

LUIS EDUARDO JARAMILLO FLOREZ

**EFEITO DO pH NA MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO*  
DE MASSAS PRÓ-EMBRIOGÊNICAS DE PALMA DE ÓLEO  
(*Elaeis guineensis*)**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2018

LUIS EDUARDO JARAMILLO FLOREZ

**EFEITO DO pH NA MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO*  
DE MASSAS PRÓ-EMBRIOGÊNICAS DE PALMA DE ÓLEO  
(*Elaeis guineensis*)**

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

APROVADA: 21 de fevereiro de 2018.

---

Sebastián Giraldo Montoya

---

Ricardo Salles Tinoco

---

Rachel Ramos Soares

---

Sergio Yoshimitsu Motoike  
(Orientador)

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

T

J37e  
2018

Jaramillo Florez, Luis Eduardo, 1993-  
Efeito do pH na multiplicação *in vitro* de massas  
pró-embriogênicas de palma de óleo (*Elaeis guineensis*) / Luis  
Eduardo Jaramillo Florez. – Viçosa, MG, 2018.  
ix, 37f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Sérgio Yoshimitsu Motoike.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 32-37.

1. Dendezeiro - Propagação *in vitro*. 2. Dendezeiro -  
Embriologia. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento  
de Fitotecnia. Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia.  
II. Título.

CDD 22. ed. 633.8513

Dedico:

*A Deus, por dar-me a sabedoria e a força para superar esta etapa  
tão importante na minha vida.*

*À minha mãe Fanny por todo seu amor, apoio, paciência e motivação  
para tornar hoje tudo isto possível.*

*À minha família, especialmente aos meus tios Jorge, Rafael e Cláudia, a meus irmãos por me apoiarem e  
me darem a paz e tranquilidade no momento que mais a necessitei.*

*“O impossível custa um pouco mais, e derrotados são apenas aqueles que abaixam os braços e se entregam”.*

*-Jose Mujica.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus pelas oportunidades e bênçãos que me oferece sempre.

Ao Brasil, por ter-me acolhido e recebido como um dos seus filhos e ter-me oferecido experiências maravilhosas tanto na minha vida profissional como pessoal.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Departamento de Fitotecnia, pela oportunidade de realização da pós-graduação.

À Universidad del Tolima, minha “alma mater”, a qual me deu as bases do conhecimento que me fizeram um profissional.

Ao Professor Sergio Yoshimitsu Motoike, pela compreensão, confiança, amizade e por ter-me ajudado a crescer como pessoa e como profissional sendo um bom exemplo a seguir.

Aos Professores Carlos Sigueyuki Sedyama e Claudio Horst Bruckner pelo incentivo, apoio, colaboração e inclusão de novas ideias.

Aos amigos, Danielle Silva, João Alison, Vanessa Queiroz, Sebastián Giraldo, Rachel Ramos, Tamiris Elerati, e demais funcionários da UFV e do laboratório de Cultura de Tecidos, pela valiosa ajuda na condução deste trabalho.

Aos amigos Juan Camilo Rey, Laura Martinez, Nicolas Osorio, Erika Giraldo, Oscar Medina, Ximena Díaz, Cristian Conde, Andres Vanegas, Takefumi Ushimaru, Henry Eduardo, Daniel Bustos, Silvana Orozco, Luis Fagundes pela companhia, risadas e conselhos que me fizeram combater as adversidades longe de casa e aos demais amigos que me acompanharam e apoiaram neste processo.

Em especial, à minha família, pois foram as pessoas que me criaram e ensinaram os valores para que eu pudera tornar o homem que sou hoje. À minha mãe Fanny, meu pai Bernardo, minha avó Delia, minha tia Claudia, meu tio Jorge, meu tio Rafael e meu tio Juan, sem seu amor, conselhos e apoio infinito isto não teria sido possível.

## **BIOGRAFIA**

Luis Eduardo Jaramillo Florez, filho de Luis Bernardo Jaramillo Martinez e Fanny Florez Borja, nasceu em 11 de fevereiro de 1993 em Ibagué, Tolima, Colômbia.

Em 2014, graduou-se no curso de Agronomia na Universidad del Tolima, Tolima, Colômbia.

Em 2015, ingressou no programa de pós-graduação em Fitotecnia em nível de mestrado, concentrando suas atividades na área de “Genética e Melhoramento de Plantas” na Universidade Federal de Viçosa.

Defendeu sua dissertação em fevereiro de 2018.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>vi</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>viii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>3</b>
2.1. Aspectos botânicos da palma de óleo.....	3
2.2. Aspectos gerais da palma de óleo. ....	4
2.3. Micropropagação <i>in vitro</i> .....	5
2.4. Embriogênese somática.....	6
2.5. Solução nutritiva .....	8
<b>3. OBJETIVO .....</b>	<b>12</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>13</b>
4.1. Local de condução dos experimentos. ....	13
4.2. Fase de multiplicação.....	13
4.3. Fase de maturação .....	15
4.4. Fase de germinação. ....	16
4.5. Análise estatística.....	16
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>17</b>
5.1. Fase de multiplicação.....	17
5.2. Fase de maturação .....	21
5.3. Fase de germinação .....	25
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>27</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>28</b>
<b>8. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>28</b>
<b>9. ANEXOS .....</b>	<b>30</b>
<b>10. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA. ....</b>	<b>32</b>

## RESUMO

JARAMILLO, Luis Eduardo, Florez, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa fevereiro de 2018. **Efeito do pH na multiplicação *in vitro* de massas pró-embriogênicas de palma de óleo (*Elaeis guineensis*)**. Orientador: Sergio Yoshimitsu Motoike.

A palma de óleo (*Elaeis guineensis*) conhecida no Brasil como dendê, é uma espécie nativa da África equatorial. Seu fruto possui um alto teor de óleo, que é o seu principal produto. Devido a seu uso industrial, alimentício e sua alta produtividade, o dendê se tornou a maior produtora de óleo vegetal do mundo, sendo responsável pela produção de 35% de todo óleo produzido a nível mundial. Embora sua reprodução seminífera seja eficiente e bastante difundida, do ponto de vista do melhoramento vegetal, a propagação seminífera apresenta desvantagens devido à alta heterozigosidade da espécie. Assim, a micropropagação do dendê é uma opção atrativa e vantajosa para a reprodução desta cultura. No entanto, a micropropagação do dendê apresenta baixo rendimento na multiplicação e regeneração de embriões somáticos. O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito do pH do meio de cultura *in vitro*, no crescimento e desenvolvimento de massas pró-embriogênicas de dendê em meio de cultura tamponado com MES hidratado. Cinco clones de *Elaeis guineensis* híbrido, *Tenera*, AM21 (Kigoma), AM23 (Deli x Lame Embrapa), AM24 (Deli x Lame), PL10 (Deli x Lame) e PL26 (Deli x Lame) foram cultivados em meio de cultura Y3 (Euweens, 1973) modificado por Carvalho (2009), em seis pHs (6.0, 5.5, 5.0, 4.5 e 4.0) e tamponados com 25 mM de MES hidratado, menos o tratamento testemunha (sem tampão) no qual o pH foi de 5,7. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 5x6 com cinco clones, seis níveis de pH com cinco repetições. Após 60 dias na ausência de luz, foram avaliadas as massas pró-embriogênicas resultantes, sendo separadas em embriogênicas e não embriogênicas. Observou-se que massas pró-embriogênicas de dendê se multiplicam melhor em pHs mais baixos, sendo a máxima multiplicação observada entre 4.5 e 5.0. No entanto, o PL 26 apresentou melhor taxa de multiplicação em meio de cultura sem tamponamento. Para monitorar e avaliar o efeito dos tratamentos, massas pró-embriogênicas obtidas dos tratamentos foram subcultivadas em meio de regeneração. Após 45 dias, o clone AM23 obteve o maior número de embriões regenerados em massas pró-embriogênicas obtidas por subcultivo, em meio de multiplicação com pHs ajustados para 4.5 e 5.0. Para os clones AM21, AM24 e PL26 os tratamentos não foram diferentes com  $p > 0,05$ . No entanto, o clone PL10 obteve maior



número de embriões em massas pró-embriogênicas obtidas por subcultivo em meio de multiplicação com pHs ajustados para 4.5, 6.0 e no tratamento testemunha.

## ABSTRACT

JARAMILLO, Luis Eduardo, Florez, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2018. **Effect of pH on *in vitro* multiplication of pro-embryogenic palm oil masses (*Elaeis guineensis*)**. Advisor: Sergio Yoshimitsu Motoike.

The oil palm (*Elaeis guineensis*) known in Brazil as Dendê, is a species native to equatorial Africa. Its fruit has a high oil content, which is its main product. Due to its industrial use, food and its high productivity, palm oil has become the largest producer of vegetable oil in the world, being responsible for the production of 35% of all oil produced worldwide. Although its seminiferous reproduction is efficient and widespread, from the standpoint of plant breeding, seminiferous propagation has disadvantages due to the high heterozygosity of the species. Thus, the micropropagation of palm oil is an attractive and advantageous option for the reproduction of this culture. However, the micropropagation of palm oil presents low yield in the multiplication and regeneration of somatic embryos. The objective of this work was to study the effect of the pH of the culture medium *in vitro* on the growth and development of pro-embryogenic dendê masses in culture medium buffered with hydrated MES. Five clones of *Elaeis guineensis* hybrid, Tenera, AM21 (Kigoma), AM23 (Deli x Lame Embrapa), AM24 (Deli x Lame), PL10 (Deli x Lame) and PL26 (Deli x Lame) were grown in Y3 culture medium (Euweens, 1973) modified by Carvalho (2009), at six pHs (6.0, 5.5, 5.0, 4.5 and 4.0) and buffered with 25 mM hydrated MES, minus the control treatment (without buffer) in which the pH was 5.7. The experiment was conducted in a completely randomized design (DIC) in a 5x6 factorial scheme with five clones, six pH levels with five replicates. After 60 days in the absence of light, the resulting pro-embryogenic masses were evaluated, being separated into embryogenic and non-embryogenic. It was observed that pro-embryogenic dendê masses multiply better at lower pHs, with maximum multiplication observed between 4.5 and 5.0. However, PL 26 showed a better multiplication rate in culture medium without buffering. To monitor and evaluate the effect of the treatments, pro-embryogenic masses obtained from the treatments were subcultured in regeneration medium. After 45 days, clone AM23 obtained the highest number of embryos regenerated in pro-embryogenic masses obtained by subculture, in medium of multiplication with pHs adjusted to 4.5 and 5.0. For the AM21, AM24 and PL26 clones the treatments were not different at  $p > 0.05$ . However, clone PL10 obtained a larger number of embryos in pro-embryogenic masses

obtained by subculture in medium of multiplication with pHs adjusted to 4.5, 6.0 and in the control treatment.

## 1. INTRODUÇÃO

A Palma de óleo (*Elaeis guineensis*, Jacq) é uma planta perene de origem africana da família Areaceae, de cujos frutos podem-se extrair dois tipos de óleo: o óleo de palma e o óleo de palmiste, ambos com amplo emprego alimentar e industrial. A palma de óleo é a oleaginosa de maior produtividade conhecida no mundo, podendo fornecer anualmente de quatro a seis toneladas de óleo por hectare (MÜLLER, 1980). Individualmente, responde por 40% da produção mundial de óleo, contabilizando 67,4 milhões de toneladas, ocupando o primeiro lugar em produção mundial de óleo dentre as oleaginosas exploradas pelo homem (USDA, 2017).

Esta espécie é cultivada no trópico equatorial onde se encontram grandes extensões de área de produção. Os maiores produtores são a Indonésia, Malásia, Tailândio sudeste asiático; Nigéria, Costa do Marfim e Gana na África; Colômbia, Peru, Brasil, Costa Rica, Honduras e Equador nas Américas; e Papua Nova Guinéa Oceania (EPOA, 2014).

Os principais produtos do dendezeiro são os óleos de palma e de palmiste, extraídos industrialmente da polpa do fruto e da amêndoa, respectivamente. Por essa razão, essa cultura vem assumindo, cada vez mais, maior importância, graças à crescente demanda por óleos vegetais, para a área alimentícia, medicinal, cosmética, industrial e, principalmente, para o biodiesel, além de ser fonte reconhecida de vitaminas A e E (BOARI, 2008).

Por ser uma planta alógama, as populações e progênies de dendê são geneticamente heterogêneas e heterozigotas. Obter sementes melhoradas em espécies perenes com essa característica reprodutiva é um processo longo e dispendioso. Assim, uma grande quantidade dos cultivares melhorados de espécies perenes são multiplicados por propagação vegetativa. Contudo, a palma de óleo é uma espécie monopodial de fuste único que não permite a aplicação de técnicas convencionais de propagação vegetativa, sendo a micropropagação a única forma de se reproduzir vegetativamente (PLATA & REY, 2006).

A micropropagação é uma forma de multiplicação assexuada, conduzida sob condições adequadas de assepsia, nutrição e fatores ambientais, como fotoperíodo e temperatura. Nessa técnica, explantes das matrizes elites são induzidas à multiplicação celular *in vitro*, mediada por fitorreguladores, produzindo grande quantidade de novos

indivíduos, genotípica e fenotipicamente idênticos. O fundamento básico da micropropagação é a totipotência celular, segundo a qual, qualquer célula viva no organismo vegetal contém a informação genética necessária à regeneração de uma planta completa (FEHÉR, PASTERNAK & DUDITS, 2003).

A micropropagação pode ser obtida pela proliferação de gemas axilares ou pela indução de gemas adventícias, em um evento morfogênico conhecido por organogênese, ou pela indução da embriogênese somática. Em palma de óleo, a embriogênese somática é a via preferida de multiplicação (MONTEIRO & SCHERWINSKI-PEREIRA, 2013). A embriogênese somática é o processo pelo qual as células somáticas haplóides ou diplóides desenvolvem-se em plantas diferenciadas através de estágios embriológicos característicos, sem fusão de gametas (WILLIAMS & MAHESWARAN, 1986).

A regeneração da palma de óleo através da embriogênese somática compreende quatro etapas: calogênese, embriogênese, desenvolvimento do meristema apical e enraizamento (DUVAL, ENGELMANN & DURAND-GASSELIN, 1995). O potencial embriogênico de uma cultura reside principalmente em uma subpopulação da cultura, que é denominada "massa pró-embriogênica". Massa pró-embriogênica é um conjunto de células somáticas em constante divisão, os quais podem ser induzidos a se regenerarem embriões somáticos (WILLIAMS & MAHESWARAN, 1986). No entanto, nem todos os clones de palma de óleo produzem massas pró-embriogênicas viáveis (CORLEY & TINKER, 2003).

Em cultura de tecidos e células, é fundamental entender a interação entre o balanço nutricional do meio de cultura e as massas pró-embriogênicas para uma eficiente multiplicação e desenvolvimento. Hipoteticamente substâncias ácidas podem causar uma ativação da  $H^+$ -ATPase da membrana plasmática criando uma variação do gradiente eletroquímico de  $H^+$  que vai provocar um aumento positivo na absorção de nutrientes em especial íons de carga negativa (FAÇANHA, OKOROKOVA, *et al.*, 2002). Este aumento do gradiente eletroquímico origina uma acidificação do apoplasma facilitando o aumento em tamanho e elasticidade das células por meio do rompimento de ligações nas paredes celulares (CANELLAS & SANTOS, 2005). Além da influência das substâncias ácidas sobre a absorção de nutrientes, a quantidade absorvida também depende da área superficial das células (MACHADO, VARGAS, *et al.*, 2009).

Por conseguinte, o pH dos meios de cultura é um fator crítico para o sucesso da multiplicação de massas pró-embriogênicas. No entanto, o pH do meio de cultura é

geralmente negligenciado em estudos de embriogênese somática. Tradicionalmente em cultura de tecidos de palma de óleo o pH é ajustado a  $5.7 \pm 0.1$ . Uma vez que é bem sabido que o crescimento celular e o metabolismo alteram o pH do meio, é interessante determinar se o pH torna-se inibitório ou potencializa o processo de multiplicação para alguns explantes e fases da embriogênese somática, portanto, estratégias poderiam ser desenvolvidas para controlar o pH do meio (PULLMAN, JOHNSON, *et al.*, 2005). Dentre estas estratégias, sugere-se o uso de agentes tampão de pH como o MES hidratado.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Aspectos botânicos da palma de óleo.

O gênero *Elaeis*, do grego *elaion* (óleo), pertence à classe Liliopsida (Monocotiledônea), ordem arcales (palmales), família Arecaceae (Palmaceae), subfamília Arecoideae, tribo cocoseae (Cocoinae), subtribo Elaeidinae (RIOS, VIEIRA, *et al.*, 2012). A palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.), ou dendezeiro, é uma palmeira originária da Costa Ocidental da África (Golfo da Guiné), sendo encontrada em povoamentos subespontâneos desde o Senegal até Angola. Foi introduzida no Brasil ainda no século XVII. Essa palmeira está bem adaptada à região Amazônica, onde encontram condições de alta temperatura, intensidade luminosa e chuvas durante todo o ano, necessários ao bom desenvolvimento da cultura (MONTEIRO & SCHERWINSKI-PEREIRA, 2013).

*Elaeis guineensis* é uma palmeira que pode atingir até 20 metros de altura e tem apenas um ponto de crescimento terminal. Há cerca de 40 a 60 folhas do centro da depressão até o ponto mais alto na borda. As folhas são pinadas, o tronco é colunar solitário, com internódios curtos. O desenvolvimento da folha é inicialmente muito lento. Estas permanecem guardadas por aproximadamente 2 anos, e após esse período se desenvolvem rapidamente em uma "lança" central e, finalmente, se abre. O eixo da folha, ou ráquis, é duro e fibroso e pode atingir até 8 metros (CORLEY & TINKER, 2003). A produção de folhas determina o rendimento de racemos de curto prazo, uma vez que para cada folha corresponde uma inflorescência cujo tamanho e desenvolvimento depende do estado fisiológico da palmeira (LOPEZ & CAYÓN, 2014). Há espinhos curtos no pecíolo da folha e dentro do cacho de frutos. A radícula principal cresce a uma taxa de

aproximadamente 4,4 mm / dia, até um comprimento máximo de cerca de 50 cm (JOURDAN & REY, 1997).

O dendezeiro é geralmente monóico, as flores masculinas e femininas ocorrem separadamente na mesma planta, geralmente em inflorescências distintas, que se desenvolvem nas axilas das folhas. Os frutos são agrupados em cachos grandes e compactos. O fruto é uma drupa séssil variando de quase esférico a ovóide ou alongado e ligeiramente com abaulamento no topo. O comprimento varia de cerca de 2 cm a mais de 5 cm, em peso de 3 g a mais de 30 g. O pericarpo da fruta consiste no exocarpo externo ou na pele, no mesocarpo ou na polpa e no endocarpo ou na casca. A polpa do fruto, que fornece óleo de palma, envolve uma noz, cuja capa encerra a semente da palmeira (CORLEY & TINKER, 2003).

## 2.2. Aspectos gerais da palma de óleo.

O fruto da palma de óleo fornece dois tipos diferentes de óleo, como óleo de palma e óleo de palmiste. Os principais subprodutos do óleo de palma são a estearina e oleína de palma, que tem vários usos na indústria de alimentos. Uma das principais características dos produtos derivados do óleo de palma é que ele oferece uma fonte natural de gordura sólida sem ácidos graxos trans, que tem efeitos negativos na saúde humana (GARCÉS & SÁNCHEZ, 1997).

A tendência mundial nos últimos anos tem sido a busca por fontes combustíveis mais limpas e renováveis, em substituição à fontes não renováveis, o o petróleo. Neste contexto, o Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB), de iniciativa nacional e criado por Decreto em 23 de dezembro de 2003, tem como principal meta, desenvolver a tecnologia de produção do biodiesel, visando diminuir a dependência do petróleo, reduzir a emissão de gases causadores do efeito estufa e gerar emprego e renda, principalmente pelo estímulo da agricultura familiar (MIRAGAYA, 2005).

O biodiesel é uma denominação genérica para combustíveis e aditivos derivados de fontes renováveis, como os óleos de soja e palma de óleo. Entre as plantas oleaginosas potenciais, a palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.) apresenta grande destaque, por ser uma cultura com elevada produtividade de óleo vegetal (5 a 7 ton/ha/ano) em comparação a outras espécies (DEORE & JOHNSON, 2008). No Brasil, os plantios comerciais estão localizados principalmente na região Norte e Nordeste, com grande potencial de expansão. Contudo, quase a totalidade dos plantios se encontra hoje na região Norte, com

destaque ao Estado do Pará, com cerca de 80% dos plantios comerciais (CHIA, LOPES, *et al.*, 2009).

A cultura é propagada convencionalmente por sementes, que requer um período relativamente longo até que novas mudas sejam formadas, além de apresentar formação de plantios com alta variabilidade, promovendo dessa forma a desuniformidade na produção e dificuldades nas práticas de manejo. Já os métodos de propagação vegetativa, apesar de serem altamente desejáveis para o desenvolvimento do setor produtivo desta cultura, ainda são estudados e não são plenamente dominados (MONTEIRO & SCHERWINSKI-PEREIRA, 2013). Estudos sobre a propagação vegetativa de indivíduos com alto potencial de produção podem contribuir para a adoção de protocolos eficientes de embriogênese somática e micropropagação em larga escala dessa cultura (KONAN, DURAND-GASSELIN, *et al.*, 2010).

Em razão da crescente demanda por produtos desta cultura, a biotecnologia agrícola surge como uma ferramenta na busca de novas técnicas que possibilitem a multiplicação de genótipos elite em larga escala. A cultura de tecidos de plantas *in vitro* ou micropropagação oferece vantagens significantes em comparação à propagação convencional, que é feita exclusivamente pela via sexuada (sementes) (SOH, WONG, *et al.*, 2011).

### 2.3. Micropropagação *in vitro*.

As plantas podem ser propagadas através de duas vias de desenvolvimento: o sexual ou assexual. No ciclo sexual, novas plantas surgem após a fusão dos gametas parentais e desenvolvem-se a partir de embriões zigóticos contidos em sementes ou frutos. Em contraste, no ciclo vegetativo (assexual), as características únicas de qualquer planta selecionada para propagação (denominada planta matriz) são geralmente perpetuadas. Durante a divisão celular (mitose), os genes são tipicamente copiados exatamente em cada divisão mitótica. O de plantas reproduzidas de maneira assexual é denominado clone (GEORGE, HALL & KLERK, 2008).

O conceito de cultura de tecidos vegetais abrange diversas técnicas e princípios. Entre estes princípios, os mais importantes são a totipotência celular e a hipótese do balance hormonal. As técnicas de cultivos assépticos têm contribuído não só para o melhor entendimento dos eventos da diferenciação celular, e também para melhor aproveitamento de tais eventos na exploração mais eficiente das plantas. Tendo em vista



os princípios anteriormente discutidos, pode-se dizer que quando um explante, com potencialidade de diferenciação é inoculado *in vitro*, em condições favoráveis pode regenerar um novo indivíduo (VILLALOBOS & THORPE, 1993).

O objetivo da propagação da planta através da cultura de tecidos, denominada micropropagação, é propagar plantas completas, isto é, os clones. A produção de plantas a partir de gemas axilares ou meristemas provou ser o método mais aplicável e fiável de propagação *in vitro*. O explante mais utilizado em palma de óleo é a folha, em particular, as folhas imaturas, que formam o ápice, graças a sua grande capacidade mitótica (ROCHA, 2007). As plantas obtidas a partir de cultura de tecidos podem ser originadas de diferentes rotas morfogênicas (GEORGE, HALL & KLERK, 2008).

A regeneração de plantas diretamente dos explantes, ou a partir de calos, pela via da organogênese ou da embriogênese somática tem sido utilizada como alternativa nos métodos de propagação de palma de óleo. A organogênese compreende o desenvolvimento de gemas ou de meristemas radicais a partir dos explantes diretamente, ou a partir dos calos. Para que a organogênese ocorra a partir de um calo deve-se produzir mudanças que dirija à organização celular (LITZ & JARRET, 1993).

#### 2.4. Embriogênese somática

A embriogênese somática é um processo pelo qual as células somáticas se diferenciam em embriões somáticos, é utilizado naturalmente por algumas plantas para superar vários fatores ambientais e genéticos que impedem a fertilização. Os embriões somáticos se assemelham a embriões zigóticos morfologicamente. São bipolares e possuem órgãos embrionários típicos. No entanto, eles se desenvolvem através de um caminho diferente (GEORGE, HALL & KLERK, 2008). Naturalmente ocorre em uma grande variedade de espécies, tanto em seus tecidos reprodutivos como células do óvulo, e tecidos somáticos, como margens de folhas (KARPOFF, 1982).

Este método de propagação está baseado no princípio da totipotência celular, ou seja, a capacidade que tem as células para dar origem a todos os tipos de células diferenciadas e de regenerar o organismo completo ao qual pertence (GUTIERRES, 2006); (PORTILLO & SANTA CRUZ, 2004).

A embriogênese somática é um procedimento válido de propagação vegetativa em termos de taxa de multiplicação. É o único método de grande escala para a produção de

plantas tropicais de espécies com polinização cruzadas e/ou espécies sem sistema de propagação vegetativa convencional (DUBLIN, 1993). Este método tem suas aplicações potencializadas quando há ocorrência de embriogênese somática secundária, que é a produção de novos embriões a partir de embriões somáticos pré-existent. Os calos embriogênicos são altamente regeneráveis, podem gerar grande número de propágulos e se manter por longos períodos (MOURA, MOTOIKE, *et al.*, 2008).

Em palma de óleo, a indução de embriogênese somática tem sido obtida a partir de diferentes explantes, tais como raízes terciárias e quaternárias, e folhas imaturas (EEUWENS, LORD, *et al.*, 2002), inflorescências imaturas (TEIXEIRA, SONDAHL & KIRBY, 1994) e embriões zigóticos (TEXEIRA, SONDAHL, *et al.*, 1995). O processo de embriogênese ocorre de forma indireta, inicialmente por meio do desenvolvimento de massa pró-embriogênica, que se diferenciam, formando os embriões somáticos (CARVALHO, MOTOIKE, *et al.*, 2009).

Esta via regenerativa *in vitro* é a preferida para as palmeiras, já que essa via morfogênica pode aumentar o número de plântulas regeneradas em comparação com a organogênese, além de ter um alto potencial em rendimento (STEINMACHER, KROHN, *et al.*, 2007). Entre outras vantagens, a embriogênese somática permite a criação de cultivos cíclicos através do uso de suspensões celulares (SANÉ, ABERLENC-BERTROSSI, *et al.*, 2006).

Além disso, as culturas embriogênicas representam um sistema bastante eficiente para a aplicação de técnicas de biotecnologia, como transformação genética, indução e seleção de mutações e regeneração de plantas haplóides. A embriogênese somática também pode ser um meio para a produção de sementes sintéticas e como fonte de explantes para criopreservação de espécies em extinção (MOURA, MOTOIKE, *et al.*, 2008).

De acordo com George et al. (2008), a regeneração das plantas através da embriogênese somática *in vitro* inclui cinco passos: 1) Iniciação de culturas embriogênicas cultivando o explante primário em meio suplementado com reguladores de crescimento das plantas, principalmente auxina, mas muitas vezes também citocinina. 2) Proliferação de culturas embriogênicas em meio semi-sólido ou líquido suplementado com reguladores de crescimento, de forma semelhante à iniciação. 3) Maturação de embriões somáticos em meio sem reguladores de crescimento; isso inibe a multiplicação celular e estimula a formação de embriões somáticos e desenvolvimento inicial. 4)

Maturação de embriões somáticos por cultura em meio suplementado com NOA e / ou com potencial osmótico reduzido. 5) Regeneração de plantas em meio sem reguladores de crescimento.

Segundo Fehér et al. (2003), esta rota morfogênética é influenciada por vários fatores impostos por condições *in vitro*, como a disponibilidade de nutrientes e mudanças de pH, que afetam diretamente as transições metabólicas e de desenvolvimento em uma grande variedade de células.

Protocolos de embriogênese somática já foram relatados com sucesso para a palma de óleo (SILVA, LUIS & SCHERWINSKI-PEREIRA, 2012). Além da aplicação desta técnica na palma de óleo, a micropropagação por embriogênese somática já tem proporcionado bons resultados para palmeiras como macaúba (*Acrocomia aculeata*) (MOURA, MOTOIKE, et al., 2008), açaizeiro (*Euterpe oleracea*) (SCHERWINSKI-PEREIRA, GUEDES, et al., 2012), coqueiro (*Cocos nucifera* L) (CHAN, SAÉNZ, et al., 1998); (FERNANDO, VERDEIL, et al., 2003) pupunheira (*Bactris gasipaes*) (STEINMACHER, KROHN, et al., 2007) e tamareira (*Phoenix dactylifera*) (SANÉ, ABERLENC-BERTROSSI, et al., 2006).

## 2.5. Solução nutritiva

As culturas de células e tecidos são iniciadas a partir da inoculação de um ou mais explantes em um recipiente pré-esterilizado, contendo meio nutritivo estéril. O material vegetal só crescerá *in vitro* quando fornecido com meios especializados. Um meio geralmente consiste de uma solução de sais, que fornece os elementos essenciais (macro e micronutrientes), necessários para o crescimento de plantas inteiras, além de componentes orgânicos, como vitaminas, aminoácidos, sacarose (fonte de energia) e reguladores de crescimento (GEORGE, HALL & KLERK, 2008).

O balanço de cargas do meio de cultura é fundamental para o sucesso da cultura de tecidos. Os aspectos mais importantes desse balanço de cargas são a relação mútua entre os ânions e entre os cátions, a concentração de nutrientes expressos com a condutividade elétrica (CE), o pH, a relação  $\text{NO}_3^- : \text{NH}_4^+$  e a temperatura (HERRERA, 2000).

O pH é considerado um fator crítico do meio de cultura (MURASHIGE, 1974), influenciando a disponibilidade de nutrientes, de fitorreguladores e no grau de solidificação do ágar. Usualmente, é ajustado em uma faixa que varia de 5.0 a 6.0 para o

desenvolvimento adequado da maioria das espécies; em níveis inferiores a 4,5 e superiores a 7,0, geralmente ocorre paralisação do crescimento e do desenvolvimento *in vitro* (SOARES, PAIVA, *et al.*, 2009). Esta faixa cria uma relação mútua ótima entre os ânions  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  e  $\text{SO}_4^{2-}$ , e entre os cátions  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{NH}_4^+$ ; além disso facilita a solubilização do  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , regula o conteúdo de  $\text{HCO}_3^-$ , e evita a precipitação de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$  (HERNANDEZ, CASTILLO, *et al.*, 2006).

Na interação do material vegetal com a solução nutritiva, o efeito do pH sobre o crescimento de plantas cultivadas em solução nutritiva pode ser direto ou indireto. O efeito direto resulta da ação dos íons de  $\text{H}^+$  ou  $\text{OH}^-$  sobre as membranas das células. Já o efeito indireto do pH diz respeito à solubilidade de nutrientes (MARTINEZ & CLEMENTE, 2011). As concentrações de íons de hidrogênio no meio criam alterações durante o desenvolvimento da cultura (RAMACHANDRA & RAVISHANKAR, 2002).

Respeito ao efeito direto, o aumento da absorção de nutrientes proporcionado pela presença de substâncias ácidas na solução nutritiva tem sido atribuído ao aumento da permeabilidade da membrana plasmática por meio da ação das substâncias ácidas e à ativação da  $\text{H}^+$ ATPase de membrana plasmática (MACHADO, VARGAS, *et al.*, 2009). As  $\text{H}^+$  ATPase (bombas de  $\text{H}^+$ ) são enzimas transmembranas capazes de hidrolisar ATP, gerando energia e gradiente eletroquímico que está diretamente envolvido em dois mecanismos fundamentais para o desenvolvimento e crescimento vegetal: (a) energização de sistemas secundários de translocação de íons fundamentais para a absorção de macro e micronutrientes, e (b) aumento da plasticidade da parede celular para possibilitar o processo de crescimento e divisão da célula vegetal (RODDA, CANELLAS, *et al.*, 2006).

A ativação da  $\text{H}^+$  ATPase promove um aumento do gradiente eletroquímico de  $\text{H}^+$ , provocando a acidificação do apoplasto, o que leva ao rompimento de ligações da parede celular, promovendo sua elasticidade, o que favorece o crescimento celular (CANELLAS & SANTOS, 2005). Além da influência das substâncias ácidas sobre a absorção de nutrientes, a quantidade absorvida também depende da área superficial das células (MACHADO, VARGAS, *et al.*, 2009).

Segundo Hernandez *et al.* (2006), o pH tem um efeito indireto, que pode afetar a disponibilidade e a absorção dos elementos essenciais do meio de cultura como, por exemplo: em pH superior a 8,0, o  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  precipitam rapidamente na forma de carbonatos; o  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  em pH maior a 7,0 é dissociado e transformado em  $\text{HPO}_4^{2-}$ , que

facilmente é precipitado junto ao  $\text{Ca}^{2+}$ ; e à medida que o pH aumenta ocorre redução da disponibilidade de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$ .

A principal causa da variação da relação na absorção entre ânions e cátions depende da forma química em que é administrado o nitrogênio na solução nutritiva (HERRERA, 2000). Segundo McDonald e Jackman (1989) a redução inicial do pH na solução ocorre durante a assimilação preferencial da amônia e, incrementa, durante a assimilação de nitrato. O efeito do pH externo sobre a absorção do nitrogênio, depende da forma de absorção, como amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) ou como nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ). A diminuição do pH externo aumenta a absorção do  $\text{NO}_3^-$ , mas diminui a absorção de  $\text{NH}_4^+$  (ZSOLDOS & HAUNOLD, 1982).

O  $\text{NH}_4^+$  é absorvido pelas células por processo ativo, quando a concentração externa é baixa, e por processo passivo em altas concentrações. Processo ativo é mediado por uma proteína transportadora AMT1 localizada na membrana. Várias hipóteses foram apresentadas para explicar os processos fisiológicos subjacentes à toxicidade do amônio. Quando tecido de plantas alimentadas com amônio é analisado, várias alterações químicas são observadas (MARSCHNER, 2012).

De modo geral, em plantas fertilizadas com nitrato há um acúmulo de íons de amônia, ânions inorgânicos, como cloreto, sulfato e fosfato, assim como de aminoácidos. Em contraste, há uma redução na concentração dos cátions essenciais, como  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , assim como ácidos orgânicos, como o malato (BRITTO & KRONZUCKER, 2002). Estas e outras observações levaram à hipótese de que a toxicidade do amônio pode ser o resultado de (i) diminuição da absorção de cátions essenciais (SIDDIQI, MALHOTRA, *et al.*, 2002), (ii) distúrbios induzidos por amônio na regulação do pH (WALCH-LIU, NEUMANN, *et al.*, 2000) ou (iii) consumo excessivo de açúcares por assimilação de amônio causando limitação de carboidratos (FINNEMANN & SCHJOERRING, 1999).

A partir do exposto, é evidente que o grau de toxicidade de  $\text{NH}_4^+$  é dependente não só da concentração externa de  $\text{NH}_4^+$ , mas também sobre o pH externo. Para a maioria das espécies a utilização do  $\text{NH}_4^+$  é inferior a  $\text{NO}_3^-$  como fonte de nitrogênio. Isto é inesperado pois com assimilação de  $\text{NH}_4^+$  a planta poderia economizar a energia necessária para a redução de  $\text{NO}_3^-$ . O nitrato e o amônio são as principais fontes de N inorgânico absorvido pelas raízes das plantas superiores (MARSCHNER, 2012). O nitrato também é mais móvel do que o amônio e, portanto, mais disponível para as plantas (MILLER & CRAMER, 2004).

O nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) é a fonte mais importante de Nitrogênio mineral para plantas que crescem em solos aeróbicos. As plantas adquirem seu  $\text{NO}_3^-$  da solução do solo, absorvendo-o apenas por processo ativo através da membrana plasmática (PM) das células epidérmicas e corticais da raiz (OWEN & JONES, 2001). Segundo Pao et al. (1998) as células possuem pelo menos três sistemas distintos de captação de  $\text{NO}_3^-$ , dois dos quais têm alta afinidade para o  $\text{NO}_3^-$ , enquanto o terceiro tem uma baixa afinidade; estes sistemas são controlados pela proteína portadora nitrato-nitrito, esta proteína transportadora é pertencente à família NRT1 y NRT2, que codificam transportadores que funcionam em simporte com  $\text{H}^+$ ; esta família transportadora é designada para o transporte do  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NO}_2^-$ .

Considerações termodinâmicas indicam que a incorporação de  $\text{NO}_3^-$  exigirá um sistema de transporte ativo, mesmo nas maiores concentrações de  $\text{NO}_3^-$  provavelmente encontradas no solo (WALKER, SMITH & MILLER, 1995) e estudos fisiológicos forneceram evidências de que o influxo de  $\text{NO}_3^-$  é próton-acoplado e dependente da atividade do  $\text{H}^+$  na solução nutritiva e do bombeamento na PM pela  $\text{H}^+$ -ATPase (FORDE, 2000).

Depois do carbono, o nitrogênio (N) é o elemento requerido em maior quantidade pelas plantas: cerca de 1-5% da matéria seca total da planta consiste em N, que é um constituinte integral das proteínas, ácidos nucleicos, clorofila, coenzimas, fitohormônios e metabólitos secundários. A disponibilidade de N nas células é, portanto, um fator decisivo para o crescimento das plantas (MARSCHNER, 2012).

Os primeiros produtos estáveis de assimilação de nitrogênio são os aminoácidos e amidas essenciais nos blocos de construção das proteínas. As alterações na concentração de vários aminoácidos ou aminoácidos totais estão envolvidos na regulação de diversos processos relacionados com o metabolismo da planta (ATILIO & CAUSIN, 1996).

É importante ressaltar a importância primordial do controle do pH por processos biofísicos na membrana plasmática e no tonoplasto (bombeamento de  $\text{H}^+$  e fluxo iônico através de canais), além de mencionar que o controle do metabolismo (pH bioquímico) é um mecanismo de ajuste fino do pH citoplasmático que trabalha em coordenação com os processos de membrana (SAKANO, 2001).

Vários estudos demonstraram que a modificação do pH citoplasmático é importante no controle do ciclo celular, na divisão celular e no crescimento celular,

relatado por vários autores (ERDEI, BÉREZI & ZSOLDOS, 1981); (MARRÉ, ROMANI, *et al.*, 1986); (BITTISNICH & WILLIAMSON, 1989). O rápido movimento de prótons, associado à deslocalização do potássio e gerado pela atividade da ATPase da membrana plasmática, pode levar a uma rápida alcalinização do citoplasma com a estimulação do ciclo celular. O DNA é duplicado e a atividade mitótica aumenta, manifestando uma correlação entre o pH citoplasmático e o desenvolvimento celular, sugerindo o envolvimento do pH citoplasmático como um sinal mitótico na regulação do ciclo celular em plantas (PICHON & DESBIEZ, 1994).

O pH da solução nutritiva pode ser controlado com agentes tampão, estes são elementos que regulam as mudanças no pH, no caso do presente trabalho é utilizado o MES hidratado. O MES (MES Hydrate) com fórmula molecular:  $C_6H_{13}NO_4Sx H_2O$  e peso molecular: 195,24g/mol é considerado um tampão interessante, desenvolvidos para aplicações biológicas, pois tem as seguintes características: pKa de médio porte, solubilidade máxima em água e solubilidade mínima em todos os outros solventes, efeitos salinos mínimos, alteração mínima em pK com temperatura, quimicamente e enzimaticamente estável, absorção mínima na faixa espectral visível ou UV e facilmente sintetizada (SIGMA ALDRICH).

Processos de embriogênese somática iniciados *in vitro* sob o efeito do controle do pH tem sido descritos em palmeiras como coqueiro (*Cocos nucifera L.*) (BASU, SETHI & GUHA-MUKHERJEE, 1988) e outras diversas espécies como cenoura (*Daucus carota*) (SMITH & KRIKORIAN, 1990), pinho (*Pinu taeda* e *Pseudotsuga menziesii*) (PULLMAN, JOHNSON, *et al.*, 2005), alfafa (*Medicago sativa*) (PASTERNAK, PRINSEN, *et al.*, 2002), banana (*Musa sp*) (KOSKY, SILVA, *et al.*, 2002) e abóbora (*Cucurbita pepo*) (LELJAK-LEVANIC, BAUER, *et al.*, 2004).

Neste contexto a hipótese deste trabalho foi que meios de cultura *in vitro*, cujo pH seja mantido constantemente baixo levaria a uma maior absorção dos ânions incluindo o  $NO_3^-$  em detrimento à absorção de  $NH_4^+$ . Dessa forma, ocorre o acúmulo e absorção de  $NH_4^+$  tóxico, o que promove o equilíbrio de cargas, produzindo moléculas nitrogenadas essenciais na estrutura da célula e promove, em última instância, a divisão e o crescimento celular. Conseqüentemente, aumenta a produção das massas pró-embriogênicas e, portanto, o número de células capazes de se regenerar em embriões somáticos.

### **3. OBJETIVO**

Estudar o efeito de diferentes níveis de pH no crescimento e desenvolvimento *in vitro* de massas pró-embriogênicas em clones de Palma de óleo (*Elaeis guineensis* jacq) em meio de cultura tamponado com MES Hidratado.

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

##### 4.1. Local de condução dos experimentos.

Os ensaios foram conduzidos no laboratório de Cultura de Células e Tecidos Vegetais do Setor de Fruticultura da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais.

##### 4.2. Fase de multiplicação.

Foram utilizadas massas pró-embriogênicas de cinco clones de Palma de óleo (*Elaeis guineensis*) hib. *Tenera*, já estabelecidas *in vitro*, AM21 (Kigoma), AM23 (Deli x Lame Embrapa), AM24 (Deli x Lame), PL10 (Deli x Lame) e PL26 (Deli x Lame), provenientes de matrizes elites da empresa Agropalma S.A, selecionadas pelo seu alto rendimento, resistência a doenças e capacidade adaptativa em campo.

As massas pró-embriogênicas foram transferidas para meio de cultura de multiplicação Y3 (EEUWENS, 1978) modificado por Carvalho (2009) acrescidos de 2-4D 198  $\mu\text{M/L}$ , asparagina 0,1g/L, arginina 0,1g/L, inositol 0,1g/L, glutamina 0,1g/L, caseína 1g/L, sacarose 30g/L. O pH foi ajustado de acordo com os tratamentos (6.0, 5.5, 5.0, 4.5 e 4.0), os quais foram mantidos constantes com tampão MES hidratado a 25 mM e o tratamento testemunha com pH 5.7 sem tampão.

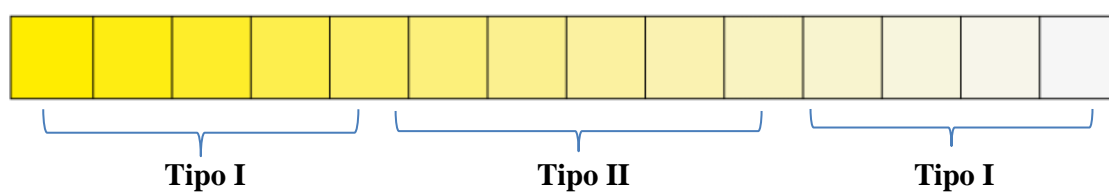
Após a formulação, o meio de cultura foi solidificado com 2,5 g L<sup>-1</sup> de Phytigel® (Sigma, USA) e autoclavado por 20 minutos a 121 °C a 1,5 atm em frascos tipo Erlenmeyer com 300 ml de meio de cultura. Após a autoclavagem adicionou-se 1000  $\mu\text{M}$  de putrescina em câmara de fluxo. O meio foi vertido em placas de Petri de poliestireno em meio de cultura em câmara de fluxo laminar. Após a transferência das massas pró-embriogênicas para este meio, as placas foram seladas com filme PVC e mantidas em sala de crescimento, à temperatura de  $27 \pm 1$  °C na ausência de luz por 60 dias.

O experimento foi conduzido em Delineamento Inteiramente Casualizado, em esquema fatorial 5x6, com cinco clones, seis pHs (5+1 tratamento testemunha adicional)



e cinco repetições, constituindo 30 tratamentos e 150 placas de petri, representando as unidades experimentais conforme a Tabela 1, cada uma das unidades experimentais contendo cinco massas embriogênicas.

Após 60 dias, foram avaliadas as massas pró-embriogênicas resultantes, sendo classificadas em dois tipos de acordo com as características que apresentavam: massas Tipo I apresentavam células alongadas e translúcidas, massas desuniformes ou compactas com coloração branca ou amarela, que foram caracterizadas como incapazes de gerar plantas. E massas Tipo II, apresentavam forma globular, friável, com coloração bege caracterizadas como embriogênicas; esta classificação foi feita seguindo os padrões encontrados por Pádua et al. (2012). Estas massas, após separação, foram pesadas em balança de precisão digital. Os valores obtidos foram submetidos ao teste de regressão Weibull de 5 parâmetros, além disso, foram encontrados e comparados os pontos de máxima produção estimada no eixo  $Y_{máx}$  e  $X_{máx}$  de cada clone.



**Figura 1.** Classificação por coloração das massas tipo I ou não embriogênicas e massas tipo II ou embriogênicas.

**Tabela 1.** Distribuição dos tratamentos na fase de multiplicação de massas pró-embriogênicas.

Clones	MES Hidratado (25 Mm)	Nível de pH	Tratamento
AM21 (KIGOMA)	Ausência	5.7	T1
	Presença	6.0	T2
		5.5	T3
		5.0	T4
		4.5	T5
		4.0	T6
		Ausência	5.7
		6.0	T8

AM23 (Deli x Lamé EMBRAPA)	Presença	5.5	T9
		5.0	T10
		4.5	T11
		4.0	T12
		Ausência	5.7
AM24 (Deli x Lamé)	Presença	6.0	T14
		5.5	T15
		5.0	T16
		4.5	T17
		4.0	T18
	Ausência	5.7	T19
PL10 (Deli x Lamé)	Presença	6.0	T20
		5.5	T21
		5.0	T22
		4.5	T23
		4.0	T24
	Ausência	5.7	T25
PL26 (Deli x Lamé)	Presença	6.0	T26
		5.5	T27
		5.0	T28
		4.5	T29
		4.0	T30

#### 4.3. Fase de maturação

Para monitorar e avaliar o efeito dos tratamentos descritos na Tabela 1, massas pró-embriogênicas obtidas dos tratamentos foram subcultivadas em meio de pré-acondicionamento. A fase de maturação foi conduzida em meio de cultura Y3 (EEUWENS, 1978) modificado por Carvalho (2009), utilizando o mesmo meio da multiplicação, acrescido asparagina 0,1g/L, arginina 0,1g/L, inositol 0,1g/L, glutamina 0,1g/L, caseína 1g/L, sacarose 30g/L. O pH do meio de cultura foi ajustado em  $5.7 \pm 0,1$ . O meio foi vertido após a autoclavagem e adicionou-se 482,5µl/300 ml de putrecina em câmara de fluxo; o meio foi vertido em placas de Petri de poliestireno com 90 x 15 mm de dimensão, com 30 ml de meio de cultura. Cada grupo de massas pró-embriogênicas obtidas na fase

de multiplicação foram individualizadas e transferidas separadamente para o meio de Regeneração, mantendo o mesmo delineamento do experimento descrito na Tabela 1.

Após a transferência das massas pró-embriogênicas dos clones neste meio, as placas foram seladas com filme PVC (Rolopac®) e mantidas em sala de crescimento, à temperatura de  $27 \pm 1$  °C na ausência de luz por 45 dias. Após 45 dias foram avaliados o número de embriões somáticos obtidos e a porcentagem de massas pró-embriogênicas que produziram embriões somáticos. Os valores obtidos foram submetidos à análise de variância, tendo as médias sido comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

#### 4.4. Fase de germinação.

Para avaliar o efeito dos tratamentos descritos na Tabela 1 na qualidade dos embriões somáticos obtidos na fase de regeneração, estes foram germinados em meio de germinação composto por sais e vitaminas de Y3 (EEUWENS, 1978), modificado por Carvalho (2009), utilizando Asparagina 0,33g/L, Arginina 0,33g/L, Inositol 0,1g/L, Glutamina 0,33g/L, Caseína 1g/L, Sacarose 30g/L, Crescidos 10,054µM/L de ácido naftaleno acético (ANA). O pH do meio de cultura foi ajustado em  $5.7 \pm 0.1$ . O meio foi vertido após a autoclavagem e adicionou-se 1000µM/L de putrecina em câmara de fluxo. O meio de cultura foi disposto em frascos de vidro, de 300 ml, os quais receberam 40 ml do meio de cultura. Após a transferência dos embriões somáticos, os frascos foram fechados e selados com uma tampa plástica e filme PVC (Rolopac®) e incubados em sala de crescimento durante 60 dias mantidos a  $27 \pm 2$  °C, com fotoperíodo de 16 horas dia<sup>-1</sup> e irradiância de 30 µmol m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup> provida por lâmpadas tubulares de LED (18 W, Arapeva Iluminação LED).

Após 60 dias foi avaliado a porcentagem de germinação dos embriões somáticos. Os valores obtidos foram submetidos à análise de variância, tendo as médias sido comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

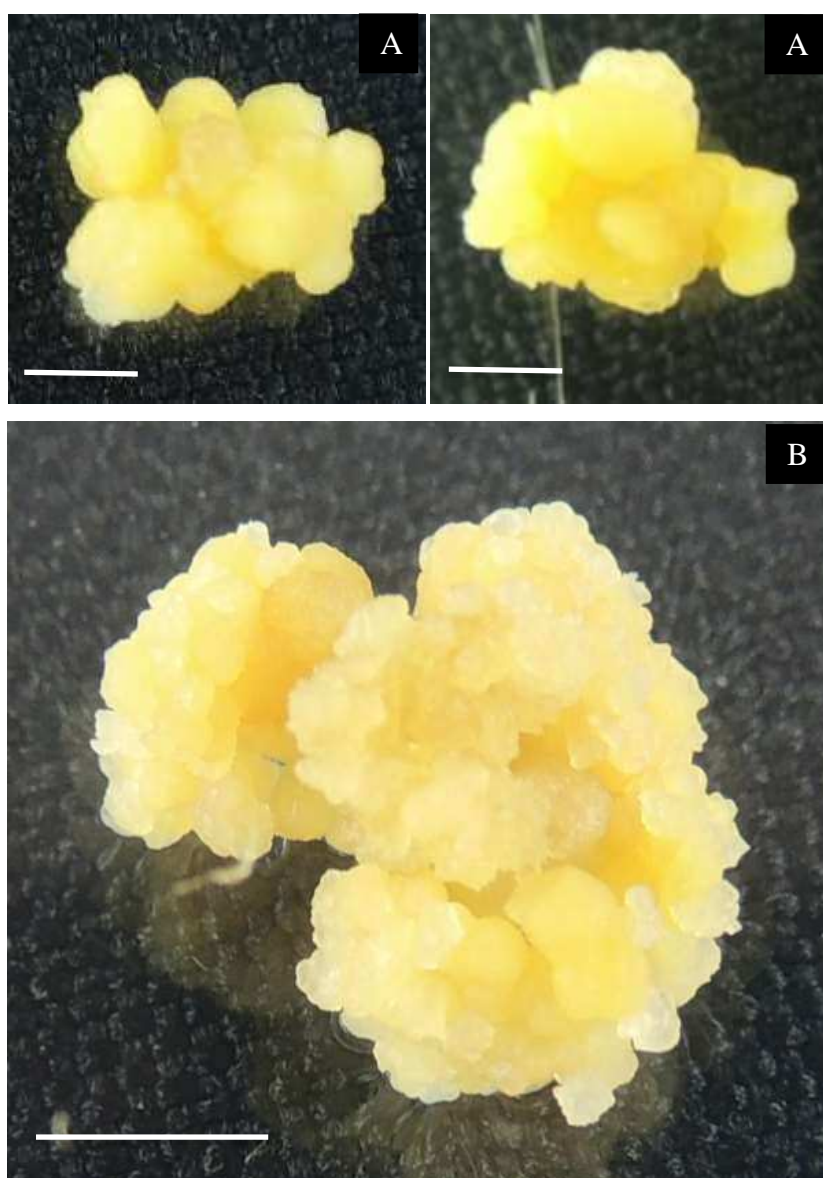
#### 4.5. Análise estatística.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e de regressão, aplicando-se, quando cabível, os testes de média, ao nível de 5% de probabilidade, utilizando-se o programa GENES (COSME, 1998).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Fase de multiplicação

Aos 60 dias foi observada a formação de massas pró-embriogênicas em todos os tratamentos. Nesse período as massas pró-embriogênicas triplicaram o seu tamanho e foi possível observar diferentes aspectos dessas massas, como a formação de dois tipos diferentes de massas: massa tipo I ou não embriogênico, (Figura 1A); e a massa tipo II ou embriogênica (Figura 1B). Observou-se na maioria dos casos, a obtenção de massas compactas em pH altos como 5.5, 5.7 e 6.0. Também foi bastante comum observar massas translúcidas friáveis ou brancas e compactas em pHs muito baixos como no caso do pH 4.0.



**Figura 2.** Comparação entre a massa tipo I não embriogênico(A) e massa tipo II embriogênico (B). Barras = 0.5cm.

**Tabela 2.** Produção estimada de massas pró-embriogênicas nos pontos Y<sub>máx</sub> e X<sub>máx</sub> do gráfico (Figura 3)e o total de massa tipo II para cada clone.

	<b>Y máx</b>	<b>X máx</b>	<b>Total de massa tipo II</b>
<b>AM21</b>	242,2 mg/placa	pH 4.73	868,8
<b>AM23</b>	92,22 mg/placa	pH 4.5	190,7
<b>AM24</b>	245,9 mg/placa	pH 4.85	1041,1
<b>PL10</b>	179,8 mg/placa	pH 4.71	693,5
<b>PL26</b>	148,3 mg/placa	pH 4.6	803,8

O clone AM21 (KIGOMA), foi o genótipo com melhor capacidade de adaptação e resposta em todos os tratamentos, multiplicando-se adequadamente nos diversos pHs testados. O valor estimado de produção de massas pró-embriogênicas foi duas vezes maior ao observado para o tratamento testemunha (Figura 3A). Foi observado que sua multiplicação conseguiu aproximadamente 90% de massas tipo II ou embriogênicas.

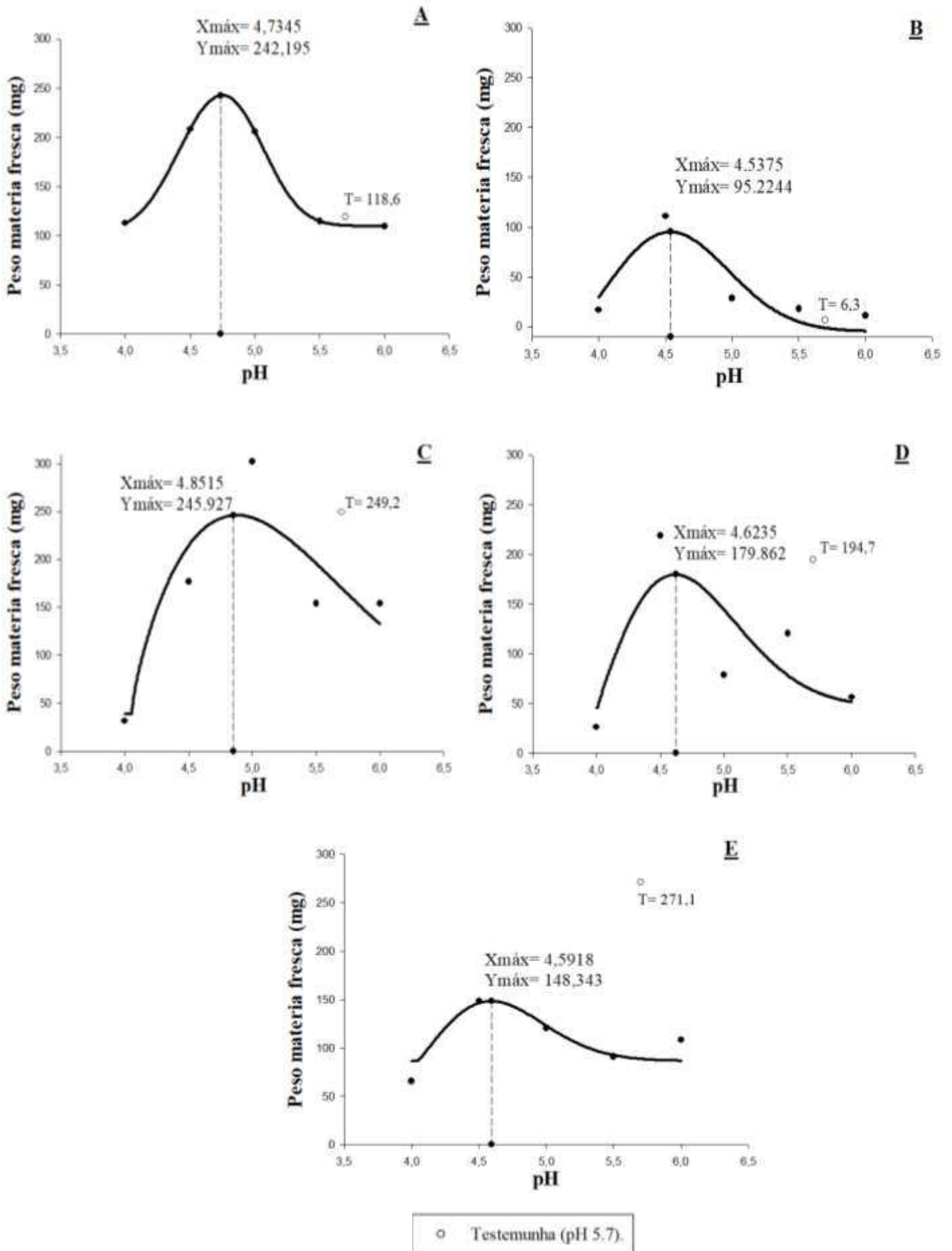
Para o clone AM23 (Deli x Lame EMBRAPA) observou-se menor taxa de multiplicação entre os clones avaliados. No entanto, o valor estimado de produção de massas pró-embriogênicas foi 14,6 vezes superior à massa obtida no tratamento testemunha (Figura 3B). Este clone caracterizou-se por obter massas de tamanho médio-baixo, perto do 50% das estruturas foram compactas e só 65% das massas foram tipo II. No caso do tratamento com pH 5,7 foi observado a maior quantidade de massa tipo I (63%) entre todo os tratamentos.

Verificou-se que o clone AM24 (Deli x Lame EMBRAPA) obteve o maior produção de massas pró-embriogênica entre todos os clones. Além disso, sua produção estimada de massas pró-embriogênicas foi a maior superando em 1,5% ao clone AM21(Figura 3C). Observou-se que este clone produziu no total 98,5% de massas tipo II, no entanto, o único tratamento com pH 6.0apresentou 9% da massa não desejável.

Ao examinar o clone PL10 (Deli x Lame) foi observada uma resposta consideravelmente alta na produção de massa pró-embriogênica, comparado aos outros clones. No entanto sua produção estimada de massas pró-embriogênicas foi 7,7% menor do que o observado para o tratamento testemunha (Figura 3D), e 26,9% menor do que o

clone AM23 (Tabela 2). Embora este clone obtivesse 85% de massa tipo II, suas massas foram caracterizadas como pouco friáveis.

O Clone PL26 (Deli x Lame) foi o segundo clone com menor taxa de multiplicação entre os clones estudados. A produção estimada de massas pró-embriogênicas para esse clone foi 45,3% menor do que o observado para o tratamento testemunha (Figura 3E), e 60,3% menor do que o clone AM23 (Tabela 2). Este clone caracterizou-se por ter uma produção de massa tipo II de 76%, embora tenha apresentado a menor quantidade de massas desenvolvidas entre todos os clones.



**Figura 3.** Matéria fresca de massas pró-embriogênicas dos clones AM21 (A), AM23 (B), AM24 (C), PL10 (D) e PL26 (E) após 60 dias de multiplicação em cinco diferentes pH.

## 5.2. Fase de maturação

Aos 45 dias, todas as massas pró-embriogênicas em todos os tratamentos formaram embriões somáticos. A formação dos embriões somáticos ocorreu de forma não sincronizada, podendo-se observar embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento, sendo que na maioria das vezes o grande número de embriões somáticos confirmaram o potencial e a qualidade da massa pró-embriogênica obtidas no processo de multiplicação.

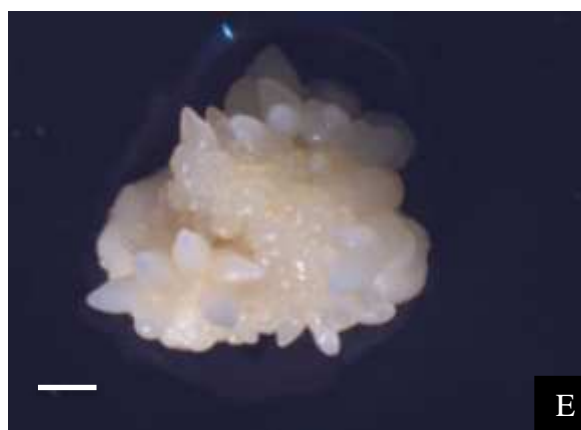
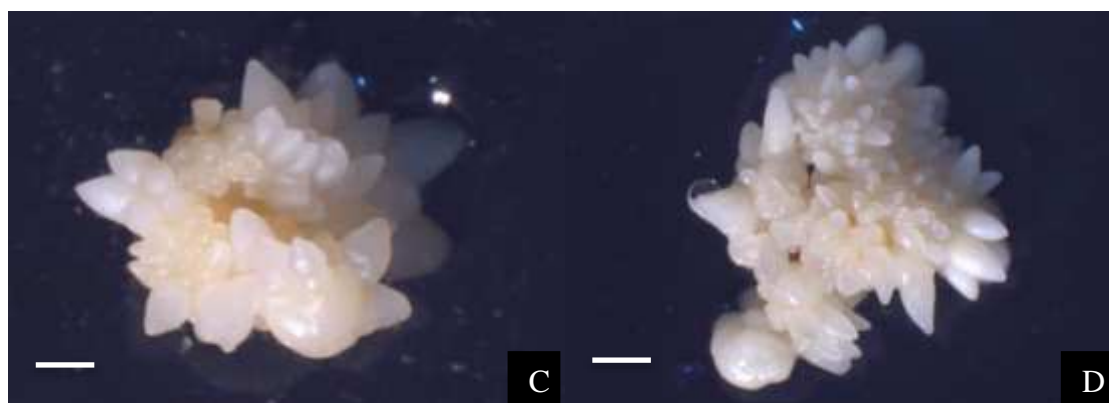
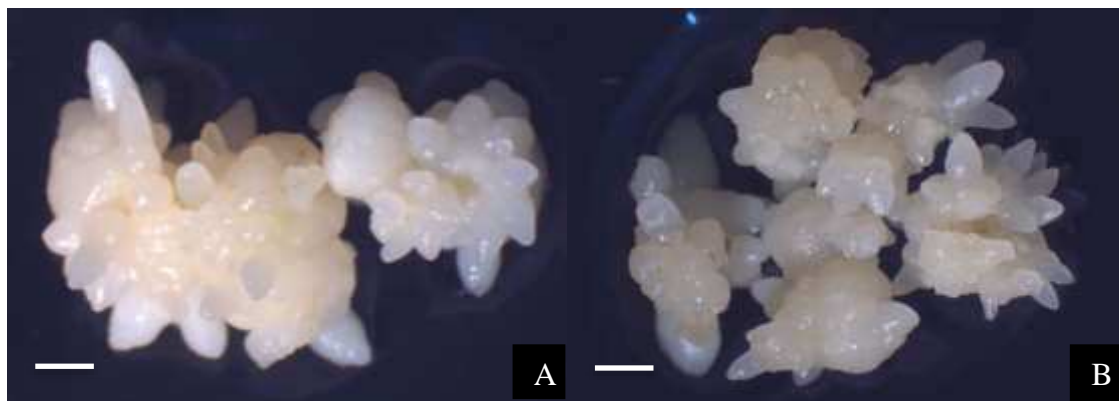
Para o Clone AM21 (KIGOMA) o número de embriões regenerados das massas pró-embriogênicas obtidas por subcultivo em meio de multiplicação com pHs ajustados entre 4.5 e 6.0, incluindo o tratamento testemunha, não foram diferentes a nível de 5% de probabilidade, no entanto, os obtidos em pH 4.0 apresentaram um menor número de embriões significativamente em relação aos outros tratamentos. Em geral as massas pró-embriogênicas do clone AM21 resultaram em uma maior produção de embriões somáticos, dentro de cada tratamento comparado aos outros clones (Figura 6A).

No Clone AM23 (Deli x Lame EMBRAPA) o maior número de embriões regenerados foram observados em massas pró-embriogênicas obtidas por subcultivo em meio de multiplicação com pH ajustado a 4.5 e 5.0. A massa pró-embriogênica multiplicada no tratamento testemunha resultou em baixa produção de embriões somáticos, comparando-se à produção de embriões dos tratamentos extremos, ou seja, pH 4.0 e 6.0 (Figura 6B).

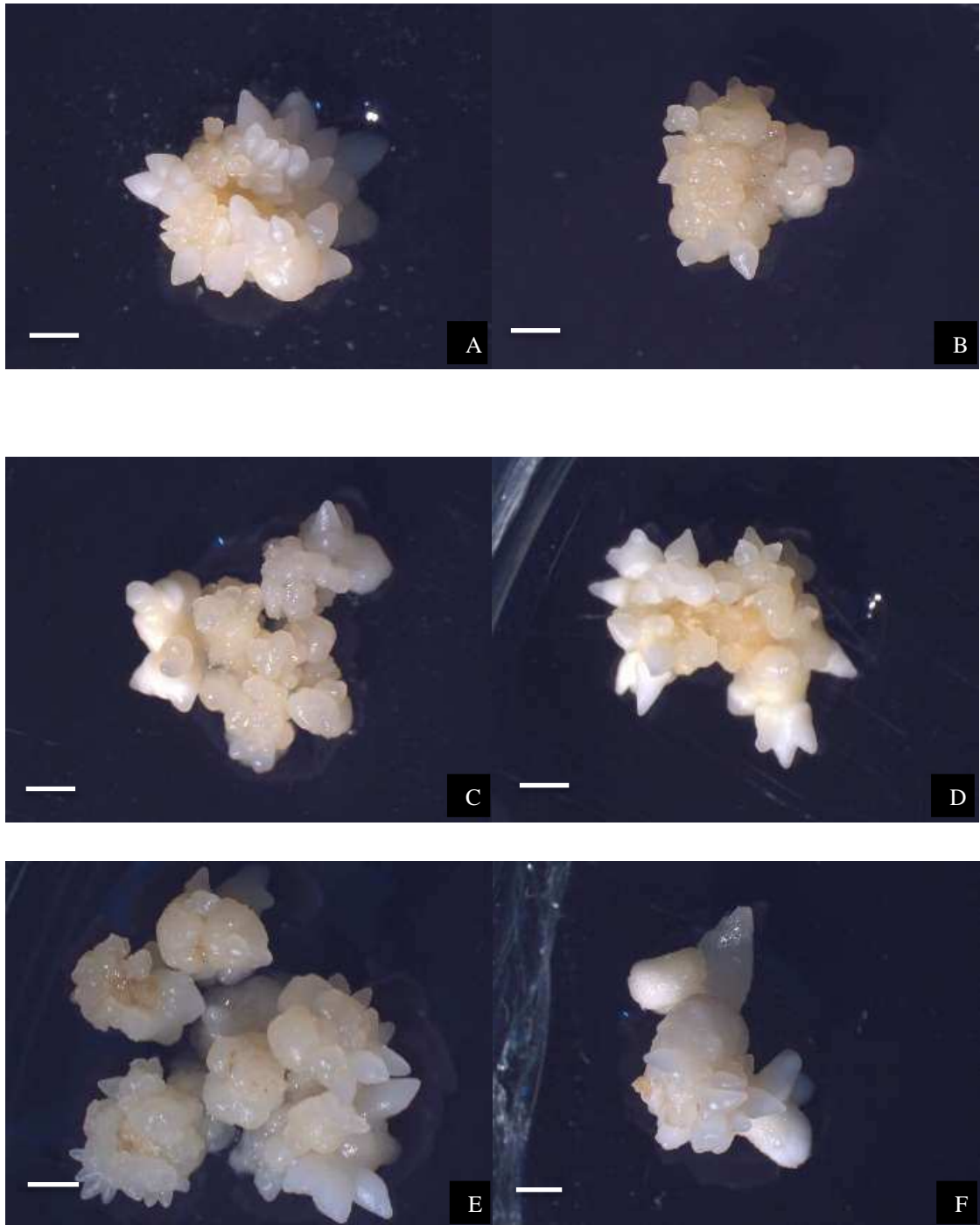
Verificou-se que para os clones AM24 (Deli x Lame) e PL26 (Deli x Lame) comportaram-se similarmente ao clone AM 21, não tendo diferença significativa no número de embriões regenerados das massas pró-embriogênicas obtidas por subcultivo em pHs ajustados entre 4.5 e 6.0 e menor produção de embriões de massas pró-embriogênicas obtidas em pH 4.0 (Figura 6C-E). No entanto, o número de embriões obtidos das massas pró-embriogênicas foi menor que o observado para o AM 21.

No Clone PL10 (Deli x Lame) os maiores números de embriões regenerados foram observados em massas pró-embriogênicas obtidas por subcultivo em meio de multiplicação com pH ajustado a 4.5, 6.0 e no tratamento testemunha. A massa pró-embriogênica multiplicada nos pHs ajustados em 4.0, 5.0 e 5.5 resultaram em baixa produção de embriões somáticos (Figura 6D).

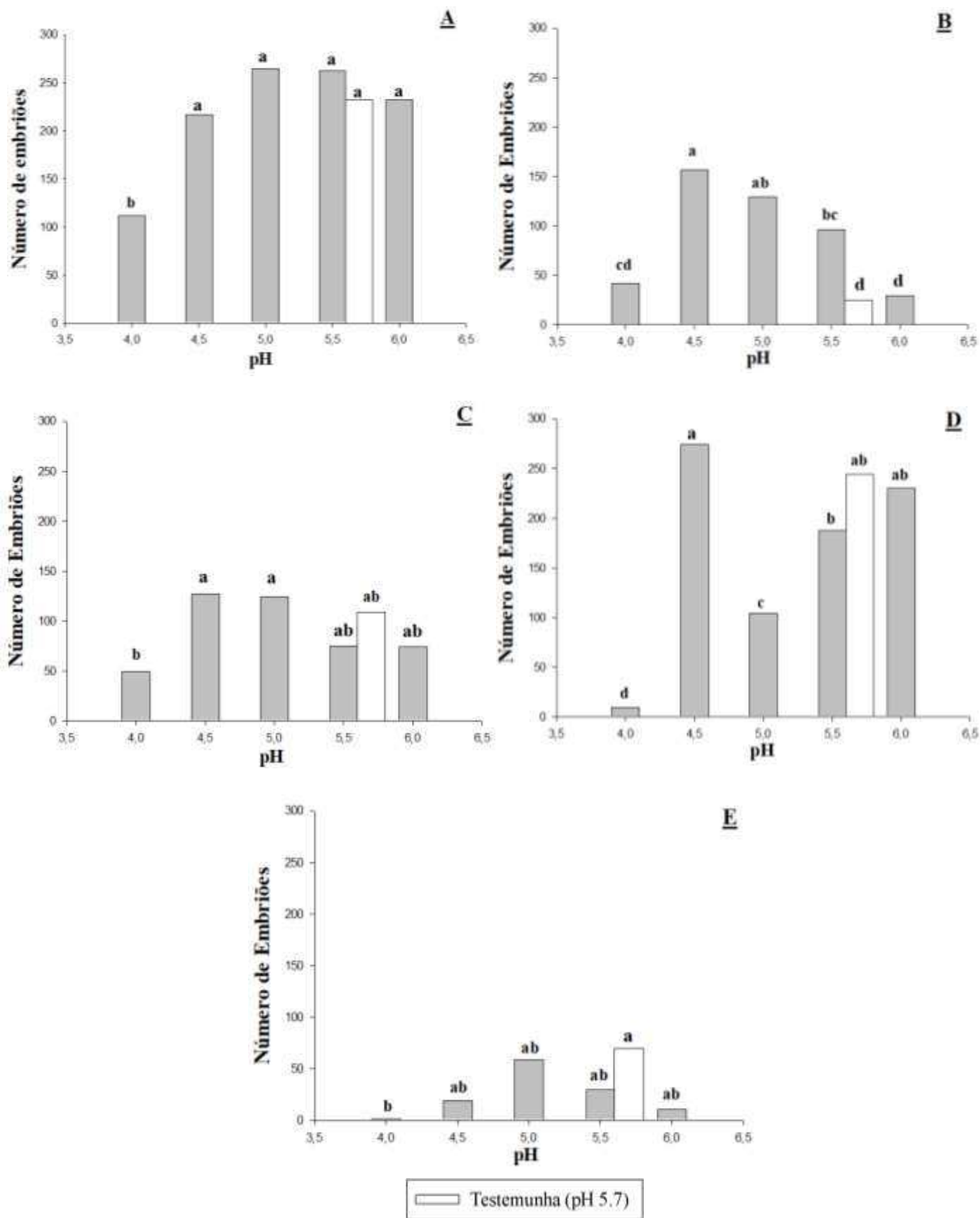




**Figura 4.** Embriões somáticos representativos dos clones AM21 (A), AM23 (B), AM24 (C), PL10 (D) e PL26 (E) após 45 dias em meio de pré-condicionamento. Bar= 0.1 cm.



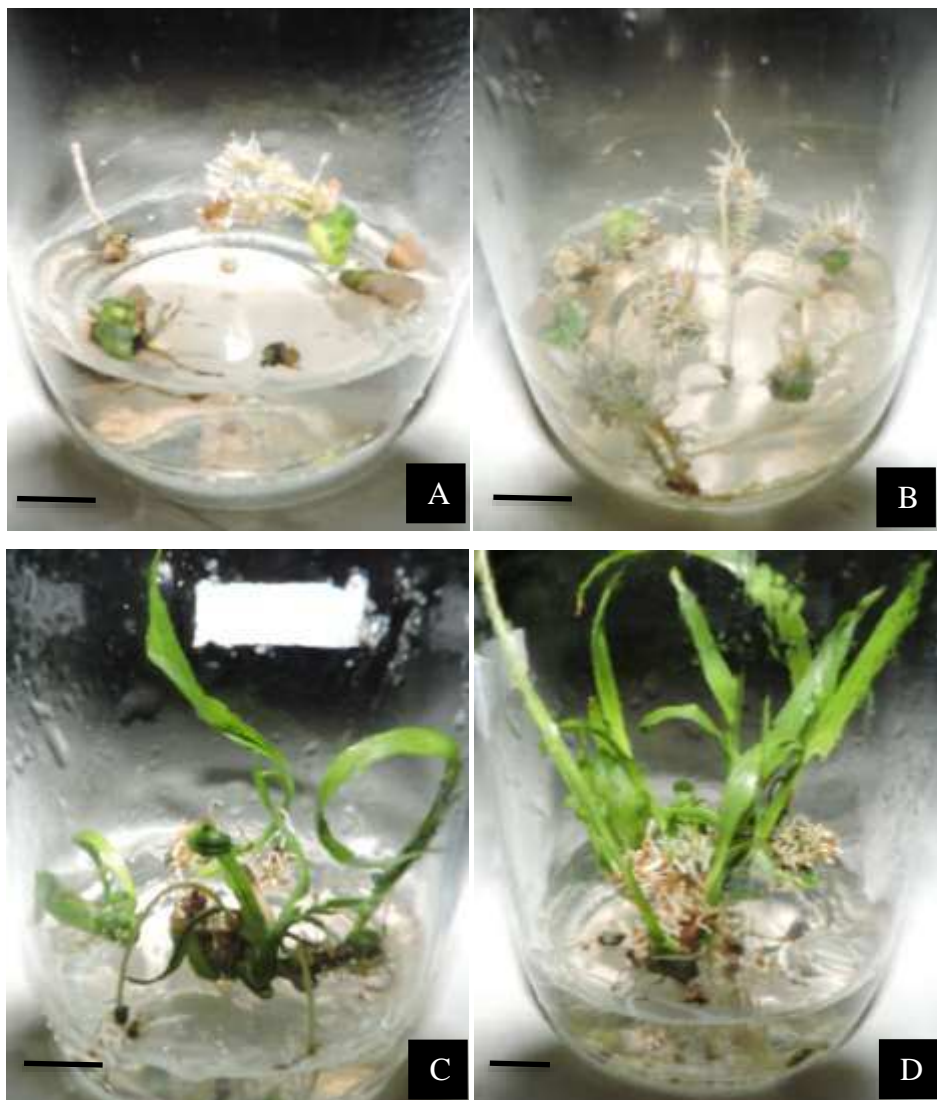
**Figura 5.** Embriões somáticos representativos do clone AM23 em pH 6.0 (A), 5.7 (B), 5.5 (C), 5.0 (D), 4.5 (E) e 4.0 (F), após 45 dias em meio de pré-condicionamento. Bar= 0.1 cm.



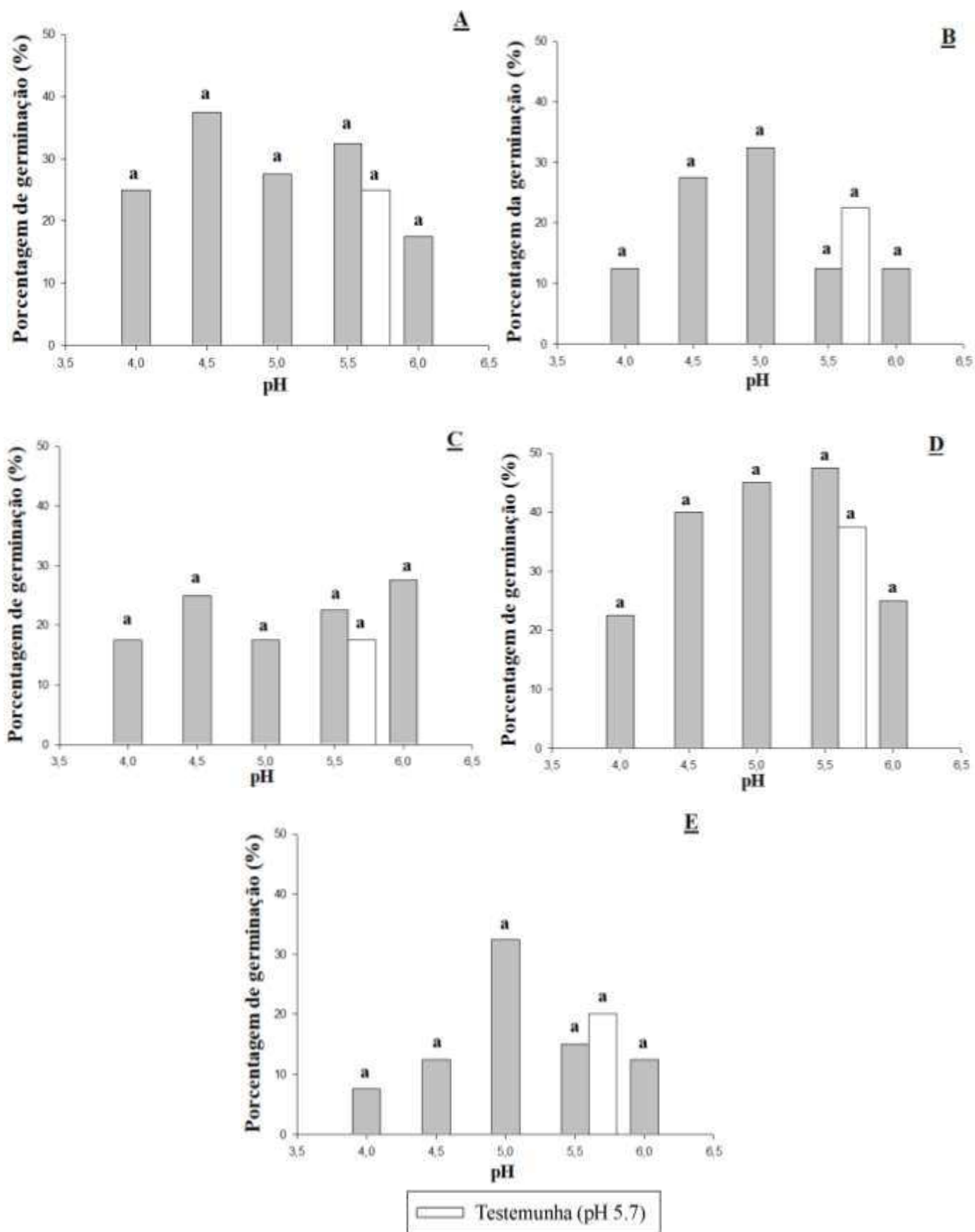
**Figura 6.** Número de embriões somáticos obtido sem meio de pré-condicionamento de Carvalho (2009) por 45 dias, dos clones AM21 (A), AM23 (B), AM24 (C), PL10 (D) e PL26 (E) provenientes dos meios de multiplicação com diferentes pHs ajustados para cada tratamento. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de TUKEY com  $P > 0,05$ .

### 5.3. Fase de germinação

A germinação iniciou-se após oito dias da repicagem do embrião somático em meio de germinação. Aos 60 dias, os embriões somáticos germinados se converteram em plântulas. No entanto, foi observado anomalias na germinação e conversão de plântulas. Alguns embriões não germinaram, outros desenvolveram somente radículas ou a plúmula e poucos completaram o seu desenvolvimento, originando uma plântula perfeita. O número de plântulas perfeitas obtidas não diferiu estatisticamente entre os tratamentos aplicados na produção de massa pró-embriogênica.



**Figura 7.** Embriões somáticos não desenvolvido (Clone PL26, pH 5.5) (A), Embriões somáticos que desenvolveram unicamente radícula (clone AM23, pH 5.7) (B), Embriões somáticos que desenvolveram unicamente plúmula (clone PL10, pH 5.5) (C) e Embriões somáticos originando plântulas perfeitas (clone AM21, pH 5.7) (D). Bar= 1 cm.



**Figura 8.** Porcentagem de germinação de plântulas, 60 dias após transferência, dos clones AM21 (A), AM23 (B), AM24 (C), PL10 (D) e PL26 (E) provenientes dos meios de multiplicação com diferentes pHs ajustados para cada tratamento. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de TUKEY com  $p > 0,05$ .

## 6. DISCUSSÃO

Sabe-se que o baixo pH externo da solução nutritiva pode influenciar o pH interno, tanto no citoplasma como no vacúolo (REID, SMITH & WHITTINGTON, 1989). Pichon e Desbiez (1994) demonstram a correlação entre pH citoplasmático e desenvolvimento celular, sugerindo o envolvimento do pH citoplasmático como sinal mitótico na regulação do ciclo celular nas plantas. Pode-se inferir pelos resultados obtidos (Figura 3), que a acidificação do meio de cultura alterou o pH intracelular, influenciando diretamente na divisão e multiplicação celular dos explantes. Caso similar foi descrito por Aerts et al., (1985) no seu trabalho em células de *Dictyostelium*, em que descreveram mudanças no pH intracelular durante o ciclo de divisão celular, que aumentou tanto a síntese de proteínas como a replicação do DNA, deduzindo que estes processos são extremamente sensíveis ao pH.

É conhecida a similaridade entre embriões somáticos e embriões zigóticos, portanto seus processos metabólicos podem ser influenciados de igual forma, como descrito por Smith e Krikorian, (1990), em embriões somáticos de cenoura (*Daucus carota*). Os mesmos autores afirmam que o controle do pH do médio externo influencia as mudanças no pH intracelular das células pró-embriogênicas e, portanto, imitando diretamente ou indiretamente processos normais que ocorrem durante a embriogênese zigótica. Outros autores relatam a influência do pH ácido externo na multiplicação celular, maturação e germinação de embriões zigóticos como no caso do feijão (*Phaseolus vulgaris*) (LA PAGE-DEGIVRY, BARTHE, et al., 1989). Por outro lado, o pH da água do coco altamente ácida (pH 4.7) inibe a divisão celular e evita a germinação precoce do embrião de coco (*Cocos nucifera L.*) (BASU, SETHI & GUHA-MUKHERJEE, 1988).

Este favorecimento da multiplicação de massas pró-embriogênicas da palma de óleo em pH baixo pode ter ocorrido em função da maior absorção de nitrogênio na forma de  $\text{NO}_3^-$  em detrimento ao  $\text{NH}_4^+$ , pois o transporte das diferentes formas de nitrogênio dependem do gradiente eletroquímico externo das células, como reportado por Zsoldos e Haunold, (1982). Leljac-levanic et al. (2004), descrevem os efeitos negativos de altos níveis de  $\text{NH}_4^+$  em cultura embriogênica de abóbora (*Cucurbita pepo L.*), pois bloqueia a maturação e a multiplicação das massas embriogênicas. Por outro lado, ressaltaram que o  $\text{NO}_3^-$  absorvido sozinho ou em combinação com baixos níveis de  $\text{NH}_4^+$  estimula os diversos estágios da embriogênese, sendo favorável à multiplicação de embriões somáticos.

O presente estudo mostra que a multiplicação de massa pró-embriogênica de palma de óleo foi favorecida utilizando o MES hidratado. Pasternak et al, (2002), apresentaram mudanças na morfologia e divisão celular na embriogênese somática de alfafa (*Medicago sativa*) quando utilizado MES como tamponante na solução nutritiva, ressaltando que o estabelecimento do gradiente de pH/próton na membrana plasmática é importante na desdiferenciação e divisão celular. Além disso, os mesmos autores relataram que quando o pH é menor que 5.4 as células são liberadas do bloqueio e reativadas para a divisão celular. Outros estudos destacam o MES como promotor e estimulante na formação de tecido embriogênico e o crescimento e multiplicação de embriões somáticos (PULLMAN, JOHNSON, *et al.*, 2005).

## **7. CONCLUSÃO**

Os clones avaliados responderam de maneira diferenciada na fase de multiplicação nos diversos níveis de pH, indicando que há variabilidade quanto à eficiência do pH para a produção de massas pró-embriogênicas.

Embora todos os clones tenham se ajustado melhor a pHs entre 4.5 e 5.0, cada clone diferiu na magnitude da multiplicação, demonstrando que este não só depende das condições exógenas, mas também do genótipo de cada material vegetal.

Já que existe uma resposta positiva dos clones para pHs entre 4.5 e 5.0, pode-se concluir que o gradiente eletroquímico baixo estimula a absorção de anions como o  $\text{NO}_3^-$  e promove a produção e desenvolvimento das massas pró-embriogênicas.

O desenvolvimento dos embriões dependeu não só da influência da fase da multiplicação, como também cada um pode apresentar diferentes exigências de pH dos clones avaliados nas fases de regeneração e germinação.

## **8. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que seria útil avaliar o papel do pH do saco embrionário no fruto e o pH intracelular das células zigóticas antes, durante e após a fertilização, e o potencial de auxinas exógenas para controlar a embriogênese por meio de mudanças no pH intracelular, isso com o objetivo de analisar o comportamento natural em que se desenvolve o embrião zigótico.

Sugere-se outros estudos para verificar a influência dos anions no pH citoplasmático e as mudanças que podem causar no metabolismo celular e na divisão celular das massas pró-embriogênicas de palma de óleo.

Embora resultados obtidos na fase de maturação e na fase de germinação não diferenciam estatisticamente entre os tratamentos avaliados, se esses dados forem levados para uma produção industrial, aquelas pequenas diferenças nos gráficos poderiam transformar-se em resultados significativos e poderia ser utilizado como base para uma maior produção de plântulas de palma de óleo.



## 9. ANEXOS

**Figura 9.** Equação Weibull de 5 parâmetros.

$$f = \begin{cases} y_0, & \text{se } x \leq x_0 - b \left( \frac{c-1}{c} \right)^{\frac{1}{c}}; \\ y_0 + a \left( \frac{c-1}{c} \right)^{\frac{1-c}{c}} \left[ \left( \frac{x-x_0}{b} \right) + \left( \frac{c-1}{c} \right)^{\frac{1}{c}(c-1)} \right] e^{- \left[ \left( \frac{x-x_0}{b} \right) + \left( \frac{c-1}{c} \right)^{\frac{1}{c}(c-1)} \right]^{\frac{c-1}{c}}}, & \text{se } x > x_0 - b \left( \frac{c-1}{c} \right)^{\frac{1}{c}} \end{cases}$$

$$f(x) = \begin{cases} y_0, & \text{se } x \leq x_0 - b \left( \frac{c-1}{c} \right)^{\frac{1}{c}}; \\ y_0 + a \left( \frac{c-1}{c} \right)^{\frac{1-c}{c}} \left[ \left( \frac{x-x_0}{b} \right) + \left( \frac{c-1}{c} \right)^{\frac{1}{c}(c-1)} \right] e^{- \left[ \left( \frac{x-x_0}{b} \right) + \left( \frac{c-1}{c} \right)^{\frac{1}{c}(c-1)} \right]^{\frac{c-1}{c}}}, & \text{se } x > x_0 - b \left( \frac{c-1}{c} \right)^{\frac{1}{c}} \end{cases}$$

**Tabela 3.** Parâmetros de regressão para peso da matéria fresca em cada clone na fase de multiplicação.

AM21	AM23	AM24	PL10	PL26
<b>Equação: Pico; Weibull, 5 Parâmetros</b>				
a=133.3446	a=100.0662	a=207.3626	a=133.8696	a=61.9845
b=0.9764	b=0.9881	b=1.3689	b=0.8872	b=0.7515
c=3.2956	c=2.4257	c=1.7128	c=1.9373	c=2.0579
x0=4.7476	x0=4.5369	x0=4.8769	x0=4.6177	x0=4.5909
y0=109.3954	y0=-5.0943	y0=38.6863	y0=45.5133	y0=86.2554

**Tabela 4.** Coeficiente de determinação na regressão de Weibull de 5 parâmetros para peso da matéria fresca em cada clone na fase de multiplicação.

CLONES	R <sup>2</sup>
AM21	99,99
AM23	79,46
AM24	82,52
PL10	58,71
PL26	94,27

**Tabela 5.** Teste de hipótese F parapeso da matéria fresca na fase de multiplicação.

<b>FV</b>	<b>TESTE</b>	<b>GL NUM</b>	<b>GL DEN</b>	<b>F</b>	<b>PROBABILIDADE (%)</b>
Tratamento	QMG/QMR	5	33	29.52339	.0 **
Clone	QMA/QMR	4	33	40.75448	.0 **
Trat x Clone	QMGA/QMR	7	33	19.71674	.0 **

**Tabela 6.** Teste de hipótese F paranúmero de embriões na fase de maturação.

<b>FV</b>	<b>TESTE</b>	<b>GL NUM</b>	<b>GL DEN</b>	<b>F</b>	<b>PROBABILIDADE (%)</b>
Tratamento	QMG/QMR	5	120	37.77689	.0 **
Clone	QMA/QMR	4	120	161.82645	.0 **
Trat x Clone	QMGA/QMR	20	120	11.5599	.0 **

**Tabela 7.** Teste de hipótese F paranúmero de embriões desenvolvidos na fase de germinação.

<b>FV</b>	<b>TESTE</b>	<b>GL NUM</b>	<b>GL DEN</b>	<b>F</b>	<b>PROBABILIDADE (%)</b>
Tratamento	QMG/QMR	5	120	6.54682	.00358 **
Clone	QMA/QMR	4	120	7.58353	.00146 **
Trat x Clone	QMGA/QMR	20	120	1.71624	3.9485 *

## 10. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.

- AERTS, R.; DURSTON, A.; MOOLENAAR, W. Cytoplasmic pH and the Regulation of the Dictyostelium Cell Cycle. **Cell**, v. 43, p. 653-657, 1985.
- ATILIO, B.; CAUSIN, H. The Central Role of Amino Acids on Nitrogen Utilization and Plant Growth. **J. Plant Physiol**, v. 149, p. 358-362, 1996.
- BASU, A.; SETHI, U.; GUHA-MUKHERJEE, S. Induction of Cell Division in Leaf Cells of Coconut Palm by Alteration of pH and its Correlation with Glyoxalase-I Activity. **Journal of Experimental Botany**, v. 39, n. 209, p. 1735-1742, 1988.
- BITTISNICH, D.; WILLIAMSON, R. Tip-localised H<sup>+</sup> fluxes and the applicability of the acid-growth hypothesis to tip growing cells: control of chloronemal extension in *Funaria hygrometrica* by auxin and light. **Planta**, v. 178, p. 96-102, 1989.
- BOARI, A. D. J. **Estudos Realizados sobre o Amarelecimento Fatal do Dendzeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.)**. EMBRAPA. Belém, p. 67. 2008. (1517-2201).
- BRITTO, D.; KRONZUCKER, H. NH<sub>4</sub><sup>+</sup> toxicity in higher plants: a critical review. **Journal of Plant Physiol**, v. 159, p. 567-584, 2002.
- CANELLAS, L.; SANTOS, G. **HUMOSFERA, Tratado preliminar sobre a química das substâncias húmicas**. [S.l.]: BossaMídia Ltda, 2005. ISBN 85-905835-1-1.
- CARVALHO, M. et al. **Embriogênese somática a partir de folhas imaturas e flores desenvolvidas in vitro em dendzeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.)**. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, p. 86. 2009.
- CHAN, J. et al. Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 515-521, 1998.
- CHIA, G. et al. Repetibilidade da produção de cachos de híbridos interespecíficos entre o caiaué e o dendzeiro. **Acta Amazonica**, v. 39, n. 2, p. 249-254, 2009.
- CORLEY, R.; TINKER, P. **The Oil Palm**. 4. ed. [S.l.]: Blackwell Science Ltd, 2003.
- COSME, D. Programa GENES - Aplicativo Computacional em Estatística Aplicada à Genética (GENES - Software for Experimental Statistics in Genetics). **Genet. Mol. Biol**, v. 21, n. 1, p. 1-4, 1998. ISSN 1678-4685.
- DEORE, J.; JOHNSON, S. High-frequency plant regeneration from leaf-disc cultures of *Jatropha curcas* L.: an important biodiesel plant. **Plant Biotechnol Rep**, n. 2, p. 7-11, 2008.
- DUBLIN, P. Multiplicación vegetativa de café, hevea y cacao. In: ROCA, W.; MROGINSKI, L. **Cultivo de tejidos en la agricultura**. [S.l.]: CIAT, 1993. Cap. 26, p. 578-596.

- DUVAL, Y.; ENGELMANN, F.; DURAND-GASSELIN, T. Somatic Embryogenesis in Oil Palm. **Biotechnology in Agriculture and Forestry**, Montpellier, France, v. 30, p. 335-352, 1995.
- EEUWENS, C. Effects of organic nutrients and hormones on growth and development of tissue explants from coconut (*cocos nucifera*) and date palm (*Phoenix dactylifera*) palms cultured in vitro. **Physiol. Plant**, v. 42, p. 173-178, 1978.
- EEUWENS, C. et al. 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**, v. 70, p. 311-323, 2002.
- EPOA. **Historia del Aceite de Palma Datos y Cifras**. European Palm Oil Alliance. Países Bajos, p. 16. 2014.
- ERDEI, L.; BÉREZI, A.; ZSOLDOS, F. Membrane and ion transport peculiarities in cereals under acidic and alkaline stress. **Physiol. Plant**, v. 53, p. 471-474, 1981.
- FAÇANHA, A. et al. Bioatividade de ácidos húmicos: efeitos sobre o desenvolvimento radicular e sobre a bomba de prótons da membrana plasmática. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 37, n. 9, p. 1301-1310, 2002.
- FEHÉR, A.; PASTERNAK, T. P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 74, p. 201-228, 2003.
- FERNANDO, S. et al. Histological analysis of plant regeneration from plumule explants of *Cocos nucifera*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 72, p. 281-284, 2003.
- FINNEMANN, J.; SCHJOERRING, J. Translocation of NH<sup>+</sup> in oilseed rape plants in relation to glutamine synthetase isogene expression and activity. **Physiol. Plant.**, v. 105, p. 469-477., 1999.
- FORDE, B. Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 1465, p. 219-235, 2000.
- GARCÉS, I.; SÁNCHEZ, M. Productos derivados de la industria de la palma de aceite. **Palmas**, v. 18, n. 1, p. 33-48, 1997.
- GEORGE, E.; HALL, M.; KLERK, G. **Plant Propagation by Tissue Culture**. third. ed. [S.l.]: Springer, 2008.
- GUTIERRES, L. PERSPECTIVAS DE LA BIOTECNOLOGIA EN LAS ECOTECNOLOGIAS. **Scientia et Technica**, v. 12, n. 32, p. 451-456, 2006.
- HERNANDEZ, J. et al. Propuesta para la formulación de soluciones nutritivas en estudios de nutrición vegetal. **nterciencia**, v. 31, n. 4, p. 246-253, 2006.

- HERRERA, A. Manejo de la solución nutritiva en la producción de tomate en hidroponía. **Terra Latinoamericana**, v. 17, p. 221-229, 2000. ISSN 2395-8030.
- JOURDAN, C.; REY, H. Architecture and development of the oil-palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) root system. **Plant and Soil**, n. 189, p. 33-48, 1997.
- KARPOFF, A. Hormones and early in vitro development of epiphyllous propagules on *Bryophyllum calycinum*. **American Journal of Botany**, v. 69, n. 3, p. 348-355, 1982.
- KONAN, K. et al. In vitro conservation of oil palm somatic embryos for 20 years on a hormone-free culture medium: characteristics of the embryogenic cultures, derived plantlets and adult palms. **Plant Cell Rep**, v. 29, p. 1-13, 2010.
- KOSKY, R. et al. Somatic embryogenesis of the banana hybrid cultivar FHIA-18 (AAAB) in liquid medium and scaled-up in a bioreactor. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 68, p. 21–26, 2002.
- LA PAGE-DEGIVRY, M. et al. Regulation of abscisic acid translocation during embryo maturation of *Phaseolus vulgaris*. **Physiologia Plantarum**, v. 77, p. 81-86, 1989.
- LELJAK-LEVANIC, D. et al. Somatic embryogenesis in pumpkin (*Cucurbita pepo* L.): Control of somatic embryo development by nitrogen compounds. **J. Plant Physiol**, v. 161, p. 229–236, 2004.
- LITZ, R.; JARRET, R. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. In: ROCA, W.; MROGINSKI, L. **Cultivo de tejidos en la agricultura**. [S.l.]: CIAT, 1993. Cap. 7, p. 144-157.
- LOPEZ, J.; CAYÓN, D. **Cacarterización fisiológica y morfológica de palmas de aceite Taisha TAISHA (*Elaeis oleífera* HBK Cortés) y sus híbridos (*Elaeis oleífera* HBK Cortés x *Elaeis guineensis* Jacq.) en la región amazónica del Ecuador**. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, p. 80. 2014.
- MACHADO, C. et al. Efeito de substâncias húmicas na cinética de absorção de potássio, crescimento de plantas e concentração de nutrientes em *Phaseolus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, p. 959-967, 2009.
- MARRÉ, M. et al. Stimulation of weak acid uptake and increase in cell sap pH as evidence for fusicoccin and K<sup>+</sup> induced cytosol alkalization. **Plant Physiol**, v. 82, p. 316-323, 1986.
- MARSCHNER, P. **Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants**. third. ed. [S.l.]: Elsevier Ltd, 2012.
- MARTINEZ, H.; CLEMENTE, J. **O uso do cultivo hidropônico de plantas em pesquisa**. primera. ed. Viçosa: Editora UFV, 2011.

- MCDONALD, K.; JACKMAN, A. Bioreactor studies of growth and nutrient utilization in alfalfa suspension cultures. **Plant Cell Reports**, v. 8, p. 455-458, 1989.
- MILLER, A.; CRAMER, M. Root nitrogen acquisition and assimilation. **Plant Soil**, v. 274, p. 1–36., 2004.
- MIRAGAYA, J. Biodiesel: Tendências no mundo e no Brasil. **palma de aceite**, n. 26, p. 7-13, 2005.
- MONTEIRO, T. R.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. **Embriogênese somática e regeneração de plantas de dendezeiro (Elaeis guineensis Jacq.) a partir do uso de meios de consistência líquida e de cultivos em suspensão**. Universidade de Brasília. Brasília, p. 104. 2013.
- MOURA, E. et al. Histological study of somatic embryogenesis induction on zygotic embryos of macaw palm (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Martius). **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 95, p. 175-184, 2008.
- MÜLLER, A. A. **A cultura do dendê**. EMBRAPA. Belém- PA, p. 25. 1980. (0100-7262).
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Annual Reviews Plant Physiol**, v. 25, p. 135-66, 1974.
- OWEN, A.; JONES, D. Competition for amino acids between wheat roots and rhizosphere microorganisms and the role of amino acids in plant N acquisition. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 33, p. 651±657, 2001.
- PAO, S.; PAULSEN, I.; SAIER, M. Major Facilitator Superfamily. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 62, p. 1–34, 1998.
- PASTERNAK, T. et al. The Role of Auxin, pH, and Stress in the Activation of Embryogenic Cell Division in Leaf Protoplast-Derived Cells of Alfalfa. **Plant Physiology**, v. 129, p. 1807-1830, 2002.
- PICHON, O.; DESBIEZ, M. Is cytoplasmic pH involved in the regulation of cell cycle in plants? **Physiologia plantarum**, v. 92, p. 261-265, 1994.
- 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**. CENIPALMA. Barrancabermeja, p. 4. 2006. (0123-8353).
- PORTILLO, L.; SANTA CRUZ, F. Totipotencia celular: Una revisión y aplicación del concepto. **Scientia CUCBA**, v. 6, p. 13-18, 2004.
- PULLMAN, G. et al. Somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda*) and Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*): improving culture initiation and growth with MES pH buffer, biotin, and folic acid. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 80, p. 91–103, 2005.

- RAMACHANDRA, S.; RAVISHANKAR, G. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 20, p. 101–153, 2002.
- REID, R.; SMITH, A.; WHITTINGTON, J. Control of Intracellular pH in *Chara corallina* during Uptake of Weak Acid. **Journal of Experimental Botany**, v. 40, n. 217, p. 883-891, 1989.
- RIOS, S. et al. **Recursos Genéticos da Palma de Óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.) e Caiuapé (*Elaeis oleifera* (H.B.K.) Cortés)**. EMBRAPA. Manaus, p. 44. 2012. (1517-3135).
- ROCHA, P. Cultivo de tejidos: una herramienta valiosa para el desarrollo de la palma de aceite en Colombia. **Palmas**, v. 8, n. 1, p. 53-64, 2007.
- RODDA, M. et al. ESTÍMULO NO CRESCIMENTO E NA HIDRÓLISE DE ATP EM RAÍZES DE ALFACE TRATADAS COM HUMATOS DE VERMICOMPOSTO. I - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, n. 30, p. 649-656, 2006.
- SAKANO, K. Metabolic Regulation of pH in Plant Cells: Role of Cytoplasmic pH in Defense Reaction and Secondary Metabolism. **Internacional Review of Cytology**, v. 206, p. 1-44, 2001.
- SANÉ, D. et al. Histocytological Analysis of Callogenesis and Somatic Embryogenesis from Cell Suspensions of Date Palm (*Phoenix dactylifera*). **Annals of Botany**, v. 98, p. 301-308, 2006.
- SCHERWINSKI-PEREIRA, J. et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration in açai palm (*Euterpe oleracea*). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 109, p. 501-508, 2012.
- SIDDIQI, M. et al. Effects of ammonium and inorganic carbon enrichment on growth and yield of a hydroponic tomato crop. **J. Plant Nutr. Soil Sci**, v. 165, p. 191–197, 2002.
- SIGMA ALDRICH. Mes Hydrate, p. 1. Disponível em:  
<<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/m8250?lang=en&region=CO>>.
- SILVA, R.; LUIS, Z.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. Differential responses to somatic embryogenesis of different genotypes of Brazilian oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 111, p. 59-67, 2012.
- SMITH, D.; KRIKORIAN, A. Somatic embryogenesis of carrot in hormone-free medium: external pH control over morphogenesis. **American Journal of Botany**, v. 77, n. 11, p. 1634-1647, 1990.
- SOARES, F. et al. Efeito de meios de cultura, concentrações de GA3 e pH sobre a germinação in vitro de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência agrotecnologica de Lavras**, v. 33, p. 1847 -1852, 2009.

- SOH, A. et al. Commercial-Scale Propagation and Planting of Elite Oil Palm Clones: Research and Development Towards Realization. **Journal of Oil Palm Research**, v. 23, p. 935-952, 2011.
- STEINMACHER, S. et al. 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, p. 699-709, 2007.
- TEIXEIRA, J.; SONDAHL, M.; KIRBY, L. Somatic embryogenesis from immature inflorescences of oil palm. **Plant Cell Reports**, v. 13, p. 247-250, 1994.
- TEIXEIRA, J. et al. Establishment of oil palm cell suspensions and plant regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 40, p. 105-111, 1995.
- USDA. United States Department of Agriculture, 2017. Disponible em: <<https://www.fas.usda.gov/data/oilseeds-world-markets-and-trade>>.
- VILLALOBOS, V.; THORPE, T. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. In: ROCA, W.; MROGINSKI, L. **Cultivo de Tejidos en la Agricultura**. Cali: [s.n.], 1993. Cap. 6, p. 127-141.
- WALCH-LIU, P. et al. Rapid effects of nitrogen form on leaf morphogenesis in tobacco. **J. Exp. Bot**, v. 51, p. 227-237, 2000.
- WALKER, D.; SMITH, S.; MILLER, A. Simultaneous Measurement of Intracellular pH and K<sup>+</sup> or NO<sub>3</sub><sup>-</sup> in Barley Root Cells Using Triple-Barreled, Ion-Selective Microelectrodes. **Plant Physiol**, v. 108, p. 743-751, 1995.
- WILLIAMS, E.; MAHESWARAN, G. Somatic Embryogenesis: Factors Influencing Coordinated Behaviour of Cells as an Embryogenic Group. **Annals of Botany**, Victoria, Australia, v. 57, p. 443-463, 1986. ISSN 0305-7364.
- ZSOLDOS, F.; HAUNOLD, E. Influence of 2,4-D and low pH on potassium, ammonium and nitrate uptake by rice roots. **Physiology of Plants**, v. 54, p. 63-68, 1982.