



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA**

**CONVERSÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE HÍBRIDOS DE
DENDEZEIRO (*ELAIS GUINEENSIS X E. OLEIFERA*) EM PLÂNTULAS.**

JOSEANE DE NAZARÉ OLIVEIRA CARDOSO

Belém- Pará
2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

**CONVERSÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE HÍBRIDOS DE
DENDEZEIRO (*ELAIS GUINEENSIS X E. OLEIFERA*) EM PLÂNTULAS.**

JOSEANE DE NAZARÉ OLIVEIRA CARDOSO

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, para obtenção do título de **Mestre**.

Orientador: Prof. Dr. Vicente Savonitti Miranda
Co-orientador: Dr. Oriel Filgueira de Lemos

Belém- Pará
2010



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

**CONVERSÃO IN VITRO DE EMBRIÃO EM PLANTA DE HÍBRIDOS DE
DENDEZEIRO**

JOSEANE DE NAZARÉ OLIVEIRA CARDOSO

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, para obtenção do título de “Mestre em Agronomia”.

Banca Examinadora

Engenheiro Agrônomo Prof.Dr. Vicente Savoniti Miranda
(Universidade Federal Rural da Amazônia)
Presidente da Banca- Orientador

Biólogo Prof.Dr. Roberto Cezar Lobo da Costa
(Universidade Federal Rural da Amazônia)
1º Avaliador

Bióloga Dra. Elisa Ferreira Moura Cunha
(Embrapa Amazônia Oriental)
2º Avaliador

Engenheiro Agrônomo Dr. Osmar Alves Lameira
(Embrapa Amazônia Oriental)
3º Avaliador

SUMÁRIO

	p.
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMO	10
ABSTRACT	10
INTRODUÇÃO	12
REVISÃO DE LITERATURA	12
Histórico	12
Morfologia do dendezeiro	14
Importância ambiental	16
Importância sócio-econômica	17
Pragas e doenças do dendezeiro	21
Recursos genéticos e melhoramento genético de plantas	26
Germinação e propagação vegetativa	19
Aplicação de cultura de tecidos em dendezeiro	27
Resgate de embriões	29
MATERIAL E MÉTODOS	29
Desinfestação dos embriões	31
RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
Contaminação dos embriões	33
Oxidação dos embriões	35
Conversão de embriões in vitro em plântulas de dendê	36
Regeneração de embriões	37
Formação de plântulas	40

CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
ANEXO	50
ANEXO 1	50
ANEXO2	51

LISTA DE TABELAS

	p.
Tabela 1: Consumo mundial de óleo de palma (mil ton) de acordo com os principais países consumidores.	20
Tabela 2: Comparação da produtividade e geração de emprego de algumas oleaginosas com potencial para produção de biodiesel.	21
Tabela 3: Meios de cultura componentes dos quatro tratamentos.	40
Tabela 4: Composição do meio de cultura de Murashige & Skoog (1962).	41
Tabela 5: Composição do meio de cultura Y ₃ (Eeuwens, 1976)	41
Tabela 6: Médias do número e comprimento de raízes, comprimento do caule adicionalmente altura das plantas no híbrido CN 470.	51
Tabela 7: Médias do número e comprimento de raízes, comprimento do caule adicionalmente altura das plantas no híbrido CN 353.	52
Tabela 8: Médias do número e comprimento de raízes, comprimento do caule adicionalmente altura das plantas no híbrido CN 514.	52

LISTA DE FIGURAS

	p.
Figura 1: Tipos de frutos de dendezeiro em função da espessura do endocarpo. Figura 2a – Frutos do tipo dura. Figura 2 b –Frutos do tipo tenera. Figura 2c – Frutos do tipo psifera.	15
Figura 2: Corte longitudinal do fruto do dendezeiro.	16
Figura 3: Etapas do processo de transformação primário do dendê, com respectivos subprodutos e usos.	22
Figura 4: Óleos de dendê: A - oil palm extraído da polpa e B - kernel oil extraído da amêndoa.	23
Figura 5: Danos causados pelo Amarelecimento Fatal.	25
Figura. 6.a: Dendezeiro: amarelecimento e necrose da ponta do folíolo para base; (b) Necrose da folha flecha.	27
Figura 7 a: Sintoma interno do A.V (b) Sintoma externo do A.V.	27
Figura 8: Sintomas da fusariose.	28
Figura 9: Etapas do processo de assepsia e inoculação de embriões de dendê.	39
Figura 10: Porcentagem de oxidação dos genótipos inoculados de dendê.	43
Figura 11: Porcentagem de contaminação dos genótipos inoculados de dendê.	44
Figura 12 a: Porcentagem de embriões contaminados por bactéria; 12 b: Porcentagem de embriões contaminados por fungos.	46
Figura 13: Germinação <i>in vitro</i> de embriões de dendê dos híbridos CN 470, CN 514 e CN 353, respectivamente.	47
Figura 14. Porcentagem de germinação <i>in vitro</i> de embriões de dendê em 4 meios de cultura e 3 diferentes genótipos.	47
Figura 15: Embrião na fase escura aos sete dias de cultivo	48
Figura 16: Embrião cultivado na fase clara aos 21 dias.	48
Figura 17: Início do processo de emissão da radícula em embriões de dendezeiro.	49
Figura 18: Conversão <i>in vitro</i> de embriões de dendê a uma planta completa, onde se observa a formação da folha (F), do ápice cotiledonar	49

(A.C) e da raiz(R).

Figura 19: Aspecto de uma planta desenvolvida *in vitro* cultivada em meio nutritivo após 3 meses de cultivo.

50

LISTA DE ABREVIATURAS

A.F	Doença do dendezeiro: Amarelecimento fatal
A.V	Doença do dendezeiro: Anel vermelho
cm	centímetro
EDTA	Etilenodiamino tetraacetato
G x A	Genótipo- Ambiente
ha	hectare
mL	mililitro
mg	miligrama
MS	Meio básico de cultura de Murashige e Skoog (1962)
NaH ₂ PO ₄	Fosfato diácido de sódio.
Y ₃	Meio básico de cultura Y ₃ (Eeuwens, 1976)

RESUMO

O dendezeiro (*Elaeis guineensis* jacq) se constitui numa das principais espécies para o cultivo em áreas devastadas. Apresenta como principal fator limitante da expansão do cultivo no Pará, a doença conhecida como amarelecimento fatal associada às dificuldades de aquisição de sementes de híbridos. Dentro do programa de melhoramento genético a hibridação interespecífica entre as duas espécies principais, *Elaeis guineensis* e *E. oleífera* tem gerado híbridos com resistência ao AF, porém a germinação das sementes é baixa, alcançando apenas cerca de 30%. O objetivo deste trabalho foi estabelecer a germinação *in vitro* de híbridos de dendezeiro por meio da identificação de condições de cultivo mais adequadas para conversão de embriões zigóticos em plantas provenientes de sementes de três de híbridos de dendê. Foram inoculados cinco embriões por frasco em quatro meios de cultura diferentes, e avaliados respostas quanto à germinação e formação de plantas, e os dados foram submetidos a análise de variância e teste de comparação de média de Tukey a 5 % de probabilidade utilizando o software SISVAR 5.2. O híbrido CN 470 apresentou melhores resultados em nas variáveis analisadas, sendo o meio composto por MS + NaH₂PO₄ 0,17g.L⁻¹ + CA o mais adequado para a conversão de embriões zigóticos em plântulas, onde observou se que há grande influência do genótipo na germinação *in vitro*. É possível a formação, em três meses, de plântulas completas e normais a partir da germinação *in vitro* de embriões zigóticos de sementes híbridas de dendezeiro.

PALAVRAS-CHAVE: *Elaeis guineensis* e *E. oleífera*, hibridação interespecífica, cultura de embrião, melhoramento genético, amarelecimento fatal;.

ABSTRACT

The Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq) if constitutes one of the main species for cultivation in deforested areas, it reduces the environmental impact when fully established, protects the soil against erosion and provides a significant level of "carbon sequestration", besides the possibility of holding long term, around 20 to 25 years, with high potential for oil production (from 4400 to 6600 liters per ha), and basically propagated by seeds. Presents the main factor limiting the expansion of cultivation in Pará, the disease known as fatal yellowing of the difficulties associated with the purchase of hybrid seeds. Within the breeding program of interspecific hybridization between the two main species, *Elaeis guineensis* and *E. oleifera* has generated hybrids with resistance, but seed germination is low, reaching about 30%, the objective was to establish the in vitro germination of different hybrids through the identification of culture conditions more suitable for the conversion of zygotic embryos in plants from seeds of three varieties of oil palm hybrids. Five embryos were inoculated per bottle in four different culture media, and evaluated responses for seed germination and seedling plants, and data were submitted to the analysis of variance and comparison tests of Tukey test at 5% probability using the software SISVAR 5.2. Variety CN 470 achieved better results in all aspects analyzed, and the medium consisting of MS + NaH₂PO₄ 0.17 g L⁻¹ + CA the most suitable for the conversion of zygotic embryos on seedlings, where he observed that there is great influence of genotype on in vitro germination. the presence of 0.17 gL⁻¹ of NaH₂PO₄ proved crucial in the process of seedling used in any medium, it is possible to form in three months and normal complete plantlets from in vitro germination of zygotic embryos of hybrid seed palm.

KEYWORDS: *Elaeis guineensis* and *E. oleifera*, interspecific hybridization, embryo culture, breeding, yellowing gret.

CONVERSÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE HÍBRIDOS DE DENDEZEIRO (*ELAIS GUINEENSIS X E. OLEIFERA*) EM PLÂNTULAS.

2. Introdução

O dendezeiro (*Elaeis guineensis* jacq) é uma arecaceae, originária da África, cuja dispersão ocorreu a partir do século XV, com o comércio de escravos (MULLER, 1992). O dendezeiro consta dos relatos dos primeiros navegadores, como parte integrante da paisagem e da cultura popular da África, desde o século XV. O óleo de palma tem sido utilizado pelo homem desde a época dos faraós egípcios.

Os primeiros plantios industriais de dendezeiros datam do início do século passado. A África contava, em 1939, com apenas 14.000 hectares de plantações comerciais, enquanto que, desde 1935, os países do sudeste asiático (Malásia e Indonésia) já eram os primeiros exportadores mundiais de óleo de palma. No Brasil foi introduzido por escravos em 1670, dando origem ao dendezeis subspontâneos que ocorrem na zona litorânea da Bahia. Na região Norte, a sua introdução aconteceu em 1951, através do antigo Instituto Agrônomo do Norte - IAN (hoje EMBRAPA./CPATU) que importou algumas linhagens do Institut de Recherches pour les Huilles et Oleagineux (IRHO/França), para avaliar o desempenho dessa cultura nas condições edafoclimáticas da Amazônia Brasileira. O objetivo do trabalho foi selecionar o melhor híbrido e o meio de cultura mais adequado para regeneração *in vitro* de plântulas de híbridos de dendezeiro.

3. Revisão de literatura

3.1. Histórico

O dendezeiro (*Elaeis guineensis* jacq) é uma palmeira originária da Costa Ocidental da África (Golfo da Guiné), originalmente identificado por Jacquin em 1763 ao observar dendezeiros introduzidos na Martinica, oriundos do Oeste Africano, de onde acabou herdando a denominação *guineensis*, segundo Purseglove (1972).

Pertencente à família Arecaceae, normalmente cultivada em regiões tropicais úmidas na África, Ásia e América, onde é também conhecido como palmeira-de-óleo-africana, avora, palma-de-guiné, palma, dendém (em Angola), palmeira-dendém ou coqueiro-de-dendê. É considerada a segunda mais importante fonte de óleo vegetal (Henderson & Osborne, 2000; Wahid et al., 2004), e foi introduzida no Brasil no século XVII via comércio dos escravos (Muller et al., 1992).

O fruto do dendê produz dois tipos de óleo: o óleo de dendê ou de palma (palm oil, como é conhecido no mercado internacional), extraído da parte externa do fruto, o mesocarpo; e o óleo de palmiste (palm kernel oil), extraído da semente, similar ao óleo de coco e de babaçu. Inicia a sua produção no terceiro ano, podendo a exploração se estender até os trinta anos, sendo considerada a oleaginosa de maior produtividade com três a oito toneladas de óleo ha⁻¹ ano⁻¹, produzindo durante o ano todo. Segundo Pandolfo (1981), pode-se extrair até 22% de óleo de polpa e até 3,5% de óleo de amêndoa sobre o peso do cacho.

Os primeiros plantios industriais de dendezeiros datam do início do século passado. A África contava, em 1939, com apenas 14.000 hectares de plantações comerciais, enquanto que, desde 1935, os países do sudeste asiático (Malásia e Indonésia) já eram os primeiros exportadores mundiais de óleo de palma. No Brasil, as primeiras plantações industriais de dendezeiro são do início da década de 1960, na Bahia, e logo após, no Pará.

Na região Norte, a introdução aconteceu em 1951 através do antigo Instituto Agrônômico do Norte - IAN (atualmente Embrapa Amazônia Oriental) que importou algumas linhagens do Instituto de Recherches pour les Huilles et Oleagineux (IRHO/França), para avaliar o desempenho dessa cultura nas condições edafoclimáticas da Amazônia Brasileira.

Na região amazônica ocorre o caiaué (*Elaeis oleifera*, Cortés), ou o dendê nativo, que se estende às zonas tropicais do Norte da América do Sul e na América Central. Esta espécie produz pouco óleo, mas tem sido importante na hibridação com *E. guineensis*, na obtenção de cruzamentos resistentes a determinadas doenças (Veiga, et al., 2005). Ambos têm diversos usos, seja na alimentação humana e animal, ou em finalidades não comestíveis (ISAE/FGV, 2003). Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística- IBGE, em 2005 (dados mais novos) o Brasil possuía uma área

plantada de dendê equivalente a 88 mil hectares, os quais forneceram 903 mil toneladas de cachos de frutos que se expande com o respectivo crescimento na produção dos frutos.

3.2. Morfologia do dendezeiro

O dendezeiro é uma planta Monocotiledônea cujo cariótipo é $2n = 32$, pertencente à família das palmeiras, Arecaceae, anteriormente denominada Palmae. É uma palmeira com até 15m de altura, com raízes fasciculadas, estipe (tronco) ereto, escuro, sem ramificações, anelado (devido a cicatrizes deixadas por folhas antigas). As folhas podem alcançar até 1 metro de comprimento, tendo bases recobertas com espinhos. As flores são creme-amareladas e estão aglomeradas em cachos.

O gênero *Elaeis* tem sua origem em palmeiras introduzidas na Martinica, e o dendezeiro recebeu seu nome botânico de Jacquin (1763). *Elaeis* é derivado da palavra grega elaion, que significa óleo, enquanto o nome específico guineensis demonstra que Jacquin atribuíra sua origem à Costa da Guiné. No gênero *Elaeis* existem duas espécies de interesse comercial:

Elaeis oleifera: nativa da América Latina também é encontrada no Brasil e conhecida como caiaué. Tem sido procurada para obtenção de híbridos com a *Elaeis guineensis*.

Elaeis guineensis: é classificado quanto à espessura do endocarpo do fruto, que se subdividem (Muller 1980) (Figura 1):

- a) Dura: material com frutos com endocarpo de espessura ente 2 e 6 mm, com fibras dispersas em sua polpa;
- b) Tenera: material com frutos com endocarpo de espessura 0,5 a 2,5 cm e com um anel de fibras ao redor do endocarpo. Este grupo originou-se a partir do cruzamento entre os grupos Dura e Pisifera e, por fim;
- c) Pisifera: material com frutos sem endocarpo e com alta taxa de infertilidade nas flores femininas.

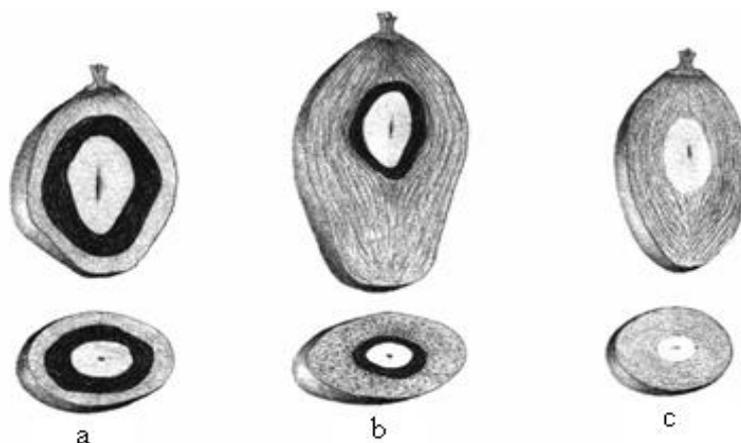


Figura 1: Tipos de frutos de dendezeiro em função da espessura do endocarpo. Figura 1a – Frutos do tipo dura. Figura 1b – Frutos do tipo tenera. Figura 1c – Frutos do tipo psifera.

O sistema radicular é do tipo fascicular sendo formado a partir do bulbo radicular, que é um órgão de aproximadamente 80 cm de diâmetro, localizado na base do estipe.

A espécie *E. guineensis* na idade adulta apresenta uma coroa com 30 a 45 folhas verdes de 5 a 9 m de comprimento, encimando um estipe cilíndrico único.

A flor é do tipo inflorescência creme-amareladas que encontram-se aglomeradas em cachos, no encontro das palmas, em seis a oito haste por ano, amadurecendo duas vezes em cada translação.

Os cachos de frutos maduros são colhidos em intervalos de 7 a 10 dias ao longo da vida econômica da palma, tendo normalmente de 30 a 40 cm de comprimento.

Os frutos são do tipo drupas ovóides amarelos ou cor-de-laranja de tamanho variável e contém sementes que são divididas em exocarpo, mesocarpo e endocarpo (Figura 2). Do mesocarpo, extrai-se o óleo que tem grande importância econômica.



Figura 2- Corte longitudinal do fruto do dendezeiro

3.3. Importância ambiental

Dos 5 milhões de km² da Amazônia brasileira, cerca de 4 milhões de km² possuem fisionomia de floresta segundo o Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (2004), portanto, a superfície total da floresta tropical brasileira soma cerca de 400 milhões de hectares.

Essas áreas devastadas devem ser ocupadas preferencialmente com culturas perenes como a seringueira (*Hevea brasiliensis* HBK), bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.), e dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.), devido terem características semelhantes às árvores de florestas tropicais, além de permitirem atividades economicamente lucrativas por muitos anos e ambientalmente aceitáveis. Dado ao reduzido impacto ambiental gerado pelo dendezeiro quando plenamente estabelecido, a palmeira protege o solo contra erosão, e possui um expressivo nível de “seqüestro de carbono”, visto que a maior contribuição para a emissão de carbono para a atmosfera provém da queima de combustíveis fósseis (petróleo e carvão mineral) nos grandes centros urbanos dos países desenvolvidos.

Nestes países, as emissões de carbono decorrem, também, da queima da biomassa proveniente da vegetação primária ou secundária (Veiga et al. 2000). As propostas para compensar as emissões desse elemento, pela fixação ou seqüestro de quantidades de carbono equivalentes, tem sido, principalmente, pelo plantio de florestas, portanto, o dendezeiro contribui para a conservação de energia e recursos naturais.

Nessa cultura ocorre um aumento da produção de óleo (entre 4.400 a 6.600 litros por ha/ano), o que a torna passível de ser utilizada nessas áreas, especialmente nas estruturas familiares dos colonos dos projetos de assentamento e dos seringueiros, gerando assim aumento de empregos nestas regiões.

Além disso, o dendezeiro possui alta capacidade fotossintética, pois a produção de massa seca total dessa palmeira é da ordem de 50 toneladas métricas por hectare anualmente (parte aérea = 30 t e raízes = 20 t). A produção de massa seca da parte aérea do dendezeiro, com exceção de plantações de eucalipto fertilizado, é superior àquela das florestas tropicais e temperadas (Dufrene& Saugier, 1993).

Portanto é possível dar preferência para implantação da cultura do dendê no aproveitamento de áreas sem cobertura vegetal, contribuindo para recuperação de áreas degradadas em substituição de outros cultivos decadentes ou ainda, na renovação de dendezaes subespontâneos. (Veiga et al 2000).

3.4. Importância sócio-econômica

Segundo Pandolfo (1981) do ponto de vista social, a cultura do dendezeiro demonstrou uma boa alternativa para regiões de baixa renda, não só pelo grande número de empregos que gera, como também por oferecer características ocupacionais que alcançam toda a estrutura familiar. Economicamente, por ser uma planta perene, caracteriza-se pelo elevado rendimento e produção contínua durante todo ano, com possibilidades de suprir não só as necessidades regionais e nacionais, como também ampliar as exportações, visto que, é um produto com grande demanda no mercado internacional.

A produção nacional de dendê é liderada atualmente pelo Estado do Pará, seguido pela Bahia, Amapá e Amazonas. Esta produção é insuficiente para atender a demanda nacional, tanto que o país importa, em média, 40.000 toneladas de óleo de palma, de palmiste e derivados de palma. Isso constitui uma clara indicação de que esta cultura tem possibilidade de duplicar a atual área plantada, baseada em uma política de substituição de importações (Viégas & Müller, 2000).

Entre as oleaginosas cultivadas, o dendezeiro é a planta que apresenta a maior produtividade de óleo por área cultivada, produzindo, em média, 10 vezes mais óleo do que a soja.

O óleo de dendê (Figura 3) que é originado do mesocarpo é insumo no preparo de sabões, detergentes, velas, produtos farmacêuticos, cosméticos, corantes naturais, margarinas e substituto do diesel. O óleo de palmiste (Figura 3) que é extraído da amêndoa ou endosperma em virtude de sua qualidade e do elevado teor de ácido láurico entra como matéria-prima na fabricação de sabonetes, detergentes, pomadas, maioneses, podendo também ser utilizado na produção de chocolates, como substituto da manteiga de cacau. (Valois, 1997).



Figura 4 – Óleos de dendê: A – óleo de palma: extraído da polpa e B – óleo de palmiste: extraído da amêndoa.

No Estado do Pará, o dendzeiro representa a principal matriz energética para produção de óleo vegetal além de possuir maior produção por produtor familiar (Tabela 2).

Tabela 2: Produção e geração de emprego de algumas oleaginosas com potencial para produção de biodiesel.

Cultura	Produtividade (toneladas de óleo/ha/ano)	Demanda de área de (ha) para produzir 1.000 t de óleo	Área por produtor familiar (ha)	Produção por produtor familiar (toneladas/ano)
Mamona	0,7	1.429	4	2,8
Soja	0,5	2.000	20	10,0
Amendoim	0,7	1.429	16	11,2
Babaçu	0,12	8.333	5	0,6
Dendê	5	200	5	25,0

(Adaptado de Holanda, 2004).

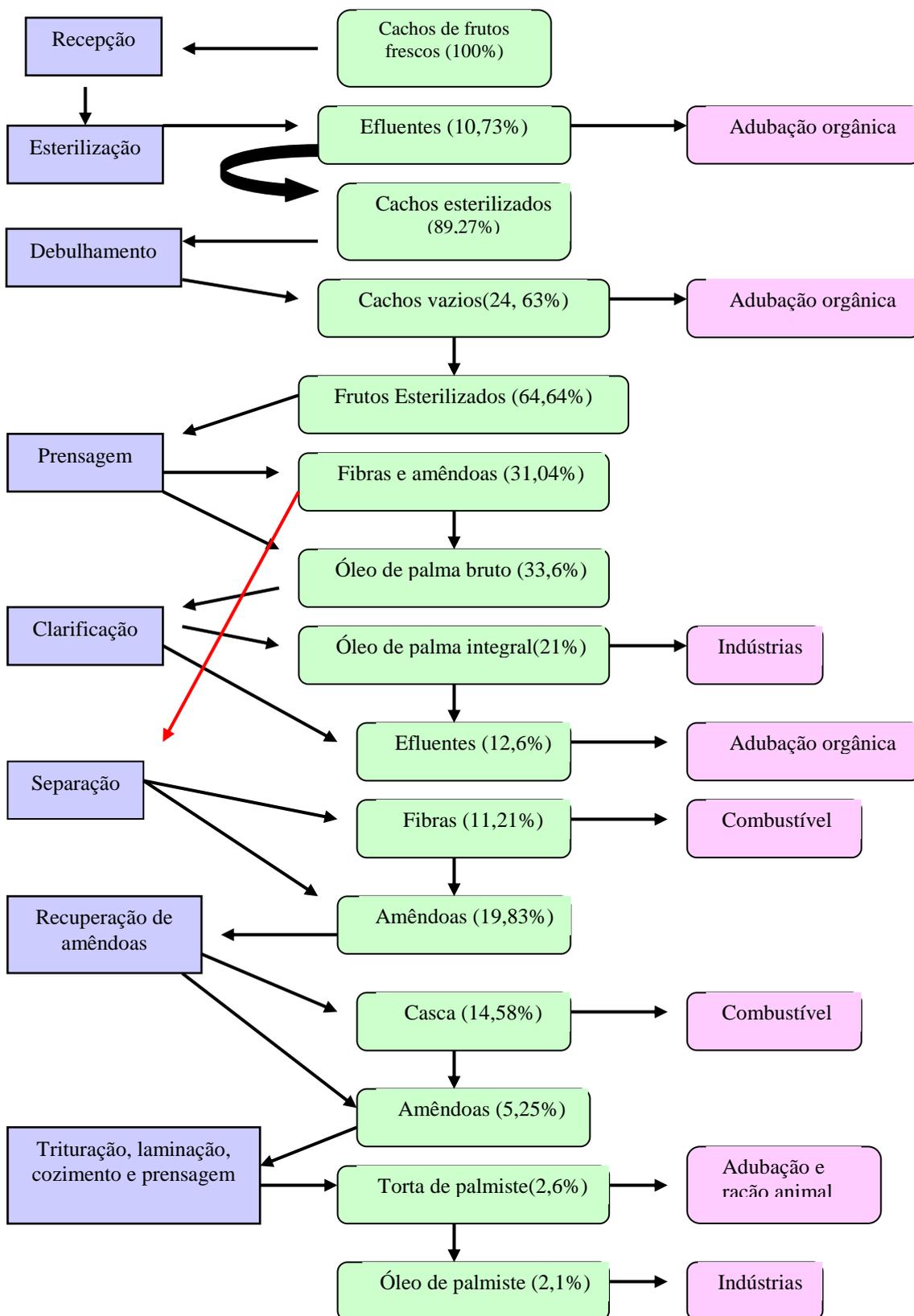
Outra opção de aproveitamento do dendê está no biodiesel, cuja base de produção é o óleo vegetal oriundo da mamona, algodão, soja, girassol, canola, babaçu, pequi, milho, entre outras oleaginosas, e o próprio dendê. O biodiesel é uma nova alternativa econômica e desejável por se tratar de um combustível absolutamente renovável e menos agressivo ao meio ambiente (Valois, 1997).

Em 2002, conforme o seminário internacional do agronegócio do dendê ocorrido em Belém, o governo federal criou o “Programa Brasileiro de Biocombustíveis – Rede

Nacional de Biodiesel”, sob a coordenação do Ministério da Ciência e Tecnologia, onde se insere o Programa Probioamazon dendê que tem por objetivo reduzir a dependência brasileira dos combustíveis fósseis e ampliar as reservas de energia alternativa que é um dos componentes desse reordenamento.

O dendezeiro possui excelente potencial produtivo dos quais seus subprodutos e outros usos (Figura 4), servem como fonte geradora de matéria-prima. A implantação do Probioamazon visa potencializar a produção de biomassa energética e, ao mesmo tempo, implantar um amplo programa de geração de emprego e renda para melhorar a qualidade de vida da população que vive nesta região.

Figura 4: Etapas do processo de transformação primário do dendê, com respectivos subprodutos e usos.



Fonte: USDA, 2009

3.5. Pragas e Doenças do dendzeiro

O cultivo do dendê também está sujeito a uma infestação acentuada de pragas e doenças (Medeiros & Sano, 1988), que muitas vezes é fator limitante à expansão da cultura. A principal praga do dendzeiro de importância econômica na Bahia é o *Rhynchophorus palmarum*, cujas larvas alimentam-se dos tecidos do estipe, fazendo galerias que podem provocar uma podridão interna e quando atinge o meristema provoca a morte da planta.

O Amarelecimento Fatal (AF) do dendzeiro é um problema de extrema importância para a economia dos países que cultivam essa oleaginosa, em particular para o Brasil, aonde vem causando perdas vultosas a partir de 1984, expandindo-se de forma avassaladora (Figura 5), com severas perdas em plantações industriais com mais de 5.000 hectares de dendzeais erradicados e centenas de demissões no Pará.

A primeira constatação da doença do AF na América Latina ocorreu na Colômbia em 1967, na plantação La Arenosa, em Turbo como afirmava Turner (1981).



Figura 5 – Danos causados pelo Amarelecimento Fatal. Fonte: Alessandra de Jesus Boari.

O AF se caracteriza inicialmente pelo ligeiro amarelecimento dos folíolos basais das folhas intermediárias (3, 4, 5 e 6) (Figura 6A), e mais tarde pelo aparecimento de necroses nas extremidades dos folíolos que evoluem para a seca total dessas folhas

(Figura 6B). Apesar de ser considerado o mais sério problema fitossanitário dessa palmácea no Brasil, o AF ainda tem causa desconhecida e não possui medidas de controle eficazes (Trindade 1995). Entretanto, Van Slobbe (1991) relata que, geralmente, as plantas morrem 7 a 10 meses após o aparecimento dos primeiros sintomas, quando não ocorre a remissão. A partir da morte da folha flecha, não há mais a produção de cachos.

Nos anos 90, apesar da continuidade das pesquisas no ramo biótico alguns estudos se voltaram para uma possível origem abiótica do AF. Neste período destacam-se os estudos de modelos epidemiológicos, abordando padrões espaciais e temporais do AF (Bergamin et al. (1998), Laranjeira et al. (1998) e Van de Lande e Zadocks, (1999). Com o insucesso das tentativas de identificação de um agente causal todos estes estudos contribuíram para a formulação de várias hipóteses, onde atualmente, impera dois ramos científicos: Causa Biótica (estes ainda buscam um agente e/ou vetor) e causa estritamente Abiótica (acreditam que fatores físico-químicos estariam causando as anomalias).



Figura 6. a) Dendezeiro: amarelecimento e necrose da ponta do folíolo para base; (b) Necrose da folha flecha.

Outra doença conhecida popularmente como anel vermelho (AV) do dendezeiro e do coqueiro é muito prejudicial para o desenvolvimento do cultivo dessas palmeiras, tanto no Brasil como em outros países, devido causar a morte das plantas e o extermínio de grandes áreas de plantio. O *Rhynchophorus palmarum* é o principal vetor do nematóide causador desta doença (Muller, 1992). No Estado do Pará, essa doença ocorre em quase todas as plantações com mais de quatro anos de idade, e, naturalmente,

é responsável pela maior perda de plantas do que todas as demais doenças do dendezeiro juntas. (Viégas e Muller, 2000). Em dendezeiros, os sintomas iniciais da doença são caracterizados por amarelecimento e secamento dos folíolos, desidratação e coloração alaranjada dos pecíolos, bloqueio do crescimento das folhas mais novas, além de apodrecimento das inflorescências e cachos (Figuras 7 a e 7 b) (Viégas e Muller, 2000).



Figura 7 a: Sintoma interno do A.V Figura 7b: Sintoma externo do A.V

Ocorre também, a doença fusariose ou secamento letal. É uma doença que causa perdas significativas nas plantações de dendezeiros em vários países da África. Ela foi identificada pela primeira vez por Wardlaw, em 1946, no Zaire. Já no Brasil, a fusariose foi relatada pela primeira vez por Van der Lande (1983), ocorrendo em uma plantação localizada em Benevides, Pará. Em palmeiras jovens, antes de iniciarem a produção, o secamento letal é caracterizado por um amarelecimento tênue e descoloração das folhas no centro da coroa, expandindo-se para as folhas vizinhas com o decorrer do tempo e posteriormente para as folhas mais baixas. A planta pode secar totalmente e morrer cerca de dois a três meses após o surgimento dos primeiros sintomas. (Figura 8).



Figura 8 : Sintomas da fusariose.

3.6. Recursos genéticos e Melhoramento Genético do Dendzeiro

No melhoramento de espécies alógamas, como o dendê, procura-se explorar a natureza heterozigótica dos genótipos. Em razão da heterozigose das espécies alógamas, estas tendem a serem menos uniformes do que as autógamias.

O melhoramento genético do dendzeiro tem como objetivo o aumento do potencial de produção de óleo por unidade de área plantada.

A utilização do germoplasma de *E. oleifera* poderá aumentar as possibilidades de progresso sobre outras diferentes características agronômicas, para as quais o *E. guineensis* não apresenta variabilidade genética capaz de permitir resultados consideráveis em um programa de melhoramento genético. Características como tolerância a pragas estão presentes em diferentes níveis nos híbridos entre as duas espécies e merecem ser melhor exploradas, além de que o caiaué é a única fonte atualmente disponível de tolerância ao AF. Essa “doença”, cujo agente etiológico é desconhecido, é uma grave ameaça à dendeicultura latino-americana, dado ao alto grau de mortalidade das plantas causado pela mesma (Bergamin et al, 1998).

A exploração e uso da coleção de germoplasma disponível na Embrapa Amazônia Ocidental realizado em Manaus possibilitarão a oferta de materiais mais produtivos, resistentes a doenças e com picos de produção diferenciados, implicando em maior rentabilidade para o agronegócio do dendê e maior segurança aos elevados investimentos requeridos pela atividade. A manutenção de coleções de germoplasma de dendê a campo requer que outras maneiras de conservação sejam utilizadas uma vez que os riscos de perdas de genótipos são grandes.

A espécie *E. oleifera* é amplamente distribuída na Amazônia Brasileira, sendo pouco conhecidas as suas características, como a existência do modelo de variação entre os materiais coletados nas suas condições naturais, fatores muito importantes na definição do programa de melhoramento para exportação dos recursos genéticos da espécie (OoI et al., 1981).

Hartley (1988) salientou a importância do *E. oleifera*, conhecido com o nome comum de caiaué que se comportava como resistente em áreas com AF, para o programa de melhoramento genético quando cruzado com *E. guineensis*, originando um híbrido interespecífico. Daí, adotou-se nos procedimentos do programa de

melhoramento e, recentemente, obteve-se híbridos com resistência e produtividade boa de óleo.

A hibridação interespecífica entre o caiaué (*E. oleifera* (Kunth) Cortés), espécie americana, e o dendezeiro (*E. guineensis* Jacq.), espécie africana, tem sido explorada com o objetivo de desenvolver cultivares tão produtivas quanto as de dendezeiro, aliada à resistência a pragas e doenças, principalmente o amarelecimento fatal, alta taxa de óleos insaturados e reduzido crescimento do tronco características do caiaué (Barcelos et al., 2000).

Todavia, especificamente com plantas perenes, no caso do dendê, o emprego das técnicas convencionais de melhoramento é dificultado por diversos fatores, destacando-se o longo período da fase juvenil, a demora para a estabilização da produção, a alta heterozigosidade dos melhores indivíduos, e a ineficiência das técnicas de melhoramento em suplantar o mascaramento imposto pelas influências do ambiente.

Por ser uma cultura perene com longo ciclo de produção e devido ao alto custo de manutenção e avaliação dos experimentos, é necessário definir o período de tempo mínimo para uma avaliação estável de produção dos híbridos interespecíficos dendê x caiaué. (Turner e Yong, 1969; Lerner, 1977). Em espécies perenes espera-se que o desempenho dos genótipos seja mantido ao longo do tempo; a consistência dessa expectativa é estimada pelo coeficiente de repetibilidade da característica avaliada (Cruz e Regazzi, 1997).

O cultivo de variedades híbridas intraespecíficas de dendê, responsável pelas elevadas produtividades verificadas na dendeicultura internacional tem como inconveniente uma estreita base genética, apesar da grande disponibilidade de recursos genéticos nas coleções de germoplasma dos programas de melhoramento genético. (Barcelos, 2005)

Apesar do esforço de coleta e conservação, os programas de melhoramento não têm sido capazes de explorar a diversidade genética disposta para a disponibilização de novas variedades de dendê aos produtores. A avaliação dos recursos genéticos da cultura deve ser considerada como de alta prioridade. Porém, as coleções são geralmente pouco avaliadas e de manutenção onerosa, como acontece para diversas outras culturas.

Os resultados esperados são a manutenção adequada das plantas para que possam expressar seu potencial genético e a partir dos dados de caracterização e avaliação selecionar genótipos para serem utilizados no programa de melhoramento genético do dendzeiro visando ampliar a base genética dos genitores atualmente utilizados na produção de sementes comerciais, obter variedades mais produtivas e com picos de produção diferenciados das atuais(Towil, 2000).

O desenvolvimento de estratégias para a conservação de germoplasma de dendê torna-se necessário, e uma das formas de conservação seria através da cultura *in vitro* de embriões zigóticos.

Cabe ao melhoramento de plantas a importante tarefa de aumentar a produtividade e melhorar a qualidade das sementes de dendê, com baixo custo, sem agressão ao ambiente.

A reprodução de genótipos especialmente no caso dos híbridos interespecíficos, também deverá ser assistida pela multiplicação *in vitro* para garantir a reprodução de cruzamentos ou genótipos em escala comercial e também garantir maior ganho genético com a seleção de indivíduos superiores dentro das progênies, que são altamente heterogêneas. As estratégias de propagação são a micropropagação de genótipos e o resgate de embriões *in vitro* de cruzamentos.

3.7. Germinação e Propagação Vegetativa

A germinação das sementes de dendê começa pelo alongamento do embrião, forçando a sua passagem através do poro germinativo. O embrião emergente forma um “botão” de tecido que rapidamente desenvolve uma plúmula (broto caulinar) em uma radícula. Ao mesmo tempo, a outra extremidade do embrião (haustório) aumenta, originando uma estrutura esponjosa que ocupa a cavidade inteira da amêndoa após cerca de 3 meses, enquanto o endosperma é degradado e absorvido.

Embora a primeira folha apareça entre 20 e 40 dias, ela não se expande completamente e a plântula permanece parcialmente dependente do suprimento do material de reserva do endosperma (principalmente triacilglicerol) até cerca de sessenta dias (Oo & Stumpf 1983). A germinação é lenta e esporádica, e altas temperaturas são necessárias para uma germinação satisfatória. Sementes armazenadas de dendê germinam mais rapidamente do que as sementes novas. Para germinação rápida e

regular, recomenda-se uma temperatura de estocagem de 39 a 40° C por 80 dias, em um baixo conteúdo de umidade na semente, porém não inferior à 14,5% . O conteúdo ótimo de umidade para germinação é de 21 a 22% para as sementes do grupo Dura, e 28 a 30% para Tenera (Purseglove, 1972).

O dendezeiro é propagado por semente, sendo os métodos hortícolas convencionais de propagação vegetativa não aplicáveis a esta cultura.

Dentre as palmeiras, com exceção da tamareira, o dendezeiro foi aquela em que mais se desenvolveu através da micro propagação. A via preferencial é a embriogênese somática, sendo que já existem vários processos de cultura de tecidos patenteados, indicando o avanço do grau de domínio dessa técnica (Gonçalves 1994).

3.8. Aplicação da Cultura de tecidos em Palmeiras.

A técnica de cultivo *in vitro* se apresenta como uma alternativa, não só no desenvolvimento de protocolos para produção de plantas a partir da cultura de calos de embriogênese somática , mas também na cultura de embriões zigóticos.

Os primeiros estudos *in vitro* com palmeiras foram realizados por CUTTER JÚNIOR & WILSON (1954), usando tecidos meristemáticos de *Cocos nucifera* L. A partir desses resultados, foram obtidos avanços consideráveis na micropropagação de palmeiras e, os estudos até agora, têm mostrado o potencial desta técnica (TISSERAT, 1984a; BLACKPOOL et al., 1986). (Colocar trabalhos mais atuais).

Cruzamentos interespecíficos como é o caso do híbrido obtido pelo cruzamento da *E.guineensis* x *E.oleifera* podem ser usados para transferir genes desejáveis entre as plantas. Entretanto segundo Gomathinayagam et al. (1999) em tais cruzamentos podem ocorrer barreiras tanto pré como pós- zigóticas, resultando em sementes com embriões abortivos. A hibridização entre espécies é frequentemente limitada por falhas no desenvolvimento do endosperma, culminando com a degeneração de embriões antes que atinjam a maturidade. Esses podem ser salvos se forem removidos antes que ocorra o aborto e cultivados artificialmente em meio nutritivo (Bueno et al., 2001).

A cultura de tecidos é uma alternativa que auxilia no combate às barreiras impostas ao processo de hibridização interespecífica que estão relacionadas com a diferença no número, na homologia e morfologia dos cromossomos e grau de semelhança genética, além da anatomia do sistema reprodutivo. Mesmo que a

fertilização nos cruzamentos seja possível, frequentemente ocorrem limitações devidas ao aborto ou desenvolvimento anormal do embrião (Bueno et al, 2001). A técnica se baseia no fenômeno da totipotência, isto é, na capacidade que a célula vegetal possui de se organizar em um novo indivíduo, mantendo a informação genética necessária, sem haver recombinação gênica, dando origem a uma nova planta (Ramalho et al.,2000).

Alves (2007), trabalhando com resgate de híbridos interespecíficos de dendezeiro, verificou diferentes respostas *in vitro* de híbridos (*E. guineensis* x *E. oleifera*) a diferentes meios de cultura refletindo bem o efeito genótipo x ambiente. Portanto, a única saída para uniformizar híbridos com características desejáveis é a clonagem *in vitro*.

Diversas palmeiras de importância econômica têm sido multiplicadas com maior ou menor sucesso, como *C. nucifera* L. (coqueiro), *Phoenix dactylifera* L. (tamareira), *E. guineensis* Jacq. (dendezeiro), *Euterpe edulis* Mart. (Jussara, palmitreiro) e *Bactris gassipaes* Kunth. (pupunheira) (Pierik, 1990).

Em alguns casos, o cultivo *in vitro* de embriões tem solucionado as dificuldades de obtenção de híbridos interespecíficos, consistindo na remoção dos embriões antes do abortamento e seu cultivo em meio nutritivo (BUENO et al., 2001).

A clonagem *in vitro* representa a alternativa mais favorável à propagação vegetativa de pupunha, dendezeiro, tamareira e coqueiro. Entretanto, o dendezeiro tem se mostrado mais factível sob o ponto de vista econômico conforme dados de Almeida (1994). Os principais problemas relacionados à cultura de tecidos de palmeiras estão associados à obtenção de explantes adequados, ao estabelecimento de culturas viáveis e a rápida oxidação dos tecidos injuriados de acordo com Tisserat (1982). Segundo Stein (1988), devido as palmeiras serem plantas recalcitrantes à micropropagação, a adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura é fundamental à indução de regeneração de plantas completas de dendê.

3.8. Resgate de embriões

No início do século, Hanning (1904) publicou um trabalho que representa um marco para o estudo da fisiologia do desenvolvimento do embrião (Raghavan, 1976). Utilizando meios de cultura contendo sais minerais, açúcares e amino ácidos, Hanning foi capaz de cultivar embriões isolados de *Raphanus* e *Cochlearia*. Desde então, a técnica de cultura de embriões tem-se expandido e dado importantes contribuições em estudos básicos da fisiologia do desenvolvimento do embrião, em programas de melhoramento genético, pela recuperação de híbridos de interesse de cruzamentos incompatíveis, bem como para a quebra de dormência de sementes, observada em algumas espécies (Ferreira et al., 1990).

A cultura de embriões, isto é, o cultivo de embrião em meio de cultura, é empregada para produzir plântulas originadas de cruzamentos incompatíveis ou para aumentar a população de plântulas em espécies que apresentam problemas de baixa germinação. Além disso, nos estudos sobre micropropagação *in vitro* de palmeiras, os embriões zigóticos têm sido o tipo de explante mais utilizado por sua maior competência regenerativa. Tecidos foliares, ápices caulinares, gemas laterais, ápices radiculares e inflorescências também têm sido utilizados.

Este tipo de cultivo tem sido usado para superar dormência de sementes, em virtude da imaturidade do embrião ou da presença de substâncias inibidoras no endosperma, estudar os aspectos nutricionais e fisiológicos do desenvolvimento do embrião, testar a viabilidade de sementes, recuperar híbridos raros de cruzamentos incompatíveis e como fonte de explantes devido a elevada totipotência. Além disso esta técnica oferece um sistema controlado para estudar os problemas nutricionais, fisiológicos e bioquímicos dos embriões em vários estádios de desenvolvimento (Tisserat, 1984).

Conforme Pinheiro (1986), citando Hodel (1977), a cultura de embrião em palmeiras, devido ao lento processo de germinação, resultado de um espesso e duro endocarpo do fruto, é de suma importância para obtenção de plântulas enraizadas, em menor espaço de tempo. Acrescenta-se a isso o fato de que tecidos embrionários são excelentes explantes para serem usados em estudos, visando a propagação clonal *in vitro* em virtude de sua natureza juvenil e alto potencial regenerativo (PIERIK, 1990).

Entretanto, um importante aspecto da cultura de embriões de dendezeiro é definir um meio de cultura que possa sustentar o seu crescimento e desenvolvimento (HU & FERREIRA, 1998).

Euwens et al. (2002) trabalhando com cultura de embriões zigóticos de dendê conseguiu obter germinação *in vitro* em dendezeiro em meio MS completo com adição de sacarose a 30g. L^{-1} suplementado com ácido naftaleno acético a $0,1\text{mg. L}^{-1}$ e kinetina a $0,05\text{mg. L}^{-1}$. Williams et al., (2002) também conseguiram obter germinação *in vitro* só que usando meio $\frac{1}{2}$ MS suplementado com $0,17\text{g.L}^{-1}$ NaH_2PO_4 além de 100mg.L^{-1} de caseína hidrolisada e sacarose a 45 g. L^{-1} .

4. MATERIAL E MÉTODOS

O Trabalho foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia e Recursos Genéticos da EMBRAPA Amazônia Oriental, Belém, Pará e constou de atividades relacionadas à assepsia e isolamento de embrião, e cultura de embrião zigótico para conversão em plantas, e aclimatização das plantas.

Os embriões zigóticos de sementes de híbridos de dendezeiro utilizados nos experimentos foram provenientes do banco de germoplasma de semente de dendê, situado no campo experimental da EMBRAPA Amazônia Ocidental, estação do Rio Urubu, Amazonas.

Os embriões zigóticos foram retirados de frutos maduros 13 meses após a abertura da inflorescência. Primeiramente foram fornecidas 11 sementes de híbridos de dendezeiro, os quais depois de inoculados foram verificadas altas porcentagens de contaminação provavelmente por fungo e bactéria. Após isso, chegaram mais 17 híbridos, os quais apenas três, quais sejam CN 353, CN 470 e CN 514, germinaram. Posteriormente a isso, obtivemos mais 14 híbridos provenientes da Embrapa Amazônia Ocidental, os quais três germinaram, sendo eles: CM 378, CM 865 CM 887. Isso comprova que taxa de germinação dos híbridos é muito baixa, fazendo com que este trabalho seja relevante na área da pesquisa

As plantas obtidas *in vitro* dos experimentos supracitados foram transferidas para bandejas de plásticos com duas plantas por célula cujo substrato utilizado foi a vermiculita. As plantas foram nutridas com solução de NPK quinzenalmente com 30 mL por célula.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, no total de 97 plântulas, enraizadas, provenientes dos doze tratamentos. Transferiram-se as plantas para bandejas plásticas descartáveis de 36 cm x 27 cm constituídas de 24 células. Cada célula continha 2 plântulas.

Os experimentos subseqüentes são uma continuação de trabalhos realizados no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Amazônia Oriental, dos quais foram selecionados a melhor assepsia, os melhores meios de cultura e as melhores concentrações de sais a serem utilizadas.

4.1. Desinfestação dos Embriões

Visando retirar o excesso de impurezas e prevenir a contaminação, sementes maduras de dendezeiro foram inicialmente lavadas com detergente neutro e água corrente e, imersas no fungicida Derosal 0,2 % por 20 minutos.

Em seguida, as sementes foram quebradas manualmente com o auxílio de um martelo para a retirada do tegumento. Posteriormente, as sementes foram desinfestadas em câmara de fluxo laminar, sendo imersas em álcool etílico a 70% por um minuto e, em seguida em solução de NaClO a 2,5 % por 20 minutos sob agitação. As sementes foram então lavadas cinco vezes e imersas por vinte e quatro horas em água destilada e autoclavada perfazendo assim um total de doze tratamentos. No dia seguinte, os embriões assépticos foram inoculados em frascos de 300 mL, contendo 40 mL de meio de cultura MS e Y₃, completo e com metade de sais (Anexo 1 e 2), suplementado com 0,2 % de carvão ativado, 0,2% de sacarose e 0,17g.L⁻¹ de ácido NaH₂PO₄ e solidificado com 0,7% de ágar. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com arranjo fatorial de 3x4, perfazendo assim um total de doze tratamentos no geral, assim denominados: T1: MS + NaH₂PO₄ 0,17g.L⁻¹ + CA; T2) ½ MS + NaH₂PO₄ 0,17g.L⁻¹ + CA; T3) Y₃ + NaH₂PO₄ 0,17g.L⁻¹ + CA e T4) ½ Y₃ + NaH₂PO₄ 0,17g.L⁻¹ + CA. Cada frasco representava uma repetição que continha cinco embriões, totalizando 160 embriões utilizados por tratamento. O pH foi ajustado para 5,8 antes da esterilização em autoclave a 120 °C durante 20 minutos, e cultivados em sala de crescimento com temperatura e luminosidade controladas.

Primeiramente, os embriões foram cultivados em sala de crescimento no escuro por um período de 4 semanas. Após esse período, os frascos contendo os embriões foram transferidos para a sala de crescimento sob iluminação. Durante o cultivo, os embriões foram avaliados quanto a porcentagem de contaminação e oxidação dos embriões, comprimento do caule, comprimento da raiz, altura da planta, embriões germinados, até a formação de plântulas (Figura 9). Os dados foram submetidos à análise de variância e testes de comparação de médias pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade utilizando o software SISVAR 5.2. O experimento foi avaliado duas vezes por semana durante 12 semanas .

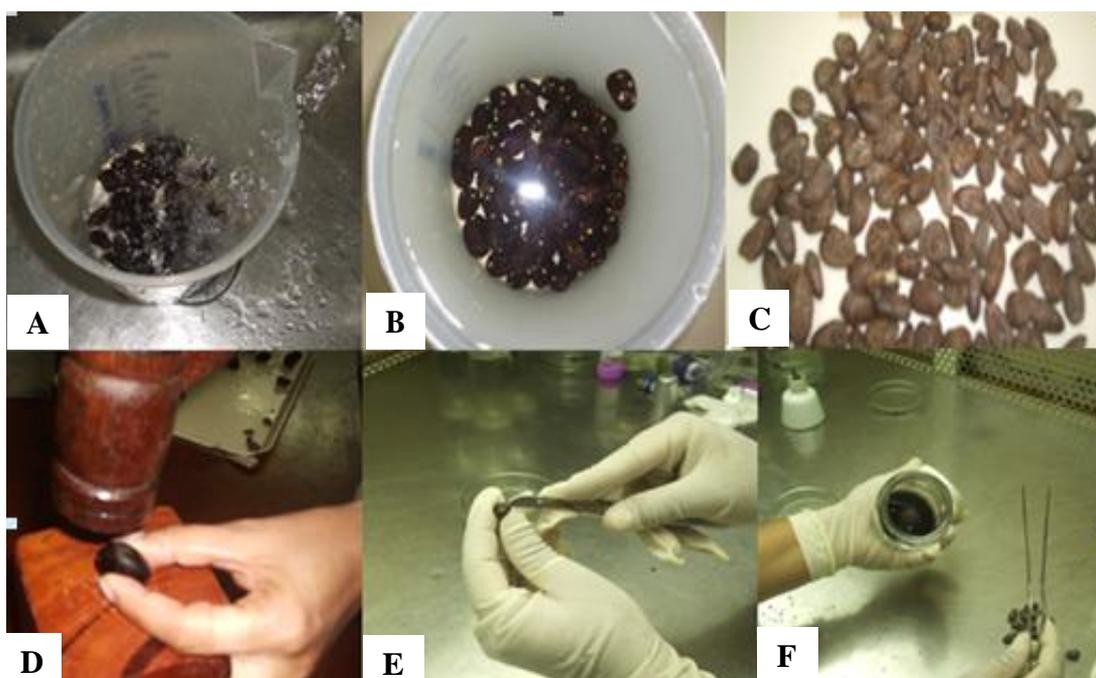


Figura 9: Etapas do processo de assepsia e inoculação de embriões de dendê. 9- A: Lavagem das sementes ;9- B: Imersão das sementes em solução de derosal 0,2%; 9- C: Secagem das sementes; 9- D: Quebra das sementes; 9- E: Retirada do embrião; 9- F:Inoculação do embrião.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Contaminação dos Embriões

A eficácia do protocolo de assepsia do trabalho anteriormente realizado com o fungicida Derosal na concentração de 0,2 %, dependeu do genótipo utilizado. O genótipo CN 470, no tratamento T1, não foi afetado pela contaminação de fungos e bactérias. Waldow *et al* (2007) também obtiveram baixos índices de contaminação em embriões de dendezeiro com o mesmo meio de cultura utilizado. Mesmo em tratamentos diferentes T2 (14,8%) e T3 (14,8%) as porcentagens de contaminação desse genótipo foram menores quando comparadas com os outros genótipos e os outros tratamentos. (Figura 11).

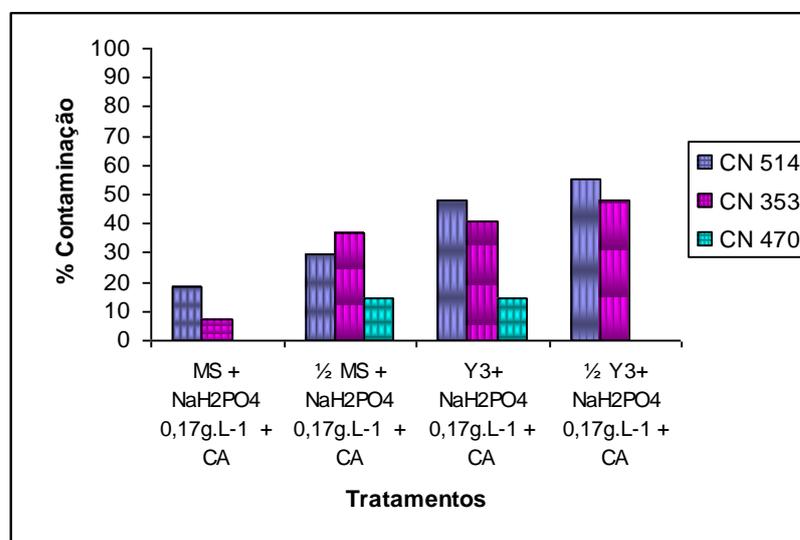


Figura 11: Porcentagem de contaminação dos genótipos de dendê inoculados em meio de cultura.

De uma forma geral a contaminação variou entre 14, 2 e 55,5 %. Este elevado índice foi verificado no genótipo CN 514 (55,5 %) e CN 353 (48, 2%), no T4 composto por 1/2 Y3, podem estar relacionados as condições de armazenamento e estocagem das sementes pós-colheita.

Pereira et al (2006) obtiveram uma porcentagem de germinação similar de 85,9% em embriões zigóticos de Murumuru (*Astrocharyum ulei*) com a mesma

concentração de hipoclorito utilizada na assepsia (2,5 %) e pelo mesmo intervalo de tempo (20 minutos). Este resultado também assemelha-se a desinfestação realizada por Cavalcante (2001), em sementes de açaizeiro (*E. oleracea*), que obteve uma porcentagem de 88,80% de embriões germinados na mesma concentração de hipoclorito utilizada na assepsia das sementes. Em embriões zigóticos de *Butiá eriospatha* e *B. capitata* apresentaram elevados percentuais de germinação *in vitro*, em meio MS completo de sais, adicionando NaH_2PO_4 , independentemente do uso de reguladores de crescimento (Santiago, 2001).

No genótipo CN 470, ocorreu somente a contaminação aparentemente por bactéria nos tratamentos T2 e T3 com 14,8%. (Figura 12 a). Estes resultados reafirmam que o fungicida Derosal na concentração de 0,2 % foi eficaz no combate a proliferação de fungos. A eficiência nos genótipos CN 353, nos meios de cultura onde continha a metade da presença de sais, $\frac{1}{2}$ MS + NaH_2PO_4 $0,17\text{g.L}^{-1}$ + CA e $\frac{1}{2}$ Y3 + NaH_2PO_4 $0,17\text{g.L}^{-1}$ + CA, apresentaram as maiores contaminações fúngicas, e na mesma taxa de 37% (Figura 12 b).

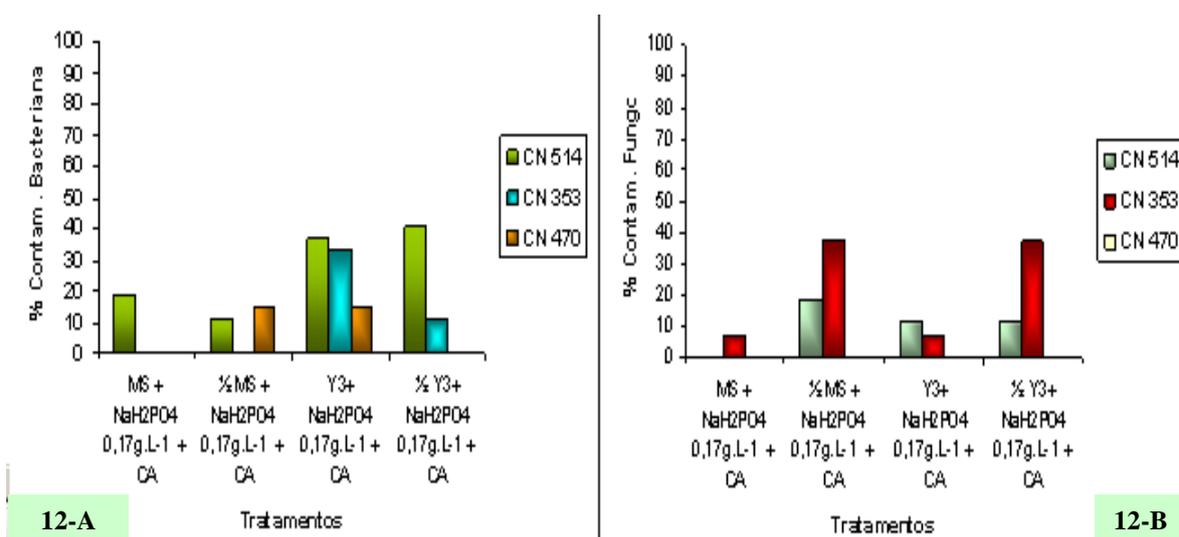


Figura 12 a: Porcentagem de embriões aparentemente contaminados por bactéria;
12 b: Porcentagem de embriões aparentemente contaminados por fungos.

Segundo Solano (2003), as contaminações por bactérias por vezes se dá devido ao próprio material genético que é mais susceptível à entrada de bactérias que se alojam

dentro das sementes. Para Filho (2005), os genótipos atacados por fungos muito têm a ver com a manipulação asséptica feita antes da inoculação de cada material genético.

4.2. Oxidação dos Embriões

As melhores respostas foram obtidas na variedade CN 470 onde nenhum dos tratamentos apresentou oxidação. A maior média de embriões oxidados foi encontrado na variedade CN 514, tratamento T3 composto por Y3, com a porcentagem de 44,4% de embriões oxidados, seguidos da variedade CN 353, tratamentos T2 (40,7%) e T3 (40,7%) (Figura10). Estes resultados demonstram que há diferença entre os genótipos quanto a exsudação de compostos fenólicos e, conseqüentemente, do fenômeno da oxidação. Esses resultados estão de acordo com Ashuburner, et al. (1993) que controlaram a oxidação por fenóis na cultura *in vitro* de embriões de coco (*Cocos nucifera* L.), efetuando a suplementação com carvão ativado a 0,2% adicionados ao meio MS.

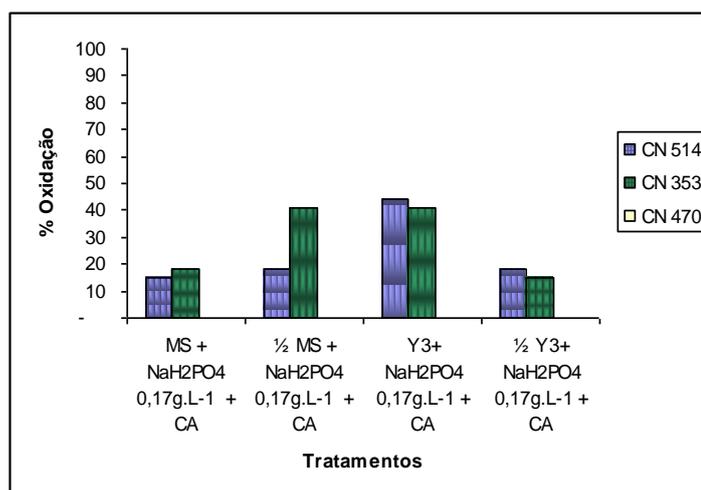


Figura 10: Porcentagem de oxidação dos genótipos inoculados de dendê.

A oxidação do explante é considerado um dos aspectos mais sérios relacionados com a cultura de tecidos de palmeiras. (George, 1996). Segundo (ORTOLANI, 1985), a oxidação fenólica é altamente dependente do genótipo. Considerando que na variedade CN 470 os melhores resultados foram observados, podemos afirmar que os meios suplementados com totalidade e metade dos sais, mais a presença de carvão ativado a 0,2 % estão de acordo com os resultados obtidos por Cavalcante (2001), que

trabalhando com açazeiro (*Euterpe oleraceae*) obteve os mesmos resultados na concentração de 0,2% de carvão ativado.

Esse resultado mostra a eficácia do carvão ativado como agente anti-oxidante, pois segundo Teixeira (1993), o carvão ativado apresenta cargas residuais, as quais são capazes de adsorver substâncias fenólicas ou seus produtos de oxidação, as quinonas, evitando com isso o desencadeamento do processo oxidativo *in vitro*.

Para o genótipo CN 470, a oxidação fenólica pode não ter ocorrido devido o genótipo ser pouco indutor do fenômeno da oxidação. Isto provavelmente se deve a época que este material fora coletado (março de 2008), onde temos um período mais chuvoso e mais favorável ao crescimento, em que há baixo acúmulo de polifenóis nos tecidos e, conseqüentemente, menor a oxidação fenólica dos explantes *in vitro*.

Segundo Preece & Compton (1991) a oxidação fenólica se dá por meio de uma enzima chamada de polifenol oxidase. Esta enzima contém íons cobre para sua ativação e está presente nos plastídeos. A oxidação dos polifenóis leva à produção de substâncias amareladas de composição complexa, do tipo quinonas. Estas substâncias podem se ligar a proteínas das membranas ou enzimas, acarretando toxidez e morte da célula (VALOIS et al. (1980) e isto é o que provavelmente pode ter acontecido com os genótipos CN 514 e CN 353, que se mostraram mais susceptíveis à oxidação.

Os embriões que não germinaram mostravam sinais de oxidação nos primeiros dias após a inoculação. Alguns destes apresentaram, inicialmente, desempenho semelhante aos germinados, mas senesceram em até 15 dias.

4.3. Conversão de embriões zigóticos *in vitro* em plântulas de dendê

Os embriões que não sofreram processos de oxidação e de contaminação desencadearam o processo de germinação que oscilou entre 88,9 a 100% (Figura 14). As melhores porcentagens ocorreram para o genótipo CN 470 e foram em ordem decrescente, tais quais: T1(100 %), T2 (88,9 %), T3 (85 %) e T4 (18,5 %), como ilustra a figura 14. Por conseguinte, o genótipos CN 514 e CN 535 apresentaram resultados similares no T1 composto pelo meio MS completo de sais (Figura 13 b e 13 c).



Figura 13 : Germinação *in vitro* de embriões de dendê nas variedades CN 470 (13 a), CN 514 (13 b) e CN 353 (13 c), respectivamente.

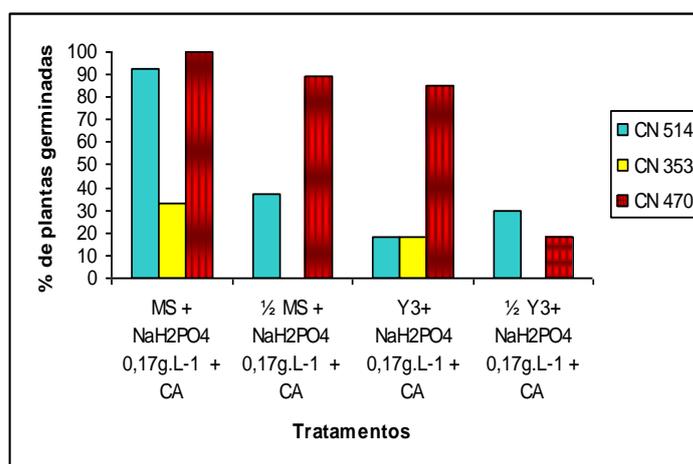


Figura 14. Porcentagem de germinação *in vitro* de embriões de dendê em 4 diferentes tratamentos e 3 diferentes genótipos.

4.4. Resgate de embriões

Após a primeira semana de cultivo, na fase escura, foi observado apenas o entumescimento dos embriões zigóticos. (Figura 15). Com 12 dias houve o início do gancho plumular que permaneceu se curvando até o final da terceira semana (21 dias) (Figura 16), quando se iniciou o processo de emissão da radícula (Figura 17) e posteriormente da parte aérea aos 30 dias (Figura 18). Quando completados sessenta dias, a diferenciação estava bastante clara, onde se observou a formação do ápice cotiledonar, raiz propriamente dita e folha (Figura 19).



Figura 15: Embrião na fase escura aos sete dias de cultivo.



Figura 16: Embrião cultivado na fase clara aos 21 dias.



Figura 17: Início do processo de emissão da radícula em embriões de dendezeiro



Figura 18: Embrião aos trinta dias de cultivo.

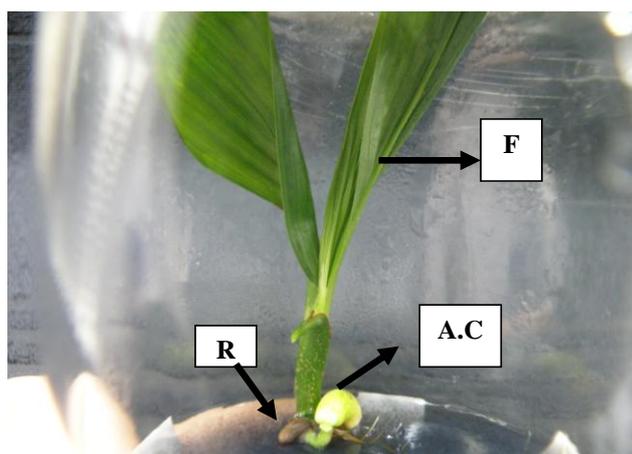


Figura 19: Conversão *in vitro* de embriões de dendê a uma planta completa, onde se observa a formação da folha (F), do ápice cotiledonar (A.C) e da raiz(R).

Os híbridos CN 470 e CN 514 apresentaram os melhores resultados, nos meios MS e Y3, assim como em metade de sais presentes nesses meios ($\frac{1}{2}$ MS e $\frac{1}{2}$ Y3) (Figura 14). Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Tomlinsom, (1960) e Lorenzi, (1996) onde embriões zigóticos de *E. guineensis*, espécie pisífera de dendê, se desenvolveram rapidamente em plântulas quando cultivadas em meio contendo carvão ativado adicionados aos meios MS e Y3 e suas respectivas metades.

O híbrido CN 353 apresentou resultados inferiores em todos os meios de cultura avaliados (Figura 14). Essa diferença observada entre os híbridos estudados reflete bem o efeito do genótipo x ambiente. Segundo Fantini Junior & Graça, (1990) a superioridade genética de uma variedade para uma determinada característica, pode ser revelada quando essa variedade é cultivada em determinados meios nutritivos

associadas com o NaH_2PO_4 $0,17\text{g.L}^{-1}$, ou seja, a resposta de explantes em um sistema de cultura de tecidos depende do genótipo do material colocado em cultura. Segundo Handley et al. (1995), vários estudos tem demonstrado que a resposta a um determinado sistema de cultura de células é dependente do genótipo.

As plântulas completas com a presença de folhas e raízes foram obtidas após três meses de inoculação (Figura 19), em todos os tratamentos, possibilitando a transferência para condições *ex vitro*. Silva (2002), trabalhando com coqueiro (*C. nucifera*) conseguiu obter plantas adultas em dois meses e meio utilizando meio MS completo. Sharma et al. (1980) constataram que, dentro de seis semanas, embriões zigóticos de tamareira (Nome científico) dão origem a plântulas.

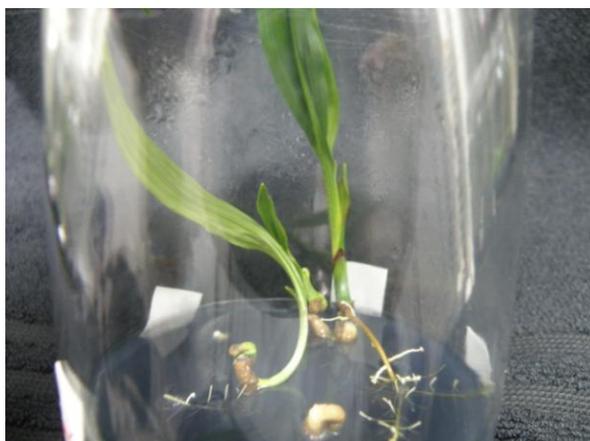


Figura 19: Aspecto de uma planta desenvolvida *in vitro* cultivada em meio nutritivo após 3 meses de cultivo.

4.5. Formação de plântulas de dendê

Noventa e sete plantas foram acompanhadas para a avaliação das variáveis comprimento de raízes, do caule e altura das plantas.

Em relação ao desenvolvimento da planta, o híbrido CN 470 respondeu melhor em todos os parâmetros analisados se comparados com o híbrido CN 514 e CN 353 (Figura 6). Em relação ao comprimento das raízes, o meio de cultura MS e Y3 apresentou os melhores resultados para os híbridos.

Para a variável comprimento do caule, o melhor tratamento composto pelo meio de cultura com totalidade de sais MS, variedade CN 470, foi o que apresentou a maior

média que foi de 2,32 cm (Tabela 6) diferindo significativamente a nível de 5% de probabilidade da média obtida pelo tratamento $\frac{1}{2}Y3$ (0,04). Os tratamentos $\frac{1}{2}MS$ (1,03) e $Y3$ (1,33) não diferiram estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade. Para a altura das plantas, os tratamentos T2 (1,26), T3 (1,19) e T4 (0,04) não diferiram estatisticamente entre si. (Tabela 6).

Tabela 6: Médias do comprimento do caule, comprimento de raízes e altura das plantas no híbrido CN 470.

Tratamento	Comprimento do caule (cm)	Comp. de raiz (cm)	Altura das plantas (cm)
T1	2.32 a	0.73 a	2.48 a
T2	1.03 b	0.22 b	1.26 b
T3	1.33 b	0.70 a	1.19 b
T4	0.04 c	0.07 b	0.04 b

Analisando a variedade CN 353, para formação de plântulas *in vitro*, levando em consideração o aspecto comprimento do caule, comprimento da raiz e altura das plantas, os embriões apresentaram as melhores respostas em meio de cultura com a totalidade das concentrações de sais MS (Tabela 7). Estes resultados concordam com os obtidos por Rajesh et al.(2003) e Euwens et al.,(2002) que obtiveram resultados semelhantes em cultura de embriões *in vitro* de dendê (*E. guineensis* jacq) com meio MS só que além de $0,17\text{g.L}^{-1}$ de NaH_2PO_4 inserido no meio, também havia $0,1\text{ g.L}^{-1}$ de arginina. A adição de NaH_2PO_4 nos os tratamentos suplementados com a totalidade de sais MS, se mostrou importante no desenvolvimento de plântula para todas os híbridos testados. Entretanto o T3, juntamente com o T1, mostrou se mais adequado na variável comprimento de raiz. Esses resultado são concordam com os obtidos por Alves (2007), em que embriões zigóticos de híbridos de dendezeiro, inoculados em meio de cultura contendo $0,17\text{g.L}^{-1}$ de NaH_2PO_4 , mostrou se mais eficaz para o desenvolvimento de plântulas de dendezeiro (Alves, 2007).

Tabela 7: Médias do comprimento do caule, comprimento de raízes e altura das plantas no híbrido CN 353.

Tratamento	Comprimento do caule (cm)	Comp. de raiz (cm)	Altura das plantas (cm)
T1	0.20 a	0.12 a	0.24 a
T2	0.06 b	0.00 c	0.06 b
T3	0.01 bc	0.09 ab	0.03 b
T4	0.00 c	0.00 c	0.00 c

Para o híbrido CN 514, o T1 foi o mais adequado nos três parâmetros avaliados. O T3 com relação ao comprimento do caule e altura das plantas foi o que obteve os piores resultados quando comparados com os demais. O tratamentos $\frac{1}{2}Y3$ e $\frac{1}{2}MS$ também não diferiram estatisticamente entre si nas variáveis comprimento do caule, raiz e altura das plantas. (Tabela 8).

Tabela 8: Médias do comprimento do caule, comprimento de raízes e altura das plantas no híbrido CN 514.

Tratamento	Comprimento do caule (cm)	Comp. de raiz (cm)	Altura das plantas (cm)
T1	1.56 a	0.34 a	1.95 a
T2	0.62 b	0.16 b	0.61 b
T3	0.26 c	0.10 b	0.30 c
T4	0.57 b	0.05 b	0.58 b

5- CONCLUSÕES

Para a conversão de embriões zigóticos de híbridos de dendezeiro (*E.gineensis* x *E. oleifera*), o meio de cultivo MS + NaH₂PO₄ 0,17g.L⁻¹ + CA é o mais adequado e se mostrou muito eficaz na formação de plântulas para posterior cultivo, independentemente do híbrido utilizado. E dentre os híbridos utilizados, o CN 470 foi o que se mostrou mais adequado todas as variáveis utilizadas

6- REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M. de. **Emprego da cultura in vitro para multiplicação vegetativa de pupunha (*Bactris gasipaes* H.B.K.) Palmae**. 1994. 78f. Tese (Doutorado em Ciências). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1994.

AYALA, L. S. Relatório de visita à Denpasa (1999). In: DENPASA. **Pesquisa sobre amarelecimento fatal do dendezeiro**. Belém, PA, 2001. v. 1, 319 p.

BARCELOS, E.; NUNES, C.D.M.; CUNHA, R.N.V. da. **Melhoramento Genético e produção de sementes comerciais de dendezeiro**. In.: Viégas, I.J.; Müller, A.A. A cultura do dendezeiro na Amazônia brasileira. Embrapa Amazônia Oriental, Belém/Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus. 2000. p.145-174.

BARCELOS, E.; PACHECO, A. R.; MÜLLER, A. A.; VIÉGAS, I. de J. M.; TINÔCO, P. B. **Dendê: informações básicas para o seu cultivo**. Belém, PA: Embrapa Uepae de Belém: Brasília, DF: Embrapa-DDT 2000. (Embrapa Uepae de Belém. Documentos, 1).

BLACKPOOL, A.L.; RICHARD, L.B.; BLAKE, J. Regeneration in palms, In: VASIL, I. K. (Ed.). **Cell cultures and somatic cell genetics of plants**. New York: Academic Press, 1986. v.3, p.321-222.

BERGAMIN FILHO, A., AMORIM, L., LARANJEIRA, F.F., BERGER, R.D., HAU, B. **Análise temporal do Amarelecimento Fatal do dendezeiro como ferramenta para elucidar sua etiologia**. Fitopatologia Brasileira, v.23, p. 391-396, 1998.

BUENO, L.C.S ; MENDES, A.N.G; CARVALHO, S.P de. **Melhoramento de plantas: princípios e procedimentos**. Lavras: UFLA, 2001.

CAVALCANTE, A.S.L. **Respostas morfogenéticas in vitro de açazeiro (*Euterpe oleracea* L.) e de cupuçuazeiro. (*Theobroma grandiflorum* (Wild. Ex Spreng) Schum)**. Tese de Doutorado da Universidade Federal do Ceara- UFC. Fortaleza.2001.

CRUZ, C.D.; Regazzi, A.J. 1997. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 2 Ed. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 390pp.

CUTTER JUNIOR, V.M.; WILSON, K.S. **Effect of coconut endosperm and other growth stimulants upon development in vitro of embryos of *Cocos nucifera***. Botanical Gazette, Chicago, v.115, n.3, p.234-240, Mar.1954.

DUFRENE, E.; SAUGIER, B. **Gas exchange of oil palm in relation to light, vapour pressure deficit, temperature and leaf age**. Oléagineux, v. 48, n. 8-9, p. 347-356. 1993.

EUWENS, C. J. **Effects of organic nutrients and hormones on growth and development of tissue explants from coconut (*Cocos nucifera*) and date (*Phoenix dactylifera*) palms cultured in vitro**. Physiologia Plantarum, 42: 173-178. 1976.

FAURE, O.; DEWITTE, W.; NOUGARÈDE, A.; VAN OCKELEN, H. **Precociously germinating somatic embryos of *Vitis vinifera* have lower ABA and IAA levels than their germinating zygotic counterparts**. Physiologia Plantarum, Edinburgh, v.102, p. 591-595.1998.

FERREIRA, M. E; CALDAS, L. S; PEREIRA, E. A. **Aplicações da Cultura de Tecidos no Melhoramento Genético de Plantas**. In: TORRES, A. C; CALDAS, L. S; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA – SPI/EMBRAPA – CNPH, v. 1, p. 11-20. 1998.

FERRI, M. G. **Botânica: morfologia interna das plantas (anatomia)**. 9. ed. São Paulo: Nobel, 1990. 114p.

FREIRE, F.C.O. **As doenças do dendê (*Elais guineensis* Jacq.) na região amazônica brasileira**. Belém: EMBRAPA-UEPAE de Belém, 1988. (EMBRAPA- UEPAE de Belém. Circular Técnica, 2).

GOMATHINAYAGAM, P.; RAM, S. G.; RATHNASWAMY, R.; RATHNASWAMY, N. M. **Interspecific hybridization between *Vigna unguiculata* (L.) Walp. and *V. vexillata* (L.) A. Rich. through *in vitro* embryo culture.** *Euphytica*, Wageningen, v. 102, n. 2, p. 203-209, 1999.

HARTLEY, C. W. S. **The oil palm.** Essex: Longman, 1988. 761 p.

HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. Cultura de embriões. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília, DF: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, 1998. v. 1, p. 371-393.

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS. **Taxas de desflorestamento obtidas por classificação de 207 imagens LANDSAT, 2004.**

KAGEYAMA, P. Y. **Variação genética em uma população de *Eucalyptus grandis* (Hill) Maiden.** Piracicaba, 1980. 125p. (Tese-Doutoramento-ESALQ).

HANNIG, E. **Zur physiologie pflanzlicher embryonen.** I. Veber die Kultur von cruciferen embryonen ausserhalb des embryosaaacks. *Botanische Zeitung*, v.62, p. 45-80, 1904.

HARTLEY, C.S.W. **The oil palm.** 3rd. ed. Tropical agriculture, Series. England. 1983.761p.

MULLER, A. A. **Curso sobre a cultura do dendezeiro ((*Elaeis guineensis* jacq).** Belém, 1992. 55p.

OOI, S. C.; SILVA, E. B.; MÜLLER, A. A. E.; NASCIMENTO, J. **Oil palm genetic resources – native *E. oleifera*.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, DF, v. 16, n. 3, p. 385-395, 1981.

PACHECO, A.R.; TAILLIEZ, B.J.; VIÉGAS, I.J.M. **Resposta de N-P-K-Ca e Mg no desenvolvimento de mudas de dendê na região de Manaus-AM.** Belém: Embrapa-UEPAE de Belém, 1985. 17p.

PANDOLFO, C. **A cultura do dendê na Amazônia.** Belém, SUDAM, 1981. 35p

PIERIK, R. L. M. **Cultivo in vitro de las plantas superiores.** 3. ed. Madrid: Mundi-Prensa, 1990. 326 p.

PIERIK, R.L.M. **In vitro culture of higher plants.** Dordrecht: Martinus Nyjhoff Publishers, 1987. 344p.

RAGHAVAN, V.; TORREY, J. G. Effects of certain growth substances on the growth and morphogenesis of immature embryos of capsella in culture. **Plant Physiology**, v. 39, p. 691- 699, 1976.

RAMALHO, M. A. P.; ABREU, A. de F. B.; SANTOS, J. B. 2000. **Melhoramento de espécies autógamas.** In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S. de; VALADARES-INGLIS, M. C. (Eds.). **Recursos genéticos e melhoramento plantas.** Rondonópolis: Fundação MT. p. 201-230.

RODRIGUES, M.R.L. **Resposta do dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) à aplicação de fertilizantes nas condições do médio Amazonas.** Piracicaba: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 1993. 81p. (Tese M.Sc.).

SILVA, H.M. **O anel vermelho do dendezeiro e do coqueiro.** Belém: EMBRPA-CPATU, (EMBRAPA-CPATU. Documentos, 60). 17p.1996.

TISSERAT, B. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J (Ed.) **Cell and tissue culture in forestry.** Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987.p.339-356.

TISSERAT, B. Date palm. In: Sharp, W.R.; EVANS, D.A.; AMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. (Ed.) **Handboobk of plant cell culture**. New York: Mcmillan, 1984. V.2, p.505-545.

TISSERAT, B. **Factors involved in the production of plantlets from date palm callus cultures**. Dordrecht: Euphytica, v.31, n,1, p.201-214, jan.-Mar. 1982.

TOWILL, L. E. 2000. **Germplasm preservation**. In: R. N. Trigiano & D. J. Gray (Ed.) Plant tissue culture concepts and laboratory exercises. 2nd. Edition. CRC Press, Boca Raton, pp. 337-353.

TURNER, H.N.; Young, S.S.Y. 1969. **Quantitative genetics in sheep breeding**. Cornell University, Ithaca, NY. 332pp.

VALOIS, A.C.C. **Possibilidades da cultura do dendê na Amazônia**. Brasília: Embrapa-Cenargen,.. (Embrapa-Cenargen. Comunicado Técnico, n.19). 7p. 1997

VAN DE LANDE, H.L. e ZADOCKS J.C. **Spatial patterns of spear rot in oil palm plantations in Suriname**. Plant Pathology, v.48, n.2, p. 189-201, 1999.

VAN SLOBBE, W. G. **Amarelecimento fatal: final report**. Belém, PA: Denpasa, 1991. 100 p.

VEIGA, A. S. JÚNIOR, J. F. KALTNER, F. J. **Políticas públicas na agroindústria do dendê na visão do produtor**. Belém, 2005, 24p.

VEIGA, A.S.; SMIT, L.; FÚRIA, L.R.R. **Avaliação do dendezeiro como opção para o seqüestro de carbono na Amazônia**. In: VIÉGAS, I. de J.M.; MÜLLER, A.A. (ed). A cultura do dendezeiro na Amazônia Brasileira. Belém: EMBRAPA/CPATU, 2000. 374p

VIÉGAS, I. de J.M; MÜLLER, A.A. **A cultura do dendezeiro na Amazônia Brasileira**. Belém: EMBRAPA/CPATU, 2000. 374p

WALDOW (b), D. A. G.; GOLLE, D. P.; ROSA, F. C.; HANAUER, J. G.; CURTI, A. R.; REINIGER, L. R. S. **Germinação de embriões de *Butia capitata in vitro* com ácido giberélico.** In: SIMPÓSIO DE BIODIVERSIDADE, 1.; 2007, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: UFSM, 1946. p. 22-23.

AGROPALMA. **Notícias.** Disponível em www.agropalma.com.br. Acesso em novembro de 2009.

IBGE. **Produção Extrativa Vegetal.** Disponível em www.ibge.gov.br. Acesso outubro de 2009.

USDA. **Production, Supply and distribution on line.** Disponível em www.usda.gov.br. Acesso em maio de 2009.

Disponível em www.cnpae.embrapa.br. Acesso outubro de 2009.

Anexo 1- Composição do meio de cultura de Murashige & Skoog (1962).

CONSTITUINTES	QUANTIDADE em mg/L
INORGÂNICOS	
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ 2 H ₂ O	440
MgSO ₄ 7 H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
KI	0,83
H ₃ BO ₃	6,2
MnSO ₄ 4 H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ 7 H ₂ O	8,6
Na ₂ MoO ₄ 2 H ₂ O	0,25
CuSO ₄ 5 H ₂ O	0,025
CoCl ₂ 6 H ₂ O	0,025
FeSO ₄ 7 H ₂ O	27,8
Na ₂ EDTA 2 H ₂ O	37,3
ORGÂNICOS	
Inositol	100
Tiamina Hl	0,1
Ácido Nicotínico	0,5
Piridoxina HCl	0,5
Glicina	2,0
Sacarose	30000
Agar	0,8%

Anexo 2: Composição do meio de cultura Y₃ (Eeuwens, 1976).

MEIO Y3 MODIFICADO	(mg / 1000 mL)
KN ₃	2022
KCl	1491
NH ₄ Cl	535
Na ₂ H ₂ P ₄	240
CaCl ₂ ·2H ₂ O	294
MgSO ₄ ·7H ₂ O	246,5
KI	8,3
COCl ₂	0,25
H ₃ B ₃	3,09
Na ₂ M ₂ O ₄ ·2H ₂ O	0,25
MnSO ₄ ·4H ₂ O	7,55
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,25
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	7,19
FeSO ₄ ·7H ₂ O	13,9
Na ₂ EDTA	18,7
L-glutamina	100
L-arginina	120
L-asparagina	88
Cisteína	500 (Não utilizar)
PVP-40	5000
Sacarose	30000

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)