994), immature leaves, and tertiary and quaternary roots (Eeuwens et al., 2002). The micro propagation of the oil palm BRS - Manicoré hybrid is still unknown and in this research we hypothesize that immature inflorescences may be an adequate explant to start *in vitro* cultivations of this hybrid. Our expectations are based on the totipotency of immature inflorescence cells, which also should present low levels of contamination by microorganisms since they are protected by floral spaths. We also hypothesize that BRS - Manicoré micro propagation may be achieved through somatic embryogenesis and in this context we believe that auxins may be crucial due to its effects on cell de-differentiation (Elhiti et al., 2013). The most used auxins for somatic embryogenesis induction are 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid (Picloram) and 3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid (Dicamba). These chemicals may act on gene expression and in cell division and expansion, leading to callogenesis, embryogenesis and organogenesis (Krikorian, 1991).

Thus, this study was carried out to evaluate the ability of immature inflorescences in inducing *in vitro* callus and flowers in oil palm BRS - Manicoré hybrid growing at two concentrations of Murashige and Skoog salts (total concentration, MS; or halved concentration, ½ MS) and three concentrations of auxin (0; 225 and 450 µM Picloram). The outcome of this work will further support studies on *in vitro* oil palm regeneration via somatic embryogenesis, aiming at producing BRS - Manicoré seedlings on a large scale.

## 2. Materials and Methods

### 2.1 Plant Material

Immature female inflorescences of oil palm BRS - Manicoré hybrid at different developmental stages were used as explants. The inflorescences were collected in Moju, state of Pará, northern Brazil (01° 53' 02" S and 48° 46' 08" W) and identified according to the corresponding phyllotaxis order (leaf number) arranged throughout the plant as follows: I-9, inflorescence from the ninth leaf; I-12, inflorescence from the 12<sup>th</sup> leaf; and I-15, inflorescence from the 15<sup>th</sup> leaf.

At the laboratory, inflorescences still containing spathe were washed with neutral liquid soap, then dipped in 2.5% sodium hypochlorite and rinsed in deionized water. The outer and inner spathes were removed and inflorescences were immersed in 70% (v/v) ethanol for 1 min and subsequently in sodium hypochlorite (2.5%) for 15 min. Finally, the inflorescences were washed three times in sterile distilled water before inoculation in culture mediums. All sterilization procedures were performed in a laminar flow cabinet.

## *2.2 Growth Conditions and Experimental Design*

The I-9, I-12 and I-15 inflorescences were cross-sectioned and sections were inoculated in MS medium (Murashige and Skoog, 1962) containing either a total concentration (MS) or halved concentration ( $\frac{1}{2}$  MS) of salts combined with three concentrations of auxin (0; 225 and 450  $\mu$ M Picloram). Therefore, the experiment consisted of the following culture mediums: MS + 0  $\mu$ M Picloram; MS + 225  $\mu$ M Picloram; MS + 450  $\mu$ M Picloram;  $\frac{1}{2}$  MS + 0  $\mu$ M Picloram;  $\frac{1}{2}$  MS + 225  $\mu$ M Picloram;  $\frac{1}{2}$  MS + 450  $\mu$ M Picloram. All culture mediums were supplemented with 30 g L<sup>-1</sup> sucrose, 0.3% (w/v) phytagel, and 2.5 g L<sup>-1</sup> activated carbon. The medium pH was adjusted to 5.8 before autoclaving at 120 °C for 20 min. The explants were inoculated in flasks containing 40 mL culture medium, which were placed in a growth chamber at 25 °C under darkness.

The experiment was performed in a completely randomized design, in a 3 x 2 x 3 factorial scheme (inflorescence developmental stages x MS medium salt concentration x Picloram concentrations), totalling 18 treatments and six replications. Each experimental unit consisted of a culture flask containing five rachilla sections.

## *2.3 Assessments*

Evaluations were carried out 45 days after inoculation by assessing the explants contamination and oxidation rates and determining the callus and flower induction rates. All data were expressed in percentage, calculated as the total number of occurrences in relation to total number of explants per flask.

Histological analyses of the cultures were performed by fixing the samples in 70% FAA (formaldehyde, ethyl alcohol, and acetic acid) for 24 h followed by progressive ethanol dehydration (70% - 80% - 90% - 100%). The time of incubation in each ethanol concentration was about 30 min. The samples were then transferred to a pre-infiltration solution containing 95% ethanol and Leica histo-resin (1:1, w/v) for 24 h. After that, all samples were immersed in an infiltration solution for at least 24 h. The samples were embedded in Leica histo-resin and sectioned using a manual microtome. The samples were stained with 0.05% blue toluidine prior to glass slide setting.

## *2.4 Statistics*

The data did not present normal distribution even after arcsine transformation (Fischer 1922, Zubin 1935). Therefore, all data set were submitted to non-parametric analysis by the Kruskal Walls method, somehow the differences between treatments were performed by Dunn's test ( $p < 0.05$ ). Data analysis was accomplished by using SAS software (SAS Institute Inc., Cary, USA).

# **3. Results and Discussion**

## *3.1 Explant Contamination and Oxidation*

The rate of explant contamination was only about 3.5%. Hence, this indicates that the explants presented low endogenous contamination by microorganisms. Moreover, the use of

ethanol and sodium hypochlorite was efficient in promoting the surface asepsis of explants without impairing their morphogenic responses to callus and flower induction treatments.

Irrespective of the Picloram concentrations (Figure 1A), a high rate of explant oxidation (> 61%) was observed in MS mediums independently of the inflorescence developmental stage and salts concentration. In explants originated from I-9 and I-12 inflorescences, the oxidation rates were not influenced by MS salts concentration. However, the oxidation rate in I-15 inflorescence explants was 39% higher in ½ MS than in MS medium (Figure 1A).

The overall effects of Picloram in attenuating the explants oxidation independently of MS medium salts concentration are shown in Figure 1B. The addition of 225 µM Picloram was sufficient to reduce the oxidation of explants obtained from both I-9 and I-15 inflorescences by 25% and 29%, respectively, while a higher concentration of this compound (450 µM) was necessary to reduce the oxidation rate in I-12 inflorescence explants by 15%. When explant oxidation rates were evaluated regardless of inflorescence developmental stage (Figure 1C), one can note that oxidation rate was higher in the absence of Picloram. The lower oxidation rates were observed in MS medium containing 225 µM Picloram (Figure 1C).

The explant oxidation may be a response to phenolic compounds, which seems to be common *in vitro* oil palm cultivation (Silva et al., 2012). According to Teixeira et al. (1994), the use of activated carbon in the MS medium may significantly reduce phenolic oxidation. Likewise, Thomas (2008) reported the benefits of activated carbon on plant growth and development due to its potential to adsorb inhibitory substances in the culture medium. In this experiment, however, the activated carbon did not prevent explant oxidation but data shows that explant oxidation tended to be lower in the presence of Picloram, particularly in the MS mediums. Although this result suggests that Picloram may attenuate explant oxidation, one must be cautious, however, because such antioxidant effect has not been earlier described.

### 3.2 Callus Induction

In this experiment we observed that explants oxidation in inflorescences at all developmental stages did not affect callus induction, as also previously observed by Teixeira et al. (1994). Therefore, such friable, beige - colored calluses can be observed in oxidized BRS - Manicoré explants in Figure 2 and 4. Comparatively, Silva et al. (2012) observed high occurrence of phenolic oxidation in explants from some oil palm genotypes even in the presence of activated carbon (2.5 g L<sup>-1</sup>); however, the oxidation level was not harmful to *in vitro* morphogenesis. Teixeira et al. (1993) used immature zygotic embryos of oil palm in a culture medium to induce callus formation and showed that the presence of 0.3% activated carbon attenuated the oxidation of explants by the adsorption of part of the 2,4-D present in the MS medium.

In I-9 inflorescence explants, the callus induction rate was 17% higher in ½ MS than in MS medium (Figure 3A). On the other hand, in explants from both I-12 and I-15 inflorescences, the callus induction rates were higher than 95% regardless of the MS salt concentrations in the culture medium (Figure 3A). Therefore, the results evidence that the highest callus induction did not occur in the youngest tissues (I-9), as previously reported by Pierik (1990).



The callus induction is commonly mediated by auxins (Ozias-Akins; Vasil, 1985). Auxins are substances involved with de-differentiation and redifferentiation mechanisms in most models of somatic embryogenesis (Thuzar et al., 2011). In indirect embryogenesis, which involves the formation of callus, the de-differentiation occurs prior to the cell redifferentiation via genetic reprogramming. At this point, the physiological stage of the explant and plant growth regulator type and concentration are crucial because they act as chemical signals to activate specific pattern of gene expression (Guerra et al., 2016).

According to Soh et al. (2011), the rate of callus induction and callus growth seems to be slower in *E. guineensis* than in other plant species, even under similar cultivation conditions, indicating that the callus induction follows a specific pattern for each species. Besides that, different rates of callus induction have been reported for different *E. guineensis* genotypes, indicating that callus induction in African oil palm is a genotype-specific response (Corrêa et al. 2015). Furthermore, Balzon et al. (2013) observed that the frequency of embryogenic callus induction in oil palm growing in culture medium containing both Picloram (450  $\mu\text{M}$ ) and activated carbon (2.5  $\text{g L}^{-1}$ ) reached 97.5% of zygotic embryos in the MS medium, while the response was 79.4% in the MS medium supplemented with 2,4-D and activated carbon.

In this study, the Picloram - mediated induction of callus was only evident in explants from the youngest inflorescences (I-9), particularly at the concentration of 450  $\mu\text{M}$  Picloram (Figure 3B). In the most mature inflorescences (I-12 and I-15), the callus induction rates were higher than 92% regardless of Picloram concentration in the culture medium (Figure 3B). In addition, it was demonstrated that the callus induction rate in the absence of Picloram was lower in MS than in  $\frac{1}{2}$  MS medium, while no significant effect of the MS salts concentration was observed in the presence of 225 or 450  $\mu\text{M}$  Picloram (Figure 3C). These results indicate that all explants evaluated in this study presented a sufficient concentration of endogenous auxins to induce callus growth. Furthermore, since the effect of Picloram in stimulating significant increases in the callus induction rate was limited to I-9 inflorescences, it can be inferred that these younger inflorescences must have a lower endogenous concentration of auxins than more mature inflorescences (I-12 and I-15). Therefore, the addition of Picloram to the culture medium must have properly compensated for the lower endogenous concentration of auxin in I-9 inflorescences.

### 3.3 Flower Induction

The differentiation of inflorescences started seven days after explants inoculation in the respective culture mediums. After 45 days of growth under darkness, numerous calluses (Figure 4A) and flowers (Figure 4B) were evident in all treatments, even in explants presenting pronounced oxidation (Figure 4C and 4D). Then, explants containing flowers and calluses (Figure 5A) were subjected to histological traits. From the results we evidenced the presence of parenchyma, randomly distributed bundles-sheath, and vacuolated cells in the calluses (Figure 5B and 5D). Such structures showed the same pattern as commonly observed in monocotyledons. Further, we also confirmed the presence of floral structures initiation with three verticils (Figure 5C).

Floral induction was observed in the explants originated from inflorescences at all

developmental stages and it was irrespective of the MS salts concentration in the culture medium (Figure 6A). However, the average rates of floral induction were lower in explants originated from the youngest inflorescences (I-9, with 45% of flowers) than those from more mature inflorescences (I-12 and I-15, higher than 90% of flowers). Therefore, the stage of maturation of the explant significantly influenced *in vitro* differentiation of flowers in BRS - Manicoré hybrid. A similar result was observed in *Bactris gasipar*, in which the formation of floral structures was higher in more mature inflorescences (Steinmacher et al. 2007). By contrast, Carvalho (2009) demonstrated that the developmental stage of *E. guineensis* inflorescence affects the percentage of rachilla with flowers, somehow the higher average was observed in explants obtained from younger inflorescences.

When the youngest inflorescences (I-9) were used as explants, the absence of Picloram in the MS medium completely inhibited the floral induction (Figure 6B). In such explants, floral induction significantly increased as a function of Picloram concentration in the MS medium, which reached 36% and 98%, respectively, at 225  $\mu\text{M}$  and 450  $\mu\text{M}$  Picloram (Figure 6B).

There was no interaction between medium composition (MS and  $\frac{1}{2}$  MS) and Picloram concentrations (0; 225  $\mu\text{M}$  and 450  $\mu\text{M}$ ). However, a clear upward trend in flower induction rates was observed in response to increases in Picloram concentration in the culture medium (Figure 6C).

In general, our results demonstrate the importance of Picloram in underlying *in vitro* floral induction in explants originated from oil palm BRS - Manicoré inflorescences, particularly in younger ones. It was also evidenced that the floral induction is dependent on the concentration of Picloram present in the MS medium. Comparatively, Teixeira et al. (1994) observed that the addition of 2,4-D auxin (475  $\mu\text{M}$ ) to the MS medium induced the development of floral structures in oil palm inflorescences (*Psifera*). According to Teixeira et al. (1994) and Zaid and Tisserat (1983), the development of these floral structures is a consequence of a high degree of inflorescence architecture determination, thus presenting less sensitivity to *in vitro* stimuli.

#### 4. Conclusions

1. The oxidation of explants - even in the presence of activated carbon in the MS medium - did not prevent *in vitro* induction of callus and flower in all inflorescences tested.
2. The explants obtained from I-9, I-12 and I-15 inflorescences are suitable to induce *in vitro* callus and flower formation, and however, the highest rates of floral induction were observed in the I-12 and I-15 explants regardless of medium composition.
3. A significant effect of Picloram in inducing *in vitro* calluses and flowers was evident only in younger inflorescence explants (I-9) growing in  $\frac{1}{2}$  MS medium containing 450  $\mu\text{M}$  Picloram.

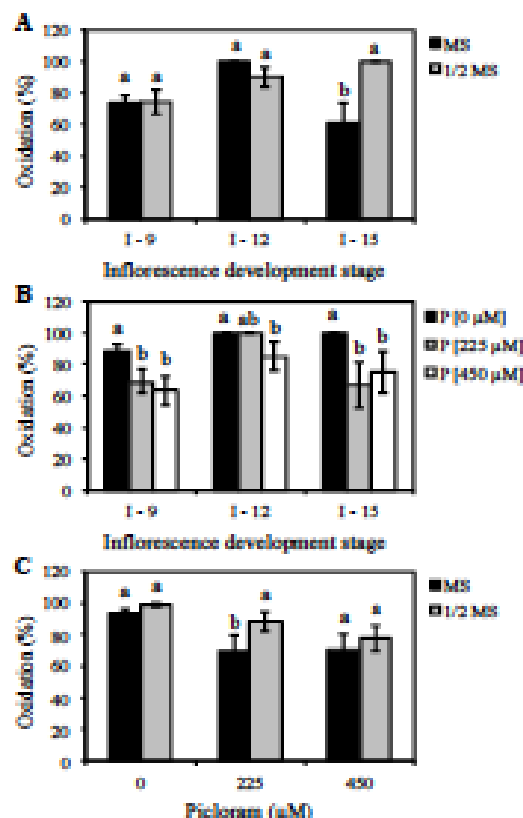


Figure 1. Effects of salt (total concentration, MS; or halved concentration, 1/2 MS) and Picloram (0; 225 and 450 µM) concentrations on oxidation rates of oil palm BRS - Manicoré explants obtained from inflorescences at different stages of development (I-9, I-12 and I-15).

The data are presented as means  $\pm$  SD ( $n = 6$ ). In Figures 1A and 1B, lowercase letters indicate significant differences between treatments with different MS medium compositions (A) or Picloram concentration (B) at the same stage of floral development. In Figure 1C, lowercase letters denote significant differences between treatments with different MS medium compositions at the same concentration of Picloram. The means were compared by Dunn's test ( $p < 0.05$ ).



Figure 2. Frangible calluses (yellow arrow) in I-15 immature inflorescences of oil palm BRS - Manicoré hybrid.

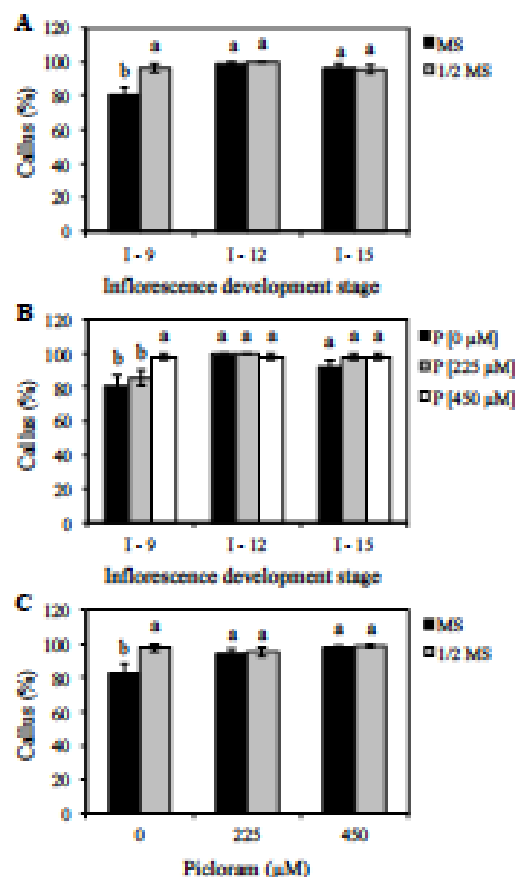


Figure 3. Effects of salt (total concentration, MS; or halved concentration, 1/2 MS) and Picloram (0; 225 and 450  $\mu\text{M}$ ) concentrations on callus induction rates of oil palm BRS - Manicoré explants obtained from inflorescences at different stages of development (I-9, I-12 and I-15). The data are presented as means  $\pm$  SD ( $n = 6$ ). In Figures 3A and 3B, lowercase letters indicate significant differences between treatments with different MS medium compositions (A) or Picloram concentration (B) at the same stage of floral development. In Figure 3C, lowercase letters denote significant differences between treatments with different MS medium compositions at the same concentration of Picloram. The means were compared by Dunn's test ( $p < 0.05$ ).

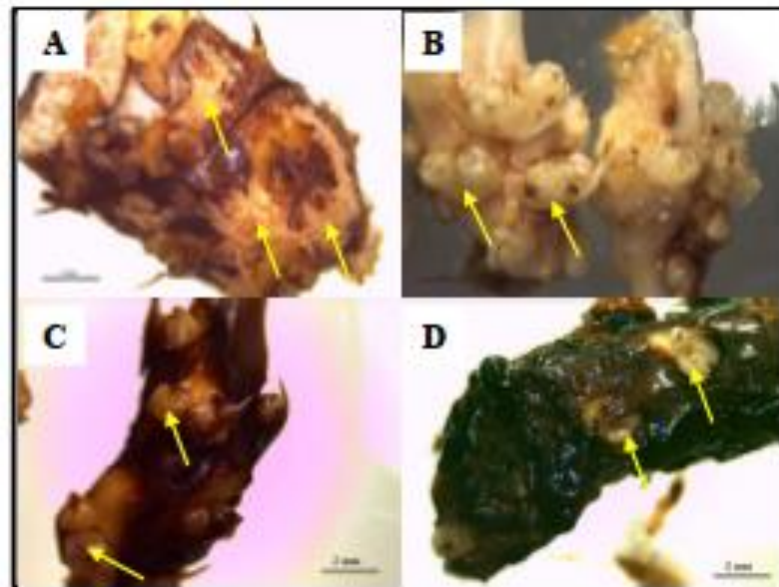


Figure 4. Morphogenesis in rachilla segments obtained from immature female inflorescences of oil palm BRS - Manicoré hybrid. Pictures were taken 45 days after inoculation in culture mediums. A, callus formation; B, floral structures; C and D, floral structures in oxidized rachilla segments

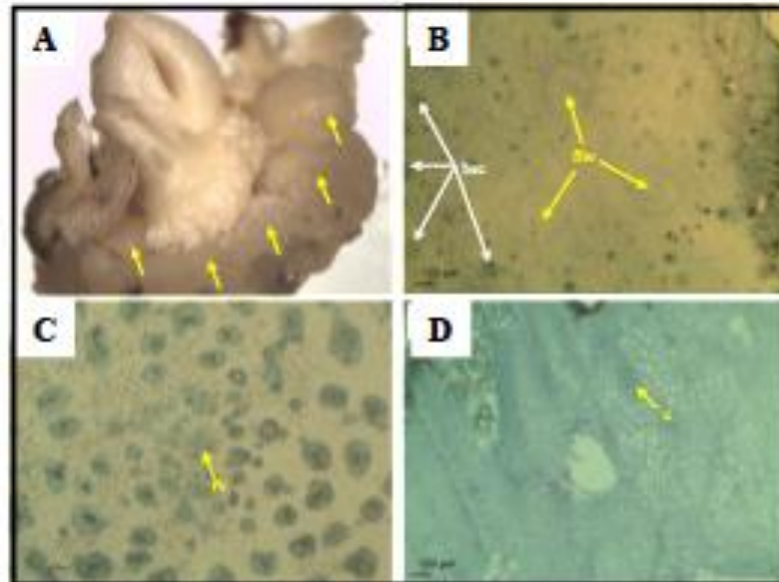


Figure 5. *In vitro* floral structure originated from female inflorescences of oil palm BRS - Manicoré hybrid. A, callus formation at the base of floral structure (yellow arrows); B, histological cross - section of the floral structure (fw) surrounded by randomly - distributed vascular bundles sheath cells (bsc); C, histological median - section showing floral verticils (fv); D, histological basal - section of floral structure showing numerous callus cells (c).

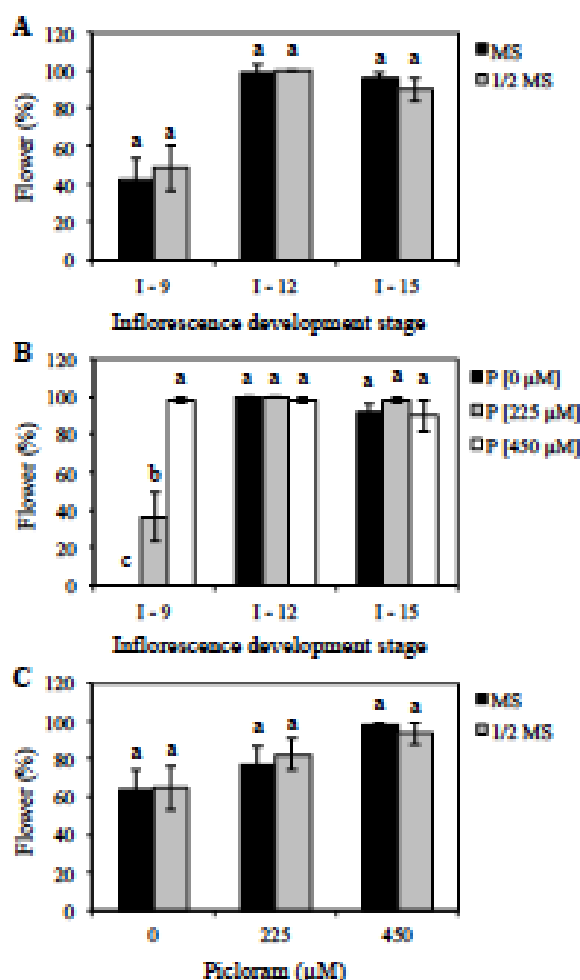


Figure 6. Effects of salt (total concentration, MS; or halved concentration, 1/2 MS) and Picloram (0; 225 and 450 µM) concentrations on flower induction rates of oil palm BRS - Manicoré explants obtained from inflorescences at different stages of development (I-9, I-12 and I-15). The data are presented as means  $\pm$  SD ( $n = 6$ ). In Figures 6A and 6B, lowercase letters indicate significant differences between treatments with different MS medium (A) compositions or Picloram (B) concentration at the same stage of floral development. In Figure 6C, lowercase letters denote significant differences between treatments with different MS medium compositions at the same concentration of Picloram. The means were compared by Dunn's test ( $p < 0.05$ )

#### Acknowledgements

The authors are grateful to Marborges Agroindustry S.A. (Moju, state of Pará, Brazil) for the availability of oil palm plantations to obtain the explants used in this research and to Dr. Rui Alberto Gomes Junior (Embrapa Amazônia Oriental, Belém, Pará, Brazil) for his contribution during the selection of plants and collection of inflorescences. This project was coordinated

by J.M.M. Souza and supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil, grant number 425383/2016-4). Scholarships were granted by CNPq (BB Boás) and by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Brazil; graduate scholarship to MGT Monteiro). The authors also thank CAPES / PG-Agro / UFRA for funding English-proofreading service and publication fees.

#### References

- Angelo, P. C. S. da., Moraes, L. A. C., Sousa, N. R., Lopes, R., & Cunha, R. N. V. da. (2007). Resgate de embriões híbridos de dendezeiro x caiaué. Comunicado Técnico nº 265 – Embrapa, Manaus, AM. <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/681667>
- Balzon, T. A., Luis, Z. G., & Scherwinski-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. Dev. Biol. - Plant*, 49, 41-50. <https://doi.org/10.1007/s11627-012-9479-3>
- Campos, R. A. S., Añez, L. M. M., Dombroski, J. L. D., & Dignart, S. L. (2007). Micropropagação de *Jatropha elliptica* (Pohl) Müll. Arg. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 9(3), 30-36.
- Carvalho, M. (2009). Embriogênese somática a partir de folhas imaturas e flores desenvolvidas *in vitro* de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq). 86 p. Tese (Doutorado) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Corrêa, T. R., Motoike, S. Y., Coser, S. M., Silveira, G., Resende, M. D. V., & Chia, G. S. (2015). 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*, 77, 1033-1038. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.09.066>
- Cunha, R. N. V., & Lopes, R. (2010). BRS Manicoré: híbrido interespecífico entre o caiaué e o dendezeiro africano recomendado para áreas de incidência de amarelecimento-fatal. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 4p. Embrapa Amazônia Ocidental, comunicado técnico, 85.
- Cunha, R. N. V., Lopes, R., Rocha, R. N. C., Lima, W. A. A., Teixeira, P. C., Barcelos, E., & Rodrigues, M. R. (2009). Domesticação e melhoramento do caiaué. In: Borém, A., Lopes, M. T. G., Clement, C. R. (Ed.). Domesticação e melhoramento: espécies amazônicas. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 275-296.
- De Franqueville, H. (2003). Oil palm bud rot in Latin America. *Experimental Agriculture*, 39(3), 225-240. <https://doi.org/10.1017/s0014479703001315>.
- Euwens, 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*, 70(3), 311-323. <https://doi.org/10.1023/A:1016543921508>
- Elhiti, M., Stasolla, C., & Wang, A. (2013). Molecular regulation of plant somatic

embryogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 49(6), 631-642. <https://doi.org/10.1007/s11627-013-9547-3>

Erig, A. C., & Schuch, M. W. (2005). Micropropagação fotosutotrófica e uso da luz natural. *Ciência Rural*, 35(4), 961-965. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782005000400039>

Fischer, R. A. (1922). On the dominance ratio. *Proceedings of the Royal Statistical Society of Edinburgh*, 42, 321-341. <https://doi.org/10.1017/S0370164600023993>

Guerra, M. P., Nodari, R. O., Fraga, H. P. F., Vieira, L. N., & Fritsche, Y. (2016). Biotecnologia I. Universidade Federal de Santa Catarina, centro de ciências agrárias, departamento de fitotecnia, 44p.

Karun, A., Siril, E., Radha, E., & Parthasarathy, V. A. (2004). Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from leaf and inflorescence explants of arecanut (*Areca catechu* L.). *Current Science*, 86, 1623-1628.

Krikorian, A. D. (1991). Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. In: Roca, W. M.; Mroginsky, L. A. (Eds.). Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Cali: CIAT, p. 41-77.

Lopes, S. C. (2013). Regeneração *in vitro* de híbridos interespecíficos da palma de óleo (*E. oleifera* x *E. guineensis*). 105 p. Tese (Doutorado) Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém.

Maquiné, T. M., Queiroz, A. C., Abreu, S. C., Lima, W. A. A. de., Green, M., & Rios, S. A. (2012). Despolpa mecânica sobre a germinação de sementes do híbrido interespecífico BRS Manicoré (*Elaeis oleifera* x *Elaeis guineensis*). In: II Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos, 2012, Belém, PA. Anais... Belém, PA: Sociedade Brasileira de Recursos Genéticos, 2012. p. 664-667.

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15(19), 473-97. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

Ozias-Akins, P., & Vasil, I. K. (1985). Nutrition of plant tissue cultures. In: VASIL, I. K. (Ed.). Cell culture and somatic cell genetics of plants: cell growth, nutrition, cytodifferentiation and cryopreservation. Florida: Academic, 2, 128-147.

Pierik, R. L. M. (1990). Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Tradução por Luis Ayerbe Mateo-Sagasta. *In vitro culture of higher plants*, cap.12, 326 p.

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*, 81, 91-95. <https://doi.org/10.1023/A%3A1024679910085>

SAS INSTITUTE INC (2014). SAS University Edition: version for Windows. Cary, NC, USA. SAS Institute.

Silva, R. C., Luis, Z. G., & Scherwinski-Pereira, J. E. (2012). Differential responses to



somatic embryogenesis of different genotypes of Brazilian oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Plant Cell Tiss Org Cult*, *111*, 59-67. <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0170-5>

Soh, A. C., Wong, G., Tan, C. C., Chew, O. S., Chong, S. P., Ho, Y. W., ... Kumar, K. (2011). Commercial-scale propagation and planting of elite oil palm clones: research and development towards realization. *J Oil Palm Res*, *23*, 935-952

Steinmacher, D. A., Clement, C. R., & Guerra, M. P. (2007). Somatic embryogenesis from immature peach palm inflorescence explant: towards developmental of na efficient protocol. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *89*(1), 15-22. <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9207-6>

Teixeira, J. B., Sandahl M. R., & Kirby, E. G. (1994). Somatic embryogenesis from immature inflorescences of oil palm. *Plant Cell Report*, *13*, 247-250. <https://doi.org/10.1007/BF00233313>

Teixeira, J. B., Sondahl, M. R., Nakamura, T., & Kirby, E. G. (1995). Establishment of oil palm cell suspensions and plant regeneration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *40*, 105-111. <https://doi.org/10.1007/BF00037662>

Teixeira, J. B., Sondahl, M. R., & Kirby, E. G. (1993). Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of oil palm. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *34*, 227-233. <https://doi.org/10.1007/BF00029711>

Thomas, T. D. (2008). The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology Advances*, *26*, 618-631. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.08.003>

Thuzar, M., Vanavichit, A., Tragoonrung, S., & Jantasuriyarat, C. (2011). Efficient and rapid plant regeneration of oil palm zygotic embryos cv. "Tenera" through somatic embryogenesis. *Acta Physiol Plant*, *33*, 123-128. <https://doi.org/10.1007/s11738-010-0526-6>

Viégas, I. J. M., & Müller, A. A. (2000). A cultura do dendezeiro na Amazônia brasileira Belém: Embrapa Amazônia Oriental. 44 p.

Zaid, A., & Tisserat, B. (1983). Morphogenetic responses obtained from a variety of somatic explant tissues of date palm. *Journal of Plant Research*, *96*(2), 67-73. <https://doi.org/10.1007/BF02491091>

Zubin, J. (1935). Note on a transformation function for proportions and percentages. *Journal of Applied Psychology*, *Washington*, *19*, 213-220. <https://doi.org/10.1037/h0057566>

### Copyright Disclaimer

Copyright for this article is retained by the author(s), with first publication rights granted to the journal.

This is an open-access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## **CAPÍTULO 2: Indução de calos a partir de flores induzidas *in vitro* e de embriões zigóticos de palma de óleo em função de diferentes auxinas e citocinina**

### **Resumo**

A micropropagação é uma alternativa importante na propagação de palma de óleo (*Elaeis guineenses* Jacq.) visando a multiplicação de plantas sadias. Nesta espécie, a folha é o explante mais utilizado para obtenção da embriogênese somática, principalmente as folhas imaturas. As inflorescências imaturas também são uma boa opção de explantes, podendo induzir além de calos e embriões somáticos, novas flores que também podem ser usadas como fonte de explante. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade de indução de calos a partir de flores produzidas *in vitro* e de embriões zigóticos de híbridos de palma de óleo em meios de cultura combinados com as auxinas Picloram ou 2,4-D e com a citocinina 2iP. Para isto, foram conduzidos dois experimentos: Experimento 1 - que utilizou cortes finos (1 mm) de flores do HIE BRS Manicoré produzidas *in vitro* inoculados em meio de cultura MS e Y3, em combinação às auxinas Picloram ou 2,4-D (9 µM) e citocinina 2-iP (0; 6; 12 µM), formando assim 14 combinações de meio de cultura (tratamentos); Experimento 2 - que utilizou embriões zigóticos das cultivares BRS Manicoré, BRS 2501 e BRS 2528 inoculados em meios de cultura MS ou Y3 combinados a duas concentrações de Picloram ou 2,4-D (0; 475µM), totalizando seis tratamentos. Verificou-se no experimento 1 que a oxidação dos explantes não impediu a diferenciação de calos e flores *in vitro* e que o melhor meio para indução exclusiva de calos foi constituído de Y3 + 9 µM Picloram + 12 µM 2iP. No experimento 2, foi observado que a indução de calos foi muito limitada, variando em função do meio de cultura e material vegetal (híbridos), com indução de calos observada apenas nos híbridos BRS 2501 e BRS 2528 e somente na presença de auxina.

Palavras-chave: Micropropagação, calogênese, inflorescências, embrião zigótico, palma de óleo.

## 1. Introdução

A micropropagação é uma forma de multiplicação assexuada que permite o crescimento e multiplicação de células, tecidos, órgãos ou parte de órgãos de uma planta, denominado de explante, em meio nutritivo sob condições assépticas e fatores ambientais controlados, tais como fotoperíodo e temperatura (Carvalho, 1999; Fehér et al., 2003). A multiplicação celular *in vitro* dos explantes é mediada por fitoreguladores, produzindo novos indivíduos, genotípica e fenotipicamente idênticos (Fehér et al., 2003).

Um dos métodos utilizados na micropropagação é a embriogênese somática, em que o embrião se desenvolve a partir de células somáticas, podendo originar plantas inteiras idênticas à matriz (Williams e Maheswaran, 1986; Soh et al., 2011). Se eficientemente desenvolvida, a embriogênese pode permitir a obtenção de inúmeras plantas a partir de um pequeno número de explantes (Filippi et al., 2001). Em palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.), a embriogênese somática é a principal via de multiplicação *in vitro* (Monteiro; Scherwinski-Pereira, 2013), permitindo a propagação em massa de mudas clonais da espécie (Duval et al., 1995). Devido a ocorrência de amarelecimento fatal (AF), a micropropagação é uma alternativa importante na propagação da palma de óleo, visando a multiplicação de plantas saudáveis (Cunha et al., 2010).

O híbrido interespecífico (HIE) BRS Manicoré é o resultado do cruzamento entre a palma de óleo africana (*E. guineensis*) ou dendenzeiro, de origem La Mé, e a palma de óleo americana ou caiaué (*Elaeis oleifera*), originada da cidade de Manicoré, na Amazônia brasileira, e foi lançado pela Embrapa em 2010 (Tavares, 2013). Este híbrido mantém as características desejáveis apresentadas pela palma de óleo americana, como reduzido crescimento de caule, maior insaturação de óleo e tolerância a pragas e doenças e ao amarelecimento fatal (AF) (Cunha et al., 2009).

A embriogênese somática pode ocorrer de duas formas: por via direta ou por via indireta. Geralmente, ocorre de forma indireta, inicialmente por meio do desenvolvimento de massas pró-embriogênicas que posteriormente se diferenciarão em embriões somáticos (Almeida, 2007; Carvalho et al., 2009). A via regenerativa indireta é a muito comum em palmeiras, já que pode aumentar o número de plântulas regeneradas em comparação à organogênese, além de ter um alto potencial em rendimento (Steinmacher et al., 2007).

Em palma de óleo, a folha é o explante mais utilizado para obtenção da embriogênese somática, principalmente as folhas imaturas que formam o ápice da planta e isto se deve a sua grande capacidade morfogênica (Rocha, 2007). Entretanto, quando as folhas usadas são imaturas e provenientes de plantas adultas, estas, ao serem retiradas, afetam a produtividade das plantas por ser um método invasivo (Coely e Tinker, 2003). Desta forma, testar a eficiência

de outros tipos de explantes na micropropagação de palma de óleo que sejam de fácil disponibilidade e sua coleta seja menos invasiva é uma estratégia interessante para permitir clonagem de materiais vegetais de interesse. De acordo com Teixeira et al. (1994), as inflorescências são importantes fontes de explantes, pois além de serem abundantes em plantas adultas, são retiradas sem comprometer o vigor da planta. Segundo Carvalho (2009), é possível obter embriogênese somática a partir de flores formadas *in vitro* em ráquias retirada de inflorescências imaturas de *E. guineensis*.

Embora alguns autores mencionem que o uso de inflorescências não compromete o vigor da planta (Teixeira et al., 1994), a coleta de inflorescências em estágio inicial também é uma operação invasiva e causa estresse na planta, já que para obter as inflorescências é necessário a retirada de folhas. Nesse sentido, a utilização de inflorescências induzidas *in vitro* é uma boa alternativa para obter esse tipo de explante. Assim, flores obtidas *in vitro* a partir de inflorescências imaturas do HIE BRS Manicoré são importantes fontes de explantes, tanto por suas condições assépticas quanto pelo seu potencial para micropropagação (Monteiro et al., 2020).

A indução de flores *in vitro* do HIE BRS Manicoré foi observada a partir de inflorescências femininas de diferentes estádios de desenvolvimento, tendo sido demonstrado que inflorescências das folhas 12 e 15 cultivadas em meio MS (Murashige e Skoog, 1962) leva à uma maior formação *in vitro* de flores e calos (Monteiro et al., 2020). Considerando que a indução de calos pode ocorrer em qualquer tecido, flores produzidas *in vitro* bem como os próprios embriões zigóticos obtidos diretamente das sementes podem ser boas alternativas para indução de calos visando a embriogênese somática.

Assim, este trabalho teve como objetivo geral avaliar a viabilidade de indução de calos a partir de flores produzidas *in vitro* e embriões zigóticos em dois meios de cultura em combinação as auxinas Picloram e 2,4-D e a citocinina 2iP. Para isso, dois experimentos foram conduzidos, tendo o Experimento 1 o objetivo específico de avaliar a melhor composição de meio de cultura (tipo de sais, auxina e concentração de 2iP) para promover a indução de calos a partir de seções de flores do HIE BRS Manicoré produzidas *in vitro*; enquanto o Experimento 2 foi conduzido com o objetivo específico de verificar o potencial de indução de calos a partir de embriões zigóticos de diferentes híbridos de palma de óleo (BRS Manicoré, BRS 2501 e BRS 2528) em função de diferentes composições de meio de cultura e auxinas.

## 2. Material e métodos

### 2.1 Experimento 1 - Indução de calos embriogênicos a partir de flores de palma de óleo, HIE BRS Manicoré em função de doses de Picloram e 2,4-D combinadas com 2iP

Neste experimento, foram usados como explantes flores produzidas *in vitro* conforme descrito por Monteiro et al. (2020). As flores foram provenientes de inflorescências imaturas do HIE BRS Manicoré, cultivadas por 180 dias em meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) suplementado com 450  $\mu\text{M}$  Picloram, 30  $\text{g L}^{-1}$  sacarose, 3  $\text{g L}^{-1}$  phytigel e carvão ativado. O pH do meio foi ajustado em 5,8 antes da adição do phytigel e os meios de cultura foram autoclavados a 120 °C por 20 min. O cultivo foi conduzido no escuro, em sala de crescimento à temperatura média de  $25 \pm 2$  °C e umidade relativa do ar de  $50 \pm 2$  %. Durante o período de indução de flores, o material foi subcultivado a cada 60 dias no mesmo tipo de meio de cultura.

As flores obtidas *in vitro* foram seccionadas em cortes finos de aproximadamente 1 mm de espessura para serem utilizados como explantes. Os meios de cultura utilizados foram Y3 (Eeuwens, 1976) e MS, combinados à diferentes reguladores de crescimento, compondo assim 14 tratamentos (Tabela 1). Todos os meios de cultura foram suplementados com 45  $\text{g L}^{-1}$  sacarose, 3  $\text{g L}^{-1}$  phytigel e 3  $\text{g L}^{-1}$  carvão ativado. O pH foi ajustado para 5,8 antes da adição do phytigel e os meios foram autoclavados a 120 °C por 20 min. Os meios de cultura foram distribuídos em frascos de vidro de 6 cm de diâmetro contendo 30 mL de meio de cultura por frasco. Em cada frasco foram inoculados cinco explantes. Os frascos foram dispostos no escuro, em sala de crescimento a temperatura média de  $25 \pm 2$  °C e umidade relativa do ar de  $50 \pm 2$  %. Subcultivos foram realizados a cada 60 dias e o experimento foi avaliado após 240 dias da inoculação, determinando-se a porcentagem de oxidação de explantes, a porcentagem de estruturas formadas (calos e flores) e a porcentagem de oxidação das estruturas formadas.

O Experimento 1 foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com 14 tratamentos e seis repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída de 01 (um) frasco contendo cinco seções de inflorescência utilizada como explante. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade e como não apresentaram distribuição normal mesmo após a transformação angular (Fischer 1922, Zubin 1935, Bartlett, 1947), eles foram submetidos ao teste de qui-quadrado e convertidos em porcentagem. Para análise estatística dos dados, utilizou-se o software R (v.4.0.5 R Core Team, 2021).

**Tabela 1.** Composição dos meios de cultura (tratamentos) do Experimento 1 em função do tipo de meio de cultura (Y3 e MS), de diferentes tipos e concentrações de auxinas (Picloram e 2,4-D) e diferentes concentrações da citocinina 2-iP.

<b>Tratamento</b>	<b>Meio básico</b>	<b>Auxina</b>	<b>Citocinina</b>
T1	Y3	-	-
T2	Y3	9 µM Picloram	-
T3	Y3	9 µM Picloram	6 µM 2-iP
T4	Y3	9 µM Picloram	12 µM 2-iP
T5	Y3	9 µM 2,4-D	-
T6	Y3	9 µM 2,4-D	6 µM 2-iP
T7	Y3	9 µM 2,4-D	12 µM 2-iP
T8	MS	-	-
T9	MS	9 µM Picloram	-
T10	MS	9 µM Picloram	6 µM 2-iP
T11	MS	9 µM Picloram	12 µM 2-iP
T12	MS	9 µM 2,4-D	-
T13	MS	9 µM 2,4-D	6 µM 2-iP
T14	MS	9 µM 2,4-D	12 µM 2-iP

## **2.2 Experimento 2- Indução de calos embriogênicos a partir de embriões zigóticos de palma de óleo, HIE BRS Manicoré**

Neste experimento foram utilizadas sementes do HIE BRS Manicoré e de dois híbridos intraespecífico da palma de óleo variedade Tenera (BRS C2501 e BRS C2528). As sementes de todos os materiais vegetais utilizados foram obtidas junto à Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, Brasil. O endocarpo das sementes foi envolvido em um tecido macio e quebrado cuidadosamente utilizando um martelo de madeira para evitar danos ao endosperma (amêndoa) e ao embrião. Após a retirada do endocarpo, as sementes foram lavadas em água corrente e sabão neutro por, aproximadamente, 5 min e em seguida levadas à câmara de fluxo laminar para assepsia em álcool etílico 70% por 1 min e hipoclorito de sódio 2,5% por 15 min. Após lavagem por três vezes em água destilada e autoclavada, os explantes foram incubados em água destilada e autoclavada por 48 h para facilitar a retirada do embrião. Os embriões obtidos foram utilizados para o experimento de indução de calos (Experimento 2) e teste de viabilidade (teste de tetrazólio ou TCT), conduzidos paralelamente.

Para o Experimento 2, os embriões foram submetidos à assepsia em álcool etílico 70% por 1 min e em hipoclorito de sódio 1% por 10 min, seguindo-se de três lavagens em água destilada e autoclavada. Como tratamentos, foram utilizados dois meios de cultura (MS e Y3), combinados a 475 µM Picloram e/ou 475 µM 2,4-D (Tabela 2). Os meios de cultura foram

suplementados com L-glutamina (0,5 g L<sup>-1</sup>), sacarose (20 g L<sup>-1</sup>), phytigel (2,5 g L<sup>-1</sup>) e carvão ativado (2,5 g L<sup>-1</sup>), conforme Silva et al. (2012). O pH dos meios foi ajustado em 5.8 e os mesmos foram autoclavados a 120 °C por 20 min. Após a inoculação, os tubos de ensaio contendo os embriões zigóticos foram mantidos em câmara de crescimento tipo BOD (EL 202/E, Eletrolab®, São Paulo, Brasil), no escuro, à temperatura média de 25 ± 2 °C e umidade relativa do ar de 50 ± 2%. Subcultivos foram realizados a cada 60 dias e avaliação do experimento foi realizada após 210 dias da inoculação, avaliando-se a porcentagem de indução de calos e oxidação.

O Experimento 2 foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com seis tratamentos (Tabela 2) e cinco repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída de um tubo de ensaio contendo um embrião zigótico. Os dados de indução de calos e oxidação foram submetidos ao teste de normalidade e, como não apresentaram distribuição normal mesmo após a transformação angular (Fischer 1922, Zubin 1935, Bartlett, 1947), foram submetidos ao teste de qui-quadrado e convertidos em porcentagem. As análises estatísticas foram realizadas no software R (v.4.0.5 R Core Team, 2021).

A viabilidade dos embriões foi avaliada por meio do teste de tetrazólio (2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio ou TCT) de acordo com Lopes (2013). Os embriões foram imersos em 0,5% TCT por 17 h, em câmara de crescimento tipo BOD, no escuro, à temperatura média de 39 ± 2 °C. Após este tempo, cada embrião foi classificado de acordo com a coloração resultante da redução do TCT, com base na intensidade, uniformidade e local da coloração e na turgescência aparente dos tecidos (Lopes, 2013). Foram considerados viáveis os embriões que apresentavam coloração vermelho claro brilhante na parte superior e turgidez no haustório. Embriões que não apresentavam mudança de coloração ou possuíam tecidos flácidos no haustório foram considerados inviáveis.

**Tabela 2.** Composição dos meios de cultura (tratamentos) do Experimento 2 em função do tipo de meio (Y3 e MS) e de diferentes tipos de auxinas (Picloram e 2,4-D).

Tratamento	Meio básico	Auxina
T1'	MS	-
T2'		475 µM Picloram
T3'		475 µM 2,4-D
T4'	Y3	-
T5'		475 µM Picloram
T6'		475 µM 2,4-D

### 3. Resultados

### **3.1 Experimento 1 - Indução de calos embriogênicos a partir de flores de palma de óleo, HIE BRS Manicoré em função de doses de Picloram e 2,4-D combinadas com 2iP**

Independentemente da composição do meio de cultura, foi observado que parte dos explantes apresentaram um determinado grau de oxidação (Fig. 1). Essa oxidação variou de 46,7% no meio Y3 + 9  $\mu$ M Picloram + 12  $\mu$ M 2iP a 90% em meio MS sem adição de reguladores de crescimento (Tabela 3).

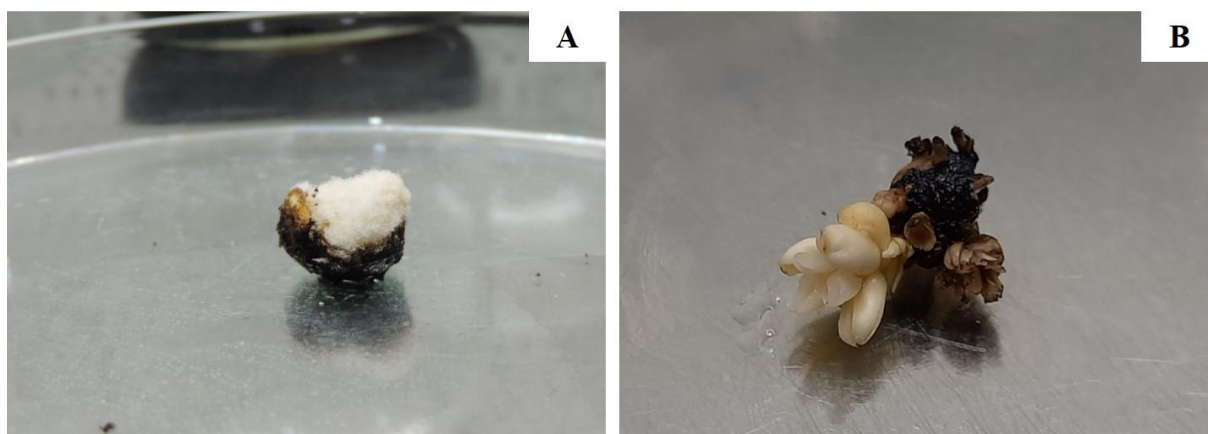
Nos meios Y3, a porcentagem de oxidação aumentou com a adição de Picloram e 2iP em relação ao meio sem reguladores de crescimento. Ainda no meio Y3, a porcentagem de oxidação foi maior na presença de 9  $\mu$ M 2,4 D e de 9  $\mu$ M 2,4 D combinado a 6  $\mu$ M 2iP em relação ao meio Y3 sem reguladores. Por outro lado, uma redução na porcentagem de oxidação foi observada em meio Y3 acrescido de 9  $\mu$ M 2,4 D e 12  $\mu$ M 2iP quando comparado ao meio Y3 sem reguladores (Tabela 3).

Nos meios MS, a máxima porcentagem de oxidação de explantes (90%) foi observada no meio MS sem reguladores de crescimento (Tabela 3). Uma diminuição significativa da porcentagem de oxidação foi observada na presença das auxinas e da citocinina, particularmente quando a auxina utilizada foi o 2,4 D. Portanto, a porcentagem de oxidação reduziu de 90% no controle (MS sem reguladores) para 56,7% na presença de 9  $\mu$ M 2,4 D e 6 ou 12  $\mu$ M 2iP (Tabela 3). Contudo, a oxidação dos explantes não impediu a formação de calos e flores (Fig. 1), mas a indução dessas estruturas foi demasiadamente lenta, tendo o início da formação de calos e flores sido observado a partir de 60 e 90 dias, respectivamente.

Os resultados apresentados na Tabela 4 evidenciam que a maior parte dos explantes inoculados não apresentaram calos e flores ao final do período experimental de 240 dias. Assim, a máxima porcentagem de indução de calos foi obtida no meio de cultura Y3 + 9  $\mu$ M Picloram + 12  $\mu$ M 2iP (53,3%), seguido dos meios Y3 sem reguladores de crescimento (20%), Y3 + 9  $\mu$ M Picloram + 6  $\mu$ M 2iP (10%) e Y3 + 9  $\mu$ M 2,4-D (3,3%) (Tabela 4). Dos meios MS, a indução de calos só foi observada no meio que continha 9  $\mu$ M Picloram e 6  $\mu$ M 2iP (Tabela 4). Por outro lado, a indução de flores *in vitro* foi observada em nove meios de cultura. Nesse caso, a máxima porcentagem de indução de flores (33,3%) ocorreu no meio Y3 acrescido de 9  $\mu$ M 2,4-D e 6 ou 12  $\mu$ M 2iP e nos meios MS sem reguladores de crescimento ou na presença de 9  $\mu$ M Picloram (Tabela 4). Além disso, foi observado que apenas os calos formados no meio MS acrescido de 9  $\mu$ M Picloram e 6  $\mu$ M 2iP não apresentaram oxidação (Tabela 5). Por outro lado, não houve oxidação de flores em nenhum dos meios de cultura utilizados.



Do exposto, os resultados obtidos no Experimento 1 permitem inferir que (i) a oxidação do explante não impede a diferenciação de calos e flores *in vitro*; (ii) o melhor meio indutor de calos (Y3 + 9  $\mu$ M Picloram + 12  $\mu$ M 2iP) não induz a formação de flores *in vitro*, porém os calos formados nesse meio apresentaram 100% de oxidação; e (iii) os melhores meios para indução de flores *in vitro* não induziram a formação de calos.



**Figura 1.** Indução de calo (A) e flor (B) a partir de explantes parcialmente oxidados do HIE BRS Manicoré após 240 dias de cultivo *in vitro* em meio Y3 + Picloram 9  $\mu$ M + 2ip 12  $\mu$ M (A) e meio MS + Picloram 9  $\mu$ M (B). Imagens representativas de seis repetições por tratamento.

**Tabela 3.** Teste qui-quadrado para porcentagem de oxidação dos explantes do HIE BRS Manicoré cultivados *in vitro* por 240 dias em meios de cultura Y3 e MS com diferentes combinações de auxina e citocinina.

Meio de cultura			Explantes oxidados (%)	
Sais	Auxina	Citocinina		
Y3	-	-	56,7	
	9 $\mu$ M Picloram	-	60,0	
	9 $\mu$ M Picloram	6 $\mu$ M 2iP	63,3	
	9 $\mu$ M Picloram	12 $\mu$ M 2iP	80,0	
	9 $\mu$ M 2,4 D	-	80,0	
	9 $\mu$ M 2,4 D	6 $\mu$ M 2iP	86,7	
	9 $\mu$ M 2,4 D	12 $\mu$ M 2iP	46,7	
	MS	-	-	90,0
MS	9 $\mu$ M Picloram	-	76,7	
	9 $\mu$ M Picloram	6 $\mu$ M 2iP	70,0	
	9 $\mu$ M Picloram	12 $\mu$ M 2iP	70,0	
	9 $\mu$ M 2,4 D	-	60,0	
	9 $\mu$ M 2,4 D	6 $\mu$ M 2iP	56,7	
	9 $\mu$ M 2,4 D	12 $\mu$ M 2iP	56,7	
	$X^2 = 29,43$ GL = 13 $p$ -valor = 0.006**			

\*\* $p$ -valor < 1%

**Tabela 4.** Teste qui-quadrado para estruturas formadas a partir de flores femininas do HIE BRS Manicoré cultivadas *in vitro* por 240 dias em meios de cultura Y3 e MS com diferentes combinações de auxina e citocinina.

Meio de cultura			Explantos	Explantos	Explantos	Explantos
Sais	Auxina	Citocinina	com calos (%)	sem calos (%)	com flor (%)	Explantos sem flor (%)
Y3	-	-	20.0	80.0	0	100
	9µM Picloram	-	0.00	100.0	16,7	83,3
	9 µM Picloram	6 µM 2iP	10.0	90.0	16,7	83,3
	9 µM Picloram	12 µM 2iP	53.3	46.7	0	100
	9 µM 2,4 D	0	3.3	96.7	16,7	83,3
	9 µM 2,4 D	6 µM 2iP	0.0	100.0	33,3	66,7
	9 µM 2,4 D	12 µM 2iP	0.0	100.0	33,3	66,7
MS	-	-	0.0	100.0	33,3	66,7
	9 µM Picloram	-	0.0	100.0	33,3	66,7
	9 µM Picloram	6 µM 2iP	16.7	83.3	0	100
	9 µM Picloram	12 µM 2iP	0.0	100.0	0	100
	9 µM 2,4 D	-	0.0	100.0	0	100
	9 µM 2,4 D	6 µM 2iP	0.0	100.0	16,7	83,3
	9 µM 2,4 D	12 µM 2iP	0.0	100.0	16,7	83,3
			X <sup>2</sup> = 125,98 GL = 13		X <sup>2</sup> = 61,20 GL = 13	
			p-valor < 0,001***		p-valor < 0,001***	

\*\*\*p-valor < 0,1%

**Tabela 5.** Teste qui-quadrado para porcentagem de oxidação de calos produzidos *in vitro* a partir de seções de flores do HIE BRS Manicoré cultivadas por 240 dias em meios de cultura Y3 e MS com diferentes combinações de auxina e citocinina.

Meio de cultura			Calos oxidados (%)	Calos não oxidados (%)
Sais	Auxina	Citocinina		
Y3	-	-	33,3	66,7
	9 µM Picloram	6 µM 2iP	66,7	33,3
	9 µM Picloram	12 µM 2iP	100	0
	9 µM 2,4 D	-	100	0
MS	9 µM Picloram	6 µM 2iP	0	100
			X <sup>2</sup> = 314.82 GL = 4 p-valor < 0.001***	

\*\*\*p-valor < 0,1%

### 3.2 Experimento 2 - Indução de calos embriogênicos a partir de embriões zigóticos de palma de óleo, HIE BRS Manicoré

A indução de calos a partir de embriões zigóticos foi muito limitada e variou tanto em função do meio de cultura quanto com o material vegetal utilizado (Tabela 6). Assim, a indução

de calos foi observada somente nos híbridos BRS 2501 e BRS 2528 (Fig. 2) e obrigatoriamente na presença de auxina (Tabela 6).

Para o híbrido BRS 2501, a indução de calos não foi influenciada pela composição de sais do meio de cultura (i.e., Y3 ou MS), mas variou com o tipo de auxina utilizada. Nesse caso, a taxa de indução de calos foi 100% maior nos meios contendo 2,4-D que nos meios contendo Picloram (Tabela 6). Já para o híbrido BRS 2528, a maior taxa de indução de calos foi observada no meio MS + 475  $\mu$ M Picloram (40% de taxa de indução de calos), enquanto os meios MS e Y3 na presença de 2,4-D promoveram a indução de calos em apenas 10% dos embriões zigóticos (Tabela 6). Do exposto, pode-se inferir que a indução de calos embriogênicos nos híbridos avaliados é diferentemente influenciada pela composição de sais do meio de cultura e pelo tipo de auxina.

As diferenças observadas nas taxas de indução de calos dentre híbridos podem ser, em parte, relacionadas às diferentes viabilidades dos embriões zigóticos utilizados como explante, conforme evidenciado pelo teste de tetrazólio. Neste caso, o híbrido BRS 2528 apresentou 61% de embriões viáveis (Fig. 3C e 3F); seguido do híbrido BRS 2501, com 50% dos embriões viáveis (Fig. 3D e 3F). Por outro lado, os embriões zigóticos do HIE BRS Manicoré mostraram-se inviáveis (Fig. 3E e 3F).

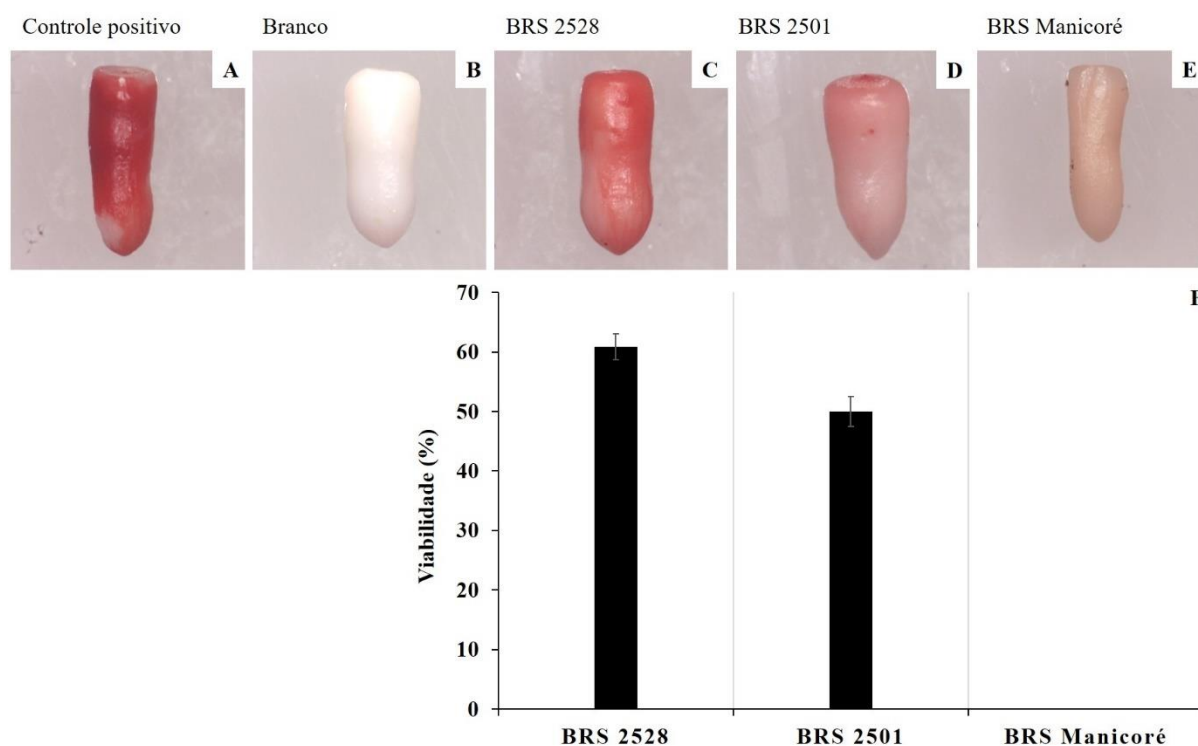


Figura 2 – Indução de calos em embriões zigóticos dos híbridos de palma de palma de óleo BRS 2501 (Fig. 2A), BRS 2528 (Fig. 2B) e BRS Manicoré (Fig. 2C) em meio de cultura Y3 + 2,4-D 475  $\mu$ M.

**Tabela 6.** Taxa de indução de calos embriogênicos (%) a partir de embriões zigóticos de três híbridos de palma de óleo cultivados em diferentes composições de meio de cultura.

Meio de cultura		BRS Manicoré		BRS 2501		BRS 2528	
Sais	Auxina	Embrião com calos (%)	Embrião sem calos (%)	Embrião com calos (%)	Embrião sem calos (%)	Embrião com calos (%)	Embrião sem calos (%)
Y3	-	0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0
	475 $\mu$ M Picloram	0	100.0	20.0	80.0	0.0	100.0
	475 $\mu$ M 2,4-D	0	100.0	40.0	60.0	10.0	90.0
MS	-	0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0
	475 $\mu$ M Picloram	0	100.0	20.0	80.0	40.0	60.0
	475 $\mu$ M 2,4-D	0	100.0	40.0	60.0	10.0	90.0
		X <sup>2</sup> = NA, GL= 5 <i>p</i> -valor =NA		X <sup>2</sup> = 84,86 GL= 5 <i>p</i> -valor < 0,001		X <sup>2</sup> = 95,16 GL= 5 <i>p</i> -valor < 0,001	

\*\*\**p*-valor < 0,1%; NA – Sem número



**Figura 3.** Teste de viabilidade de embriões zigóticos de três híbridos de palma de óleo (BRS 2528, BRS 2501, BRS Manicoré) em função do padrão de coloração em 0.5% TCT (Fig. 3C, D e E). Como controle positivo foi utilizado um embrião zigótico de palma de óleo cv. Tenera (Fig. 3A); como controle negativo, os embriões dos híbridos (BRS 2528, BRS 2501, BRS Manicoré) foram incubados em água destilada (como exemplo, ilustra-se o embrião do híbrido BRS 2528, Fig. 3B). A porcentagem de viabilidade (Fig. 3F) foi calculada para cada híbrido quando comparada ao seu respectivo controle negativo.

## 4 Discussão

### 4.1 Experimento 1 - Indução de calos embriogênicos a partir de flores de palma de óleo, HIE BRS Manicoré em função de doses de Picloram e 2,4-D combinadas com 2iP

Os explantes obtidos a partir de flores tiveram níveis elevados de oxidação, acima de 47%. A oxidação de explantes é uma das maiores dificuldades enfrentadas no cultivo *in vitro* de palmeiras, pois a produção de compostos fenólicos, normalmente, inibe o crescimento e desenvolvimento dos explantes, podendo ocasionar a morte dos tecidos (Costa et al. 2006). No entanto, pode-se observar neste trabalho que, mesmo ocorrendo oxidação dos explantes, houve indução de calos e flores. Resultados similares foram obtidos por Monteiro et al. (2020), em inflorescências imaturas de híbrido de palma de óleo. Almeida et al. (2020), usando folhas imaturas de diferentes genótipos de palma de óleo variedade Pisífera, observaram níveis altos de oxidação (acima de 80%) a partir de 90 dias de cultivo, mesmo tendo adicionado carvão ativado ( $2,5 \text{ g L}^{-1}$ ) ao meio de cultura; e, esta oxidação ocorreu em todos os genótipos estudados.

Na tentativa de atenuar e/ou evitar a oxidação de explantes, alguns compostos são adicionados ao meio de cultura, tais como carvão ativado, polivinilpirrolidona (PVP), ácido ascórbico e ácido cítrico (Lin et al., 2007). Van Winkle et al. (2003) mencionam que, dentre diferentes antioxidantes, o carvão ativado tem sido utilizado com maior frequência aos meios de cultura com o objetivo de adsorver os compostos fenólicos tóxicos aos explantes. Devido à alta incidência de oxidação fenólica ocorrida em inflorescências imaturas de palma de óleo (*E. guineensis*) var. Pisífera, Teixeira et al. (1994) aumentaram as concentrações de carvão ativado no meio de cultura de 0,3% para 0,5%, tendo observado que a oxidação aumentou nos tratamentos em que a concentração de 2,4-D não foi alterada, porém, nos tratamentos que tiveram aumento na concentração de 2,4-D (de  $475 \mu\text{M}$  para  $500 \mu\text{M}$ ) juntamente com a concentração de carvão ativado, a oxidação diminuiu de 46% para 28%. Costa et al. (2006), relataram que, embora o carvão ativado seja usado como antioxidante, ele pode ocasionar a adsorção de outros componentes do meio de cultura, como, por exemplo, dos reguladores de crescimento (auxinas e citocinina), interferindo assim no padrão de desenvolvimento dos cultivos.

O processo de oxidação ocorre em função da liberação de compostos fenólicos ocorrido logo após o corte do tecido (Van Winkle et al., 2003) o que pode ocasionar diminuição na formação de calos em palmeiras (Viñas, Jiménez, 2011). Ribeiro et al. (2019), verificaram que proteínas antioxidantes envolvidas na resposta ao estresse aumentaram na fase inicial (14 dias) do cultivo *in vitro* de folhas imaturas de híbrido entre *E. Oleifera* x *E. guineense*. Este resultado

é uma resposta da planta na tentativa de controlar o estresse na fase de indução de calos e isso pode ser um fator determinante para a aquisição de competência embriogênica na palma de óleo. Para Jayanthi et al. (2015), em alguns casos a oxidação não chega a ser prejudicial à algumas culturas, parecendo ser um requisito para formação de calos.

Neste trabalho, a oxidação pode ter limitado a formação de calos, mas não impediu que explantes, mesmo oxidados, induzissem a diferenciação de calos embriogênicos, tendo as respostas de indução de calos sido, em sua maioria, dependentes de auxina. De acordo com Silva-Cardoso (2020), as respostas calogênicas em tecidos foliares de híbrido de palma de óleo em meio com auxina induz modificações no padrão de expressão gênica mediadas, provavelmente, por alterações nos níveis de metilação de DNA, as quais possivelmente incrementam a plasticidade celular, possibilitando a expressão de genes importantes para a proliferação celular seguida ou em paralelo a aquisição da totipotência.

No Experimento 1, 86,6 % dos calos obtidos foram induzidos em meio Y3 e os demais em meio MS. Este resultado difere daqueles relatados por Constantin et al. (2015), em que a maioria dos calos (87%) induzidos a partir de explantes obtidos de folhas imaturas de palma de óleo foram obtidos em meio MS + 107,41  $\mu\text{M}$  ácido naftaleno acético (ANA). Ademais, a capacidade de atividade das células meristemáticas de induzir calogênese foi reduzida na presença de 2,4-D no meio de cultura (Constantin et al. 2015).

Guedes (2008), usando inflorescências imaturas femininas de palma de óleo em meio de cultura Y3 combinado a diferentes concentrações de 2,4-D (0; 225; 450 e 675  $\mu\text{M}$ ), verificou, após 90 dias de cultivo, que os melhores resultados na indução de estruturas com características embriogênicas (49%) foram obtidos em meio de cultura contendo 225  $\mu\text{M}$  2,4-D. Além disso, Guedes (2008) também demonstrou que concentrações de 2,4-D maiores que 225  $\mu\text{M}$  influenciaram negativamente a indução de calos, possivelmente em função do efeito fitotóxico aos explantes. Assim, a maior taxa de indução de calos obtida por Guedes (2008) foi próxima a maior taxa obtida neste trabalho (53,3%), a qual foi observada para o meio de cultura Y3 em presença de 9  $\mu\text{M}$  Picloram e 12  $\mu\text{M}$  2iP.

Em cultivo *in vitro* de explantes obtidos de folhas e inflorescências imaturas de tamareira (*Phoenix dactylifera*) em meio de cultura com concentração de sais MS e 2,4-D (0.5 e 10  $\text{mg L}^{-1}$ ), por aproximadamente cinco meses (150 dias), Fki et al. (2003) concluíram que a capacidade das inflorescências em formar calos foi muito maior em relação às folhas. Ademais, a formação de calos a partir desses explantes demandou de quatro a oito meses de cultivo.

## **4.2 Experimento 2 - Indução de calos embriogênicos a partir de embriões zigóticos de pama de óleo, HIE BRS Manicoré**

No Experimento 2, a indução de calos embriogênicos a partir de embriões zigóticos foi baixa e ocorreu somente em dois híbridos (BRS 2501 e BRS 2528) e na presença de auxinas no meio de cultura. Alguns autores mencionam que as respostas a indução de calos com competências embriogênicas não depende somente das condições de cultivo, mas também do genótipo utilizado (Jiménez 2001; Rival e Parveez 2004; Thuzar et al. 2012; Constantin et al. 2015).

Para obter calos embriogênicos, Gomes et al. (2016) cultivaram embriões zigóticos por seis meses em meio MS com Picloram ( $108,6 \text{ mg L}^{-1}$ ). Esse tempo foi menor que o tempo de execução deste trabalho (210 dias). Contudo, foi demonstrado aqui, através do teste de tetrazólio, que a baixa indução de calos embriogênicos observada pode estar relacionada à baixa viabilidade dos embriões zigóticos utilizados. Essa baixa viabilidade deve ter exercido algum efeito tanto no tempo necessário para induzir calogênese quanto na taxa de calos induzidos propriamente dito.

Segundo Soh et al. (2011) e Constantin et al. (2015), as respostas à indução de calos embriogênicos geralmente são baixas (menor que 5%) em *E. guineensis*, independente da fonte de explante utilizada, e pode ocorrer respostas diferentes dentre genótipos, mesmo em condições semelhantes de cultivo. Tisserat et al. (1987), relata que a produção de calos em palmeiras é extremamente lenta.

## **5 Conclusão**

Os resultados obtidos demonstraram que é possível usar seções de flores produzidas *in vitro* para induzir calos visando a embriogênese somática em híbrido interespecífico BRS Manicoré e para isto o melhor meio foi o composto de sais de Y3 suplementado com  $9 \mu\text{M}$  Picloram e  $12 \mu\text{M}$  2iP. Contudo, a indução de calos embriogênicos a partir de embriões zigóticos depende do tipo de material vegetal, da composição do meio de cultura e da viabilidade do embrião zigótico. Nesse caso, a indução de calos no híbrido BRS 2501 foi maior em meio MS ou Y3 acrescido de  $475 \mu\text{M}$  2,4-D, e no híbrido BRS 2528 em meio MS acrescido de  $475 \mu\text{M}$  Picloram.

## Referências

- Almeida JAS (2007) Da folha à obtenção de embriões somáticos de Coffea. O Agrônomo, Campinas. 59(1):63-64.
- Almeida RF, Meira FS, Gomes HT, Balzon TA, Bartos PMC, Meira RO, Da Cunha RNV, Lopes R, Mehta A, Scherwinski-Pereira JE (2020) Capacity for somatic embryogenesis of adult oil palm genitors (*Elaeis guineensis*, var. Pisifera) from immature leaf tissues. South African Journal of Botany, 131:229-239. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.02.026>
- Carvalho JMFC (1999) Técnicas de micropropagação. Campina Grande: Embrapa-CNPQ. 1999. 39p.
- Carvalho M (2009) Embriogênese somática a partir de folhas imaturas e flores desenvolvidas in vitro em dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq). Tese. Universidade Federal de Viçosa.
- Cid LPB (1987) Regeneração de plantas de *Elaeis oleifera* e de seu híbrido com *Elaeis guineensis* via embriogênese somática. Pesquisa agropecuária brasileira. 22(1):109-113.
- Corley RHV, Tinker PB (2003) The oil palm. Blackwell Science, Oxford, 4 ed. <https://doi.org/10.1017/S001447970422244X>
- Costa FHS, Pereira JES, Pereira MAA, Oliveira JP (2006) Efeito da interação entre carvão ativado e N6-benzilaminopurina na propagação *in vitro* de bananeira, cv. Grand Naine (AAA). **Rev. Bras. Frutic.** 28(2):280-283. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452006000200028>
- Constantin M, Nchu WA, Godswill N-N, Wiendi NMA, Wachjar A, Frank NEG (2015) Induction of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq. var. Tenera) callogenesis and somatic embryogenesis from young leaf explants. J Appl Biol Biotechnol 3:4–10. <https://doi.org/10.7324/JABB.2015.3402>
- Duval Y, Engelmann f, Durand-gasselin T (1995) Somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). In: Bajaj Y. P. S. (ed). Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I, Biotechnology in Agriculture and Forestry. 30:335–352.
- Fki L, Masmoudi, R, Drira N, Rival A (2003). An optimized protocol for plant regeneration from embryogenic suspension cultures of date palm, *Phoenix dactylifera* L., cv. Deglet Nour. Plant Cell Reports. 21:517–524. <https://doi.org/10.1007/s00299-002-0558-5>
- Guedes RS (2008) Embriogênese somática e regeneração de plantas de dendezeiro. Dissertação, Universidade Federal do Acre.
- Fehér A, Pasternak, TP.; Dudits D (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 74:201- 228.
- Gomes HT, Bartos PMC, Balzon, TA, Scherwinski-Pereira JE (2016) Regeneration of somatic embryos of oil palm (*Elaeis guineensis*) using temporary immersion bioreactors. Industrial Crops and Products 89:244-249. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.05.021>
- Jayanthi M, Susanthi B, Murali Mohan N, Mandal PK (2015) In vitro somatic embryogenesis and plantlet regeneration from immature male inflorescence of adult dura and tenera palms of *Elaeis guineensis* (Jacq.). SpringerPlus 4:256. <https://doi.org/10.1186/s40064-015-1025-4>
- Jiménez VM (2001) Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on to the role of endogenous hormones. Rev Bras Fisiol Veg 13:196–223. <https://doi.org/10.1590/S0103-31312001000200008>



- Kanchanapoom K, Domyoas P, Pádua MS, Paiva LV, Labory CRG, Alves E, Stein VC (2013) Induction and characterization of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) pro-embryogenic masses. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 85(4):1545-1556.
- Monteiro MGT, Souza JMM, Pinheiro, HÁ, Lemos OF, Oliveira RP, Boás BB, Souza FIB (2020) In Vitro Induction of Callus and Flowers in Immature Oil Palm Inflorescences. *JAS*. 8(4):712-724. <https://doi.org/10.5296/jas.v8i4.16114>
- Ribeiro DG, Almeida RF, Fontes W, Castro MS, Valle M, Ricart CAO, Cunha RNV, Lopes R, Scherwinski-Pereira JE, Mehta A (2019) Stress and cell cycle regulation during somatic embryogenesis plays a key role in oil palm callus development. *J. Proteomics*, 192:137-146. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.08.015>
- Rival A, Parveez G (2004) *Elaeis guineensis*, oil palm. In: Litz R (ed) *Biotechnology of fruit and nut crops*. CABI Publishing, Wallingford, UK, pp 113–143 <http://dx.doi.org/10.1079/9780851996622.0000>
- Silva-Cardoso IMA, Meira RO, Neves JS, Souza ALX, Cunha RNV, Lopes R, Scherwinski-Pereira JE (2020) Dinâmica da metilação durante a indução de calos em explantes foliares de *Elaeis oleifera* x *E. guineensis* durante a embriogênese somática. VI Congresso Brasileiro De Recursos Genéticos. <https://icongresso.sbrg.itarget.com.br/anais/index/resultado/index/index/cc/3>
- Soh AC, Wong G, Tan CC, Chew PS, Chong SP, Ho YW, Wong CK, Choo CN, Nor-Azura h, Kubmar K (2011) Commercial-scale propagation and planting of elite oil palm clones: research and development towards realization. *Journal of Oil Palm Res*. 23:935-952.
- Teixeira JB, Söndahl MR, Kirby EG (1994) Somatic embryogenesis from immature inflorescences of oil palm. *Plant Cell Reports* 13:247–250. <https://doi.org/10.1007/BF00233313>
- Thuzar M, Vanavichit A, Tragoonrung S (2012) Recloning of regenerated plantlets from elite oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) cv . Tenera. *African J Biotechnol* 11:14761–14770. <https://doi:10.5897/AJB12.1351>
- Tisserat B (1987) Palm. In: Bonga, JM.; Durzan, DJ. (Ed) *Cell and tissue culture in forestry* Dordrecht: Martinus Nijhoff. p.339-356.
- Van Winkle S, Johnson S, Pullman, GS (2003) The impact of gelrite and activated carbon on the elemental composition of plant tissue culture media. *Plant Cell Reports* 21:1175-1182. <https://doi.org/10.1007/s00299-003-0637-2>
- Viñas M, Jiménez VM, (2011) Factores que influyen en la embriogénesis somática *in vitro* de palmas (Arecaceae). *Rev. Colomb. Biotecnol.* 13(2):229–242. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77621587023>
- Williams EG, Maheswaran G (1986) Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Annals of Botany*. 57:443-462.

