

Respostas morfogenéticas *in vitro* de açaizeiro
(*Euterpe oleracea* Mart.) e de cupuaçuzeiro (*Theobroma*
***grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum.)**

ANA DA SILVA LEDO CAVALCANTE

FORTALEZA-CEARÁ
2001

C364r Cavalcante, Ana da Silva Ledo
2001 Respostas morfogênicas *in vitro* de açaizeiro (*Euterpe oleracea* L.)
e de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng)
Schum.)/
Ana da Silva Ledo Cavalcante.-Fortaleza: UFC/Departamento de
Fitotecnia, 2001.
124f. : il.

Tese – (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará,
Departamento de Fitotecnia

1. Micropropagação. 2. Embriogênese somática.
3. Cultura de Tecidos.I.Título

CDD 631.53

RESPOSTAS MORFOGENÉTICAS *IN VITRO* DE AÇAIZEIRO
(*Euterpe oleracea* Mart.) **E DE CUPUAÇUZEIRO** (*Theobroma*
grandiflorum (Willd. ex Spreng.) Schum.)

ANA DA SILVA LEDO CAVALCANTE

TESE SUBMETIDA À COORDENAÇÃO DO CURSO DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO
FITOTECNIA, COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENÇÃO DO GRAU
DE DOUTOR.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ - UFC

FORTALEZA-CE

2001

Esta tese foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção de Grau de Doutor em Agronomia, Área de Concentração em Fitotecnia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca de Ciências e Tecnologia da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho desta dissertação é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

Ana da Silva Ledo Cavalcante

Autora

TESE APROVADA EM 24/08/2001.

Prof. Abdellatif Kemaleddine Benbadis, Ph.D.

Orientador

Pesq. Osmar Alves Lameira, D.Sc.

Co-orientador

Prof. Sebastião Medeiros Filho, D.Sc.

Conselheiro

Prof. Renato Innecco, D.Sc.

Conselheiro

Pesq. Dalva Maria Bueno, D.Sc.

Conselheira

A Deus,

OFEREÇO

***“Em qualquer lugar, Em qualquer tempo,
Sempre haverá
Um homem plantando, Um homem colhendo,
Alimentando a vida, Renovando o mundo!”
(Cora Coralina)***

Ao meu pai Berlando (*in memoriam*)

À minha mãe Ivanira

Ao meu marido Expedito

À minha irmã Patrícia

Aos meus irmãos Ivo, Francisco José e Carlos Alberto

Ao meu sobrinho Marcus Vinícius

À minha cunhada Edlenice

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Ceará -UFC, em especial ao Departamento de Fitotecnia, pela oportunidade de realização do curso de pós-graduação.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-Embrapa, em especial à Embrapa Acre, pela oportunidade concedida neste treinamento de longa duração.

À Embrapa Amazônia Oriental, em especial ao Laboratório de Recursos Genéticos e Biotecnologia, pelo apoio financeiro e de infraestrutura para a execução deste trabalho.

Ao professor Abdellatif Kemaleddine Benbadis pela orientação, pelos ensinamentos e apoio na realização do curso.

Ao pesquisador Osmar Alves Lameira da Embrapa Amazônia Oriental pela orientação e amizade.

Aos professores Sebastião Medeiros Filho e Renato Innecco e a pesquisadora Dalva Maria Bueno da Embrapa Agroindústria Tropical, pelos comentários e sugestões.

À técnica especializada Ilmarina Campos de Menezes e aos pesquisadores Oriel Filgueira de Lemos e Maria do Socorro Padilha de Oliveira da Embrapa Amazônia Oriental pela amizade, pelas valiosas sugestões e colaboração.

Ao corpo docente do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará pelos ensinamentos transmitidos e pela contribuição à minha formação acadêmica.

Ao pessoal de apoio do Laboratório de Recursos Genéticos e Biotecnologia da Embrapa Amazônia Oriental, em especial, Aloísio de Souza Paiva e às bolsistas Elisa Moura, Rairys Cravo Nogueira, Ana Carolina, Alethéa Fernanda Lisboa, Clarisse Beltrão Rosas e Sebastião Lopes pelo apoio, amizade e convivência durante a execução deste trabalho.

Às amigas Ana Josicleide Maia, Erneida Coelho de Araújo, Polyana Aparecida Ehlert, Renata Tuma Sabá Paes e Valéria Momenté pela sincera amizade e convivência.

Aos amigos do curso, em especial, Roberto César Mesquita, Francisco Roberto de Azevedo, Antônio Marcos Esmeraldo Bezerra, Joaquim Torres Filho, Marli Pedroso da Costa, Roselita Maria de Souza Mendes, Edilza Maria Felipe Vasquez, Ewerton Cordeiro, Leodécio Holanda Martins, José Washington Gomes Coriolano, Gleidson Vieira Marques, Luis Antônio da Silva, Francisco das Chagas Vidal Neto e Hamilton de Jesus Almeida, pela união e amizade.

Aos funcionários do Departamento de Fitotecnia da UFC, Deocleciano Ivo Xavier e Eliane de Lima Marcelino pela atenção dispensada durante o curso.

À Orlane da Silva Maia, bibliotecária da Embrapa Acre e Rosane Maria Costa, bibliotecária da Biblioteca de Ciências e Tecnologia-UFC, pelo apoio e atenção dispensada.

À Francis Saboya Guimarães do Nascimento pelos ensinamentos e orientação durante a minha permanência em Fortaleza, que muito contribuíram para a finalização deste curso.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiv
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	02
2.1. Aspectos gerais e econômicos do açaizeiro	02
2.2. Aspectos gerais e econômicos do cupuaçuzeiro.....	05
2.3. Cultura de tecidos e morfogênese.....	08
2.4. Organogênese e embriogênese somática.....	11
2.5. Cultura de embriões.....	14
2.6. Propagação <i>in vitro</i> de palmeiras.....	15
2.7. Oxidação em tecidos de palmeiras cultivados <i>in vitro</i>	24
2.8. Regeneração <i>in vitro</i> de <i>Euterpe</i> spp.....	26
2.9. Regeneração <i>in vitro</i> de <i>Theobroma</i> spp.....	28
CAPÍTULO 1 – RESPOSTAS MORFOGENÉTICAS <i>IN VITRO</i> DE AÇAIZEIRO (<i>Euterpe oleracea</i> Mart.).....	33
RESUMO.....	33
ABSTRACT.....	35
1. INTRODUÇÃO.....	37
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	38
2.1. Cultura de embriões zigóticos de açaizeiro.....	38
2.2. Oxidação de segmentos de ráquias de açaizeiro.....	39
2.3. Capacidade morfogênica de explantes de açaizeiro.....	41
2.3.1. Embriões zigóticos.....	41
2.3.2. Segmentos de ráquias.....	41
2.3.3. Ápices caulinares.....	42
2.3.4. Folhas jovens.....	43
2.3.5. Ápices radiculares.....	44
2.4. Manutenção e multiplicação de culturas embriogenéticas.....	45
2.5. Desenvolvimento, maturação e conversão de embriões somáticos.....	45
2.6. Análises estatísticas.....	46

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
3.1. Cultura de embriões zigóticos de açaizeiro.....	47
3.2. Oxidação de segmentos de ráquilas de açaizeiro.....	52
3.3. Capacidade morfogênética de explantes.....	55
3.3.1. Embriões zigóticos maduros.....	55
3.3.2. Embriões zigóticos imaturos.....	59
3.3.3. Segmentos de ráquilas.....	61
3.3.4. Ápices caulinares.....	63
3.3.5. Folhas jovens e ápices radiculares.....	66
3.4. Manutenção e multiplicação de culturas embriogenéticas.....	67
3.5. Desenvolvimento, maturação e conversão de embriões somáticos.....	69
4. CONCLUSÕES	75
CAPÍTULO 2 – RESPOSTAS MORFOGENÉTICAS IN VITRO DE CUPUAÇUZEIRO (<i>Theobroma grandiflorum</i> (Willd. ex Spreng.) Schum.).....	77
RESUMO	77
ABSTRACT	79
1. INTRODUÇÃO	80
2. MATERIAL E MÉTODOS	81
2.1. Cultura de embriões zigóticos de cupuaçuzeiro.....	81
2.2. Capacidade morfogênética de explantes.....	82
2.2.1. Eixos embrionários.....	82
2.2.2. Folhas jovens.....	83
2.2.3. Segmentos cotiledonares.....	84
2.2.4. Segmentos caulinares.....	84
2.2.5. Ápices caulinares.....	85
2.3. Indução de culturas embriogenéticas.....	86
2.4. Análises estatísticas.....	86
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	87
3.1. Cultura de embriões zigóticos de cupuaçuzeiro.....	87
3.2. Capacidade morfogênética de explantes.....	92
3.2.1. Eixos embrionários.....	92
3.2.2. Folhas jovens.....	95
3.2.3. Segmentos cotiledonares.....	99
3.2.4. Segmentos caulinares.....	103
3.2.5. Ápices caulinares.....	105
3.3. Indução de culturas embriogenéticas.....	106
4. CONCLUSÕES	109
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	110
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111

LISTA DE TABELAS

	Página	
1	Resumo da análise de variância para médias da percentagem de conversão de embriões zigóticos (%CEZ), da percentagem de plântulas normais (%PN), do comprimento da parte aérea (CPA) e do número de raízes por plântula (NR) de <i>Euterpe oleracea</i> Mart., em meio MS suplementado com diferentes concentrações de ANA e de BAP. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2000.....	48
2	Médias da percentagem de conversão de embriões zigóticos (%CEZ) aos 10 dias de cultura, da percentagem de plântulas normais (%PN), do comprimento da parte aérea (CPA) e do número de raízes por plântula (NR) de <i>Euterpe oleracea</i> Mart. aos 48 dias de cultura, em meio MS suplementado com diferentes concentrações de ANA e de BAP. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2000.....	51
3	Médias da intensidade de oxidação de segmentos de ráquias (SR) de <i>Euterpe oleracea</i> Mart., cultivados em meio MS em função do estágio de desenvolvimento da espata e de diferentes antioxidantes, aos 15 dias de cultura. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2000.....	53
4	Respostas morfogênicas de embriões zigóticos maduros de <i>Euterpe oleracea</i> Mart., cultivados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D, aos 80 dias de cultura. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2000.....	56
5	Respostas morfogênicas de embriões zigóticos imaturos de <i>Euterpe oleracea</i> Mart., cultivados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D, aos 80 dias de cultura. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2000.....	60
6	Médias da percentagem de ápices caulinares de <i>Euterpe oleracea</i> Mart. com calos friáveis, cultivados <i>in vitro</i> em meio MS suplementado com diferentes concentrações e combinações de ANA e BAP, aos 30 dias de cultura. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2000.....	64

- 7 Médias da frequência embriogenética (FRE), do número de embriões somáticos (NES) por cultura e da eficiência embriogenética (EFE) de embriões zigóticos maduros de *Euterpe oleracea* Mart. cultivados em meio secundário MS na presença de 0,537 μ M de ANA e 12,30 μ M de 2iP, aos 150 dias de cultura. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2000..... 68
- 8 Médias da frequência embriogenética (FRE), do número de embriões somáticos na fase bipolar (NEB) e do número de plântulas regeneradas (NPR) por cultura, a partir de embriões zigóticos maduros de *Euterpe oleracea* Mart. cultivados em meio $\frac{1}{2}$ MS, na ausência de reguladores de crescimento, aos 210 dias de cultura. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2001..... 70
- 9 Resumo da análise de variância para médias da percentagem de conversão de embriões zigóticos (%CEZ), do peso da matéria fresca da parte aérea (PMFPA), do sistema radicular (PMFSR), dos cotilédones (PMFCO) e do comprimento da parte aérea (CPA) de plântulas de *Theobroma grandiflorum*, em função do tipo de substrato (SUB) e da ausência ou presença de meio de cultura MS e $\frac{1}{2}$ MS (MC). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2000..... 89
- 10 Médias da percentagem de conversão de embriões zigóticos (%CEZ) aos 10 dias de cultura, do peso da matéria fresca da parte aérea (PMFPA), do sistema radicular (PMFSR), dos cotilédones (PMFCO) e do comprimento da parte aérea (CPA) de plântulas de *Theobroma grandiflorum* aos 45 dias de cultura, em função do tipo de substrato e da ausência ou presença de meio de cultura MS e $\frac{1}{2}$ MS. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2000..... 91
- 11 Respostas morfogênicas de eixos embrionários de *Theobroma grandiflorum*, cultivados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de ANA, TDZ e 2,4-D, aos 30 dias de cultura. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2000... 92
- 12 Percentagem de oxidação e respostas morfogênicas de segmentos de folhas jovens de *Theobroma grandiflorum*, cultivados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de TDZ e 2,4-D, aos 45 dias de cultura. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2000..... 96

- 13 Respostas morfogênicas de segmentos cotiledonares de *Theobroma grandiflorum*, cultivados em meio MS suplementado com diferentes concentrações e combinações de reguladores de crescimento, aos 60 dias de cultura. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2000..... 100
- 14 Respostas morfogênicas de segmentos caulinares de *Theobroma grandiflorum*, cultivados em meio MS suplementado com diferentes concentrações e combinações de reguladores de crescimento, aos 60 dias de cultura. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2000..... 103
- 15 Respostas morfogênicas de calos friáveis iniciados em meio primário a partir de eixos embrionários (EE), segmentos de folhas jovens (SFJ) e segmentos caulinares (SC) de *Theobroma grandiflorum*, cultivados em meio secundário MS suplementado com água de coco (AC), 2iP e diferentes concentrações de ANA, aos 30 dias de cultura. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2000..... 106

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Conversão <i>in vitro</i> de embriões zigóticos de <i>Euterpe oleracea</i> Mart. A- início da expansão da lâmina cotiledonar (haustório-H) (15X); B- emissão da radícula (R) e do coleóptilo cotiledonar (C) (15X); C- início da expansão do limbo foliar e de raízes secundárias; D- plântulas normais e anormais aos 60 dias de cultura. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2000.....	49
2 Oxidação de segmentos de ráquulas de <i>Euterpe oleracea</i> Mart. em meio MS sólido suplementado com diferentes antioxidantes aos 15 dias de cultura. A- segmentos de ráquulas jovens; B- segmentos de ráquulas maduras. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2000.....	54
3 Embriogênese somática em embriões zigóticos maduros de <i>Euterpe oleracea</i> Mart. cultivados em meio MS suplementado com 2,4-D. A- estrutura granular na região do nó cotiledonar aos 40 dias de cultura (15X); B- embriões somáticos globulares na região do nó cotiledonar aos 80 dias de cultura (19X). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2000.....	58
4 Percentagem de embriões zigóticos maduros de <i>Euterpe oleracea</i> Mart. com estruturas granulares (EGR) e embriões somáticos globulares (EGL) sob diferentes concentrações de 2,4-D aos 80 dias de cultura. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2000.....	59
5 Iniciação de calo e crescimento do meristema apical em ápice caulinar de <i>Euterpe oleracea</i> Mart. em meio MS suplementado com ANA e BAP aos 15 dias de cultura (15X). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2000.....	65
6 Conversão de embriões somáticos de <i>Euterpe oleracea</i> Mart. em plântulas aos 210 dias de cultura. A- desenvolvimento da radícula (R) e do coleóptilo cotiledonar (C) (15X); B- expansão da lâmina cotiledonar (haustório-H) (15X). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2001.....	72

- 7 Embriogênese somática em embriões zigóticos maduros de *Euterpe oleracea* Mart. aos 210 dias de cultura. A- formação direta de embriões somáticos a partir de embriões diferenciados (12,5X); B- formação direta de embriões somáticos a sobre plântula recém-regenerada (12,5X). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2001..... 73
- 8 Plântulas. regeneradas a partir de embriogênese somática em embriões zigóticos maduros de *Euterpe oleracea* Mart., aos 240 dias de cultura, em meio ½ MS na ausência de reguladores de crescimento A- plântulas normais; B- proliferação de múltiplas plântulas. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2001..... 74
- 9 Desenvolvimento *in vitro* de embriões zigóticos de *Theobroma grandiflorum*. A- lançamento da radícula e desenvolvimento de raízes secundárias; B- emergência do epicótilo e dos nós cotiledonares e formação do gancho epicotilar; C- alongação do gancho epicotilar e emissão do primeiro par de folhas. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2000..... 88
- 10 Calogênese em eixo embrionário de *Theobroma grandiflorum* aos 20 dias de cultura. A- iniciação de calo não friável em meio MS suplementado com ANA (19X); B- iniciação de calo friável em meio MS suplementado com 2,4-D (19X). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2000..... 93
- 11 Percentagem de eixos embrionários de *Theobroma grandiflorum* com calo friável em meio MS sob diferentes concentrações de 2,4-D aos 30 dias de cultura. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2000..... 94
- 12 Calogênese em explante foliar de *Theobroma grandiflorum* em meio MS suplementado com TDZ. A- formação de calo não friável aos 20 dias de cultura (19X); B- formação de calo friável aos 45 dias de cultura (19X). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2000..... 97
- 13 Percentagem de explantes foliares de *Theobroma grandiflorum* com calo friável em meio MS sob diferentes concentrações de TDZ aos 45 dias de cultura. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2000..... 98

- 14 Calogênese em segmento cotiledonar de *Theobroma grandiflorum*. A- formação de calo não friável em meio MS suplementado com ANA e KIN aos 25 dias de cultura (19X); B- formação de calo friável em meio MS suplementado com 2,4-D e KIN aos 60 dias de cultura (19X). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2000..... 102
- 15 Calogênese em segmento caulinar de *Theobroma grandiflorum* em meio MS suplementado com ANA ou 2,4-D combinados com KIN. A- formação de calo não friável aos 30 dias de cultura (19X); B- formação de calo friável aos 60 dias de cultura (15X). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2000..... 104

LISTA DE ABREVIATURAS

AG ₃	ácido giberélico
AIA	ácido 3-indolacético
AIB	ácido 3-indolbutírico
ANA	ácido naftalenoacético
ANOA	ácido naftoxiacético
BAP	6-benzilaminopurina
Dicamba	ácido 3,6-dicloro-metoxibenzóico
KIN	6-furfurilaminopurina (cinetina)
MS	meio de cultura descrito por Murashige & Skoog (1962)
½ MS	metade da concentração de sais do meio MS
NaOCl	hipoclorito de sódio
Picloram	ácido 4-amino-3,5,6-tricloropico-línico
PVP	polivinilpirrolidona
TDZ	1-fenil3-(1,2,3-tiadiazol-5il) uréia (tidiazuron)
Y3	meio de cultura descrito por Eeuwens (1976)
ZEA	N ⁶ -(4-hidroxi-3-metilbut-2-enil) aminopurina (zeatina)
2,4-D	ácido 2,4-diclorofenoxiacético
2iP	isopenteniladenina

RESUMO

A perspectiva de exploração sócio econômico de espécies frutíferas nativas da região Amazônica tem sido crescente nos últimos anos. Dentre elas, destaca-se o açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) e o cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum.), pelas suas diferentes possibilidades de exploração comercial. Entretanto, a utilização de técnicas de propagação pouco eficientes e a ausência de material genético melhorado, têm sido apontados com os principais entraves para a exploração econômica destas espécies. As diversas técnicas de cultura de tecidos, quando integradas em programas de melhoramento genético, são um valioso instrumento na rápida clonagem de genótipos superiores, na preservação e intercâmbio de germoplasma, no resgate de embriões interespecíficos, na produção de dihaplóides, na introgressão de genes, dentre outras aplicações. Os objetivos do presente trabalho foram estabelecer os protocolos básicos para a instalação de culturas viáveis de açaizeiro e cupuaçuzeiro e avaliar as respostas morfogênicas de diferentes explantes de submetidos a várias condições de cultura *in vitro*. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Recursos Genéticos e Biotecnologia da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA. Para a obtenção de explantes assépticos, foram avaliados os efeitos da adição de reguladores de crescimento na cultura de embriões zigóticos de açaizeiro e a eficiência de dois substratos, na presença e ausência de meio MS e ½ MS, sobre a conversão de embriões zigóticos de cupuaçuzeiro. Para o estudo da capacidade morfogênica de explantes de açaizeiro, foram utilizados embriões zigóticos maduros e imaturos, segmentos de ráquias em dois estádios de desenvolvimento, ápices caulinares, secções de folhas jovens clorofiladas e ápices radiculares. Para o cupuaçuzeiro foram utilizados explantes oriundos de eixos embrionários e segmentos cotiledonares de embriões maduros, segmentos de folhas jovens clorofiladas, segmentos caulinares e ápices caulinares. Os explantes foram cultivados em meio MS

sólido suplementado com diferentes tipos e concentrações de reguladores de crescimento. Os resultados obtidos permitiram verificar que a adição de ANA e BAP no meio de cultura foi necessária para a conversão de embriões zigóticos maduros de açaizeiro em plântulas vigorosas e normais. Os segmentos de ráquulas jovens apresentaram menor intensidade de oxidação em meio MS sólido suplementado com diferentes antioxidantes e os segmentos de ráquulas maduras em meio MS sólido com 0,3 % de carvão ativado, na presença e ausência de ácido ascórbico. Foi possível obter a expressão de um modelo de embriogênese somática direta, repetitiva e não sincronizada em embriões zigóticos maduros de açaizeiro cultivados em meio primário MS suplementado com alta concentração de 2,4-D e em meio secundário MS na presença de ANA e 2iP. A conversão de embriões em plântulas foi alcançada com a transferência das culturas para meio $\frac{1}{2}$ MS, sem reguladores de crescimento. A conversão de embriões zigóticos de cupuaçuzeiro em plântulas normais e vigorosas foi alcançada em ágar e vermiculita, na ausência de meio de cultura MS. O 2,4-D e TDZ promoveram a formação de calos friáveis em eixos embrionários e segmentos de folhas jovens de cupuaçuzeiro, respectivamente. A combinação de KIN e 2,4-D promoveu a iniciação de calos friáveis e de ANA e KIN, a rizogênese em segmentos de cotilédones. Na presença de 2,4-D e KIN houve a formação de calos friáveis em segmentos caulinares. A adição de água de coco, 2iP e ANA no meio secundário estimulou o rápido crescimento de calos em culturas de eixo embrionário, segmentos caulinares e segmentos de folhas jovens clorofiladas. Os resultados obtidos demonstram o potencial de emprego da cultura de tecidos para a propagação *in vitro* de açaizeiro e cupuaçuzeiro e em programas de melhoramento.

ABSTRACT

The economic potential for exploration of native fruitful species of the Amazon has increased in the last years. Among the several specie stands out the assai palm (*Euterpe oleracea* Mart.) and the cupuassu (*Theobroma grandiflorum* (Willd.ex Spreng.) Schum.), considering the several possibilities of the commercial exploration. However, the use of inadequate propagation techniques and the absence of improved genetic material have been aimed with the main problems to the economic expansion of these species. If the several tissue cultures techniques are included in genetic improvement programs, they may become a valuable instrument for the fast cloning of genotypes. The main objectives of the present work were to determine the basic methodologies for growing viable assai palm and cupuassu cultures and to evaluate the morphogenetic responses of different explants under diverse conditions of *in vitro* culture. The experiments were conducted in the Genetic Resources and Biotechnology Laboratory of Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA. The effect of the addition of growth regulators in the culture of assai palm zygotic embryos. The efficiency of two substrata was evaluated, in the presence and in the absence of MS and 1/2 MS medium, on the conversion of cupuassu embryos in seedlings. For the study of the morphogenetic capacity of assai palm explants, mature and immature zygotic embryos, rachyl segments, stem apexes, chlorophyllous young leaf segments and root apexes were used. For the cupuassu, embryonic axes and cotyledon segments of mature embryos, chlorophyllous young leaf segments, stem segments and stem apexes. The explants were cultivated in a gelled MS medium supplemented with different types and concentrations of growth regulators. The obtained results allowed verifying that an addition of NAA and BAP in the culture medium was necessary for the conversion of assai palm mature zygotic embryos into vigorous and normal seedlings. The young rachyl segments presented smaller oxidation intensity in a gelled MS medium supplemented with different antioxidants and the mature rachyl

segments in a gelled MS medium with 0,3% of activated charcoal, both in the presence and in the absence of ascorbic acid. It was possible to verify the expression of a direct, repetitive and asynchronized model of somatic embryogenesis in mature zygotic embryos cultivated in primary MS medium supplemented with high concentration of 2,4-D and transferred to a secondary MS medium in the presence of NAA and 2iP. The conversion of embryos in plantlets was reached with the transfer of the cultures for ½ MS medium, without growth regulators. The agar and vermiculite, in the absence of culture medium, were efficient for the conversion of cupuassu zygotic embryos in normal and vigorous seedlings. The 2,4-D and TDZ promoted the formation of friable calluses in embryonic axes and in young leaf segments, respectively. KIN combined with 2,4-D promoted the initiation of friable calluses and it NAA and KIN, the rhizogenesis in cotyledon segments. In the presence of 2,4-D and KIN there was the formation of friable calluses in stem segments. The addition of coconut water, 2iP and NAA in the secondary medium stimulated the fast growth of calluses in embryonic axis, stem segments and chlorophyllous young leaves segments cultures. The obtained results show that tissue culture has a potential use for the *in vitro* propagation and genetic programs of assai palm and cupuassu.

1. INTRODUÇÃO

A perspectiva de exploração sócio econômico de espécies frutíferas nativas da região Amazônica tem sido crescente nos últimos anos. Dentre elas, destaca-se o açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) e o cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum.), pelas suas diferentes possibilidades de uso e o potencial de comercialização de produtos e subprodutos no mercado nacional e internacional.

A utilização de técnicas de propagação pouco eficientes e a ausência de material genético melhorado têm contribuído negativamente para a exploração racional e econômica dessas espécies (ALVES et al., 1998; OLIVEIRA, 1999).

Programas de melhoramento têm sido implementados por diversas instituições de pesquisa na região, com ênfase à seleção de materiais com características agronômicas de interesse.

Neste contexto, as diversas técnicas de cultura de tecidos, quando integradas em programas de melhoramento genético, são um valioso instrumento para o intercâmbio e preservação de germoplasma em condições assépticas, a multiplicação de genótipos, a obtenção de variantes somaclonais, a obtenção de transformantes via engenharia genética, a introgressão de genes, a quebra de barreiras de incompatibilidade genética, a obtenção de haplóides, dentre outras aplicações (FERREIRA et al., 1998).

Informações sobre a propagação *in vitro* de açaizeiro e cupuaçuzeiro são escassas. Os estudos têm sido, exclusivamente, direcionados para o dendezeiro, o coqueiro, a tamareira e o cacau, que apresentam grande impacto econômico nos mercados internacionais.

Os objetivos do presente trabalho foram estabelecer os protocolos básicos para a instalação de culturas viáveis de *Euterpe oleracea* Mart. e *Theobroma grandiflorum*, avaliar as respostas morfogenéticas de explantes em diferentes estádios fisiológicos, bem como o efeito de vários reguladores de crescimento sobre a indução e a expressão da morfogênese *in vitro*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos gerais e econômicos do açaizeiro

O açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) pertence à divisão Angiosperma, classe Monocotyledonae, Ordem Principes, família Arecaceae, subfamília Arecoideae (KAHN, 1997), sendo uma palmeira tipicamente tropical. Para CAVALCANTE (1991), o centro de origem do açaizeiro é o estuário amazônico, fazendo parte do centro sul-americano, descrito por Vavilov. O centro de diversidade ocorre nas regiões das Guianas, Alto Rio Negro e no Pará (LHERAS et al., 1983).

Essa palmeira é distribuída geograficamente na América do Sul, principalmente no Brasil, nos estados do Pará, Amazonas, Acre, Amapá e Maranhão, sendo conhecida como açaí, açaí da várzea, açaí do Pará, açaizeiro e açaí do baixo Amazonas no Brasil; **uassi** e **morroke** na Venezuela, **manicole**, **pina** e **pinau** na Guiana Francesa; **palisade**, **pina**, **prasara**, **manaka** e **wasei** no Suriname e **manac** em Trinidad (JARDIM et al., 1995; KAHN, 1997).

É uma planta dominante em áreas de mata do estuário amazônico, fazendo parte da vegetação de terra firme, várzea e igapó, sendo mais comum em áreas de várzeas, aonde chega a formar populações homogêneas. Possui estipe cilíndrico anelado e curvo, formando troncos múltiplos, podendo atingir até 30 m de altura. As folhas, em torno de 10 a 12/estipe, são pinadas com 2 m de comprimento, composta de 70 a 80 pares de folíolos. Abaixo das bainhas das folhas estão as espadas ou espatas, que são de consistência coriácea que envolvem as flores até o florescimento (JARDIM et al., 1995; SIQUEIRA et al., 1998a).

As flores são sésseis, monóicas, dispostas em espádice ramosa e o fruto é uma baga globosa, apresentando coloração esverdeada, quando imaturos e coberta por uma polpa violácea e fibrosa por ocasião da

maturidade (CORRÊA, 1986; SIQUEIRA et al., 1998a). As sementes possuem um endocarpo duro e são recalcitrantes. O açazeiro apresenta floração e frutificação contínua, com picos definidos de florescimento e frutificação, que variam conforme a região. Quando a palmeira atinge a idade de 3,5 a 4 anos, entra em início de floração. É uma planta alógama, ocorrendo fecundação cruzada entre touceiras (JARDIM et al., 1995).

Dentre as diversas espécies nativas da região Amazônica, o açazeiro se destaca com grande potencial de exploração sócio econômico, visto que pode ser utilizado integralmente para a exploração econômica de frutos, palmito e celulose. Considerando as diversas possibilidades de exploração, destaca-se o uso do estipe como material de construção, celulose, lenha e isolamento elétrico; as inflorescências como adubo, no fabrico de vassouras e proteção de plantações; o palmito para a indústria de conservas, para a produção de picles e na ração animal e as folhas para cobertura de casa, fibras, adubo, entre outros. Como uso medicinal, o chá de raízes jovens é utilizado para o controle de verminoses e malária, os frutos novos como anti-diarréico, e o sumo do palmito pode ser utilizado na forma de emplastro em casos de hemorragias externas (JARDIM et al., 1995; KAHN, 1997; SIQUEIRA et al., 1998a).

Sua principal vocação é como fruteira, uma atividade mais antiga, que além de gerar divisas é responsável pela sobrevivência de milhares de famílias, sendo uma das atividades mais rentáveis no estado do Pará, gerando cerca de 25.000 empregos só na cidade de Belém (O SABOR..., 1992).

De seus frutos obtém-se um suco denominado de açáí, que tem grande aceitação no mercado local, regional e, atualmente, devido ao seu excelente valor nutritivo e calórico, vem conquistando os mercados nacional e internacional, sendo comercializado *in natura*, como suco gelado, na fabricação de geleias, sorvetes e picolés (O SABOR..., 1992).

A demanda da polpa de açáí é crescente na região Norte e no mercado nacional. A produção de seus frutos no estado do Pará aumentou de 86 mil em 1982 para 117 mil toneladas em 1992, ou seja, um incremento

de 36 % no período (SIQUEIRA et al., 1998a). A mesma tendência foi observada no mercado nacional onde, no mesmo período, houve um aumento na produção de frutos de 117 para 124 mil toneladas.

O estado do Pará é o maior produtor e consumidor nacional de frutos de açaí, sendo responsável por 93 % da produção. É o segundo alimento mais consumido na cidade de Belém, com consumo diário superior a 180.000 litros de suco de açaí. No mercado internacional o suco de açaí é ainda um produto desconhecido, entretanto, o palmito de açazeiro apresenta uma boa aceitação. O Pará exportou, no período de janeiro de 1994 a dezembro de 1996, 14.400 toneladas do produto, sendo que os maiores importadores de palmito são a Argentina, França, Estados Unidos, Espanha e Itália (SIQUEIRA et al., 1998a). Conforme NOGUEIRA (1997), mensalmente são enviadas 120 toneladas de suco para outras regiões do país, como Rio de Janeiro, São Paulo, Pernambuco, Brasília e Goiás.

Com relação aos preços de comercialização na região, existem variações significativas em função da oferta local do produto e da distância do mercado consumidor e do tamanho deste mercado. No Pará, o preço de 15 kg de frutos de açaí pode variar de US\$ 1.50 no período de pico de safra (setembro a novembro) a US\$ 40.00 na safra de inverno (março), segundo dados de SIQUEIRA et al. (1998a).

Grande parte da produção de frutos e palmito de açaí provém do extrativismo praticado em áreas de populações naturais, alcançando, aproximadamente, a produtividade de 12 t/ha/ano e 200 kg/ha/ano, respectivamente. Esse sistema de exploração apresenta vários problemas como o corte indiscriminado de plantas para a extração do palmito, dificuldade de acesso a áreas de ocorrência natural, que em grande parte são várzeas, produções irregulares, longo período de entressafra, baixa produtividade e rendimento de suco, além da depreciação do produto final (SIQUEIRA et al., 1998a).

Segundo HOMMA (1989), o extrativismo oferece situação instável para qualquer produto e, com o decorrer da exploração, a oferta e a

qualidade dos produtos tendem a diminuir, não podendo ser comparado com outros produtos obtidos de plantios racionais.

Na tentativa de atender a demanda crescente, produtores vêm implantando plantios comerciais de açazeiro utilizando sementes de baixa qualidade originárias de plantas não selecionadas e pouco adaptadas às condições de terra firme, quase sempre adquiridas em locais de beneficiamento do suco. Nos poucos plantios comerciais, observa-se um longo período para o início da frutificação, colheitas irregulares, desuniformidade na forma e coloração dos frutos, baixa produção e, principalmente, baixo rendimento de polpa/fruto. Nas populações naturais, esses aspectos estão relacionados a forte ação antrópica para a extração do palmito, exercendo pressão de seleção negativa para características de frutos (O SABOR ..., 1992).

Apesar da propagação sexuada ser a mais indicada pela facilidade e economia, este método apresenta o inconveniente da formação de plantios heterogêneos segregando para a maioria das características e causando desuniformidade na produção. A propagação vegetativa por perfilhos desta espécie é problemática e apresenta pouco sucesso. As mudas formadas são frágeis, necessitando de um período prolongado de adaptação em viveiros, não sendo um método recomendável (CALZAVARA, 1987).

2.2. Aspectos gerais e econômicos do cupuaçuzeiro

O cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum.) é uma espécie frutífera da família Sterculiaceae (VENTURIERI, 1993). Conforme classificação de CUATRECASAS (1964), o gênero *Theobroma* apresenta 22 espécies, todas restritas à América Tropical. Dentre essas espécies, o *Theobroma cacao* L. (cacau) é a mais cultivada e o *Theobroma grandiflorum* (cupuaçu), é o que apresenta frutos de maior tamanho.

O cupuaçuzeiro é encontrado, espontaneamente, nas matas de terra firme e várzea alta, na parte sul e leste do Pará, abrangendo as áreas do

médio Tapajós, rios Xingu e Guamá, alcançando a pré-Amazônia maranhense. Ocorre em estado nativo, no alto rio Itaciumas (município de Marabá-PA), nas áreas de mata baixa, como planta emergente e também na mata virgem, rala e baixa, entre os municípios paraenses de Altamira e Itaituba (CAVALCANTE, 1991; DUCKE, 1953; VENTURIERI, 1993). Atualmente o cupuaçu está disseminado por toda a bacia Amazônica e Norte do Maranhão, sendo cultivado na Bahia, Espírito Santo, São Paulo e em outras regiões do país.

Sendo uma árvore da floresta tropical úmida, ocorre normalmente como um componente do extrato intermediário, chegando a atingir o dossel superior da floresta. No estado silvestre, pode atingir 20 m de altura e 45 cm de diâmetro do caule à altura do peito, apresentando copa irregular e pouco espessa. Sob condições de cultivo domesticado, o porte varia de 6 a 8 m de altura e a copa é distribuída em andares, chegando a atingir 7 m de diâmetro (VENTURIERI, 1993).

O cupuaçuzeiro apresenta crescimento pseudo-apical, onde o eixo principal apresenta crescimento ortotrópico em estágios de um a 1,5 m, sendo que ao final de cada estágio, trifurca-se em ramos plagiotrópicos. As folhas jovens são de coloração rósea e apresentam pêlos ferrugíneos abundantes e, quando adultas, são verdes apresentando 25 a 35 cm de comprimento e nove a dez pares de nervuras (VENTURIERI, 1993).

As inflorescências são pequenas, axilares ou extra-axilares, distribuídas nos ramos plagiotrópicos. As flores são perfeitas, com cinco sépalas triangulares espessas; corola com cinco pétalas, cada uma com expansão laminar arroxeadada e base em forma de cogula, que recobre os estames formando uma barreira física entre o androceu e o gineceu (VENTURIERI, 1993).

O fruto é uma baga capsulácea, com peso médio variando de 500 a 2.500 gramas, podendo ser encontrados frutos com peso acima de 3.000 gramas. As sementes, em média 36 unidades/fruto, são recalcitrantes, apresentam, aproximadamente, 2,5 cm de largura e 0,9 cm de espessura e são superpostas em cinco colunas em torno de um eixo central, vulgarmente

denominado de "talo". Cada semente é envolvida por uma abundante polpa branco-amarelada de sabor ácido e cheiro agradável (CUATRECASAS, 1964; CAVALCANTE, 1991; VENTURIERI, 1993).

A floração e frutificação do cupuaçuzeiro variam conforme o regime hídrico da região. Diversos autores concordam que a floração ocorre no período mais seco do ano, coincidindo com o período de maior atividade de polinizadores, enquanto que o desenvolvimento dos frutos ocorre, principalmente, no período das chuvas (VENTURIERI, 1993). Seus frutos são os maiores entre os do gênero, sendo considerado um dos melhores da flora regional, cuja demanda é cada vez mais crescente, devido ao sabor agradável da polpa e sua rentabilidade como cultura perene (CALZAVARA, 1987). O cupuaçu é uma espécie predominantemente alógama, com incompatibilidade sob controle gênico, provavelmente similar ao observado em cacau (VENTURIERI, 1993).

O maior potencial de exploração da cultura é a produção de polpa para a fabricação de sorvetes, doces, geleias, néctar, licores, compotas, doces, bolos, biscoitos, iogurte e sucos (CALZAVARA et al., 1984). Das sementes pode-se obter o chocolate e também extrair uma gordura semelhante à manteiga de cacau, de alta digestibilidade (VENTURIERI, 1993). A produção inicia no quarto ano, com média de oito frutos/planta, e cresce no quinto ano, para 10 a 15 frutos/planta, tendendo a estabilizar no sétimo ao oitavo ano, com 25 a 40 frutos/planta (SOUZA et al., 1996). Estima-se que um plantio de 150 ha pode atingir a produção anual de 322 mil frutos, fornecendo 148,5 toneladas de polpa e 66,5 toneladas de sementes/ano (SIQUEIRA et al., 1998b). Entretanto, a produção é bastante variável, devido a diversos fatores, principalmente a ausência de material genético melhorado que tem promovido a formação de plantios desuniformes.

A produção de cupuaçu é concentrada na região Norte, sendo o principal estado produtor o Pará, seguido do Amazonas, Rondônia e Acre. Estatísticas indicam que a área de plantio comercial na Amazônia é de, aproximadamente, 9.000 ha (SIQUEIRA et al., 1998b). O estado do Pará,

por ser área de dispersão natural do cupuaçuzeiro, tem parte de sua produção proveniente do extrativismo e semi-extrativismo. Entretanto, o cultivo racional começou a ser incrementado a partir da década de 80, se intensificando na década de 90. Conforme dados do IBGE e da Emater-PA, no ano de 1997 o Pará produziu 9.133 mil frutos em 8.640 ha (CORAL, 1998).

As mudas produzidas são, na sua maioria, provenientes de sementes, sem uma prévia seleção da planta matriz, ocasionando a formação de plantios desuniformes quanto ao desenvolvimento vegetativo e produção (ALVES et al., 1998).

Para atender esta demanda, instituições de pesquisas na região, nos últimos anos, têm implementado programas de melhoramento com ênfase a seleção de materiais com características de alta produção de frutos, rendimento de polpa e resistência à vassoura-de-bruxa (*Crinipellis perniciosa*), principal enfermidade da cultura.

2.3. Cultura de tecidos e morfogênese

Os primeiros passos para o desenvolvimento da cultura de tecidos ocorreram no início do século XX, sendo que os maiores avanços foram observados a partir da segunda metade do século. A cultura de tecidos vegetais compreende um conjunto de técnicas nas quais um explante (célula, tecido ou um órgão) é isolado e cultivado sob condições de assepsia em um meio nutritivo artificial (PASQUAL et al., 1997). O princípio básico da cultura de tecidos é a totipotencialidade das células, ou seja, qualquer célula no organismo vegetal contém toda a informação genética necessária para a regeneração de uma planta completa (TORRES et al., 1998).

Atualmente, as técnicas de cultura de tecidos têm sido aplicadas, de modo geral, como um instrumento valioso na obtenção de plantas livres de viroses, na propagação vegetativa *in vitro* para clonagem rápida de genótipos superiores, na preservação e intercâmbio de germoplasma e no

melhoramento genético. Em programas de melhoramento de plantas, a cultura de tecidos pode ser aplicada no aumento da variabilidade genética e na introgressão de genes de interesse (FERREIRA et al., 1998).

A cultura de tecidos tem como base os mesmos princípios anatômicos e fisiológicos envolvidos no crescimento e desenvolvimento de qualquer planta sob outras condições. O termo desenvolvimento, quando aplicado a plantas superiores, refere-se a mudanças graduais e progressivas no tamanho, estrutura e função, correspondendo a transformação de um zigoto em uma planta madura. Existem três processos interrelacionados no desenvolvimento: o crescimento, a diferenciação celular e a morfogênese. O crescimento é o aumento irreversível no tamanho, não necessariamente acompanhado por um aumento no peso seco e na totalidade de protoplasma. A diferenciação celular consiste na transformação de células geneticamente idênticas, derivadas de um zigoto ou outra célula qualquer, em células especializadas bioquímica, fisiológica e estruturalmente. A morfogênese pode ser conceituada como o processo resultante da integração e coordenação da divisão e diferenciação celular (MOORE, 1979).

Durante o desenvolvimento de um organismo, o processo de diferenciação celular reflete, em última análise, o efeito de pelo menos três grupos de fatores: o fator genético, as características originadas durante a ontogênese e as características cuja expressão dependem apenas do ambiente (KERBAUY, 1999).

Os estudos *in vitro* de plantas têm sido facilitados devido ao fato das plantas possuírem um sistema de desenvolvimento aberto (ou dendrítico), ou seja, os órgãos são formados continuamente durante toda a vida, por meio da atividade dos meristemas apicais (KERBAUY, 1999). Entretanto, certos órgãos como folhas, flores e frutos, apresentam um padrão de desenvolvimento fechado.

HICKS (1980) define como determinação celular o processo pelo qual o desenvolvimento potencial torna-se restrito a uma via específica de diferenciação.

Para que ocorra a determinação, as células devem apresentar competência para responder a um determinado estímulo específico. Segundo CHRISTIANSON, citado por GUERRA et al. (1999), a competência celular é a capacidade das células reagirem a sinais específicos de desenvolvimento. Em tecidos cultivados *in vitro*, a competência para algumas respostas morfogênicas pode ser intrínseca ao explante, ou então ser induzida por meio de manipulações adequadas (CHRISTIANSON & WARNICK, 1988).

AMMIRATO (1985), reporta que a indução *in vitro* implicaria em uma mudança na competência de determinadas células do explante (indução indireta) ou desencadearia respostas diretas de diferenciação celular (indução permissiva).

A diferenciação celular está intimamente ligada a processos reguladores da atividade gênica, resultando na atividade de uma enzima ou na inativação gênica. Um exemplo clássico é a camada de aleurona em sementes de cereais, que possui células-alvo com competência para responder especialmente à giberelina, mediante a expressão de genes responsáveis pela síntese da α -amilase e outras enzimas, ou seja, num certo estágio específico da embriogênese, estas células tornam-se comprometidas numa rota definida de desenvolvimento (KERBAUY, 1999).

Em vários tecidos cultivados *in vitro*, a utilização de substâncias reguladoras de crescimento apresenta fundamental importância para o estabelecimento da competência e determinação, condições estas imprescindíveis para a formação de meristemas caulinares e/ou radiculares (KERBAUY, 1999). Os reguladores de crescimento exercem sua ação por reconhecimento de receptores específicos, presentes em células responsivas, traduzindo sinais hormonais em eventos bioquímicos e fisiológicos (GUERRA et al., 1999).

No estabelecimento de culturas a partir de células maduras (vacuoladas), é necessário que estas sofram desdiferenciação. Segundo WAREING & AL-CHALABI (1985), o processo de desdiferenciação resultaria

da retomada da divisão celular a partir de células diplóides e o estabelecimento de alterações no metabolismo especializado.

As limitações à capacidade das células se diferenciar e rediferenciar, devem ser impostas pelos componentes orgânicos e inorgânicos do meio de cultura, além do posicionamento espacial de uma célula em relação às demais (WAREING & PHILLIPS, 1982). Dentre os fatores de natureza orgânica, os reguladores de crescimento desempenham papel fundamental no controle do desenvolvimento *ex vitro* e *in vitro*.

O sinergismo hormonal entre auxinas e citocininas inicialmente observado em tecido medular de tabaco por SKOOG & MILLER (1957), vem sendo amplamente constatado em diferentes espécies, órgãos e tecidos, constituindo-se até o momento no elemento chave da morfogênese *in vitro*.

As diversas técnicas de cultura de tecidos vegetais podem ser divididas em dois grupos: organogênese e embriogênese somática (PASQUAL et al., 1997), ambos podem ser desenvolvidos por via direta (sem a formação de calos) ou por via indireta (com a formação de calos).

2.4. Organogênese e embriogênese somática

Segundo HICKS (1980), a organogênese *in vitro* envolve uma variedade de seqüências complexas de desenvolvimento, resultantes da manipulação experimental de partes de uma planta (vegetativas e florais), culminando na formação de primórdios de órgãos ou plantas inteiras.

A organogênese *in vitro* pode ser classificada em dois tipos: adventícia e não adventícia. No primeiro caso, a organogênese ocorreria na ausência de reguladores de crescimento no meio de cultura, sem a formação de calo, enquanto que a organogênese não adventícia é caracterizada pela dependência da presença de reguladores e da formação de calos (CHRISTIANSON & WARNICK, 1988).

O sinergismo entre auxinas e citocininas é crítico para o controle da morfogênese *in vitro*. Elevadas concentrações de citocininas e baixas de

auxinas induzem, predominantemente, a formação de gemas em detrimento da formação de raízes e calos e vice-versa, conforme evidenciado por SKOOG & MILLER (1957). A rizogênese é induzida pela presença isolada de auxina ou em combinação com uma citocinina em baixa concentração (FLICK et al., 1983).

Embriogênese somática, adventícia ou assexual são termos usualmente empregados para designar o processo pelo qual células haplóides ou somáticas desenvolvem-se por meio de diferentes estádios embriogênicos, dando origem a uma planta, sem que ocorra a fusão de gametas (WILLIAMS & MAHESWARAN, 1986). Esse processo constitui um exemplo da expressão da totipotencialidade das células das plantas (HABERLANDT, citado por KRIKORIAN & BERQUAM, 1969).

O padrão de desenvolvimento de um embrião somático em dicotiledôneas apresenta muitas características morfológicas semelhantes às do embrião zigótico. Ambos são caracterizados pela diferenciação de uma estrutura bipolar: ápice caulinar e radicular, passando pelos estádios de desenvolvimento pró-embriônários e embriônários: globular, codiforme, torpedo e cotiledonar (SMITH, citado por GUERRA et al., 1999). Entre as diferenças, os embriões somáticos desenvolvem-se livres de correlações físicas, fisiológicas e genéticas, as quais ocorrem no desenvolvimento de um embrião zigótico (ZIMMERMANN, 1993).

Dois padrões básicos de expressão da embriogênese somática ocorrem *in vitro*. O primeiro corresponde ao modelo direto, no qual os embriões somáticos originam-se dos tecidos matrizes sem a formação de estádios intermediários de calo. O segundo padrão corresponde ao modelo indireto no qual os embriões somáticos se formam a partir de um calo, que apresenta células em diferentes estádios de diferenciação e, conseqüentemente, com diferentes graus de determinação, as quais podem adquirir novas competências mediadas por mensageiros químicos específicos (SHARP et al., 1980).

A grande maioria dos sistemas de embriogênese somática ocorre indiretamente (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). A possibilidade de

obtenção de um satisfatório sistema experimental *in vitro* para estudos morfogênicos e para a propagação clonal, com a formação de calos é indesejável. A constituição cromossômica das células de um calo é instável e a relação entre as células potencialmente meristemáticas e o total de células da massa de um calo é pequena, além da falta de sincronia entre os meristemas de um calo (HICKS, 1980; THORPE, 1980; SHERIDAN; D'AMATO, citados por GUERRA, 1989).

Dessa forma a embriogênese somática direta oferece um maior potencial para estudo dos eventos bioquímicos e fisiológicos relacionados com a determinação. Segundo CONGER et al. (1983), a embriogênese direta é um sistema modelo para o estudo da morfologia básica de embriões não zigóticos e da influência de fitorreguladores sobre o desenvolvimento embrionário.

Nesse contexto, sistemas que atendem os três requisitos propostos por WILLIAMS & MAHESWARAN (1986) apresentam especial interesse: 1)- as células iniciais não necessitam de desdiferenciação e são, portanto, potencialmente embriogênicas por ocasião da inoculação; 2)- ciclos contínuos de embriogênese são possíveis; e 3)- os embriões somáticos são facilmente destacados do tecido matriz.

Independente do padrão direto ou indireto, as células-mães embriogênicas apresentam um conjunto de características comuns ao comportamento de células embrionárias em divisão ativa: tamanho pequeno (100-200 μm), conteúdo citoplasmático denso, núcleos grandes com nucléolos proeminentes, vacúolos pequenos e presença de grãos de amido (GUERRA et al., 1999).

Teoricamente, para a indução de calos, qualquer tecido pode ser utilizado como explante tendo em vista a totipotência das células vegetais. Na prática, entretanto, procura-se utilizar explantes que contenham maior proporção de tecido meristemático ou que contenham maior capacidade de expressar totipotência (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Segundo estes autores, explantes oriundos de tecidos jovens e com maior atividade metabólica, são mais adequados para estimular a formação de calos.

Na embriogênese somática, *in vitro* ou induzida, células em diferentes estádios de diferenciação podem ser induzidas, por estímulos ambientais ou químicos e, se reprogramadas, adquirir novas competências morfogenéticas (GUERRA et al., 1999). Em geral, na maioria dos modelos de embriogênese induzida *in vitro*, as auxinas, em especial o 2,4-D, são consideradas as substâncias responsáveis pelo desencadeamento dos processos de desdiferenciação (modelo indireto) e rediferenciação (modelo direto).

A embriogênese somática apresenta uma grande vantagem sobre os demais sistemas de micropropagação, grandes quantidades de embriões podem-se formar em suspensões de células embriogênicas com um mínimo de manipulação manual e espaço físico, principais componentes do custo de uma planta micropropagada (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

2.5. Cultura de embriões

A cultura de embriões é conhecida desde o século XIX, sendo que depois de um longo período de progresso limitado, rapidamente desenvolveu depois de 1937, com significativas aplicações no melhoramento de plantas, bem como em estudos básicos de fisiologia e bioquímica de embriões (COLLINS & GROSSER, 1984). Bonnet foi o primeiro embriologista a excisar e cultivar embriões maduros de feijão em 1754. Hanning, em 1904, obteve com sucesso o crescimento de embriões de *Raphanus sativus* em um simples meio, e muito de seus resultados são válidos até hoje (MONNIER, 1995).

A cultura de embriões tem sido empregada para descrever os processos de crescimento e desenvolvimento do embrião zigótico *in vitro*, independente da idade, tamanho e estágio de desenvolvimento em que o embrião foi excisado (RAPPAPORT, citado por HU & FERREIRA, 1998). No estudo de embriogênese *in vitro* ou *in vivo* devem ser incluídos embriões de origem não zigótica como os originários das células somáticas (nucelo ou

calos), do pólen via androgênese e aqueles originários da oosfera não fertilizada ou de outras células do saco embrionário (HU & FERREIRA, 1998).

Por tentar reproduzir *in vitro* o normal desenvolvimento de embriões, a cultura de embriões apresenta-se como uma ferramenta para elucidar alguns problemas como nutrição do embrião no óvulo, controle da embriogênese, resgate de embriões interespecíficos quando apresentam alguma incompatibilidade, produção de haplóides, superação de dormência e esterilidade de sementes, micropropagação entre outras aplicações (COLLINS & GROSSER, 1984; HU & FERREIRA, 1998).

Segundo ANDREOLI (1985), a importância da cultura de embriões se deu devido à descoberta de que poderiam ser cultivados separadamente do tecido maternal e de reserva, quando condições assépticas e nutricionais eram fornecidas. No cultivo asséptico, os embriões transpõem facilmente a fase de desinfestação por estarem protegidos dentro do fruto e semente. Devido a este fator, ao alto poder regenerativo e a natureza juvenil, embriões têm sido usados como explantes para a propagação clonal e organogênese (HU & FERREIRA, 1998).

Os meios requeridos para o contínuo desenvolvimento de embriões maduros são, geralmente, muito simples, contendo sais minerais, sacarose e menor adição de reguladores de crescimento (MOTT, 1981). Meios de cultura mais complexos são requeridos na cultura de embriões imaturos (MOTT, 1981; COLLINS & GROSSER, 1984; HU & FERREIRA, 1998).

2.6. Propagação *in vitro* de palmeiras

Os primeiros estudos *in vitro* com palmeiras foram realizados por CUTTER JUNIOR & 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).

A maioria dos estudos de propagação *in vitro* de palmeiras tem sido conduzido em *Cocos nucifera* L., *Elaeis guineensis* Jacq. e *Phoenix dactylifera* L., tendo em vista a importância econômica destas espécies em muitos países.

Diversas palmeiras de importância econômica têm sido multiplicadas com maior ou menor sucesso, como *Cocos nucifera* L. (coqueiro), *Phoenix dactylifera* L. (tamareira), *Elaeis guineensis* Jacq. (dendezeiro), *Euterpe edulis* Mart. (jussara, palmitero) e *Bactris gasipaes* Kunth. (pupunheira).

Segundo STEIN (1988), a clonagem *in vitro* representaria a alternativa mais favorável à propagação vegetativa de pupunha, dendezeiro, tamareira e coqueiro. Todavia, até o presente, apenas a micropropagação do dendezeiro tem-se mostrado mais factível sob o ponto de vista econômico (PARANJOTHY, citado por ALMEIDA, 1994).

A propagação vegetativa de palmeiras por meio da técnica de cultura de tecidos tem sido especialmente dificultada pela natureza perene dessas plantas, bem como por serem monocotiledôneas, sendo geralmente recalcitrantes à micropropagação (EEUWENS, 1976).

Embora a regeneração via organogênese adventícia e embriogênese somática tenham sido observadas em diversas espécies de palmeiras, as frequências de regeneração verificadas até o presente podem ser consideradas relativamente baixas e mais irregulares do que em outras monocotiledôneas (RABÉCHAULT & MARTIN, 1976).

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 de tecidos injuriados (TISSERAT, 1982).

Por se tratar de plantas recalcitrantes à micropropagação, a adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura é imprescindível à indução da regeneração de gemas adventícias e embriões somáticos em palmeiras de um modo geral (STEIN, 1988). Observa-se que, via de regra, a exemplo

do que se tem verificado em outras plantas que apresentam um alto grau de resistência à formação de gemas ou embriões somáticos, a presença combinada e/ou isolada de uma auxina e uma citocinina no meio de cultura apresenta-se fundamental tanto no estabelecimento quanto na manutenção das culturas de palmeiras *in vitro* (EEUWENS, 1976; TISSERAT, 1984a, 1984b; STEIN, 1988; GUERRA & HANDRO, 1998).

A embriogênese somática em palmeiras ainda não é bem entendida. Em geral, a indução de calos é um pré-requisito para a embriogênese somática (RABÉCHAULT & MARTIN, 1976) e a auxina é requerida para a indução e proliferação de calos (NWANKWO & KRİKORIAN, 1983). Depois de sucessivos subcultivos as células do calo adquirem a capacidade para a embriogênese, em altas e baixas concentrações de auxinas. Em muitos casos, a omissão ou redução da auxina é necessária para o desenvolvimento dos embriões (REYNOLDS & MURASHIGE, 1979; TISSERAT, 1979). Em outros casos, mudanças na fonte de auxinas e a adição de citocininas são favoráveis (RABÉCHAULT & MARTIN, 1976).

Diversos estudos de regeneração *in vitro* de tecidos somáticos de palmeiras têm evidenciado que o emprego de altas concentrações de auxinas, como o 2,4-D, associado a baixas concentrações de citocininas, tem induzido a formação de calos e, subsequente formação de embriões somáticos (TISSERAT, 1979, 1982; BRANTON & BLAKE, 1983; CID, 1987; STEIN, 1988; TEIXEIRA et al., 1993; GUERRA & HANDRO, 1998). Entretanto, altas concentrações de auxinas podem provocar alterações genéticas consideráveis em certos materiais cultivados *in vitro*, ou seja, variação somaclonal. Em *Elaeis guineensis* Jacq., embriões somáticos obtidos a partir de calos, originaram 5 % de plantas anormais, enquanto 100 % das plantas regeneradas produziram, quando adultas, inflorescências mal formadas (VERDEIL, citado por CRESPO, 1997).

Nos estudos de micropropagação de palmeiras, têm sido utilizadas várias fontes de explantes, sendo as mais frequentes os embriões zigóticos, tecidos foliares jovens, ápices caulinares, gemas laterais, ápices radiculares e inflorescências.

A cultura de embriões imaturos e maduros de palmeiras, para indução de organogênese e embriogênese somática, para obtenção de plântulas assépticas como fonte de explante ou para a conservação *in vitro*, tem sido bastante estudada. Tendo em vista a sua maior expressão regenerativa, os embriões zigóticos têm sido os explantes mais utilizados nos estudos básicos de micropropagação de palmeiras para interpretação de eventos regenerativos característicos de uma determinada espécie (RABÉCHAULT & MARTIN, 1976; TISSERAT, 1979; CID, 1987; TEIXEIRA et al., 1993; GUERRA & HANDRO, 1998; HU & FERREIRA, 1998).

Os primeiros estudos foram conduzidos por Rabéchault, em 1967, com o objetivo de superar dormência em sementes de *Elaeis guineensis* Jacq. (COLLINS & GROSSER, 1984).

RABÉCHAULT et al. (1970) obtiveram a formação de embrióides em *Elaeis guineensis* Jacq., sem a diferenciação de folhas. A produção de embrióides em *Elaeis guineensis* Jacq. a partir da cultura de embriões imaturos, e sua posterior diferenciação radicular em meio com 1,25 mg.L⁻¹ de ZEA foi alcançada por RODRIQUEZ (1989). TEIXEIRA et al. (1993) obtiveram a formação de tecido embriogênico, a partir de embriões zigóticos, em meio Y3 suplementado com 500 µM de 2,4-D, com posterior regeneração de plântulas. Resultados semelhantes foram obtidos por CID (1987) em *Elaeis oleifera* e seu híbrido com *Elaeis guineensis* Jacq., cultivados em meio inicial com 2,4-D e 2iP e transferidos para meio sem auxinas para proliferação de brotos e, para indução de enraizamento, em meio suprido com ANA.

AMMAR & BENBADIS (1977) observaram o desenvolvimento de calos a partir da bainha cotiledonar de embriões de *Phoenix dactylifera* L. em meio enriquecido com 10⁻⁶M de ANA, 10⁻⁷M de KIN e 15 % de água de coco. REYNOLDS & MURASHIGE (1979) e TISSERAT (1979), conseguiram a formação de plantas a partir da diferenciação de embrióides em *Phoenix dactylifera* L.

A formação de embriões somáticos, a partir de embriões zigóticos isolados de sementes de *Euterpe edulis* Mart., em meio inicial com altas

concentrações de 2,4-D (50 -100 mg.L⁻¹), foi alcançada por GUERRA & HANDRO (1998).

O desenvolvimento *in vitro* de embriões zigóticos também tem sido aplicado em palmeiras para a obtenção rápida de plântulas assépticas e, em certos casos, para evitar o aborto muito precoce, via de regra resultante de hibridações, ou então para reduzir o tempo de germinação devido à dormência das sementes (STEIN, 1988).

KARUNARATNE et al. (1985) obtiveram 62 % de formação de plântulas em *Cocos nucifera* L., em meio líquido Y3 modificado, sendo que a presença de carvão ativado e de altas concentrações de sacarose foram importantes para o crescimento de embriões. GUPTA et al. (1984) estudando embriogênese somática em *Cocos nucifera* L., ressaltaram a importância do tamanho inicial dos embriões zigóticos para a formação de plântulas completas e a utilização de meio líquido MS. LEMOS et al. (1999) alcançaram excelentes percentagens de conversão de embriões zigóticos de *Euterpe oleracea* Mart., em meio semi-sólido MS modificado, suplementado com ANA e BAP (0,5 mg.L⁻¹).

O emprego de ápices caulinares de palmeiras para o estabelecimento de culturas assépticas tem sido muito pouco utilizado, tendo em vista que a maioria delas apresenta crescimento monopodial, o que implicaria na eliminação da planta doadora de explante (STEIN & STEPHENS, 1991). Entretanto, em palmeiras que perfilham na base do estipe, como tamareira, os ápices caulinares representam uma importante fonte de explantes (STEIN, 1988).

RHISS et al. (1979) observaram a regeneração direta de gemas, a partir de ápices de brotos laterais de *Phoenix dactylifera* L. em meio suprido com auxinas e citocininas, após 3 a 4 meses de cultura. Os explantes foram cultivados inicialmente em meio suplementado com 0,1 a 1 mg.L⁻¹ de BAP, KIN e 2iP, sendo posteriormente transferidos para meios adicionados de 0,5 mg.L⁻¹ de AIB e AIA e de 1 a 5 mg.L⁻¹ de ANA, sendo o enraizamento induzido na presença de 0,1 mg.L⁻¹ de 2iP; 1 mg.L⁻¹ de ANA; 2 mg.L⁻¹ de AIB e 3 mg.L⁻¹ e AIA. TISSERAT (1979) demonstrou o estabelecimento e

considerável crescimento de ápices de *Phoenix dactylifera* L. em meio suplementado com 0,1 a 1 mg.L⁻¹ ANA ou 2,4-D. A cultura de ápices caulinares em tamareira foi melhorada por TISSERAT (1984b), principalmente a fase de estabelecimento, com o uso de 10 mg.L⁻¹ de ANA aumentando a taxa de sobrevivência e crescimento. A transferência dos ápices para meios líquidos com 0,1 mg.L⁻¹ de ANA e 10 mg.L⁻¹ de BAP estimulou a formação de brotos, quando comparado com meios geleificados.

A embriogênese somática a partir de calos oriundos de ápices caulinares e gemas laterais de *Phoenix dactylifera* L., também foi obtida por SHARMA et al. (1984), em meio MS modificado suplementado com diferentes concentrações de BAP e 2,4-D e com carvão ativado. TISSERAT (1979), estudando os efeitos de 2,4-D e ANA em meio MS modificado com carvão ativado, obteve resultados favoráveis na formação de calos, raízes e gemas adventícias em ráquias, embriões zigóticos, gemas laterais e apicais de tamareira. O autor verificou ainda que dependendo da concentração utilizada de 2,4-D, os explantes, independente da sua origem, se comportaram de forma muito semelhante. Entretanto, as gemas apicais e laterais foram mais susceptíveis a formação de calos e subsequente organogênese.

ARIAS & HUETE (1983) observaram a formação de calos em ápices caulinares de *Bactris gasipaes* Kunth: cultivados no escuro em meio suprido de 20 a 50 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 3 a 6 mg.L⁻¹ de BAP, sendo que a regeneração de plântulas foi induzida na presença de luz e ausência de reguladores de crescimento. Posteriormente, VALVERDE & ARIAS (1989) alcançaram maior produção de calos em meio MS suplementando com 0,5 ou 4 mg.L⁻¹ de Picloram e 3 mg.L⁻¹ de 2iP, sendo que em concentrações mais baixas de auxina sintética, foram obtidos calos de maior tamanho. STEIN (1988) verificou também que a combinação de BAP e 2,4-D, em diferentes concentrações, promoveu um crescimento vigoroso de calos em secções subapicais de caules de *B. gasipaes* Kunth.

PINEDO PANDURO (1987) observou a proliferação de gemas vegetativas, a partir de ápices caulinares de *Bactris gasipaes* Kunth., em

meio nutritivo suplementado somente com ANA ou em combinação com BAP, sendo que o autor ressaltou que os níveis adequados de reguladores de crescimento variam conforme o genótipo.

Resultados semelhantes foram obtidos por ALMEIDA (1994) combinando $2,4 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA com $0,8 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP, sendo observada a presença de até 15 gemas/ápice caulinar. Entretanto, CRESPO (1997) observou uma recalcitrância à regeneração em ápices caulinares oriundos de plantas adultas de pupunheira. Ambos os autores ressaltaram que explantes obtidos de plântulas cultivadas *in vitro* apresentam uma maior capacidade morfogênica e expressão regenerativa.

BLAKE (1983) observou o crescimento normal de ápices caulinares de *Cocos nucifera* L. em meios com baixa concentração de ANA ($2,5 \mu\text{M}$) na presença ou ausência de carvão ativado, sendo que a adição de 0,25 % de carvão ativado promoveu um crescimento mais acentuado. EEUWENS (1976) desenvolveu um meio de cultura específico para *Cocos nucifera* L. com elevada concentração de iodo que promoveu o crescimento de ápices caulinares e indução de calos superiores quando comparado com outros meios. O mesmo autor sugeriu que a fonte e a concentração de nitrogênio inorgânico influenciaram o crescimento das ráquias.

A reversão de gemas florais em gemas vegetativas é um fenômeno teratológico que ocorre espontaneamente em muitos gêneros, como resultado de fotoindução incompleta, infecção por fitopatógenos, tratamentos cirúrgicos ou pela aplicação de reguladores de crescimento (MOHAN & WADHI; DAVIS & SUDASRIP, citados por PINEDO PANDURO, 1987).

O cultivo de gemas florais é particularmente útil para o estudo das condições que permitam a diferenciação de partes florais específicas e se aplica aos estudos do controle da morfogênese (PINEDO PANDURO, 1987).

Para palmeiras monopodiais, a utilização de inflorescências ainda jovens apresenta-se como uma das alternativas mais interessantes para a micropropagação, sendo empregadas frequentemente ráquias ou mesmo gemas florais isoladas (ALMEIDA, 1994). Algum sucesso com a proliferação

de brotos adventícios a partir de estruturas florais cultivadas *in vitro* tem sido observado em coqueiro, dendezeiro, tamareira, pupunheira e jussara.

Segmentos de inflorescências de *Elaeis guineensis* Jacq. cresceram e fotossintetizaram em meio suplementado com 5 mg.L⁻¹ de AIA (TISSUE CULTURE of the oil palm, citado por PINEDO PANDURO, 1987). SMITH & THOMAS (1973) também observaram que explantes de inflorescências cresceram e mantiveram um alto grau de organização, mas não produziram calos. Entretanto, LIORET & OLLAGNIER (1981) verificaram, com pequena frequência, a iniciação de calos em inflorescência imatura e um crescimento lento. Resultados positivos foram obtidos recentemente por TEIXEIRA et al. (1994), com a formação de tecidos embriogênicos compactos a partir de inflorescências muito jovens de *Elaeis guineensis* Jacq. cultivadas inicialmente em meio MS suplementado com 475 e 500 µM de 2,4-D. A formação de embriões somáticos e posterior regeneração plântulas foi obtida em meio com 15 µM de ANA e 2 µM de BAP.

BRANTON & BLAKE (1983) alcançaram a formação de calos a partir de ráquias de inflorescências jovens de *Cocos nucifera* L. em meio Y3 com 5 x 10⁻⁶ M de BAP, 5 x 10⁻⁶ M de 2iP e 10⁻⁴ M de 2,4-D, e, em seguida, o desenvolvimento de estruturas nodulares semelhantes a diversos estágios de desenvolvimento de embriões zigóticos após subcultivos com redução da concentração de 2,4-D. VERDEIL et al. (1994) obtiveram a formação de calos globulares em inflorescências imaturas de coqueiro em meio Y3 suplementado com 2,5 x 10⁻⁴ e 3 x 10⁻⁴ M de 2,4-D. Entretanto, DEL ROSÁRIO & DE GUZMAN (1982) não alcançaram resultados satisfatórios com segmentos de ráquias de *Cocos nucifera* L. GUPTA et al. (1984), verificaram a formação de raízes e, em menor escala, de apêndices semelhantes a brotos em ráquias de coqueiro em meio Y3 com baixas concentrações de 2,4-D (2,3 x 10⁻⁴ µM), BAP (4,44 µM), KIN (2,32 µM) e ANA (5,38 µM).

Segundo PINEDO PANDURO (1987), provavelmente devido a uma melhor resposta dos explantes, os trabalhos com flores isoladas de *Phoenix dactylifera* L. têm sido mais intensos e alcançado mais sucesso. Diversos

trabalhos têm demonstrado que por meio da embriogênese somática direta e indireta foram regeneradas plantas completas. Entretanto, não se conhecem casos de aplicação desta metodologia em escala comercial (STEIN, 1988).

Diversos trabalhos de TISSERAT (1979, 1982) demonstraram que altas concentrações de auxina (30 a 100 mg.L⁻¹ de 2,4-D) na presença de 0,3 % de carvão ativado, induziram calos friáveis em ráquulas que, posteriormente formaram raízes e embrióides dando origem a plantas completas. DRIRA & BENBADIS (1985) observaram a regeneração direta de plantas a partir de flores de *Phoenix dactylifera* L. em meio MS enriquecido com 0,5 mg.L⁻¹ de 2,4-D; 0,5 mg.L⁻¹ de AIB e 0,2 mg.L⁻¹ de BAP. LOUTIF & CHLYAH (1998) também obtiveram a proliferação de brotos em meio com diferentes combinações de reguladores de crescimento: 0,5 mg.L⁻¹ de ANA, 2 mg.L⁻¹ de BAP e 1 mg.L⁻¹ de 2iP. Entretanto, o crescimento e enraizamento das plântulas só foram obtidos com a redução da concentração de citocinina ou pelo aumento de ANA (2 mg.L⁻¹) combinado com 1 mg.L⁻¹ de 2iP ou 1 mg.L⁻¹ de BAP. A presença de citocinina e de auxina no meio é um fator decisivo para a reversão da gema floral em *Phoenix dactylifera* L. (DRIRA & BENBADIS, 1985).

A formação de gemas vegetativas (13 brotos/explante), a partir de gemas florais de *Bactris gasipaes* Kunth., foi observada apenas em flores estaminadas após 10 meses de incubação em meio MS com 0,8 mg.L⁻¹ de BAP combinado com 2,4 mg.L⁻¹ de ANA (ALMEIDA & KERBAUY, 1996). Os autores ressaltaram que em apenas 11 % dos explantes foi observada a reversão da gema floral, indicando o alto nível de recalcitrância, e que a regeneração foi mais difícil em ráquulas maduras e largás.

Poucos trabalhos utilizando explantes foliares de palmeiras têm sido relatados. BUFFARD-MOREL et al. (1992) alcançaram a embriogênese somática a partir de calos de explantes foliares de *Cocos nucifera* L. cultivados em meio Y3 enriquecido com 1,35 a 2,7 x 10⁻⁴M de 2,4-D. ALMEIDA (1994) observou a formação de calos claros e friáveis na região seccionada, principalmente junto aos feixes vasculares, na presença de 6 a 10 mg.L⁻¹ de 2,4-D, não observando qualquer resposta morfogênética.

Resultados semelhantes foram obtidos por CRESPO (1997), que não observou a formação de calos, apenas a regeneração de raízes em um explante de ráquis foliar em meio com 130 mg.L^{-1} de 2,4-D.

A embriogênese somática e regeneração de plântulas, a partir de folhas aclorofiladas de *Euterpe edulis* Mart. cultivadas inicialmente em meio MS líquido com 2,4-D ou ANA a $10\text{-}20 \text{ mg.L}^{-1}$, foi obtida por GUERRA & HANDRO (1998).

MADHURI et al. (1998) verificaram a indução de um grande número de embriões somáticos a partir de explantes de folhas jovens de *Phoenix dactylifera* cv. Yakubi cultivados inicialmente em meio MS suplementado com 2 mg.L^{-1} de BAP, $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA e $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANOA.

Conforme relatado por KARUNARATNE et al. (1991), a capacidade embriogênica de explantes foliares está relacionada com a maturidade fisiológica de palmeiras jovens em coqueiro.

2.7. Oxidação em tecidos de palmeiras cultivados *in vitro*

O escurecimento dos explantes é, em geral, uma dificuldade nos estudos de cultura *in vitro* em palmeiras. Muitos autores têm descrito este escurecimento como consequência de oxidações, provavelmente em decorrência da liberação de compostos fenólicos pelos tecidos em resposta aos ferimentos (REYNOLDS, 1982; SONDAHL & TEIXEIRA, 1991) e pela oxidação de polifenóis e quininas, os quais são inibidores da formação de calos e do processo de embriogênese (REUVENI & LILÍEN-KIPNIS, 1974). A oxidação de tecidos em palmeiras, também pode ser promovida pelas auxinas, citocininas e impurezas do ágar (RABÉCHAULT & MARTIN, 1976).

Pré-tratamentos dos explantes e a adição de substâncias adsorventes ao meio de cultura foram amplamente testados no cultivo de tecidos de palmeiras. A combinação de ácido ascórbico com ácido cítrico tem sido relatada para retardar a oxidação de tecidos isolados (MURASHIGE, 1974; EL-HENNAWY & WALLY, 1980). Entretanto, REUVENI & LILÍEN-KIPNIS

(1974) demonstraram que o ácido ascórbico, dihidroxinaftaleno, dimetilsulfóxido e PVP não apresentaram efeito positivo sobre a oxidação de explantes de *Phoenix dactylifera* L. O mesmo efeito negativo também é relatado por REYNOLDS & MURASHIGE (1979) e TISSERAT (1979) para o PVP em tamareira. Em contrapartida, RHISS et al. (1979) obteve êxito na redução da oxidação de ápices caulinares com a adição de 200 mg.L⁻¹ de PVP ao meio de cultura.

Em *Cocos nucifera* L. o efeito benéfico da imersão de explantes foliares em ácido cítrico e ácido ascórbico, antes do isolamento, e a inoculação inicial em meio líquido têm sido reportados. Segundo EEUWENS (1976), a oxidação de explantes de *Cocos nucifera* L. é devida à presença de fontes nitrogenadas no meio, sugerindo a utilização de pontes de papel de filtro como suporte para explantes incubados em meio líquido. SIQUEIRA & INOUE (1991) observaram que o isolamento direto, em meio sólido, causou uma oxidação significativa em explantes provenientes de folhas de planta adulta de *Cocos nucifera* L., que não foi amenizada pela presença de 0,1 % de PVP. O meio líquido, independente da presença de PVP, diminuiu significativamente a incidência de oxidação em explantes foliares e de inflorescência em *Cocos nucifera* L.

SHARMA et al. (1980) contornaram a oxidação em *Phoenix dactylifera* L. com a adição de 1 % de carvão ativado ao meio líquido e 10 mg.L⁻¹ de cisteína ao sólido.

A inclusão de carvão ativado ao meio de cultura tem sido relatada como uma condição indispensável para o cultivo *in vitro* de diversas palmeiras. O carvão ativado reduziu a oxidação de explantes de *Phoenix dactylifera* L. (SHARMA et al., 1980; TISSERAT, 1984b), *Elaeis guineensis* Jacq. (NWANKWO & KRIKORIAN, 1983), *Cocos nucifera* L. (FISHER & TSAI, 1978; BLAKE, 1983; KARUNARATNE et al., 1985), *Euterpe* spp. (YOKOO et al., 1992; GUERRA & HANDRO, 1998) e *Bactris gasipaes* Kunth. (STEIN & STEPHENS, 1991).

Provavelmente, o principal efeito do carvão ativado no meio de cultura esteja relacionado com a sua capacidade de adsorver metabólitos

produzidos pelo explante *in vitro*, como compostos fenólicos, bem como diminuir os efeitos tóxicos da interação de altas concentrações de reguladores de crescimento, adicionados ao meio de cultura, com substâncias secretadas pelo explante (FRIDBORG et al., 1978; WEATHERHEAD et al., 1978; TISSERAT, 1982; STEIN & STEPHENS, 1991). O processo de adsorção de substâncias químicas parecer ser seletivo (WEATHERHEAD et al., 1978).

O efeito do carvão ativado sobre o crescimento, calogênese e morfogênese também tem sido alvo de estudos. A inclusão de carvão ativado aparentemente é necessária para iniciação de calos em *Phoenix dactylifera* L. e em outras palmeiras (REYNOLDS & MURASHIGE, 1979; TISSERAT, 1979; SHARMA et al., 1984). KARUNARATNE et al. (1985) relatam que a presença de carvão ativado a 0,25-0,1 % no meio de cultura foi absolutamente essencial para o crescimento de plântulas de *Cocos nucifera* L., a partir de tecidos embrionários. Na ausência de carvão ativado, os autores verificaram uma significativa redução no crescimento de embriões e completa paralisação do desenvolvimento do haustório e iniciação de raízes.

O exato mecanismo pelo qual o carvão ativado estimula o crescimento de embriões é ainda desconhecido. Entretanto, muitos autores têm sugerido que o seu efeito benéfico pode ser atribuído a sua capacidade de remoção de inibidores e de quantidades excessivas de reguladores de crescimento presentes no meio de cultura (FRIDBORG et al., 1978; WEATHERHEAD et al., 1978; KARUNARATNE et al., 1985).

2.8. Regeneração *in vitro* de *Euterpe* spp.

As respostas morfogenéticas favoráveis em tecidos e órgão de palmeiras cultivados *in vitro* são, em geral, difíceis e demoradas. As abordagens sobre micropropagação e estudos morfogenéticos têm sido

feitas, quase exclusivamente, em *Phoenix dactylifera* L., *Elaeis guineensis* Jacq. e *Cocos nucifera* L.

GUERRA & HANDRO (1988) publicaram os primeiros resultados de regeneração de plantas de *Euterpe edulis* Mart., utilizando embriões zigóticos em meio de cultura inicial com altas doses de 2,4-D (100 mg.L^{-1}) e, posteriormente, com apenas 5 a 8 mg.L^{-1} de 2iP.

A embriogênese somática e a regeneração de plantas em diversos explantes (embriões zigóticos, inflorescências e folhas jovens) de *Euterpe edulis* Mart, foram obtidos por GUERRA & HANDRO (1998). O processo embriogênico foi obtido diretamente, sem a formação de calos, em meio Y3, suplementado com vitaminas MW (MOREL & WETMORE, 1951) e a presença de 2,4-D em concentrações de 20 mg.L^{-1} para as folhas, 50 mg.L^{-1} para as inflorescências e de 100 mg.L^{-1} para os embriões zigóticos, em meios geleificados acrescidos de carvão ativado. As culturas com embriões no estágio globular ou pós-globular foram transferidas para meio suplementado com $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2iP e $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA e para a conversão dos embriões em plântulas, as culturas foram transferidas para meio sem reguladores de crescimento com metade da concentração de sacarose e sais. Os autores ressaltaram que a adição de carvão ativado ao meio para as culturas de embriões zigóticos e inflorescências foi essencial para o estabelecimento de culturas viáveis.

YOKOO et al. (1992) obtiveram a formação de plântulas completas de *Euterpe edulis* Mart., em estudos de germinação *in vitro*, em meio MS com 30 g.L^{-1} de sacarose, $1,9 \text{ g.L}^{-1}$ de KNO_3 e $1,65 \text{ g.L}^{-1}$ de NH_4NO_3 . Em estudos de indução de organogênese em embriões de *Euterpe oleracea* Mart., estes autores também observaram o intumescimento e a formação de estruturas esponjosas na superfície externa do haustório. A germinação dos embriões de *Euterpe oleracea* Mart. e o posterior desenvolvimento em plântulas normais, se deu principalmente em meio MS semi-sólido, com 30 g.L^{-1} de sacarose, carvão ativado $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ e vitaminas MW (MOREL & WETMORE, 1951), e em todas as dosagens de 2,4-D ($0-100 \text{ mg.L}^{-1}$), sendo observada a

formação de calos em meio MS adicionado com 100 mg.L^{-1} de 2,4-D, entretanto sem posterior regeneração de plântulas.

LEMOS et al. (1999) observaram uma maior taxa de conversão de embriões zigóticos de *Euterpe oleracea* Mart. em plântulas, em meio MS suplementado com BAP e ANA a $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ com adição de 0,1 % de carvão ativado e $0,17 \text{ g.L}^{-1}$ de NaH_2PO_4 , demonstrando-se a necessidade de um suprimento exógeno balanceado de auxina e citocinina.

2.9. Regeneração *in vitro* de *Theobroma* spp.

Os estudos de propagação *in vitro* para o gênero *Theobroma* têm-se limitado a espécie *Theobroma cacao* L., considerada, até há pouco tempo, como a única espécie do gênero cultivada comercialmente.

Os primeiros estudos de cultivo de tecidos *in vitro* com *Theobroma cacao* L. foram realizados por ARCHIBALD (1954), usando segmentos de ramo em meio de White (WHITE, 1939) desprovido de reguladores de crescimento, onde houve a formação de calos, entretanto sem a regeneração de plântulas. Resultados semelhantes foram obtidos por HALL & COLLIN (1974), cultivando segmentos de ramos ortotrópicos oriundos de plantas jovens em meio de White e MS, suplementado com KIN e carvão ativado.

ORCHARD et al. (1979), utilizando ápices caulinares de cacau em meio LS (LINSMAIER & SKOOG, 1965) suplementado com KIN, ZEA, AIB, AIA e AG_3 , observaram a expansão dos meristemas, seguida, em alguns casos, da alongação de folhas. PASSEY & JONES (1983), a partir de ápices caulinares e nós excisados de brotos jovens cultivados em meio MS suplementado com diversas combinações de citocininas (BAP, ZEA e 2iP) e auxinas (AIB e ANA), obtiveram a proliferação de alguns brotos com desenvolvimento reduzido.

Em estudos conduzidos por ESAN (1975) foi verificada a formação direta de embriões somáticos a partir de tecidos de embriões sexuais imaturos, em meio MS suplementado com ANA, caseína hidrolisada e água

de coco. PENCE et al. (1979) demonstraram a capacidade de proliferação de embriões assexuais a partir de embriões sexuais imaturos de cacau em meio MS com água de coco e $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA. A formação de calo em explantes foliares foi induzida em meio suplementado com várias combinações de auxinas e citocininas e 100 ml.L^{-1} de água de coco e em cotilédones e eixos embrionários em meio MS na ausência ou presença de água de coco e ANA. Entretanto, apenas verificou-se o crescimento organizado de raízes, a partir de calos de explante foliar e cotilédones imaturos, em meio com 20 mg.L^{-1} de auxina. No presente estudo, não foram observadas a embriogênese e a proliferação de brotos em segmentos e calos foliares, pericarpo e óvulos. KONONOWICZ & JANICK (1984) também obtiveram a formação direta e indireta de embriões somáticos, a partir de embriões sexuais, entretanto sem capacidade de desenvolver plântulas.

Resultados positivos surgiram a partir da década de 80, quando embriões somáticos, oriundos a partir do cultivo de explantes de pétalas e tecidos nucelares, regeneraram plântulas com sucesso (SONDAHL et al., 1993; DIAS, 1995). A técnica ganhou impulso com a conversão dos embriões somáticos nucelares de cacau em plântulas (FIGUEIRA & JANICK, 1993) e com o desenvolvimento de protocolo para obtenção de milhares de plântulas, a partir de uma simples gema axilar (FLYNN et al., 1990).

Conforme relatado por ELHAG et al. (1987) a embriogênese somática em cacau pode ocorrer por três vias: 1)- por meio do desenvolvimento direto de embriões somáticos a partir de células da epiderme hipocotiledonar de embriões zigóticos imaturos ou embriões somáticos; 2)- pela diferenciação direta de embriões somáticos a partir de tecidos meristemáticos internos cotiledonares; e 3)- indiretamente, pelo desenvolvimento de embriões somáticos a partir de calos embriogênicos induzidos em embriões zigóticos ou somáticos.

Os calos têm sido obtidos a partir de uma grande variedade de explantes como folhas, pericarpo, óvulos, embriões imaturos, cotilédones e eixo embrionário de embriões maduros, nos mais variados meios de cultura e sob diferentes condições fisiológicas de luz e temperatura (DIAS, 1995). A

embriogênese indireta ocorre em baixa frequência na ausência de reguladores de crescimento, entretanto pode ser incrementada com a adição de baixas concentrações de 2,4-D e AG_3 (KONONOWICZ & JANICK, 1984).

LI et al. (1998) obtiveram a regeneração de plântulas de cacau, via embriogênese somática, cultivando estaminóides de botões florais e embriões zigóticos. O rápido desenvolvimento de calos foi induzido em meio inicial DKW suplementado com 20 g.L^{-1} de glicose, 2 mg.L^{-1} de 2,4-D e $22,7 \text{ } \mu\text{M}$ de TDZ, seguida da transferência para meio DKW com 20 g.L^{-1} de glicose, 2 mg.L^{-1} de 2,4-D e $1,4 \text{ nM}$ de KIN. Embriões somáticos foram formados em calos embriogênicos após a transferência para meio DKW com sacarose e na ausência de reguladores de crescimento. Resultados semelhantes foram obtidos por MARBACH & TEIXEIRA (1999), utilizando estaminóides de botões florais com 0,5 cm de comprimento cultivados em meio inicial DKW, com $5 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ de TDZ, 2 mg.L^{-1} de 2,4-D e 2 % de glicose. A indução de calos embriogênicos foi obtida com a transferência dos explantes, aos 14 dias, para meio WPM (LLOYD & MCCOWN, 1980), com $0,3 \text{ mg.L}^{-1}$ de vitaminas B5 (GAMBORG et al., 1968), 2 mg.L^{-1} de 2,4-D, 5 % de água de coco e 2 % de glicose. O desenvolvimento de embriões somáticos foi obtido com subcultivos, a cada duas semanas, em meio DKW com 3 % de sacarose e 0,1 % de glicose.

WEN & KINSELLA (1991) alcançaram a regeneração direta de plântulas de cacau a partir da superfície hipocotiledonar de embriões zigóticos em meio MS suplementado com 6 mg.L^{-1} de ANA, 0,1 % de caseína hidrolisada e 3 % de sacarose. A indução de células embriogênicas e o rápido desenvolvimento de embriões somáticos em tecido nucelar e integumento interno de sementes imaturas de cacau cultivadas em meio MS suplementado com $4,5 \text{ } \mu\text{M}$ de 2,4-D e $0,44 \text{ } \mu\text{M}$ de BAP foram observadas por CHATELET et al. (1992). NDOUMOU et al. (1997) obtiveram a indução de calos em explantes cotiledonares *Theobroma cacao* L. em meio $\frac{1}{2}$ MS, com $6 \times 10^{-2} \text{ mg.L}^{-1}$ de sacarose, $10^{-6} \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D e $0,5 \times 10^6 \text{ mg.L}^{-1}$ de KIN, sendo que a embriogênese somática e rizogênese foram induzidas

após a transferência dos calos para meio $\frac{1}{2}$ MS com 3×10^{-2} mg.L⁻¹ de sacarose, tanto na ausência como na presença de ANA ou AIB.

Subcultivos de meristemas apicais, excisados de plântulas jovens de cacau, em meio MS líquido suplementado com 1 μ M de ZEA e várias concentrações de ANA e AG₃ foram benéficos para a alongação nodal e crescimento de brotos (ADU-AMPOMAH et al.,1992). As raízes foram induzidas em meio $\frac{1}{2}$ MS com 10 μ M de AIB e 0,1 μ M de AIA e com concentração de sacarose reduzida para 15 g.L⁻¹.

PENCE (1991) observou alta taxa de embriogênese somática em embriões zigóticos imaturos pré-cultivados em meio com 3 % de sacarose e criopreservados, em meio suplementado com 3 mg.L⁻¹ de ANA.

Segundo ELHAG et al. (1987), a embriogênese indireta em cacau é sensível à fonte e concentração de carbono, bem como ao material genético (clone). Os autores verificaram que, de modo geral, a formação de calo embriogênico, a partir de embriões somáticos, aumentou quando a sacarose foi substituída por glicose ou frutose no meio MS.

Conforme relatado por KONONOWICZ & JANICK (1984), a sacarose, a glicose ou a frutose suportam o crescimento de embriões assexuais, mas a glicose é claramente superior a sacarose. Entretanto, PENCE et al. (1981) e JANICK et al. (1982) observaram que o cultivo de embriões assexuais em meio líquido responde ao aumento da concentração de sacarose por sintetizar lipídeos com ácidos graxos e triglicerídeos de composição similar ao de embriões zigóticos durante o processo de maturação *in vivo*. ALEMANNIO et al. (1997) também ressaltaram que a presença de sacarose e de ABA no meio de maturação de embriões zigóticos e somáticos são fundamentais para o aumento da síntese de reservas, resultando em altas taxas de germinação, conversão e aclimatação de plântulas.

Outro fator a ser considerado é a presença de água de coco no meio de cultura. A água de coco, além de estimular o crescimento de calos, na presença de auxinas aumenta a embriogênese direta a partir de embriões zigóticos imaturos de cacau, devido, em parte, ao alto conteúdo de glicose e frutose. Em trabalhos conduzidos por ELHAG et al. (1987) não foram

verificados efeitos claros da água de coco na embriogênese ou no desenvolvimento de embriões a partir de calos.

Alguns autores ressaltam que as respostas morfogenéticas nas diferentes vias de micropropagação *in vitro* de cacau variam em função do genótipo da planta doadora de explantes e entre explantes da mesma planta (ELHAG, et al., 1987; WEN & KINSELLA, 1991; LOPEZBAEZ, et al., 1993; ALEMANNI et al., 1997). Em contra partida, NDOUMOU et al. (1997) verificaram que as alterações responsáveis pela diferenciação celular em explantes cotiledonares de cacau foram semelhantes para dois genótipos testados.

Poucos trabalhos têm sido relatados com *Theobroma grandiflorum*, entretanto, devida à proximidade botânica com o cacau, espera-se que protocolos possam ser adaptados para o cupuaçu.

Em estudos conduzidos por JANICK & WHIPKEY (1988), a embriogênese somática, a partir de calos embriogênicos, foi induzida em embriões imaturos de *Theobroma grandiflorum* em meio MS semi-sólido suplementado com 1 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 10 % de água de coco. As culturas embriogênicas apresentaram maior proliferação em meio sem 2,4-D e glicose, entretanto não foi observada a regeneração de plântulas.

RODRIGUES (2000), testando a capacidade de calogênese em ápice caulinar e disco foliar de cupuaçu em meio MS suplementado com 1 mg.L⁻¹ de 2,4-D ou 1 mg.L⁻¹ de Dicamba, verificou a formação de calos em apenas 10 e 20 % de explantes, respectivamente. A adição de 3 a 7 mg.L⁻¹ de 2,4-D em explantes cotiledonares e de 7 mg.L⁻¹ de 2,4-D em explantes foliares promoveu a melhor formação de calos.

CAPÍTULO 1 - RESPOSTAS MORFOGENÉTICAS *IN VITRO* DE AÇAIZEIRO (*Euterpe oleracea* Mart.)

RESUMO

Com o objetivo de estudar as respostas morfogênicas de diferentes explantes de açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) submetidos a várias condições de cultura *in vitro*, diversos experimentos foram conduzidos, em laboratório, utilizando-se material vegetal oriundo de plantas da coleção de açaizeiro da Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA e de plântulas assépticas obtidas a partir da conversão *in vitro* de embriões zigóticos maduros. O primeiro experimento constou da avaliação do efeito da adição de ANA e BAP no meio de cultura sobre a conversão de embriões zigóticos maduros em plântulas. Para a avaliação da oxidação de segmentos de ráquias de açaizeiro em dois estádios de desenvolvimento, foram testados os meios MS sólido e líquido suplementado com diferentes antioxidantes. Quanto ao estudo da capacidade morfogênica de explantes, embriões zigóticos maduros e imaturos, segmentos de ráquias em dois estádios de desenvolvimento, ápices caulinares, secções de folhas jovens clorofiladas e ápices radiculares foram cultivados em meio MS suplementado com diferentes tipos e concentrações de reguladores de crescimento. Os resultados obtidos permitiram verificar que a adição de ANA e BAP no meio de cultura foi necessária para a conversão de embriões zigóticos maduros em plântulas vigorosas e normais. Os segmentos de ráquias obtidos de inflorescências jovens apresentaram menor intensidade de oxidação em meio MS sólido suplementado com todos os antioxidantes testados e os segmentos de ráquias maduras em meio MS sólido com 0,3 % de carvão ativado, tanto na presença quanto na ausência de ácido ascórbico. Foi possível obter a expressão de um modelo de embriogênese somática direta,

repetitiva e não sincronizada em embriões zigóticos maduros cultivados em meio primário MS suplementado com 339,36 μM de 2,4-D e em meio secundário MS na presença de 0,537 μM de ANA e 12,30 μM de 2iP. A conversão de embriões em plântulas foi alcançada com a transferência das culturas para meio $\frac{1}{2}$ MS, sem reguladores de crescimento. Os embriões zigóticos imaturos e ápices caulinares apresentaram baixo potencial embriogênético e secções de folhas jovens clorofiladas e ápices radiculares não apresentaram capacidade de resposta morfogênética *in vitro*.

ABSTRACT

With the objective of studying the morphogenetic responses of different assai palm explants (*Euterpe oleracea* Mart.) under diverse conditions of *in vitro* culture, several experiments were conducted, in laboratory. The material used was collected from of assai palm plants at Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA and the aseptic seedlings were obtained from the *in vitro* conversion of mature assai palm zygotic embryos. The first experiment consisted in evaluating effect of the addition of ANA and BAP in the MS gelled medium over the conversion of mature zygotic embryos in to seedlings. To evaluate the oxidation of rachyl segments in two development stages, were tested in a MS medium added with different antioxidants. For the study of the morphogenetic capacity explants, mature and immature zygotic embryos, inflorescence at different development stages, stem apexes, chlorophyllous young leaves and root apexes were cultivated in a MS gelled medium supplemented with different types and concentrations of growth regulators. The obtained results allowed verifying that an addition of NAA and BAP in the culture medium was necessary to the conversion of mature zygotic embryos in both vigorous and normal seedlings. The young rachyl segments presented smaller oxidation intensity in a MS gelled medium supplemented with all the tested antioxidants and the mature rachyl segments in a MS gelled medium with 0,3% of activated charcoal, as well as in the presence or in the absence of ascorbic acid. It was possible to verify the expression of a direct, repetitive and asynchronized model of somatic embryogenesis in mature zygotic embryos cultivated in primary MS medium supplemented with 2,4-D (339,36 μM) and transferred to a secondary MS medium in the presence of NAA (0,537 μM) and 2iP (12,30 μM). The conversion of embryos in plantlets was reached transferring the cultures to a $\frac{1}{2}$ MS medium, without growth regulators. Immature zygotic embryos and stem apexes showed low embryogenic potential, and both

chlorophyllous young leaves and root apices did not present capacity of *in vitro* morphogenetic responses.

1. INTRODUÇÃO

Inúmeras justificativas têm sido reportadas para a utilização de técnicas de cultura de tecidos *in vitro* para palmeiras.

A cultura de tecidos tem despertado interesse por facilitar a produção de mudas elites em escala comercial, produzir plantas livres de patógenos e acelerar programas de melhoramento (FERREIRA et al., 1998). Considerando que os programas de melhoramento de palmeiras são demorados e complexos em virtude do longo ciclo, hábito de crescimento e ausência de métodos convencionais de propagação vegetativa, essa técnica torna-se imprescindível para a obtenção de resultados em menor espaço de tempo.

A propagação *in vitro* constitui-se numa importante ferramenta para plantas com dificuldade de serem multiplicadas vegetativamente, como é o caso das palmeiras e, mais especificamente do açazeiro, cujo pegamento de perfilhos é menor que 1 % (ROBLES, 1983).

A obtenção de eventos morfogênicos em tecidos de palmeiras cultivados *in vitro* deve levar em consideração que apenas a inflorescência e o ápice caulinar contém tecidos que apresentam características meristemáticas (BLAKE, 1983). Dessa forma, a seleção de explantes a serem utilizados em protocolos de propagação *in vitro* de açazeiro torna-se imprescindível para aprofundar os conhecimentos sobre os dois aspectos mais críticos da morfogênese *in vitro* de palmeiras: a iniciação de calos e indução de embriogênese somática.

Os objetivos do presente trabalho foram estabelecer protocolos básicos para a instalação de culturas viáveis de açazeiro e estudar as respostas morfogênicas de diferentes explantes de açazeiro submetidos a várias condições de cultura *in vitro*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados explantes de açaizeiro excisados de plântulas assépticas obtidas a partir da conversão de embriões zigóticos mauros *in vitro* (folhas jovens, ápices caulinares e radiculares) e de plantas adultas oriundas da coleção de açaizeiro da Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA (embriões zigóticos e segmentos de ráquillas). Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Recursos Genéticos e Biotecnologia da Embrapa Amazônia Oriental.

2.1. Cultura de embriões zigóticos de açaizeiro

Frutos maduros, com peso médio de 2,35 gramas, foram lavados em água corrente e submetidos ao despulpamento em água a 40°C. As sementes foram desinfestadas em câmara de fluxo laminar, com a imersão em álcool etílico a 70 % por dois minutos e, em seguida, em solução de NaClO a 2 % por 20 minutos sob agitação e lavadas quatro vezes em água destilada e autoclavada.

Os embriões zigóticos, excisados de sementes assépticas sob câmara de fluxo laminar, foram inicialmente inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura MS, modificado pela ausência de vitaminas e aminoácidos, suplementado com 0,6 % de ágar e 0,25 % de carvão ativado. O meio de cultura teve o pH ajustado para 5,8 e, em seguida, submetido à esterilização em autoclave a 120°C durante 15 minutos.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 26°C ± 2, umidade relativa do ar média em torno de 70 % e fotoperíodo de 16 horas de luz branca fria (52 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de irradiância)/oito horas de escuro.

Aos três dias da inoculação, foi realizada a avaliação quanto às percentagens de contaminação por microorganismos e de oxidação. Em seguida, os embriões foram transferidos para tubos de ensaio com 10 mL de meio MS modificado pela presença de $0,17 \text{ g.L}^{-1}$ de NaH_2PO_4 , com 0,6 % de ágar, 0,25 % de carvão ativado e 3 % de sacarose, suplementado com diferentes combinações de ANA e BAP, ajustando-se o pH a 5,8 antes da autoclavagem.

Foram testadas três concentrações de ANA (0,54; 2,68 e $5,37 \mu\text{M}$) combinadas com quatro de BAP (0,44; 1,11; 1,55 e $2,22 \mu\text{M}$) e uma testemunha adicional (sem regulador de crescimento), totalizando 13 tratamentos.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições. Cada unidade experimental foi constituída de 10 tubos de ensaio, contendo um explante cada.

Aos 10 dias da inoculação avaliou-se a percentagem de conversão de embriões zigóticos em plântulas e, aos 48 dias a percentagem de plântulas anormais, comprimento da parte aérea (mm) e número de raízes/plântula. As plântulas anormais foram consideradas aquelas que apresentavam ausência ou crescimento atrofiado da parte aérea, do sistema radicular e do haustório.

2.2. Oxidação de segmentos de ráquias de açazeiro

Esse experimento teve como objetivo avaliar a eficiência da adição de antioxidantes no meio de cultura e o isolamento inicial em meio líquido ou sólido para explantes de inflorescência.

Espatas, em dois estádios de desenvolvimento (10 e 25 cm de comprimento), com brácteas externa e interna fechadas, foram coletadas de plantas adultas da coleção de açazeiro da Embrapa Amazônia Oriental. Estas foram lavadas em água corrente e submetidas ao processo de desinfestação em câmara de fluxo laminar, com a imersão em álcool etílico a 70 % por dois minutos e, em seguida, em solução de NaClO a 2 % por 20

minutos sob agitação e lavadas, cinco vezes, em água destilada e autoclavada.

Após a desinfestação as espatas foram abertas, sob câmara asséptica, com a remoção das duas brácteas envoltórias, expondo-se as inflorescências. A partir da porção apical das ráquulas, foram cortados transversalmente segmentos de, aproximadamente, 5 a 10 mm de comprimento.

Os segmentos foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura básico MS com 3 % de sacarose. Os tratamentos consistiram de: meio sólido + 0,3 % de carvão ativado (CA); meio sólido + 0,3 % de CA + 0,025 % de ácido ascórbico (AA); meio sólido + 0,025 % de AA; meio sólido + 0,1 % de PVP; meio líquido + 0,3 % de CA; meio líquido + 0,025 % de AA e meio líquido + 0,1 % de PVP; combinados com dois estádios de desenvolvimento da espata (madura e jovem), totalizando 14 tratamentos.

Para os tratamentos correspondentes ao meio sólido foi adicionado 0,6 % de ágar e nos tratamentos com meio líquido utilizaram-se pontes de papel filtro. As culturas foram mantidas em sala de crescimento sob as mesmas condições do experimento anterior, mas sob ausência total de luz.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições, sendo cada unidade experimental constituída de cinco tubos de ensaio, contendo um explante cada.

Aos 15 dias da inoculação avaliaram-se a intensidade de oxidação (Ox) e o número de explantes contaminados por microorganismos. Para a quantificação da intensidade de oxidação, foi observado o percentual de oxidação da superfície dos segmentos de ráquulas, por meio de uma escala de notas: 1- nível baixo de oxidação (abaixo de 30 %); 2- nível médio de oxidação (entre 30 e 70 %); 3- nível alto de oxidação (acima de 70 %).

2.3. Capacidade morfogênica de explantes de açazeiro

2.3.1. Embriões zigóticos

Frutos maduros e imaturos de açazeiro, com peso médio de 2,17 e 1,68 gramas, respectivamente, foram despoldados e submetidos ao processo de desinfestação descrito anteriormente.

Os embriões zigóticos, maduros e imaturos, excisados de sementes assépticas sob câmara de fluxo laminar, foram inoculados em frascos de vidro, com capacidade de 200 mL, contendo 40 mL de meio de cultura básico MS com 0,6 % de ágar, 0,25 % de carvão ativado, 3 % de sacarose, 500 mg.L⁻¹ de caseína hidrolisada e suplementado com seis concentrações de 2,4-D (113,12; 226,24; 339,36; 454,48; 565,61 e 678,73 µM).

No período inicial de 30 dias, as culturas foram mantidas em sala de crescimento nas mesmas condições do experimento anterior, sob fotoperíodo de 16 horas de luz branca fria indireta (6 µmol.m⁻².s⁻¹ de irradiância)/oito horas no escuro e, em seguida, sob fotoperíodo de 16 horas de luz branca fria (52 µmol.m⁻².s⁻¹ de irradiância/oito horas de escuro.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, com seis tratamentos e quatro repetições, sendo cada unidade experimental constituída de quatro frascos, contendo três explantes cada.

Aos 80 dias da inoculação, avaliaram-se o número de explantes com respostas morfogênicas e as percentagens de explantes com calo, estruturas pró-embriogênicas e embriões somáticos globulares.

2.3.2. Segmentos de ráquias

Espatas, em dois estádios de desenvolvimento (10 e 25 cm de comprimento), com brácteas externa e interna fechadas, foram coletadas de plantas adultas. Estas foram lavadas em água corrente e, posteriormente,

submetidas ao processo de desinfestação em câmara de fluxo laminar, com a imersão em álcool etílico a 70 % por um minuto e, em seguida, em solução de NaClO a 2 % por 15 minutos sob agitação e lavadas, cinco vezes, em água destilada e autoclavada.

Após a desinfestação, as espatas foram abertas, sob câmara asséptica, com a remoção das duas brácteas envoltórias, expondo-se assim as inflorescências. A partir da porção apical e mediana das ráquulas, com 10 a 60 mm de comprimento, foram cortados transversalmente segmentos de, aproximadamente, 5 a 10 mm de comprimento. Os segmentos de ráquulas foram inoculados em erlenmeyers com capacidade de 100 mL, contendo 40 mL de meio de cultura básico MS com 0,6 % de ágar, 0,25 % de carvão ativado e 3 % de sacarose, suplementado com 14,76 μM de 2iP combinado com quatro concentrações de 2,4-D (113,12; 226,24; 339,36; 454,48 μM).

No período inicial de 30 dias, as culturas permaneceram em sala de crescimento, nas mesmas condições do experimento anterior, sob condições de ausência total de luz, sendo, posteriormente, transferidas para condições de fotoperíodo de 16 horas de luz branca fria /oito horas de escuro.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 4 (dois estádios de desenvolvimento da inflorescência combinados com quatro concentrações de 2,4-D) e quatro repetições, sendo cada unidade experimental constituída de quatro frascos, contendo três explantes cada.

Aos 180 dias da inoculação, avaliaram-se o número de explantes com respostas morfogénéticas e as percentagens de explantes com calo, estruturas pró-embriogénéticas e embriões somáticos globulares.

2.3.3. Ápices caulinares

Os ápices caulinares foram obtidos a partir de plântulas assépticas cultivadas *in vitro*, com a remoção de folhas jovens e raízes. Este explante, com aproximadamente 1 cm de comprimento, apresentava-se constituído

pelo meristema apical e primórdios foliares envolvidos por duas a três bainhas, e por tecidos subapicais.

Na primeira fase experimental, os ápices caulinares foram inoculados em tubos de ensaio, sob pontes de papel filtro, contendo 10 mL de meio de cultura básico MS com 0,3 % de carvão ativado, 3 % de sacarose e 500 mg.L⁻¹ de caseína hidrolisada, suplementado com quatro concentrações de ANA (2,68; 5,37; 8,06 e 10,74 µM) combinadas com quatro de BAP (2,22; 4,44; 6,66 e 8,88 µM), totalizando 16 tratamentos. As culturas permaneceram em sala de crescimento nas mesmas condições do experimento anterior. Na segunda fase experimental, os ápices caulinares foram submetidos previamente a uma pequena excisão na região do meristema apical e cultivados nas mesmas condições descritas anteriormente.

O delineamento estatístico foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4 x 4 (quatro concentrações de ANA combinadas com quatro de BAP), com quatro repetições, sendo cada unidade experimental constituída de quatro tubos de ensaio, contendo um explante cada.

Aos 30 dias da inoculação, avaliaram-se o número de explantes com respostas morfogénéticas e as percentagens de explantes com proliferação de gemas e iniciação de calo.

2.3.4. Folhas jovens

Secções de limbo foliar com 1cm de comprimento e 0,5 cm de largura, foram excisadas de folhas jovens clorofiladas de plântulas assépticas cultivadas *in vitro*.

As secções foliares foram inoculadas em frascos de vidro com capacidade de 200 mL, contendo 40 mL de meio de cultura básico MS com 0,6 % de ágar, 0,25 % de carvão ativado, 3 % de sacarose e 500 mg.L⁻¹ de caseína hidrolisada, suplementado com 2,4-D e ANA. Foram testadas seis concentrações de 2,4-D (67,87; 107,41; 113,12; 135,74; 180,99 e

226,24 μM) e quatro de ANA (53,70; 80,56; 107,41 e 134,26 μM), perfazendo um total de 10 tratamentos.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento, nas mesmas condições do experimento anterior, sob fotoperíodo de 16 horas de luz branca fria indireta/ oito horas de escuro.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, com dez tratamentos e quatro repetições, sendo cada unidade experimental constituída de cinco frascos, contendo três explantes cada.

Aos 120 dias da inoculação, avaliaram-se o número de explantes com respostas morfogénicas e as percentagens de explantes com calo, estruturas pró-embriogénicas e embriões somáticos globulares.

2.3.5. Ápices radiculares

Segmentos de ápices radiculares com 1 cm de comprimento, obtidos de plântulas assépticas, foram inoculados em frascos de vidro, com capacidade de 200 mL, contendo 40 mL de meio de cultura básico MS com 0,6 % de ágar, 0,3 % de carvão ativado, 3 % de sacarose e 500 mg.L^{-1} de caseína hidrolisada, suplementado com cinco concentrações de 2,4-D (4,52; 13,57; 22,62; 31,67 e 40,72 μM). As culturas foram mantidas em sala de crescimento nas mesmas condições do experimento anterior.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e quatro repetições, sendo cada unidade experimental constituída de cinco frascos, contendo três explantes cada.

Aos 120 dias da inoculação, avaliaram-se o número de explantes com respostas morfogénicas e as percentagens de explantes com calo, estruturas pró-embriogénicas e embriões somáticos globulares.

2.4. Manutenção e multiplicação de culturas embriogénicas

As culturas embriogénicas, iniciadas a partir de embriões zigóticos maduros no meio primário ou indutor (item 2.3.1.), foram transferidas, aos 85 dias de cultura, para meio secundário com o objetivo de induzir a multiplicação de células pró-embriogénicas e de embriões somáticos em estágios globulares iniciais.

As culturas pró-embriogénicas foram inoculadas em frascos de vidro, com capacidade de 200 mL, contendo 40 mL de meio de cultura básico MS com 0,6 % de ágar, 2 % de sacarose na presença de 0,537 μ M de ANA e de 12,30 μ M de 2iP. Sendo mantidas em sala de crescimento, sob fotoperíodo de 16 horas de luz branca fria indireta/ oito horas de escuro.

Aos 60 dias da transferência, avaliaram-se a frequência embriogénica obtida pela percentagem de culturas embriogénicas em relação ao total de explantes do meio primário (A), o número de embriões somáticos por explante (B) e a eficiência embriogénica $(A \times B)/100$ (LAZZERI et al., citados por GUERRA, 1989). As avaliações qualitativas consistiram da caracterização dos estágios embriogénicos e do comportamento das culturas.

2.5. Desenvolvimento, maturação e conversão de embriões somáticos

Com o objetivo de estimular a progressão das fases iniciais para fases tardias e obter embriões somáticos maduros e, posterior conversão em plântulas, as culturas embriogénicas (item 2.4) foram transferidas para meio terciário aos 150 dias de cultura.

As culturas foram inoculadas em frascos de vidros com capacidade de 200 mL, contendo 40 mL de meio de cultura $\frac{1}{2}$ MS, com 0,6 % de ágar e 1 % de sacarose, na ausência de reguladores de crescimento, sendo mantidas nas mesmas condições da fase anterior.

Aos 60 dias da transferência avaliaram-se a frequência embriogênica obtida pela percentagem de culturas embriogênicas em relação ao total de explantes do meio secundário, o número de embriões somáticos na fase bipolar e o número de plântulas regeneradas por cultura. As avaliações qualitativas consistiram da caracterização dos estágios embriogênicos e do comportamento das culturas.

2.6. Análises estatísticas

As variáveis foram submetidas à análise de variância pelo teste F e as médias comparadas pelo agrupamento de Scott & Knott (SCOTT & KNOTT, 1974) em nível de 1 % e 5% de probabilidade.

A variável de intensidade de oxidação de segmentos de ráquias foi submetida à análise não paramétrica pelo teste de Kruskal-Wallis (SIEGEL & CASTELLAN JR., 1988), em nível de 1 % de significância.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Cultura de embriões zigóticos de açaizeiro

Na primeira semana de cultura, observaram-se o intumescimento dos embriões zigóticos e o início da expansão da lâmina cotiledonar na região basal, estrutura correspondente ao haustório que apresenta atividade digestiva (Figura 1A). Os tecidos do nó cotiledonar apresentavam-se intumescidos e avermelhados. Aos 14 dias, ocorreu a emissão da radícula e do coleóptilo cotiledonar a partir da região apical periférica (Figura 1B). Na terceira semana, verificou-se a formação do pecíolo a partir do coleóptilo, o início da expansão do limbo foliar e a emissão de raízes secundárias (Figura 1C). Nas plântulas normais observou-se o rápido crescimento do haustório, que aos 60 dias apresentava-se com coloração branca e consistência esponjosa e nas plântulas anormais apresentava-se atrofiado (Figura 1D).

A análise de variância detectou efeitos significativos da interação “ANA x BAP” para o comprimento da parte aérea ($P \leq 0,05$) e do ANA para a percentagem de plântulas normais ($P \leq 0,01$) (Tabela 1).

O contraste “Fatorial vs Testemunha” foi significativo, os valores da estimativa do contraste para todas as variáveis avaliadas foram positivos (Tabela 1), ou seja, em média, todos os tratamentos constituídos da combinação de ANA e BAP foram superiores à testemunha.

Observa-se na Tabela 2, que as maiores percentagens de conversão de embriões zigóticos e formação de plântulas normais foram verificadas, em média, em todos os tratamentos constituídos da presença de ANA e BAP quando comparado com a testemunha. Estes resultados concordam com os obtidos por LEMOS et al. (1999), que observaram apenas 25 % de conversão de embriões de *Euterpe oleracea*, com a formação de apenas 12,5 % de plântulas normais na ausência de ANA e BAP. LLANO-AGUDELO et al. (1995) obtiveram 85,7 % e 83,3% de conversão de embriões zigóticos

maduros de *Persea americana* Mill cv. Americana em meio MS suplementado com 0,3 mg.L⁻¹ de AIB e 1,0 mg.L⁻¹ de KIN e 0,1 mg.L⁻¹ de AIB e 0,3 mg.L⁻¹ de KIN, respectivamente. Entretanto, YOKOO et al. (1992) observaram a formação de plântulas completas, a partir de embriões zigóticos de *Euterpe oleracea* Mart. e do híbrido *Euterpe oleracea* x *Euterpe edulis*, em meio MS modificado na ausência de reguladores de crescimento.

TABELA 1 - Resumo da análise de variância para médias da percentagem de conversão de embriões zigóticos (%CEZ), da percentagem de plântulas normais (%PN), do comprimento da parte aérea (CPA) e do número de raízes por plântula (NR) de *Euterpe oleracea* Mart., em meio MS suplementado com diferentes concentrações de ANA e de BAP. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2000.

Fontes de Variação	G.L.	Quadrados Médios			
		%CEZ	%PN	CPA(mm)	NR
ANA	2	118,75ns	3249,87**	48,47ns	0,1600
BAP	3	190,97ns	395,32ns	48,78ns	0,1929
ANA x BAP	6	257,64ns	362,22ns	106,15*	0,0896
Fatorial vs Testemunha	1	5020,67*	2734,64*	243,75*	2,1140*
Resíduo	39	150,64	272,24	27,18	0,2069
Estimativa do contraste		442,50	326,57	97,50	9,08
CV (%)		13,78	23,38	17,87	18,26

* - significativo em nível de 5 % pelo teste F; ** - significativo em nível de 1 % pelo teste F; ns - não significativo.

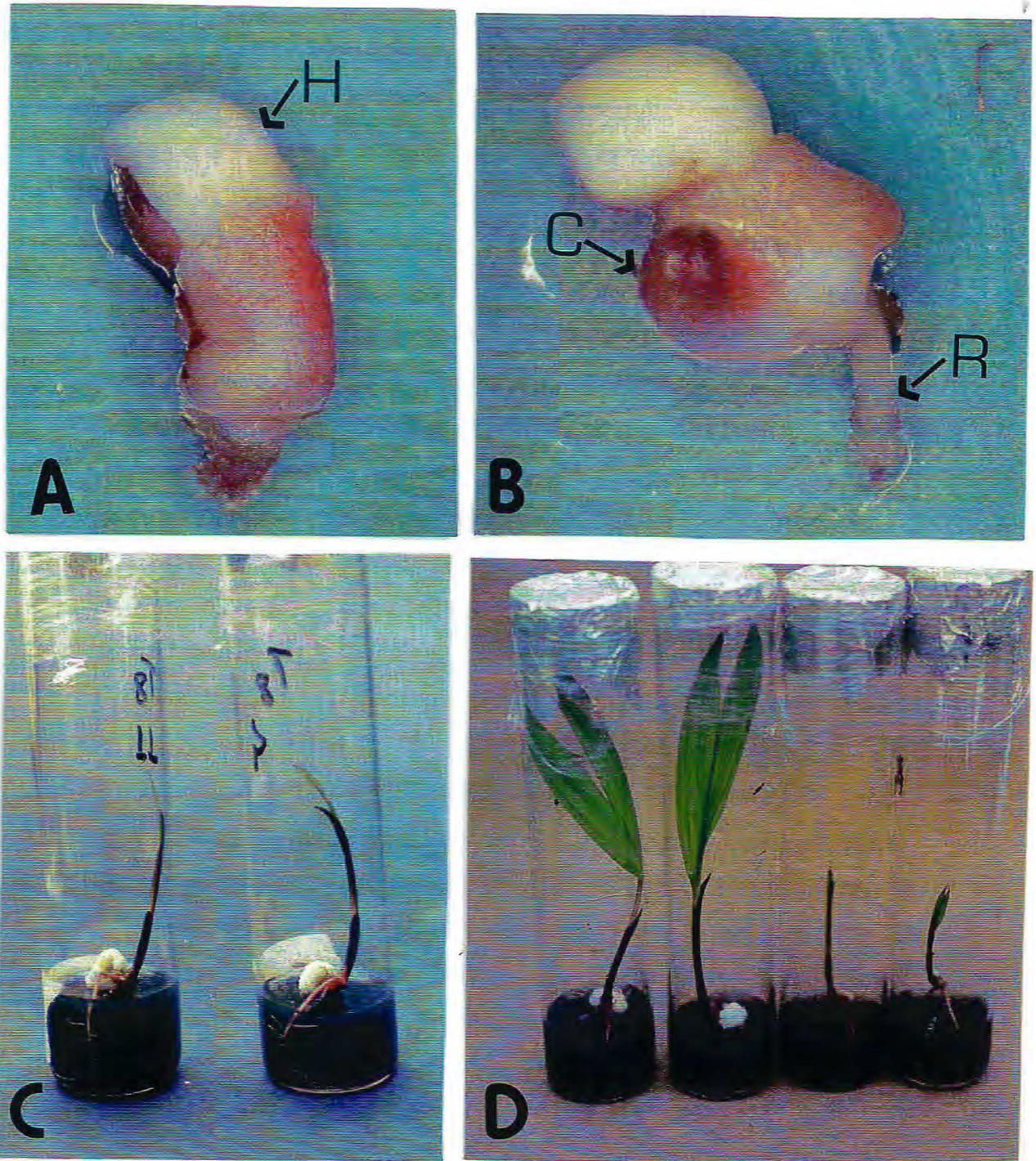


FIGURA 1 - Conversão *in vitro* de embriões zigóticos de *Euterpe oleracea* Mart. A- início da expansão da lâmina cotiledonar (haustório-H) (15X); B- emissão da radícula (R) e do coleóptilo cotiledonar (C) (15X); C- início da expansão do limbo foliar e de raízes secundárias; D- plântulas normais e anormais aos 60 dias de cultura. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2000.

Conforme HU & FERREIRA (1998), embriões excisados no estágio maduro ou próximo a este são quase autotróficos e, em geral, dependendo da espécie, não há necessidade de suplementação de fonte de energia e os reguladores de crescimento tornam-se dispensáveis. Entretanto, no presente trabalho ficou evidenciada a necessidade de enriquecimento do meio com reguladores de crescimento considerando que, na ausência destes, obteve-se apenas 55 % de conversão de embriões e a formação de 45,42 % de plântulas anormais (Tabela 2). Outro fator que pode ser considerado na cultura de embriões, além da espécie e do estágio de desenvolvimento dos explantes, é a concentração endógena de fitormônios nos explantes.

As concentrações de 0,54 e 2,68 μM de ANA promoveram, em média, maior formação de plântulas normais quando comparadas com 5,37 μM de ANA (Tabela 2). Elevadas concentrações de auxinas induzem, predominantemente, a formação de raízes em detrimento da formação da parte aérea (SKOOG & MILLER, 1957), podendo este fato ter contribuído para a maior conversão de embriões em plântulas anormais em elevada concentração de ANA.

O maior crescimento da parte aérea foi induzido pela presença de 2,68 μM de ANA combinado com 1,11; 1,55 e 2,22 μM de BAP. Em concentração elevada de ANA (5,37 μM) foi observado o menor desenvolvimento da parte aérea das plântulas em todas as combinações de BAP. Não foram verificadas diferenças significativas entre as concentrações de ANA e BAP para o número de raízes por plântula, entretanto estes tratamentos apresentaram desempenho superior quando comparados à testemunha, que apresentou, em média, apenas 1,79 de raízes por plântula (Tabela 2).

Os resultados discutidos anteriormente demonstram a necessidade de suprimento de reguladores de crescimento no meio de cultura para a conversão *in vitro* de embriões zigóticos maduros de *Euterpe oleracea* Mart. em plântulas normais e vigorosas.

TABELA 2 - Médias da percentagem de conversão de embriões zigóticos (%CEZ) aos 10 dias de cultura, da percentagem de plântulas normais (%PN), do comprimento da parte aérea (CPA) e do número de raízes por plântula (NR) de *Euterpe oleracea* Mart. aos 48 dias de cultura, em meio MS suplementado com diferentes concentrações de ANA e BAP. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2000.

ANA (μM)	BAP (μM)				Médias
	0,44	1,11	1,55	2,22	
% CEZ					
0,54	100,0	90,0	100,0	90,0	
2,68	95,0	77,5	90,0	100,0	
5,37	95,0	95,0	80,0	90,0	
Testemunha	55,0				
% PN					
0,54	85,0	72,5	85,0	66,2	77,18a
2,68	95,0	77,5	71,2	92,5	84,06a
5,37	57,5	47,5	55,4	66,2	46,67b
Testemunha	45,4				
CPA (mm)					
0,54	28,22aB	29,50bB	31,37aA	30,45bA	
2,68	25,95aB	33,32aA	36,95aA	38,00aA	
5,37	23,97aA	28,55bA	25,02bA	26,57bA	
Testemunha	21,67				
NR					
0,54	2,60	2,25	2,50	2,79	
2,68	2,28	2,56	2,45	2,52	
5,37	2,65	2,45	2,67	2,85	
Testemunha	1,79				

Médias seguidas por letras minúsculas, na coluna, e por letras maiúsculas, na linha, não diferem, estatisticamente entre si, em nível de 5 % pelo agrupamento de Scott & Knott.

3.2. Oxidação de segmentos de ráquilas de açazeiro

O valor de $H= 65,6135$, pelo teste de Kruskal Wallis, foi altamente significativo ($p= 0,00001$), ou seja, foram detectadas diferenças significativas entre os tratamentos.

Os segmentos de ráquilas obtidos de inflorescências jovens e cultivados em meio MS sólido suplementado com os antioxidantes testados apresentaram menor intensidade de oxidação, mantendo-se viáveis por períodos de até três meses, sem a necessidade de repicagens (Tabela 3 e Figura 2A). Entretanto, os segmentos de ráquilas de inflorescências maduras somente alcançaram menor intensidade de oxidação quando inoculados em meio MS sólido suplementado com 0,3 % de carvão ativado, tanto na presença quanto na ausência de ácido ascórbico (Tabela 3 e Figura 2B).

GUERRA (1989) também observou maior oxidação em explantes de *Euterpe edulis* Mart. obtidos de inflorescências em estádios mais próximos ao da abertura das flores. Possivelmente, o estágio fisiológico e de desenvolvimento do explante devem estar relacionados com a maior ou menor liberação de compostos fenólicos pelo explante no meio de cultura.

A adição de carvão ativado ao meio de cultura também reduziu a oxidação de explantes de *Cocos nucifera* L., *Elaeis guineensis* Jacq., *Phoenix dactylifera* L., *Bactris gasipaes* Kunth. e *Euterpe edulis* Mart. (BLAKE, 1983; NWANKWO & KRIKORIAN, 1983; TISSERAT, 1984a,1984b; STEIN & STEPHENS, 1991; YOKOO et al., 1992; GUERRA & HANDRO, 1998). Neste caso, o principal efeito do carvão ativado no meio de cultura esta relacionado com a sua capacidade de adsorver metabólitos produzidos pelo explante *in vitro*, como compostos fenólicos, bem como diminuir os efeitos tóxicos da interação de altas concentrações de reguladores de crescimento, adicionados ao meio de cultura, com substâncias secretadas pelo explante (FRIDBORG et al., 1978; TISSERAT, 1982; STEIN & STEPHENS, 1991).

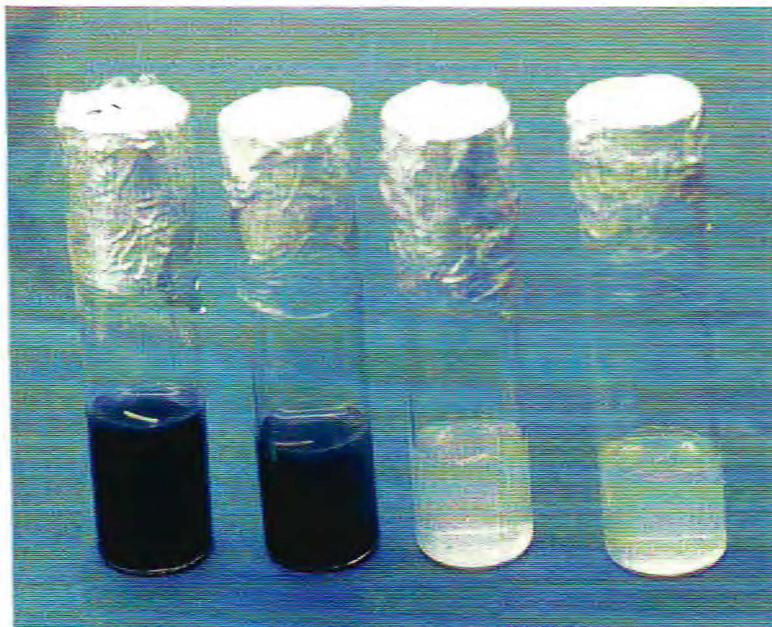
TABELA 3- Médias da intensidade de oxidação de segmentos de ráquilas (SR) de *Euterpe oleracea* Mart., cultivados em meio MS em função do estágio de desenvolvimento da espata e de diferentes antioxidantes, aos 15 dias de cultura. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2000.

Meios de Cultura + Antioxidantes	Intensidade de Oxidação	
	SR Jovem	SR Madura
sólido + 0,3 % CA	1,0bA	1,0bA
sólido + 0,3 % de CA + 0,025 % AA	1,0bA	1,0bA
sólido + 0,025 % AA	1,0bB	2,4aA
sólido + 0,1 % PVP	1,0bB	2,6aA
líquido + 0,3 % CA	3,0aA	3,0aA
líquido + 0,025 % AA	3,0aA	3,0aA
líquido + 0,1 % PVP	2,0aB	2,9aA

Médias seguidas por letras minúsculas, na coluna, e por letras maiúsculas, na linha, não diferem, estatisticamente entre si, em nível de 1 % pelo teste de Kruskal-Wallis.

Todos os antioxidantes testados quando associados ao meio MS líquido não foram eficientes no controle da oxidação em ráquilas jovens e maduras (Tabela 3). Estes resultados discordam de BLAKE (1983), que relata que meio líquido poderia liberar e diluir substâncias inibitórias ao desenvolvimento de explantes no meio de cultura e de REYNOLDS (1982), que associa a oxidação à presença de agentes geleificantes como o ágar no meio de cultura. Alguns trabalhos com outras palmeiras demonstram a eficiência do meio líquido. Explantes de inflorescências jovens de *Cocos nucifera* L., cultivados em meio líquido com 0,1 % de PVP apresentaram menor percentagem de oxidação (SIQUEIRA & INOUE, 1991).

A)



B)

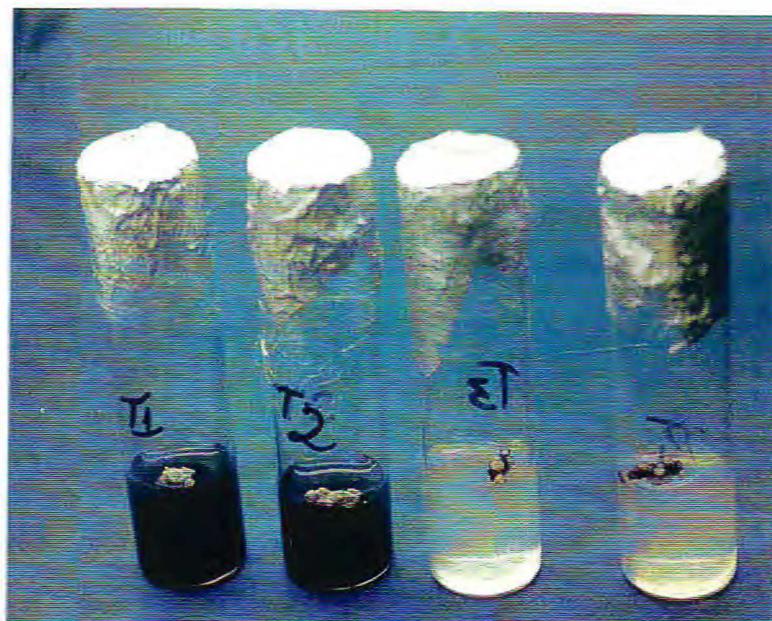


FIGURA 2 - Oxidação de segmentos de ráquias de *Euterpe oleracea* Mart. em meio MS sólido suplementado com diferentes antioxidantes aos 15 dias de cultura. A- segmentos de ráquias jovens; B- segmentos de ráquias maduras; Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2000.

GUERRA & HANDRO (1998) também contornaram a oxidação em culturas de inflorescência de *Euterpe edulis* Mart. com a inoculação inicial em meio líquido com carvão ativado.

A intensidade de oxidação, além de estar relacionada com o tipo e idade fisiológica de explante, meio de cultura, presença de reguladores de crescimento, nível endógeno de fitorreguladores e de agentes geleificantes, dentre outros fatores, depende da espécie a ser cultivada *in vitro*. Esta hipótese é reforçada pelo fato de que a eficiência de antioxidantes no meio de cultura tem variado entre diversas palmeiras e entre explantes da mesma espécie.

O procedimento de desinfestação empregado foi altamente satisfatório, considerando que não foi observada a contaminação de explantes por microorganismos.

3.3. Capacidade morfogênica de explantes

3.3.1. Embriões zigóticos maduros

Foram observadas diferentes respostas morfogênicas de embriões zigóticos maduros de açaizeiro cultivados *in vitro* em função da concentração de 2,4-D, aos 80 dias de cultura (Tabela 4).

Embriões zigóticos maduros cultivados em meio com 113,12 e 226,24 μM de 2,4-D, apresentaram o desenvolvimento do nó e da lâmina cotiledonar. Aos 14 dias de cultura foi verificada a emissão da radícula e do coleóptilo cotiledonar, dando origem a plântulas normais e vigorosas.

A supressão do desenvolvimento dos tecidos do nó cotiledonar, que dão origem à plântula, e a ausência ou o pequeno desenvolvimento da lâmina cotiledonar, estrutura correspondente ao haustório, foram observados em embriões zigóticos cultivados em meios enriquecidos com concentrações de 2,4-D maiores que 226,24 μM .

Esta supressão do processo de conversão de embriões em plântulas e o aparecimento de estruturas granulares sobre a região do pecíolo cotiledonar, aos 40 dias de cultura, caracterizaram a primeira manifestação morfogênica em embriões zigóticos cultivados em meio de cultura suplementado com 339,36; 454,48 e 565,61 μM de 2,4-D (Figura 3A). Não foi verificada a iniciação embriogenética em embriões zigóticos cultivados em meio com 678,73 μM de 2,4-D.

Aos 60 dias de cultura, sobre as estruturas granulares, agregados de embriões somáticos globulares típicos de coloração amarelada (Figura 3B) foram visualizados, sendo facilmente destacados do tecido matriz.

TABELA 4 - Respostas morfogênicas de embriões zigóticos maduros de *Euterge oleracea* Mart., cultivados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D, aos 80 dias de cultura. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2000.

2,4-D (μM)	Nº de explantes com resposta ¹	% de conversão em plântulas normais. ²	% de explantes com estruturas granulares ²	% de explantes com embriões globulares ²
113,12	36	100,0	0	0
226,24	29	100,0	0	0
339,36	39	0	80,43	19,57
454,48	27	0	61,42	38,58
565,61	17	0	93,41	6,59
678,73	0	0	0	0

¹ sobre o total de 45 explantes.

² percentagem sobre o total de explantes com resposta morfogênica.

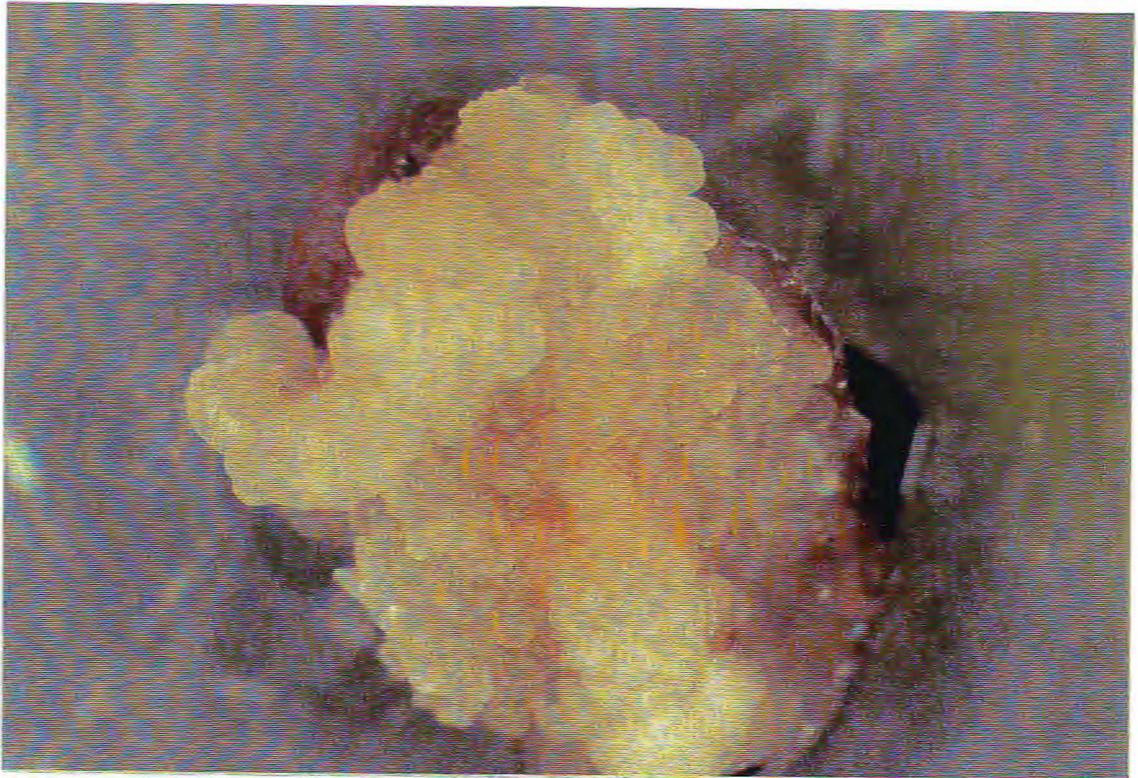
Foram detectadas diferenças significativas entre as concentrações de 2,4-D para a percentagem de embriões zigóticos maduros com estruturas granulares e embriões somáticos ($P \leq 0,01$).

As maiores frequências de embriões somáticos globulares foram verificadas em explantes cultivados em meio com 454,48 e 339,36 μM de 2,4-D (Figura 4). Apesar do tratamento constituído por 565,61 μM de 2,4-D ter induzido uma alta frequência de estruturas granulares embriogenéticas, a

percentagem de explantes com embriões somáticos globulares foi baixa. Resultados semelhantes foram obtidos por GUERRA & HANDRO (1998) em embriões zigóticos maduros de *Euterpe edulis* Mart. cultivados em meio inicial com 454,48 μM de 2,4-D, apesar de apenas 20 % das culturas tornarem-se embriogênicas.

O comportamento morfogenético observado nas culturas de embriões zigóticos maduros de *Euterpe oleracea* Mart., pode ser caracterizado por dois aspectos: a iniciação embriogênica ocorreu diretamente a partir da formação de tecido embriogênico de aspecto granular na região do nó cotiledonar e em nenhum caso foi verificada a iniciação a partir dos tecidos da lâmina cotiledonar (haustório). Estes resultados concordam com GUERRA & HANDRO (1991 e 1998) que obtiveram a iniciação embriogênica direta nos tecidos do nó cotiledonar em embriões zigóticos maduros e imaturos de *Euterpe edulis* Mart em meio MS suplementado com 50-100 mg.L^{-1} de 2,4-D. Entretanto, TEIXEIRA et al. (1993) observaram a formação de calos, em alta frequência, e a ausência de formação de tecido embriogênico em embriões zigóticos maduros de *Elaeis guineensis* Jacq. cultivados em meio Y3 com 500 μM de 2,4-D.

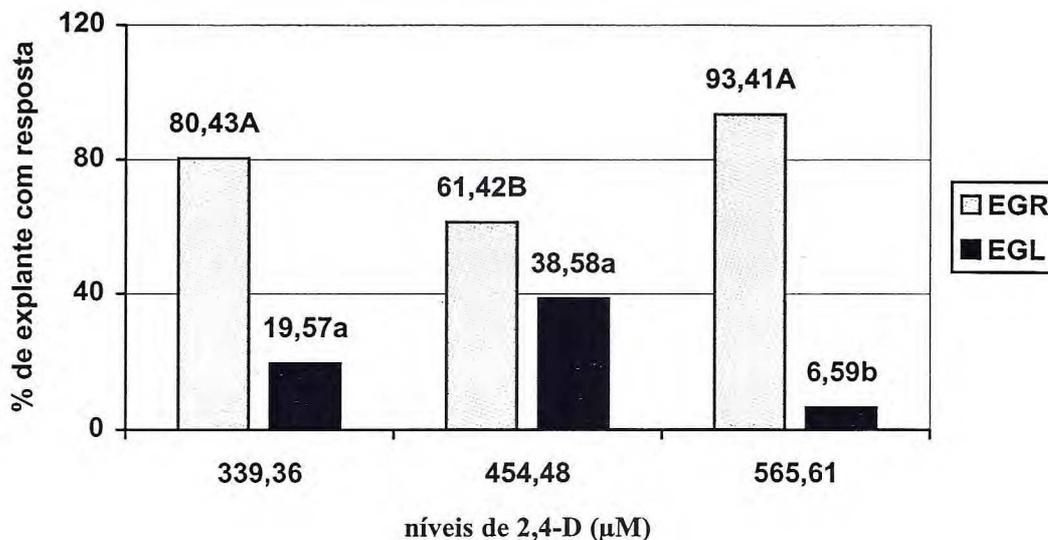
A)



B)



FIGURA 3 - Embriogênese somática em embriões zigóticos maduros de *Euterpe oleracea* Mart. cultivados em meio MS suplementado com 2,4-D. A- estrutura granular na região do nó cotiledonar aos 40 dias de cultura (15X); B- embriões somáticos globulares na região do nó cotiledonar aos 60 dias de cultura (19X). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2000.



Médias seguidas pela mesma letra não diferem, estatisticamente entre si, em nível de 1 % pelo agrupamento de Scott & Knott. EGR- CV = 8,01 %; EGL-CV = 36,60 %

FIGURA 4 - Percentagem de embriões zigóticos maduros de *Euterpe oleracea* Mart. com estruturas granulares (EGR) e embriões somáticos globulares (EGL) sob diferentes concentrações de 2,4-D aos 80 dias de cultura. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2000.

3.3.2. Embriões zigóticos imaturos

Os embriões maduros e imaturos apresentaram diferenças quanto à intensidade de resposta morfogênética, quanto ao tempo necessário para ocorrer estas respostas e quanto ao aspecto das culturas.

Apesar dos embriões imaturos, cultivados em meio com 113,12 e 226,24 µM de 2,4-D, apresentarem maior conversão em plântulas, quando comparados com embriões maduros, foi observada uma alta frequência de formação de plântulas anormais (Tabela 5). Estas plântulas apresentavam ausência ou presença de parte aérea atrofiada, ausência ou pouco desenvolvimento do haustório e ausência de sistema radicular, sendo que este, quando presente, apresentava um desenvolvimento desorganizado.

Este fato também foi observado por GUERRA & HANDRO (1991) em embriões imaturos de *Euterpe edulis* Mart. cultivados em meio MS com 226,24 μM de 2,4-D.

TABELA 5 - Respostas morfogênicas de embriões zigóticos imaturos de *Euterpe oleracea* Mart., cultivados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D, aos 80 dias de cultura. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2001.

2,4-D (μM)	Nº de explantes com resposta ¹	% de conversão em plântulas ²		% de explantes com estruturas granulares ²	% de explantes com embriões globulares ²
		Normais	Anormais		
113,12	45	31,11	68,89	6,67	0
226,24	33	0	51,51	48,49	0
339,36	14	0	28,57	71,43	0
454,48	17	0	0	100,0	0
565,61	16	0	0	100,0	0
678,73	08	0	0	100,0	0

¹ sobre o total de 45 explantes.

² percentagem sobre o total de explantes com resposta morfogênica.

O processo de conversão de embriões zigóticos imaturos em plântulas normais e anormais, não foi detectado em meio suplementado com concentrações superiores a 226,24 μM de 2,4-D. TEIXEIRA et al. (1993) verificaram a formação de plântulas anormais, sem o desenvolvimento de sistema radicular, em embriões zigóticos imaturos de *Elaeis guineensis* Jacq. em meio Y3 modificado enriquecido com 500 μM de 2,4-D.

Aos 60 dias de cultura, foi observada a formação de um tecido granular na região do nó cotiledonar em embriões cultivados na presença de 339,36; 454,48; 565,61 e 678,73 μM de 2,4-D. Entretanto, o número de embriões imaturos com resposta morfogênica (Tabela 5) foi menor quando comparado com embriões maduros (Tabela 4). Estes resultados discordam de GUERRA & HANDRO (1991, 1998), que alcançaram a rápida formação de tecido granular em embriões imaturos de *Euterpe edulis* Mart., aos 45

dias de cultura, e a formação e o desenvolvimento de embriões somáticos aos 60 dias de cultura em meio suplementado com 2,4-D. Provavelmente a maior intensidade de oxidação de embriões imaturos, cultivados em meio com altas concentrações de 2,4-D, pode ter afetado o potencial morfogênético dos explantes.

Até os 180 dias de cultura não foram detectadas a progressão dos tecidos granulares e a iniciação de embriões somáticos globulares. TEIXEIRA et al. (1993) também obtiveram uma baixa frequência de formação de tecido embriogenético friável, após 90 dias de cultura, em embriões zigóticos imaturos de *Elaeis guineensis* Jacq cultivados em meio Y3 com 500 μM de 2,4-D.

De maneira geral a indução e a expressão de rotas organogênicas parecem estar predominantemente relacionadas com o tipo e estágio fisiológico do explante e com o tipo e concentração do regulador de crescimento utilizado. Entretanto, a composição do meio de cultura e os efeitos do nitrogênio orgânico podem ser também considerados. GUERRA (1989) observou que o meio Y3 e a presença de 500 mg.L^{-1} de glutamina foram mais adequados para a obtenção de uma sequência de eventos embriogênicos em embriões zigóticos imaturos de *Euterpe edulis* Mart.

Apesar dos embriões zigóticos imaturos terem apresentado uma limitada aptidão embriogênica no presente trabalho, pesquisas devem ser conduzidas para indicar o estágio de maturação do fruto mais favorável para a excisão de embriões zigóticos imaturos, considerando a condição meristemática dos tecidos deste explante e os resultados positivos obtidos em outras palmeiras.

3.3.3. Segmentos de ráquias

Não foi verificada a indução de estruturas embriogênicas nos segmentos de ráquias maduras e imaturas até os 180 dias de cultura.

Os segmentos de ráquilas apresentaram um rápido alongamento e engrossamento a partir dos 15 dias de cultura. Nas inflorescências maduras, foi observado o desenvolvimento de flores em meio com 226,24 e 339,36 μM de 2,4-D. Nas demais concentrações testadas não foi verificada nenhuma alteração morfogênética e os explantes permaneceram viáveis até 180 dias de cultura.

Nos segmentos de ráquilas jovens não foi detectado o desenvolvimento de estruturas florais, ocorrendo um intenso escurecimento dos explantes em meio suplementado com 454,48 μM de 2,4-D.

Estes resultados concordam, em parte, com GUERRA & HANDRO (1991 e 1998), que observaram o desenvolvimento de flores em segmentos de ráquilas maduras de *Euterpe edulis* Mart. em meio suplementado com 2,4-D. Entretanto, os autores obtiveram uma rápida seqüência de eventos morfogênicos característica de um modelo de embriogênese somática direta em segmentos de inflorescências imaturas, inicialmente cultivados em meio com 50 mg.L^{-1} de 2,4-D e 3 mg.L^{-1} de 2iP. Após 60 dias de cultura, foram verificadas a formação de tecidos embriogênicos e a iniciação de embriões somáticos globulares. TEIXEIRA et al. (1994) também obtiveram a formação de embriões somáticos a partir de calos embriogênicos de inflorescências imaturas de *Elaeis guineensis* Jacq. induzidos em meio com 500 μM de 2,4-D, após 81 semanas de cultura.

Conforme discutido anteriormente, a indução e a expressão de rotas organogênicas parecem estar predominantemente relacionadas com o explante e os reguladores de crescimento utilizados. A competência embriogênica em diversas palmeiras tem sido alcançada nos primeiros estágios de cultura na presença de altas concentrações de 2,4-D (TISSERAT, 1979, 1982; BRANTON & BLAKE, 1983; CID, 1987; GUERRA & HANDRO, 1998; TEIXEIRA et al., 1993, 1994). Entretanto, o período para as respostas morfogênicas tem variado em função da espécie, tipo e estágio fisiológico dos explantes.

Apesar dos segmentos de ráquilas, nos estádios de desenvolvimento testados, não terem apresentado respostas morfogênicas, estudos devem

ser conduzidos para se identificar qual o estágio de maturação das ráquias mais favorável para a indução da embriogênese somática, tendo em vista que o emprego de inflorescências jovens tem-se apresentado como umas das alternativas mais importantes para a micropropagação de palmeiras.

3.3.4. Ápices caulinares

Na primeira fase experimental, aos 40 dias de cultura, apenas observou-se o crescimento do meristema apical, com a formação de plântulas completas de aspecto normal, em todas as combinações de ANA e BAP.

Em contrapartida, na segunda fase experimental que constou da utilização de ápices caulinares com uma pequena excisão na região do meristema apical, verificaram-se o crescimento do meristema apical e a iniciação de calo de aspecto translúcido aos 15 dias de cultura (Figura 5).

De acordo com a análise de variância, houve efeito significativo do ANA e da interação "ANA x BAP" sobre a percentagem de explantes com calos friáveis. Dentre as combinações de reguladores de crescimento testadas, a frequência de formação de calos em ápices caulinares foi sensivelmente estimulada pela presença de 5,37 μM de ANA combinado com 6,66 ou 8,88 μM de BAP e pela presença de 10,74 μM de ANA e 8,88 μM de BAP (Tabela 6). Diversos autores também detectaram a formação de calos em ápices caulinares de *Phoenix dactylifera* L. (TISSERAT, 1979) e de *Bactris gasipaes* Kunth. (ARIAS & HUETE, 1983; VALVERDE & ARIAS, 1989; ALMEIDA, 1994) em meio de cultura suplementado com auxinas e citocininas. De modo geral, a iniciação de calos é estimulada apenas pela presença de auxina no meio de cultura. Entretanto, conforme relatado por YEOMAN (1970), o crescimento de calos em diferentes espécies pode ser independente de auxina e citocinina, dependente de auxina, de citocinina ou de ambas.

TABELA 6 - Médias da percentagem de ápices caulinares de *Euterpe oleracea* Mart. com calos, cultivados *in vitro* em meio MS suplementado com diferentes combinações de ANA e BAP, aos 30 dias de cultura. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2000.

ANA (μM)	BAP (μM)			
	2,22	4,44	6,66	8,88
2,68	0,00bB	48,02aA	0,00bB	0,00bB
5,37	14,76bB	23,12aB	72,87aA	62,21aA
8,06	37,82aA	3,43bB	4,82bB	0,00bB
10,74	38,39aA	32,42aA	8,72bB	67,44aA
CV (%)	68,08			

Médias seguidas por letras minúsculas, na coluna, e por letras maiúsculas, na linha, não diferem, estatisticamente entre si, em nível de 5 % pelo agrupamento de Scott & Knott.

Apesar do açazeiro ser uma palmeira que perfilha na base do estipe, ápices caulinares excisados de plântulas *in vitro* não apresentaram proliferação de gemas, discordando dos resultados obtidos em *Phoenix dactylifera* L. (TISSERAT, 1979) e *Bactris gasipaes* Kunth. (PINEDO PANDURO, 1987; ALMEIDA, 1994). A maior capacidade morfogênica e a expressão regenerativa de ápices caulinares obtidos de plântulas *in vitro*, preconizadas por ALMEIDA (1994) e CRESPO (1997), não foram detectados no presente estudo até os 120 dias de cultura.

Provavelmente a recalcitrância observada pode ser explicada por fatores intrínsecos ao explante como o estágio fisiológico e o balanço endógeno de hormônios. O padrão de desenvolvimento do açazeiro, onde a capacidade de emissão de gemas laterais (perfilhos) está localizada na parte basal do estipe e de gemas florais nas bainhas foliares, também deve ser considerado.

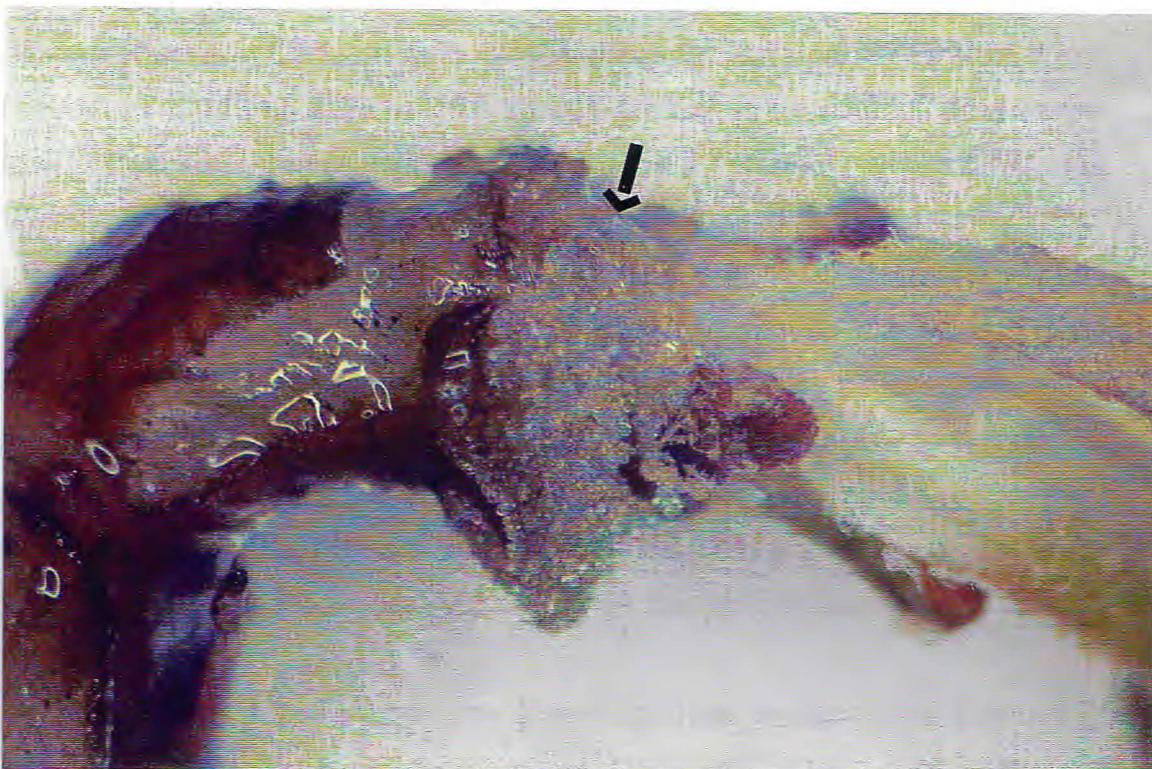


FIGURA 5 - Iniciação de calo e crescimento do meristema apical em ápice caulinar de *Euterpe oleracea* Mart. em meio MS suplementado com ANA e BAP aos 15 dias de cultura (15X). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2000.

3.3.5. Folhas jovens e ápices radiculares

As secções de folhas jovens clorofiladas e ápices radiculares excisadas de plântulas *in vitro*, apesar de apresentarem baixa percentagem de oxidação, ausência de contaminação por microorganismos e permanecerem viáveis até 120 dias após a inoculação, não apresentaram respostas morfogenéticas nas diferentes concentrações de 2,4-D e ANA testadas.

Resultados semelhantes foram observados por GUERRA (1989), em folhas jovens clorofiladas e ápices radiculares de *Euterpe edulis* Mart e por YOKOO et al. (1992) e SIQUEIRA (1988), em folhas clorofiladas de *Euterpe edulis* Mart., *Euterpe oleracea* Mart. e híbridos e em folhas jovens de *Cocos nucifera* L., respectivamente. Entretanto, em folhas jovens não clorofiladas de *Euterpe edulis* Mart. (GUERRA & HANDRO, 1998) e de *Cocos nucifera* L. (VERDEIL et al., 1992) foram verificadas a formação de tecidos pró-embriogênicos e o desenvolvimento de embriões somáticos em meio suplementado com 2,4-D. ALMEIDA (1994), apesar do intenso escurecimento dos explantes foliares, observou a formação e o lento crescimento de calos claros e friáveis, em meio com 4 a 10 mg.L⁻¹ de 2,4-D em secções foliares e ápices radiculares de *Bactris gasipaes* Kunth, após 3 meses de cultura.

Dentre os fatores limitantes à morfogênese destacam-se o tipo e o estágio fisiológico do explante. Segundo TISSERAT (1984b), as palmeiras parecem seguir o mesmo comportamento normalmente verificado para monocotiledôneas, onde a iniciação e o crescimento de calos ocorrem a partir de tecidos e órgãos derivados de regiões com alta atividade meristemática. A maioria dos resultados positivos em palmeiras foi alcançado a partir de tecidos embrionários (REYNOLDS & MURASHIGE, 1979).

Outro aspecto a ser considerado é que a composição e a concentração de reguladores de crescimento no meio são fatores determinantes no crescimento e no padrão de desenvolvimento de culturas

in vitro. Segundo YEOMAN (1970), o crescimento de calo em diferentes espécies pode ser independente de auxina e citocinina, dependente de auxina, dependente de citocinina ou dependente de ambos. Desta forma, alguns tecidos dependem da presença de reguladores exógenos no meio, enquanto outros sintetizam as quantidades que necessitam.

Provavelmente a ausência de resposta morfogênica verificada em folhas jovens clorofiladas e ápices radiculares possa estar relacionada com a interação e o balanço inadequado entre os reguladores de crescimento adicionados no meio e os níveis endógenos destes explantes e/ou baixa atividade meristemática. Conforme relatos de KERBAUY (1998), a região meristemática apical das raízes apresenta uma limitada expressão organogênica sob condições naturais.

Desta forma, explantes radiculares e foliares no presente trabalho não apresentaram potencial para capacidade morfogênica *in vitro*.

3.4. Manutenção e multiplicação de culturas embriogênicas

Aos 35 dias após a transferência de células pró-embriogênicas e de embriões somáticos em estágios globulares iniciais para o meio de manutenção e multiplicação, foi observado o início da progressão dos embriões para o estágio de desenvolvimento bipolar nos explantes pré-cultivados em meio com 339,36 μM de 2,4-D.

Apesar dos tratamentos primários com 454,48 e 565,61 μM de 2,4-D terem induzido a iniciação de estruturas pró-embriogênicas na fase inicial, verificou-se alta intensidade de oxidação dos explantes, menor número de embriões somáticos por explante e paralisação do desenvolvimento dos embriões somáticos no estágio globular, sem a progressão para os estágios subsequentes, aos 150 dias de cultura (Tabela 7). Provavelmente as altas concentrações de 2,4-D inibiram a progressão das culturas, além de contribuir para a oxidação, sugerindo que para essas concentrações o tempo de permanência no meio primário deva ser reduzido.

TABELA 7 - Médias da frequência embriogenética (FRE), do número de embriões somáticos (NES) por cultura e da eficiência embriogenética (EFE) de embriões zigóticos maduros de *Euterpe oleracea* Mart. cultivados em meio secundário MS na presença de 0,537 μ M de ANA e 12,30 μ M de 2iP, aos 150 dias de cultura. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2000.

Meio primário (μ M 2,4-D)	FRE (%) ¹ (A)	NES (B)	EFE ² (A X B)/100	Observações
339,36	86,7	25,5	22,1	Embriogênese repetitiva e não sincronizada e embriões somáticos em todos os estágios.
454,48	60,0	12,5	7,5	Leve oxidação dos embriões somáticos no estágio globular e regressão das culturas.
565,61	37,7	4,8	1,8	Oxidação intensa dos embriões somáticos no estágio globular e regressão das culturas.

¹ média de culturas embriogenéticas em relação ao total de explantes do meio primário.

² conforme LAZZERI et al., citados por GUERRA (1989).

Outro aspecto a ser levantado é o fato de que o desenvolvimento embriogenético não foi sincronizado, ou seja, as culturas apresentaram embriões somáticos em diferentes estágios de desenvolvimento. Em algumas culturas foi verificada a formação de embriões somáticos a partir dos primeiros embriões somáticos diferenciados, configurando um modelo embriogenético secundário ou repetitivo de alta frequência e longa duração. Este mesmo padrão também foi observado por GUERRA & HANDRO (1991 e 1998) em culturas de embriões zigóticos de *Euterpe edulis* Mart.

O meio secundário, suplementado com ANA e 2iP, foi eficiente para a manutenção e a multiplicação de células pró-embriogenéticas e de embriões somáticos em estágios globulares iniciais, além de promover a progressão

dos embriões para estágios mais avançados e induzir uma embriogênese repetitiva e não sincronizada.

Os resultados obtidos concordam com TISSERAT (1984a, 1984b) que reporta que o meio MS suplementado com 2,4-D, ANA e 2iP, promove as melhores condições para se obter um protocolo de regeneração de plantas, por meio da embriogênese, em palmeiras a partir de diferentes explantes. De acordo com BLAKE (1983), em um sistema de multiplicação *in vitro* de palmeiras as auxinas são requeridas para a iniciação de calos e as citocininas para a indução de embriogênese somática.

GUERRA & HANDRO (1998) também alcançaram a expressão de um modelo de embriogênese somática, a partir de embriões zigóticos imaturos e maduros de *Euterpe edulis* Mart., com a transferência dos explantes de meio enriquecido com altas concentrações de 2,4-D (50-100 mg.L⁻¹) para meio suplementado com ANA e 2iP.

3.5. Desenvolvimento, maturação e conversão de embriões somáticos

Aos 30 dias após a transferência das culturas para meio ½ MS, na ausência de reguladores de crescimento, foi detectado o início da maturação dos embriões somáticos e, aos 60 dias, a conversão de plântulas normais. A conversão foi caracterizada pela emissão da raiz primária e pelo desenvolvimento do pecíolo cotiledonar (Figura 6A), com a posterior formação do haustório (Figura 6B).

As culturas iniciadas em meio suplementado com 339,36 µM de 2,4-D apresentaram alta frequência embriogenética, bem como a progressão de embriões para a fase bipolar e a conversão de plântulas. Nas culturas inoculadas em meio primário com 454,48 µM de 2,4-D, foi observada uma paralisação no desenvolvimento dos embriões na fase globular e intensa oxidação (Tabela 8).

TABELA 8 - Médias da frequência embriogenética (FRE), do número de embriões somáticos na fase bipolar (NEB) e do número de plântulas regeneradas (NPR) por cultura, a partir de embriões zigóticos maduros de *Euterpe oleracea* Mart. cultivados em meio ½ MS, na ausência de reguladores de crescimento, aos 210 dias de cultura. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2001.

Meio primário (μM 2,4-D)	FRE ¹ (%)	NEB	NPR	Observações
339,36	92,3	16,3	14,8	Maturação e germinação dos embriões somáticos, embriogênese repetitiva e não sincronizada.
454,48	33,3	0	0	Embriogênese paralisada no estágio globular, sem progressão das culturas.

¹ média de culturas embriogenéticas em relação ao total de explantes do meio secundário.

De acordo com VASIL (1982) a competência embriogênica é adquirida nos primeiros estágios de cultura na presença de 2,4-D. Provavelmente as altas concentrações de 2,4-D, apesar de terem induzido uma competência embriogenética nos explantes no meio primário, podem ter alterado o desenvolvimento da rota morfogênica, promovendo a paralisação do desenvolvimento dos embriões no meio secundário.

O processo de embriogênese secundária direta foi mantido nesta fase de cultura na ausência de reguladores de crescimento, concordando com GUERRA & HANDRO (1991) em culturas de embriões zigóticos de *Euterpe edulis* Mart. Foi observada a formação direta de embriões somáticos a partir de embriões diferenciados (Figura 7A) e sobre plântulas recém-regeneradas (Figura 7B).

A conversão dos embriões somáticos iniciou, aproximadamente, aos 200 dias de cultura. GUERRA & HANDRO (1998) também observaram um processo de embriogênese mais lento em embriões zigóticos maduros de *Euterpe edulis* Mart. quando comparado com embriões imaturos que alcançaram a produção de plântulas aos 180 dias. Aos 240 dias de cultura,

as plântulas apresentavam-se com desenvolvimento normal da parte aérea e do sistema radicular (Figura 8A), sendo observada a formação de múltiplas plântulas, em decorrência da embriogênese direta secundária (Figura 8 B).

Muitos protocolos de regeneração de palmeiras, por embriogênese somática, têm sido obtidos indiretamente com a formação prévia de calos (RABÉCHAULT & MARTIN, 1976; AMMAR & BENBADIS, 1977; REYNOLDS & MURASHIGE, 1979; TISSERAT, 1979; NWANKWO & KRIKORIAN, 1983; BUFFARD-MOREL et al., 1992; VERDEIL et al., 1992). No presente trabalho a embriogênese somática foi direta concordando com os resultados obtidos por GUERRA & HANDRO (1991 e 1998). Além de diversos fatores, a proximidade genética das espécies *Euterpe oleracea* Mart. e *Euterpe edulis* Mart. pode ter contribuído para o desenvolvimento de um mesmo padrão morfogenético.

Este modelo apresenta a possibilidade de obtenção de um padrão contínuo de produção de embriões somáticos com riscos mínimos de alterações genéticas, conforme preconizado por GUERRA (1989). Apresenta grande potencial de aplicabilidade em estudo de eventos bioquímicos e fisiológicos relacionados com a determinação, no resgate de embriões interespecíficos, obtenção de linhagens e na conservação *in vitro* de *Euterpe oleracea* Mart.

Dentre os mais complexos e controversos aspectos da morfogênese vegetal *in vitro*, destacam-se três questões fundamentais: 1)- como ocorre a reprogramação de células em tecidos de um explante para a expressão de determinada rota morfogenética; 2)- quais os fatores e em que intensidade eles estão relacionados com a ativação de determinada rota morfogenética; 3)- se células simples ou grupos de células são o ponto de partida para a expressão de um programa embriogenético (GUERRA, 1989). Os resultados obtidos no presente trabalho parecem contribuir no avanço dessas questões, especificamente quanto aos fatores relacionados com a expressão da embriogênese somática a partir de explantes de *Euterpe oleracea* Mart.

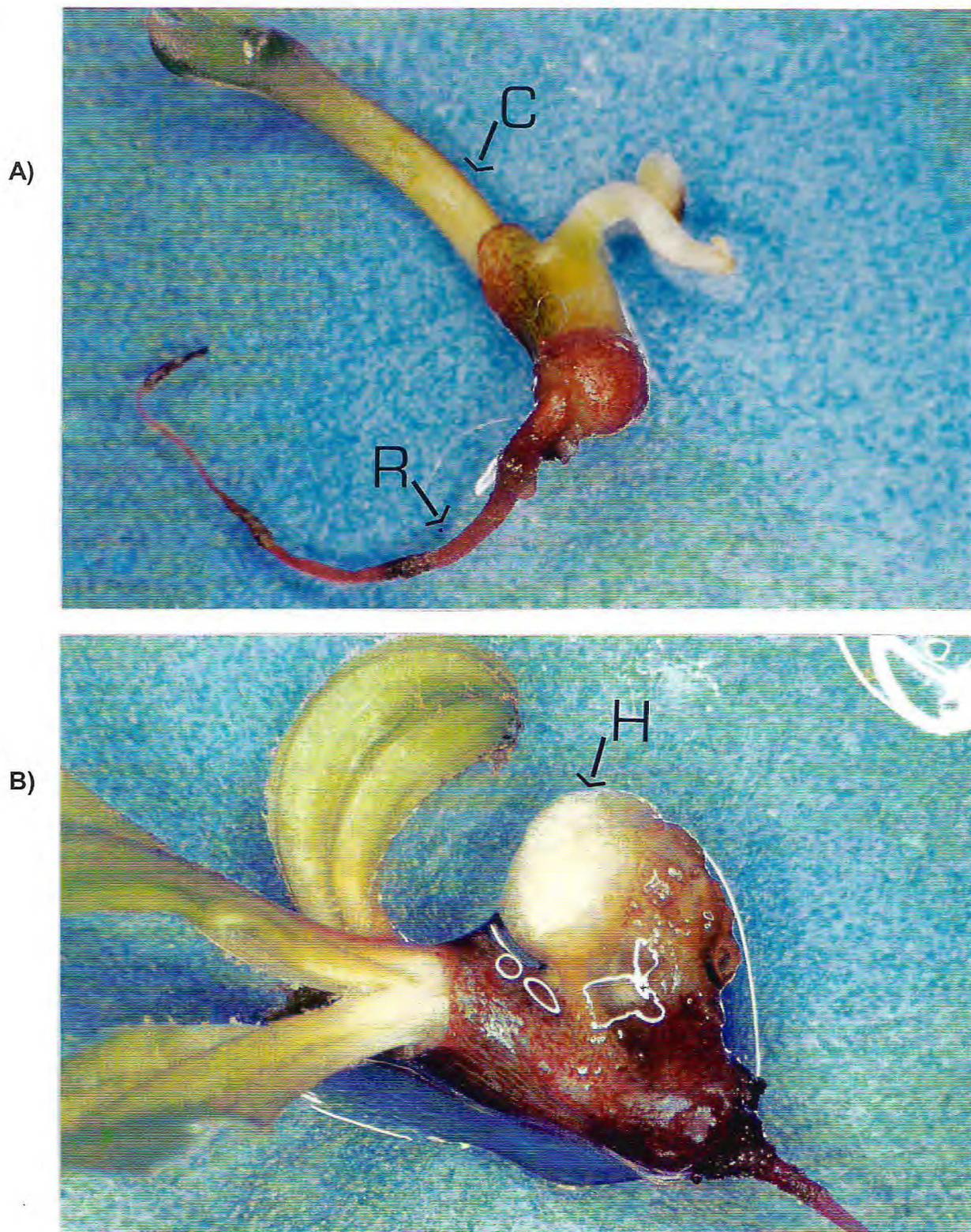


FIGURA 6 - Conversão de embriões somáticos de *Euterpe oleracea* Mart. em plântulas aos 210 dias de cultura. A- desenvolvimento da radícula (R) e do coleóptilo cotiledonar (C) (15X); B- expansão da lâmina cotiledonar (haustório-H) (18X). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2001.

A)



B)

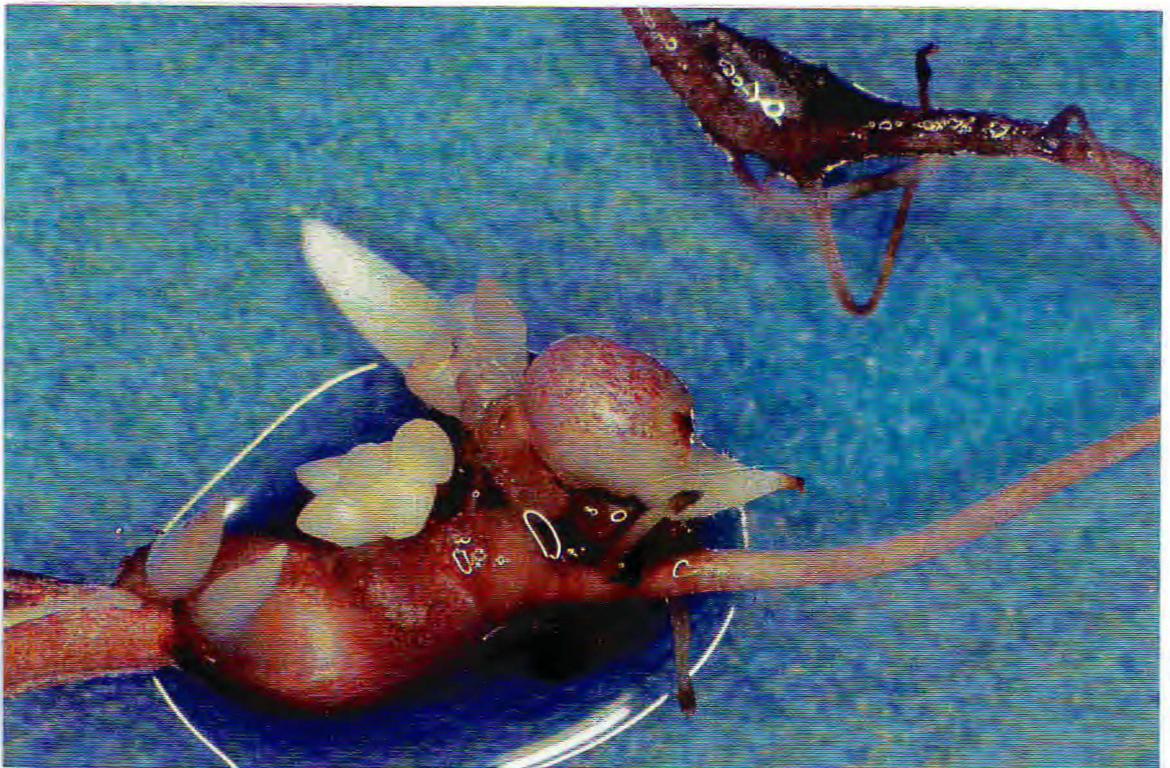
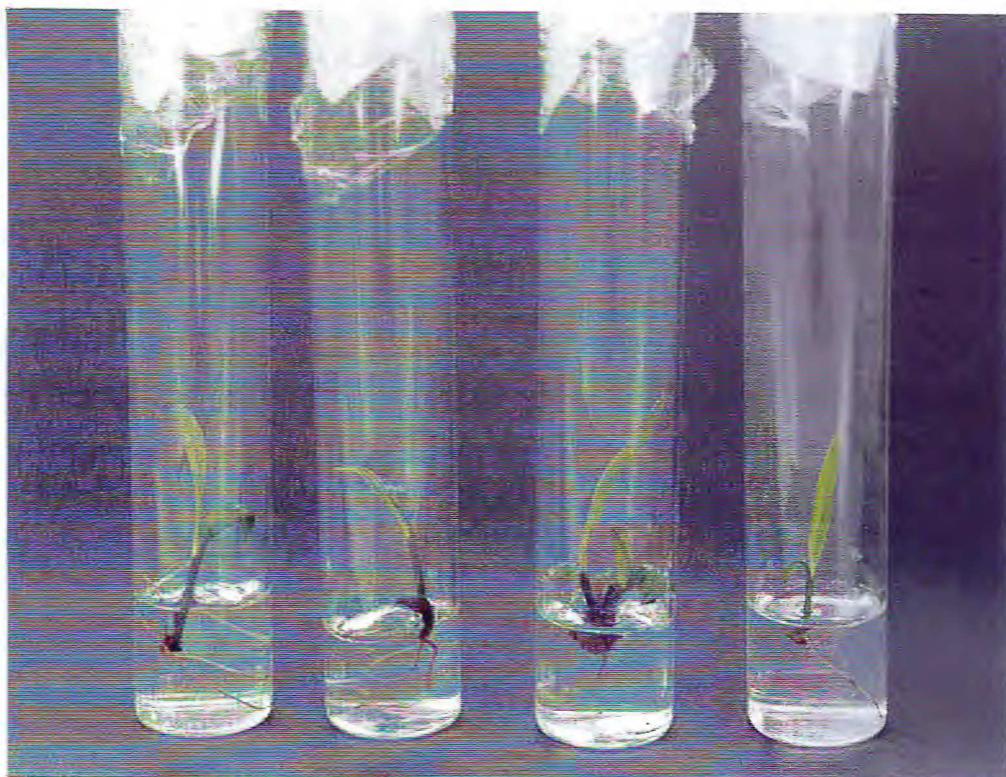


FIGURA 7 - Embriogênese somática em embriões zigóticos maduros de *Euterpe oleracea* Mart. aos 210 dias de cultura. A- formação direta de embriões somáticos a partir de embriões diferenciados (12,5X); B- formação direta de embriões somáticos sobre plântula recém-regenerada (12,5X). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2001.

A)



B)

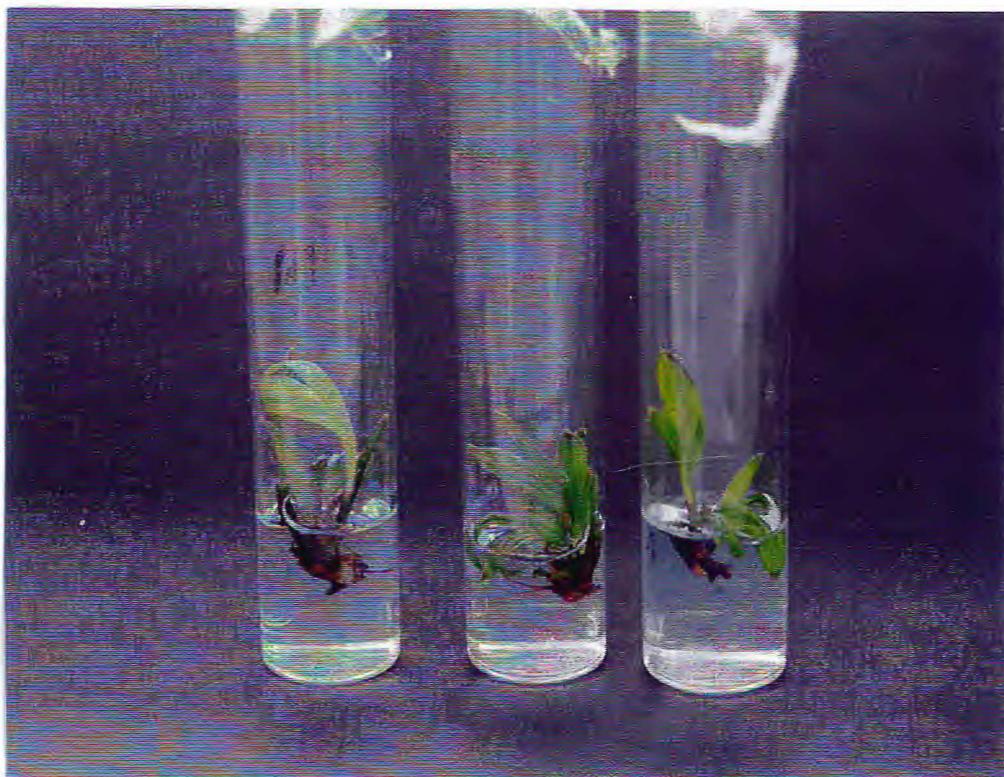


FIGURA 8 – Plântulas regeneradas a partir de embriogênese somática em embriões zigóticos maduros de *Euterpe oleracea* Mart., aos 240 dias de cultura, em meio $\frac{1}{2}$ MS na ausência de reguladores de crescimento A- plântulas normais; B- proliferação de múltiplas plântulas. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2001.

4. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos e nas condições em que o trabalho foi desenvolvido, pode-se concluir que:

- A adição de reguladores de crescimento no meio de cultura é necessária para a cultura de embriões zigóticos maduros de *Eutrope oleracea* Mart.;
- Os segmentos de ráquias excisados de inflorescências jovens apresentam menor intensidade de oxidação em meio MS sólido suplementado com carvão ativado, ácido ascórbico e PVP;
- Os segmentos de ráquias excisados de inflorescências maduras apresentam menor intensidade de oxidação em meio MS sólido suplementado com carvão ativado, tanto na presença quanto na ausência de ácido ascórbico;
- O meio MS líquido induz maior intensidade de oxidação em segmentos de ráquias jovens e maduras;
- A expressão de um modelo de embriogênese somática direta, repetitiva e não sincronizada e com alta eficiência e frequência embriogenética é alcançada em embriões zigóticos maduros cultivados em meio primário MS suplementado com 2,4-D e transferidos para meio secundário MS na presença de ANA e 2iP.
- A maturação de embriões somáticos e a conversão em plântulas normais são obtidas em meio 1/2 MS, na ausência de reguladores de crescimento;

- A ativação de um modelo de embriogênese somática em *Eutерpe oleracea* Mart. é dependente do tipo e estágio fisiológico do explante e do tipo e concentração do regulador de crescimento no meio primário;
- A formação de calos em ápices caulinares é estimulada pela presença de ANA e BAP;
- Embriões zigóticos imaturos apresentam baixo potencial embriogenético e secções de folhas jovens clorofiladas e ápices radiculares não apresentam capacidade de resposta morfogênética *in vitro*.

CAPÍTULO 2 - RESPOSTAS MORFOGENÉTICAS *IN VITRO* DE CUPUAÇUZEIRO (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum.)

RESUMO

Com o objetivo de estudar as respostas morfogênicas de diferentes explantes de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum.) submetidos a várias condições de cultura *in vitro*, experimentos foram conduzidos, em laboratório, utilizando-se material vegetal oriundo de plantas da coleção de cupuaçuzeiro da Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA e de plântulas assépticas obtidas a partir da conversão *in vitro* de embriões zigóticos maduros. O primeiro experimento constou da avaliação do efeito de dois substratos: ágar e vermiculita, na presença e ausência de meio de cultura MS e ½ MS, sobre a conversão de embriões zigóticos maduros em plântulas. Para o estudo da capacidade morfogênica de explantes, eixos embrionários e segmentos cotiledonares de embriões maduros, segmentos de folhas jovens clorofiladas, segmentos e ápices caulinares foram cultivados em meio MS sólido suplementado com diferentes tipos e concentrações de reguladores de crescimento. Os resultados obtidos permitiram verificar que o ágar a 0,6 % e a vermiculita foram eficientes e que adição de meio de cultura MS e ½ MS foi desnecessária para a conversão de embriões zigóticos em plântulas normais e vigorosas. O 2,4-D (4,52; 6,78 e 9,05 µM) promoveu a formação de calos friáveis em eixos embrionários e o TDZ (2,0 e 3,0 µM) induziu uma alta frequência de calos friáveis e menor oxidação em segmentos de folhas jovens. O 2,4-D combinado com KIN promoveu a iniciação de calos friáveis e o ANA combinado com KIN, a rizogênese em segmentos de cotiledonares. Na presença de 2,4-D (2,26 µM) e KIN (13,94 µM) houve a formação de

calos friáveis em segmentos caulinares. A adição de água de coco, 2iP e ANA no meio secundário estimulou o rápido crescimento de culturas de calos friáveis de eixo embrionário, segmentos caulinares e segmentos de folhas jovens clorofiladas. Os ápices caulinares não apresentaram capacidade de resposta morfogênética *in vitro*.

ABSTRACT

With the objective of studying the morphogenetic responses of different cupuassu explants (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum.) under diverse conditions of *in vitro* culture, several experiments were conducted in laboratory. The material used was collected from cupuassu plants at Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA and the aseptic seedlings were obtained from the *in vitro* conversion of mature cupuassu zygotic embryos. The first experiment consisted in evaluating the effect of two substrata: agar and vermiculite, both in presence and absence of MS and ½ MS culture media, over the conversion of mature zygotic embryos in to seedlings. Embryonic axes and cotyledon segments from mature embryos, chlorophyllous young leaves, stem segments and stem apexes cultivated in a MS medium supplemented with different types and concentrations of growth regulators, were used to evaluate the morphogenetic capacity of explants. The obtained results allowed to verify both the agar to 0,6% and the vermiculite efficiency and unnecessary of the addition of MS and ½ MS media to the conversion of zygotic embryos in to normal and vigorous seedlings. 2,4-D (4,52; 6,78 and 9,05 µM) promoted the formation of friable calluses in embryonic axes and TDZ (2,0 and 3,0 µM) induced a high frequency of friable calluses and smaller oxidation in segments of young leaf. 2,4-D combined with KIN promoted the initiation of friable calluses and NAA combined with KIN promoted the rhizogenesis in cotyledon segments. In the presence of 2,4-D (2,26 µM) and KIN (13,94 µM) there was the formation of friable calluses in stem segments. The addition of coconut water, 2iP and NAA in the secondary medium stimulated the fast growth of calluses in embryonic axis, stem segments, and chlorophyllous young leaf segments cultures. The stem apexes did not present capacity of *in vitro* morphogenetic responses.

1. INTRODUÇÃO

Por ser uma planta alógama, a propagação sexuada do cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum.) resulta em alto grau de variabilidade, devido à segregação e a recombinação gênica.

As mudas produzidas são, na sua maioria, provenientes de sementes, sem uma prévia seleção da planta matriz, ocasionando a formação de plantios com elevada variabilidade quanto à produção e formato dos frutos, arquitetura de copa, formato das folhas, entre outros (ALVES et al., 1998).

Plantios desuniformes associados à falta de material genético melhorado têm sido apontados como os principais fatores que limitam a expansão da cultura do cupuaçuzeiro na Amazônia (SOUZA et al., 1992).

Para atender esta demanda, instituições de pesquisas, na região Norte, têm implementado programas de melhoramento com ênfase a seleção de materiais com características de alta produção de frutos, rendimento de polpa e resistência à vassoura-de-bruxa (*Crinipellis perniciosa*), principal enfermidade da cultura.

Neste contexto, a cultura de tecidos, em especial a micropropagação, quando integrada a um programa de melhoramento, torna-se uma técnica auxiliar muito valiosa, para clonagem, em curto prazo, de genótipos superiores e para acelerar programas de melhoramento genético (FERREIRA et al., 1998).

Esta técnica, também pode apresentar importância em estudos de biossíntese de polifenóis e componentes de sabor e aroma de chocolate e de resistência a doenças, como já aplicado para o cacau (DIAS, 1995).

Os objetivos do presente trabalho foram estabelecer protocolos básicos para a instalação de culturas viáveis de cupuaçuzeiro e estudar as respostas morfogênicas de diferentes explantes de cupuaçuzeiro submetidos a várias condições de cultura *in vitro*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados explantes de cupuaçuzeiro excisados de plântulas assépticas obtidas a partir da conversão *in vitro* de embriões zigóticos maduros (segmentos caulinares, folhas jovens e ápices caulinares) e de plantas adultas oriundas da coleção de cupuaçuzeiro da Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA (eixos embrionários e cotilédones de embriões zigóticos maduros). Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Recursos Genéticos e Biotecnologia da Embrapa Amazônia Oriental.

2.1. Cultura de embriões zigóticos de cupuaçuzeiro

As sementes, provenientes de frutos maduros, foram despulpadas manualmente com auxílio de tesoura, lavadas em água corrente e imersas em NaClO a 2 % por 24 horas. Após a lavagem das sementes em água autoclavada e destilada, procedeu-se à excisão dos embriões com a retirada do tegumento sob câmara de fluxo laminar.

Os embriões zigóticos foram desinfestados em câmara de fluxo laminar, com a imersão em álcool etílico a 70 % por um minuto e, em seguida, em solução de NaClO a 2 % por 15 a 20 minutos sob agitação e lavados cinco vezes em água destilada e autoclavada.

Testaram-se como substratos o ágar e a vermiculita combinados com a ausência e a presença de 30 mL de meio $\frac{1}{2}$ MS e MS, suplementados com 3 % de sacarose. Os embriões zigóticos foram inoculados em frascos de vidro, com capacidade de 200 mL, contendo os seguintes tratamentos: 0,6 % de ágar; 0,6 % de ágar + meio $\frac{1}{2}$ MS; 0,6 % de ágar + meio MS; vermiculita + água destilada; vermiculita + meio $\frac{1}{2}$ MS e vermiculita + meio MS, totalizando 6 tratamentos.

O pH dos meios de cultura foi ajustado para 5,8 e a vermiculita foi previamente autoclavada por 30 minutos a 120°C. Todos os tratamentos foram submetidos à esterilização em autoclave a 120°C durante 15 minutos.

As culturas permaneceram em sala de crescimento com temperatura variando de 26°C ± 2, umidade relativa do ar média em torno de 70 % e fotoperíodo de 16 horas de luz branca fria (52 μmol.m⁻².s⁻¹ de irradiância)/oito horas de escuro.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 3 (dois substratos e três meios de cultura), com cinco repetições. Cada unidade experimental foi constituída de 10 frascos, contendo um embrião zigótico cada.

Aos 45 dias da inoculação, as variáveis analisadas foram a percentagem de conversão de embriões zigóticos em plântulas, a percentagem de plântulas anormais, os pesos da matéria fresca da parte aérea (g), do sistema radicular (g) e dos cotilédones (g) e o comprimento da parte aérea das plântulas (cm). As plântulas anormais foram consideradas aquelas que apresentavam ausência ou o crescimento da parte aérea e do sistema radicular.

2.2. Capacidade morfogênética de explantes

2.2.1. Eixos embrionários

Eixos embrionários, excisados de embriões zigóticos de sementes maduras de cupuaçuzeiro, foram desinfestados conforme descrito anteriormente. Em seguida, foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura básico MS com 0,6 % de ágar, 3 % de sacarose e 500 mg.L⁻¹ de caseína hidrolisada. Testaram-se os seguintes reguladores de crescimento adicionados isoladamente aos meios de culturas: ANA (10,74; 21,48; 32,22 e 42,96 μM), 2,4-D (2,26; 4,52; 6,78 e 9,05 μM) e TDZ (1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 μM).

Nos primeiros 15 dias as culturas permaneceram em sala de crescimento, nas mesmas condições do experimento anterior, entretanto sob fotoperíodo de 16 horas de luz branca fria indireta ($6 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de irradiância)/oito horas de escuro e, posteriormente, foram transferidas para fotoperíodo de 16 horas de luz branca fria direta/oito horas no escuro.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, com 12 tratamentos e quatro repetições. Cada unidade experimental foi constituída de cinco tubos de ensaio, contendo um explante cada.

Aos 30 dias de cultura, avaliaram-se o número de explantes com respostas morfogênicas e as percentagens de explantes com calo não friável e calo friável.

2.2.2. Folhas jovens

Os segmentos de folhas jovens, excisados de plântulas assépticas de cupuaçuzeiro em câmara de fluxo laminar, apresentavam-se com, aproximadamente, 0,5-0,7 cm de comprimento e 0,5 cm de largura.

Os segmentos foram inoculados em frascos de vidro, com capacidade de 200 mL, contendo 40 mL de meio de cultura básico MS com 0,6 % de ágar, 3 % de sacarose e 250 mg.L^{-1} de ácido ascórbico. Testaram-se quatro concentrações de TDZ (0; 1,0; 2,0 e 3,0 μM) combinadas com quatro de 2,4-D (0; 9,05; 18,10 e 27,15 μM), totalizando 16 tratamentos. As culturas foram mantidas em sala de crescimento nas mesmas condições do experimento anterior.

O delineamento estatístico foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4 x 4 (quatro concentrações de 2,4-D combinadas com quatro de TDZ), com três repetições. Cada unidade experimental foi constituída de dez frascos, contendo um explante cada.

Aos 45 dias de cultura, avaliaram-se a percentagem de oxidação dos explantes, o número de explantes com respostas morfogênicas e as percentagens de explantes com calo não friável e calo friável.

2.2.3. Segmentos cotiledonares

Os segmentos cotiledonares, excisados de embriões zigóticos de frutos maduros de cupuaçuzeiro em câmara de fluxo laminar, foram desinfestados conforme descrito anteriormente.

Os segmentos cotiledonares foram inoculados em frascos de vidro, com capacidade de 200 mL, contendo 40 mL de meio de cultura básico MS com 0,7 % de ágar, 3 % de sacarose e 500 mg.L⁻¹ de caseína hidrolisada. Testaram-se os seguintes reguladores de crescimento: KIN (11,61; 13,94; 16,26 e 18,59 µM) combinado com ANA (5,37 µM) ou 2,4-D (2,26 µM); e ANA (10,74; 21,48; 32,22 e 42,96 µM) combinado com TDZ (3,0 e 4,0 µM). As culturas permaneceram em sala de crescimento nas mesmas condições do experimento anterior.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, com 16 tratamentos e três repetições. Cada unidade experimental foi constituída de dez frascos contendo um explante cada.

Aos 60 dias de cultura, avaliaram-se o número de explantes com respostas morfogênicas e as percentagens de explantes com calo não friável, calo friável e raízes.

2.2.4. Segmentos caulinares

Os segmentos caulinares, excisados de plântulas assépticas de cupuaçuzeiro em câmara de fluxo laminar, apresentavam-se sem internódios com, aproximadamente, 0,5 cm de comprimento.

Os segmentos caulinares foram inoculados em frascos de vidro, com capacidade de 200 mL, contendo 40 mL de meio de cultura básico MS com 0,7 % de ágar, 3 % de sacarose e 500 mg.L⁻¹ de caseína hidrolisada. Testaram-se quatro concentrações de KIN (11,61; 13,94; 16,26 e 18,59 µM) combinadas com ANA (5,37 µM) ou 2,4-D (2,26 µM), totalizando oito

tratamentos. As culturas permaneceram em sala de crescimento nas mesmas condições do experimento anterior.

O delineamento estatístico foi o inteiramente casualizado, com oito tratamentos e três repetições. Cada unidade experimental foi constituída de dez frascos, contendo um explante cada.

Aos 60 dias de cultura, avaliaram-se o número de explantes com respostas morfogênicas e as percentagens de explantes com calo não friável e calo friável.

2.2.5. Ápices caulinares

Os ápices caulinares, excisados a partir de plântulas assépticas de cupuaçuzeiro em câmara de fluxo laminar, apresentavam-se com 0,5 cm de comprimento, com pelo menos um meristema apical e dois primórdios foliares.

Os ápices caulinares foram inoculados em tubos de ensaio, sob pontes de papel filtro, contendo 10 mL de meio de cultura básico MS líquido, 3 % de sacarose e 500 mg.L⁻¹ de caseína hidrolisada. Foram testadas duas concentrações de KIN (11,61 e 23,23 µM) combinadas com duas de ANA (0 e 0,54 µM). As culturas permaneceram em sala de crescimento nas mesmas condições do experimento anterior.

O delineamento estatístico foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 2 (duas concentrações de KIN combinadas com duas de ANA), com quatro tratamentos e cinco repetições. Cada unidade experimental foi constituída de dez tubos de ensaio contendo um explante cada.

Aos 90 dias de cultura, avaliaram-se o número de explantes com respostas morfogênicas e a proliferação de brotos.

2.3. Indução de culturas embriogénicas

As culturas de calos friáveis iniciadas a partir de segmentos caulinares, foliares e de eixos embrionários no meio primário ou indutor foram repicadas para meio secundário com o objetivo de induzir a iniciação de estruturas pró-embriogénicas e de embriões somáticos.

As culturas de calos foram inoculadas em erlenmeyers com capacidade de 100 mL, contendo 40 mL de meio de cultura MS com 0,7 % de ágar e 2 % de glicose. Testaram-se os seguintes tratamentos: meio MS; meio MS + água de coco; meio MS + água de coco + 2,69 μM de ANA + 2iP; meio MS + água de coco + 5,37 μM de ANA + 2iP; meio MS + água de coco + 8,06 μM de ANA + 2iP e meio MS + água de coco + 10,74 μM de ANA + 2iP. A água de coco foi adicionada aos meios na concentração de 100 mL.L⁻¹ e o 2iP na concentração de 12,30 μM .

As culturas permaneceram em sala de crescimento, sob fotoperíodo de 16 horas de luz branca fria indireta/ oito horas de escuro.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, com seis tratamentos e quatro repetições, sendo cada unidade experimental constituída de cinco frascos, contendo um explante cada.

Aos 30 dias de cultura, avaliaram-se as percentagens de oxidação e de culturas de calos com estruturas embriogénicas e/ou embriões somáticos. As avaliações qualitativas consistiram da caracterização dos estágios embriogénicos e do comportamento das culturas.

2.4. Análises estatísticas

As variáveis foram submetidas à análise de variância pelo teste F e as médias foram comparadas pelo agrupamento de Scott & Knott (SCOTT & KNOTT, 1974) em nível de 1 % e 5 % de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Cultura de embriões zigóticos de cupuaçuzeiro

Na primeira semana, após a inoculação, os cotilédones apresentavam-se intumescidos e com coloração esverdeada. Aos sete dias observou-se o lançamento da radícula com rápido crescimento, e, posteriormente, o desenvolvimento de raízes secundárias (Figura 9A). A partir da terceira semana ocorreu a emergência do epicótilo e dos nós cotiledonares, e a formação do gancho epicotilar (Figura 9B). A alongação do gancho epicotilar e a formação do primeiro par de folhas foram verificados a partir da quarta semana após a inoculação. As folhas apresentavam-se cobertas com pêlos e com coloração roxo-avermelhada (Figura 9C). Aos 45 dias, por ocasião do encerramento do experimento, as plântulas apresentavam o primeiro par de folhas com limbo bem desenvolvido e de coloração esverdeada. Em todas as sementes inoculadas não houve a formação de plântulas anormais. As fases descritas anteriormente concordam com as observadas por VENTURIERI (1993), entretanto devido à ausência do tegumento e as condições ambientais controladas, o desenvolvimento das plântulas *in vitro* foi mais rápido.

A análise de variância detectou efeito significativo da interação “substrato x meios de cultura” para o peso da matéria fresca da parte aérea e dos cotilédones ($P \leq 0,01$) (Tabela 9). Não foi observada interação significativa para a percentagem de conversão de embriões zigóticos em plântulas, peso da matéria fresca do sistema radicular e comprimento da parte aérea ($P > 0,05$). Houve efeito significativo do substrato para a percentagem de conversão de embriões zigóticos, e do substrato e do meio de cultura para o peso da matéria fresca dos cotilédones e comprimento da parte aérea ($P \leq 0,01$) (Tabela 9).

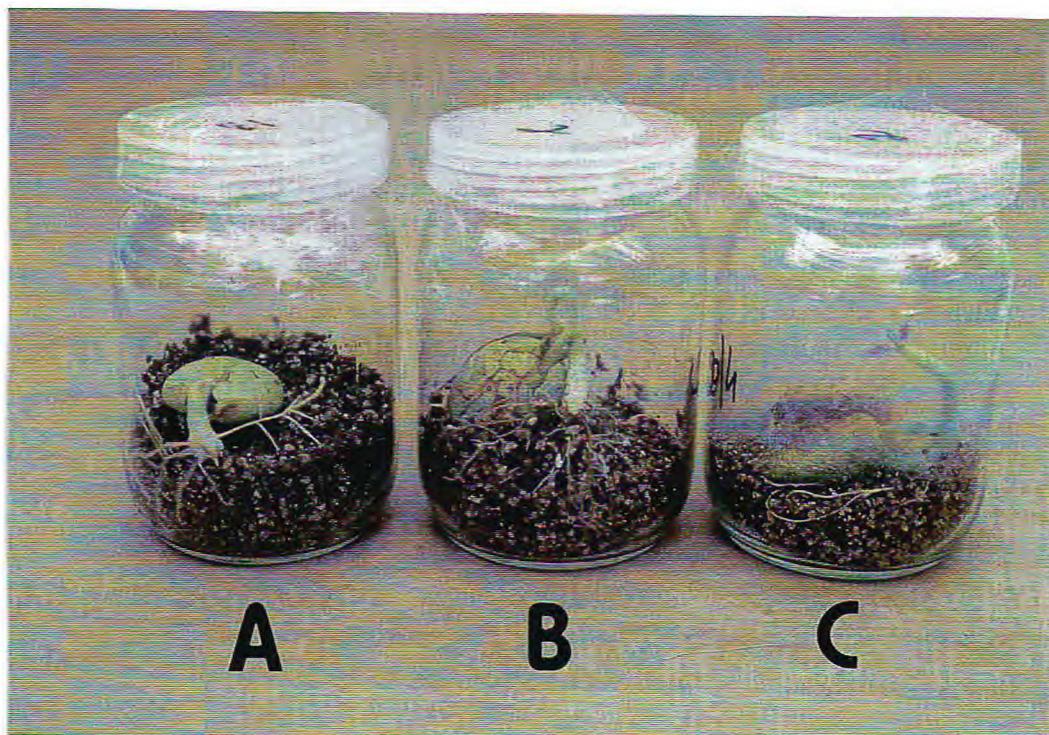


FIGURA 9 - Desenvolvimento *in vitro* de embriões zigóticos de *Theobroma grandiflorum*. A- lançamento da radícula e desenvolvimento de raízes secundárias; B- emergência do epicótilo e nós cotiledonares e formação do gancho epicotilar; C- alongação do gancho epicotilar e emissão do primeiro par de folhas. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2000.

O meio ágar 0,6 % promoveu maior percentagem de conversão de embriões zigóticos (100 %), quando comparado com a vermiculita (83,33 %), conforme a Tabela 10. Estes resultados discordam de LOPES (2000), que obteve maiores percentagens de germinação em sementes de mogno (*Swietenia macrophylla*) em vermiculita do que em meio MS + ágar. Provavelmente a incidência de 10 % de contaminação, quando os explantes foram inoculados em vermiculita, contribuiu para a menor emergência das plântulas.

TABELA 9 - Resumo da análise de variância para médias da percentagem de conversão de embriões zigóticos (%CEZ), do peso da matéria fresca da parte aérea (PMFPA), do sistema radicular (PMFSR), dos cotilédones (PMFCO) e do comprimento da parte aérea (CPA) de plântulas de *Theobroma grandiflorum*, em função do tipo de substrato (SUB) e da ausência ou presença de meio de cultura MS e ½ MS (MC). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2000.

Fontes de Variação	G.L.	Quadrados Médios				
		CEZ (%)	PMFPA (g)	PMFSR (g)	PMFCO (g)	CPA (cm)
SUB	1	2083,33**	0,0790ns	0,2253ns	9,3856**	52,4041**
MC	2	333,33ns	0,7189**	0,0883ns	2,5527**	33,3241**
SUB x MC	2	333,33ns	0,9963**	0,1959ns	0,3090ns	16,5115ns
Resíduo	24	291,67	0,1360	0,1016	0,3449	5,0819
CV (%)		18,63	28,04	25,47	9,81	18,42

**-significativo em nível de 1 % pelo teste F.

ns- não significativo em nível de 5 % pelo teste F.

As plântulas mantidas em vermiculita apresentaram maior peso da matéria fresca da parte aérea, na ausência de solução nutritiva (1,90 g). Os embriões zigóticos inoculados em meio ágar originaram plântulas mais vigorosas, que apresentaram, em média, 13,56 cm de comprimento da parte aérea. A adição de meio MS e ½ MS não induziu um aumento no crescimento, em ambos os substratos (Tabela 10). A pressão osmótica é um fator a ser considerado, uma vez que elevadas pressões osmóticas reduzem

o crescimento e afetam o metabolismo celular (NICKELL & MARETZKI; PREMECZ et al; citados por CALDAS et al., 1998). Provavelmente a alta concentração de sais no meio de cultura, promoveu um aumento do potencial osmótico, conseqüentemente diminuindo o potencial hídrico, o que pode ter influenciado o crescimento das plântulas.

Os cotilédones inoculados em ágar e na ausência de meio de cultura MS e ½ MS, apresentaram maior acúmulo de matéria fresca (Tabela 10).

Considerando que os cotilédones têm a função de armazenar substâncias de reservas até a plântula tornar-se autotrófica, a presença de solução nutritiva no meio externo torna-se dispensável para o crescimento inicial de plântulas cultivadas *in vitro*.

Apesar de CALDAS et al. (1998) ressaltarem que a vermiculita umedecida com solução nutritiva favorece a formação de raízes pelo maior grau de aeração, não foram verificadas diferenças significativas entre os substratos sobre o peso da matéria fresca do sistema radicular ($P > 0,05$). Entretanto, verificou-se que os cotilédones mantidos em ágar, na ausência de sais, apresentaram maior acúmulo de matéria fresca.

Observou-se o melhor desempenho das plântulas cultivadas em ágar 0,6%, na ausência de solução nutritiva, entretanto a vermiculita poderá ser utilizada na obtenção de plântulas assépticas de cupuaçuzeiro por apresentar um menor custo.

TABELA 10 - Médias da percentagem de conversão de embriões zigóticos (%CEZ) em plântulas aos 10 dias de cultura, do peso da matéria fresca da parte aérea (PMFPA), do sistema radicular (PMFSR), dos cotilédones (PMFCO) e do comprimento da parte aérea (CPA) de plântulas de *Theobroma grandiflorum* aos 45 dias de cultura, em função do tipo de substrato e da ausência ou presença de meio de cultura MS e ½ MS. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2000.

	% CEZ			Médias
	Ausência de MS	½ MS	MS	
Ágar 0,6 %	100,00	100,00	100,00	100,00a
Vermiculita	90,00	90,00	70,00	83,33b
Médias	95,0	95,0	85,0	
	PMFPA (g)			Médias
	Ausência de MS	½ MS	MS	
Ágar 0,6 %	1,31Ab	1,58Aa	1,20Aa	1,37
Vermiculita	1,90Aa	0,93Bb	0,96Ba	1,26
Médias	1,61	1,26	1,08	
	PMFSR (g)			Médias
	Ausência de MS	½ MS	MS	
Ágar 0,6 %	1,14	1,25	1,10	1,33
Vermiculita	1,58	1,13	1,30	1,17
Médias	1,36	1,19	1,20	
	PMFCO (g)			Médias
	Ausência de MS	½ MS	MS	
Ágar 0,6 %	7,00	6,15	6,71	6,62a
Vermiculita	6,22	5,07	5,23	5,51b
Médias	6,61A	5,61B	5,97B	
	CPA (cm)			Médias
	Ausência de MS	½ MS	MS	
Ágar 0,6 %	14,03	14,45	12,20	13,56a
Vermiculita	14,25	9,70	8,80	10,92b
Médias	14,14A	12,08AB	10,50B	

Médias seguidas por letras minúsculas, na coluna, e por letras maiúsculas, na linha, não diferem, estatisticamente entre si, em nível de 5 % pelo agrupamento Scott & Knott.

3.2. Capacidade morfogênica de explantes

3.2.1. Eixos embrionários

Observaram-se diferentes respostas morfogênicas de eixos embrionários de cupuaçuzeiro cultivados *in vitro* em função dos reguladores de crescimento adicionados ao meio básico MS (Tabela 11).

TABELA 11 - Respostas morfogênicas de eixos embrionários de *Theobroma grandiflorum*, cultivados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de ANA, TDZ e 2,4-D, aos 30 dias de cultura. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2000.

Reguladores de crescimento (µM)	Nº de explantes com resposta ¹	% de explantes com calo não friável ²	% de explantes com calo friável ²
ANA			
10,74	12	100,0	0
21,48	6	100,0	0
32,22	10	100,0	0
42,96	0	0	0
TDZ			
1,0	13	100,0	0
2,0	17	100,0	0
3,0	17	100,0	0
4,0	13	100,0	0
2,4-D			
2,26	20	30,0	70,0
4,52	20	0	100,0
6,78	20	10,0	90,0
9,05	20	0	100,0

¹ com calo não friável e/ou calo friável sobre um total de 20 explantes.

² % sobre o total de explantes com resposta morfogênica.

A)



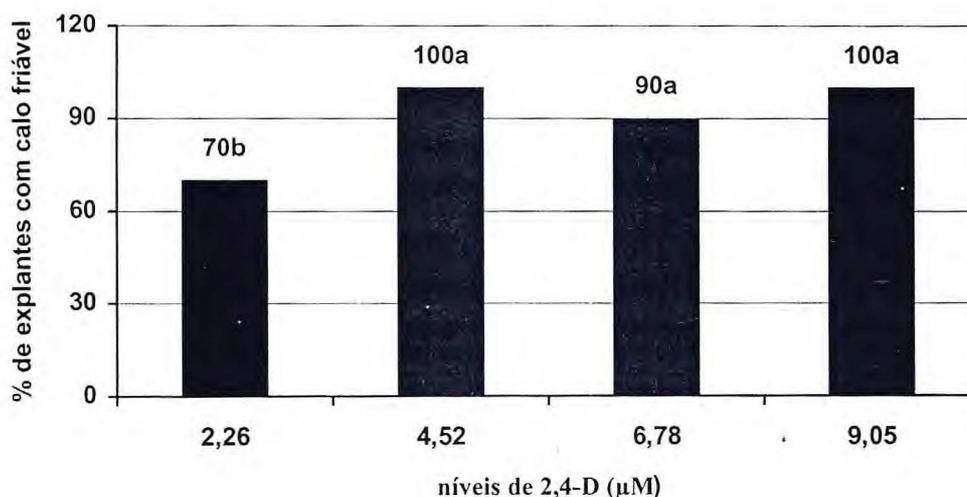
B)



FIGURA 10 - Calogênese em eixo embrionário de *Theobroma grandiflorum* aos 20 dias de cultura. A- iniciação de calo não friável em meio MS suplementado com ANA (19X); B- iniciação de calo friável em meio MS suplementado com 2,4-D (19X). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2000.

Nos eixos embrionários cultivados em meio com ANA, foi verificada, aos 20 dias, a formação de calo branco-translúcido de aspecto esponjoso e não friável cobrindo a superfície do explante, não sendo observada a iniciação de calos friáveis e de estruturas pró-embriogênicas até os 120 dias de cultura (Figura 10A). Explantes cultivados em meio suplementado com TDZ apresentaram o mesmo padrão de resposta morfogênética (Tabela 11). Entretanto, na presença de 2,4-D, após a formação do calo de aspecto não friável aos 25 dias de cultura, foi observada a iniciação e o crescimento de calo com aspecto friável em toda a superfície dos explantes (Figura 10B).

Foram detectadas diferenças significativas entre as concentrações de 2,4-D para a percentagem de explantes com calos friáveis ($P \leq 0,01$). As maiores frequências de calos friáveis foram verificadas aos 30 dias, em meio suplementado com 4,52; 6,78 e 9,05 μM de 2,4-D (Figura 11). A iniciação e o crescimento de calos em meio com menor concentração de 2,4-D (2,26 μM) foram mais lentos.



Médias seguidas pela mesma letra não diferem, estatisticamente entre si, em nível de 1% pelo agrupamento de Scott & Knott. CV= 19,64 %

FIGURA 11 - Percentagem de eixos embrionários de *Theobroma grandiflorum* com calo friável em meio MS sob diferentes concentrações de 2,4-D aos 30 de cultura. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2000.

3.2.2. Folhas jovens

Verifica-se na Tabela 12, diferentes respostas morfogenéticas em função das concentrações e reguladores de crescimento testados, em segmentos de folhas jovens clorofiladas de cupuaçuzeiro cultivados *in vitro*.

De modo geral, os segmentos de folhas jovens apresentaram o mesmo padrão de calogênese dos eixos embrionários. Foi observada a formação de calo branco-translúcido de aspecto esponjoso e não friável, aos 15 dias de cultura, com crescimento muito lento, na borda e nas nervuras centrais e secundárias dos segmentos de folhas e ausência de calos friáveis na maioria dos tratamentos testados (Figura 12A).

Na presença isolada de 1,0; 2,0 e 3,0 μM de TDZ, após a formação de calo de aspecto não friável aos 15 dias de cultura, foi verificada a iniciação e o rápido crescimento de calo friável de coloração clara em toda a superfície abaxial e adaxial dos explantes (Figura 12B). Foram detectadas diferenças significativas entre as concentrações de TDZ para a percentagem de explantes com calos friáveis ($P \leq 0,01$). As concentrações de 2 e 3 μM de TDZ induziram as maiores frequências de explantes com calos friáveis aos 45 dias de cultura (Figura 13).

Provavelmente a formação de calos friáveis em explantes foliares de cupuaçu, possa ser dependente da presença de citocininas. Segundo LU (1993) o TDZ estimula a divisão celular e, conseqüentemente, o crescimento de calos dependentes de citocininas em algumas espécies. Segundo MOK et al. (1987), o efeito do TDZ *in vitro* pode ser devido a sua atuação direta no sítio de ação das citocininas ou a sua influência na biossíntese e metabolismo das citocininas endógenas. Entretanto, algumas evidências indicam que o TDZ possa ter atividade auxínica ou estar envolvido no metabolismo de auxinas, conforme relatado por LU (1993).

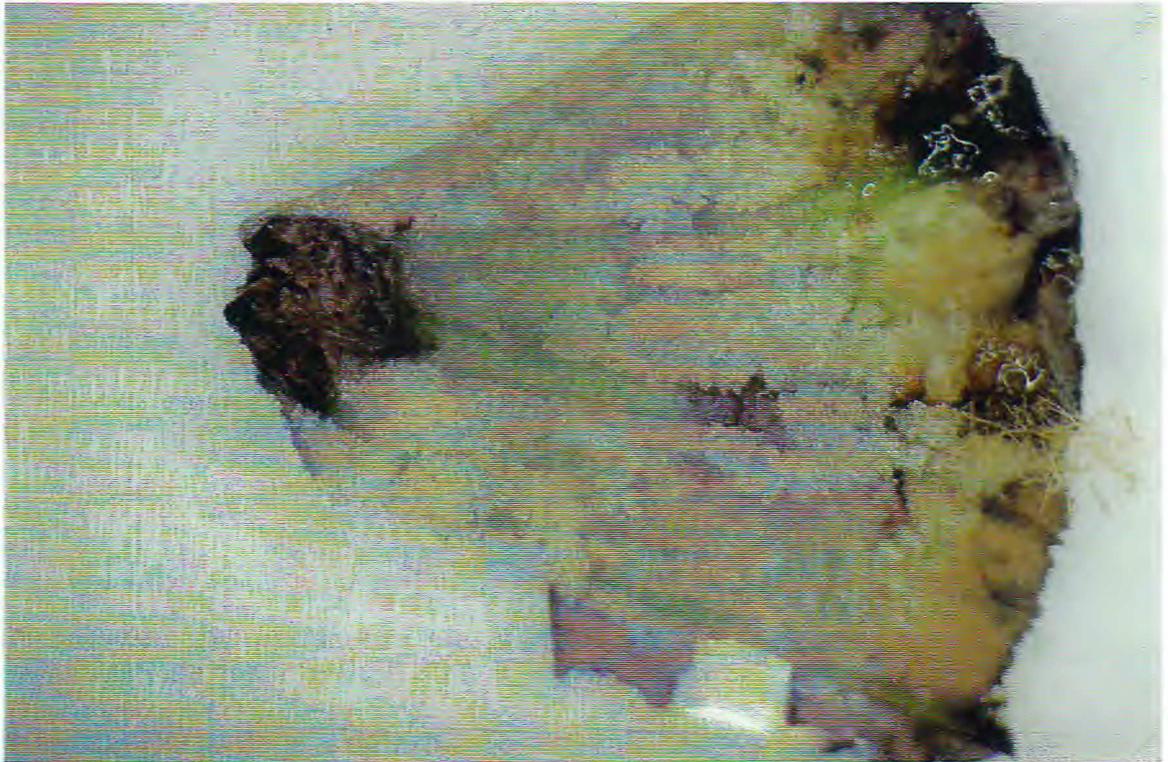
TABELA 12 - Percentagem de oxidação e respostas morfogênicas de segmentos de folhas jovens de *Theobroma grandiflorum*, cultivados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de TDZ e 2,4-D, aos 45 dias de cultura. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2000.

Reguladores de crescimento (µM)		% de oxidação	Nº de explantes com resposta ¹	% de explantes com calo não friável ²	% de explantes com calo friável ²
TDZ	2,4-D				
0	0	14,81	0	0	0
0	9,05	37,04	3	100,0	0
0	18,10	33,33	8	100,0	0
0	27,15	33,33	10	100,0	0
1,0	0	6,67	13	84,6	15,4
1,0	9,05	20,00	9	100,0	0
1,0	18,10	33,33	12	100,0	0
1,0	27,15	50,00	10	100,0	0
2,0	0	3,33	27	30,8	69,2
2,0	9,05	60,00	0	0	0
2,0	18,10	66,67	0	0	0
2,0	27,15	76,67	3	100,0	0
3,0	0	3,33	26	50,0	50,0
3,0	9,05	60,00	5	100,0	0
3,0	18,10	76,67	5	100,0	0
3,0	27,15	90,00	0	0	0

¹ com calo não friável e/ou calo friável sobre um total de 30 explantes.

² % sobre o total de explantes com resposta morfogênica.

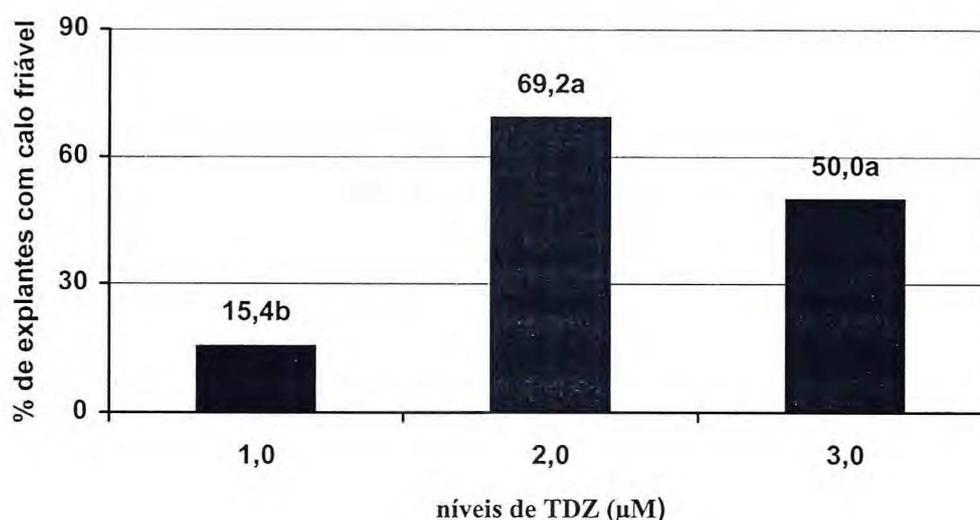
A)



B)



FIGURA 12 - Calogênese em explante foliar de *Theobroma grandiflorum* em meio MS suplementado com TDZ. A- formação de calo não friável aos 20 dias de cultura (19X); B- formação de calo friável aos 45 dias de cultura (19X). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2000.



Médias seguidas pela mesma letra não diferem, estatisticamente entre si, em nível de 1 % pelo agrupamento de Scott & Knott. CV = 24,17 %

FIGURA 13 - Percentagem de explantes foliares de *Theobroma grandiflorum* com calo friável sob diferentes concentrações de TDZ aos 45 dias de cultura. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2000.

A ausência de iniciação de calos friáveis nos demais tratamentos também pode estar relacionada com a alta oxidação observada nos explantes foliares. A rápida oxidação dos explantes, a partir de 15 dias de cultura, pode ter afetado a formação de calos friáveis, após a iniciação de calos não friáveis. Esta hipótese é reforçada pelo fato de que nos explantes inoculados em meio de cultura com 1,0; 2,0 e 3,0 μM de TDZ, a percentagem de oxidação foi de 6,7; 3,33 e 3,33 %, respectivamente. Entretanto quando o TDZ foi combinado com o 2,4-D a percentagem de oxidação variou de 14,81 a 90,0 % (Tabela 12). Resultados semelhantes foram obtidos por FLORES (1999), que observou menor oxidação de calos em explantes foliares de *Fragaria x ananassa* Duch. em meio suplementado com TDZ. Conforme relatado por MOK et al. (1987), o TDZ é resistente às oxidases, estável e biologicamente ativo em concentrações menores que as citocininas tipo adenina.

Altos índices de oxidação (77,4 %, em média) e baixa eficiência na formação de calos (17,5 %, em média) foram verificados por RODRIGUES

(2000), em discos foliares de *Theobroma grandiflorum* cultivados em meio suplementado com 4,52 μM de 2,4-D.

3.2.3. Segmentos cotiledonares

Verifica-se na Tabela 13, que a combinação de ANA e KIN, nas concentrações testadas, foi bastante favorável a indução da rizogênese em segmentos cotiledonares. PENCE et al. (1979) observaram o crescimento organizado de raízes a partir de cotilédones de *Theobroma cacao* L., em meio MS suplementado com 20 mg.L^{-1} de ANA. A rizogênese é induzida pela presença de auxina isolada ou em combinação com uma citocinina em baixa concentração (FLICK et al., 1983). Entretanto, a sensibilidade das células a um determinado hormônio vegetal está relacionada com o número de receptores e com a atuação de um hormônio sobre outro, o que pode aumentar ou inibir a resposta (FIRN, 1986), além do estágio de desenvolvimento, tipo de explante e condições fisiológicas do mesmo.

Nos tratamentos constituídos da combinação de ANA com TDZ (Tabela 13), as respostas morfogênicas limitaram-se a formação de calo de aspecto esponjoso e não friável em toda a superfície dos explantes aos 25 dias de cultura (Figura 14A). Em contrapartida, quando o 2,4-D foi combinado com KIN, após a iniciação de calo não friável, houve a formação e o rápido crescimento de calo friável em toda a superfície dos segmentos cotiledonares e, em menor frequência, a iniciação de raízes (Figura 14B).

Os calos friáveis apresentaram um rápido escurecimento, apesar de manterem uma alta taxa de crescimento até os 150 dias de cultura, não sendo verificada a iniciação de estruturas pró-embriogênicas. A oxidação e o crescimento excessivo de calos oriundos de cotilédones de *Theobroma cacao* L., têm sido reportados como os principais problemas no desenvolvimento, maturação e conversão de embriões somáticos (BERTHOULY & ESKES, 1995).

TABELA 13 - Respostas morfogênicas de segmentos cotiledonares de *Theobroma grandiflorum*, cultivados em meio MS suplementado com diferentes concentrações e combinações de reguladores de crescimento, aos 60 dias de cultura. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2000.

Reguladores de crescimento (μM)		Nº de explantes com resposta ¹	% de explantes com calo não friável ²	% de explantes com calo friável ²	% de explantes com raízes ²
ANA	KIN				
5,37	11,61	14	0	0	100,0
5,37	13,94	17	0	0	100,0
5,37	16,26	10	0	0	100,0
5,37	18,58	6	0	0	100,0
2,4-D	KIN				
2,26	11,61	10	30,0	70,0	0
2,26	13,94	13	15,4	84,6	9,0
2,26	16,26	20	0	100,0	27,7
2,26	18,58	15	0	72,5	33,3
ANA	TDZ				
10,74	3,0	20	100,0	0	0
21,48	3,0	18	100,0	0	0
32,22	3,0	12	100,0	0	0
42,89	3,0	20	100,0	0	0
ANA	TDZ				
10,74	4,0	15	100,0	0	0
21,48	3,0	13	100,0	0	0
32,22	3,0	15	100,0	0	0
42,89	3,0	9	100,0	0	0

¹ com calo não friável e/ou calo friável e/ou raízes sobre um total de 30 explantes.

² % sobre o total de explantes com resposta morfogênica.

Conforme relatado por PIOUS & RAVINDRA (1997), o maior problema na iniciação de culturas lenhosas é a presença de compostos fenólicos que estão ligados ao processo de regulação do crescimento, especialmente as auxinas, que dependendo da concentração endógena no explante, resulta na indução da síntese desses compostos.

Não foram detectadas diferenças significativas entre as concentrações de KIN combinadas com 2,26 μM de 2,4-D quanto à percentagem de explantes com calos friáveis ($P \geq 0,05$). NDOUMOU et al. (1997), trabalhando com cotilédones de *Theobroma cacao*, observaram o rápido crescimento de calos em meio $\frac{1}{2}$ MS suplementado com 2,4-D e KIN. RODRIGUES (2000) reporta que em cotilédones de *Theobroma grandiflorum* a formação de calos foi induzida na presença de altas concentrações de 2,4-D (22,62 e 31,67 μM).

A)



B)



FIGURA 14 - Calogênese em segmento cotiledonar de *Theobroma grandiflorum*. A- formação de calo não friável em meio MS suplementado com ANA e KIN aos 25 dias de cultura (19X); B- formação de calo friável em meio MS suplementado com 2,4-D e KIN aos 60 dias de cultura (19X). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2000.

3.2.4. Segmentos caulinares

Não foram observadas, em nenhum dos tratamentos, a proliferação de brotos e a indução de rizogênese a partir dos segmentos caulinares de cupuaçuzeiro. As respostas morfogênicas limitaram-se a calogênese (Tabela 14).

A combinação de ANA ou 2,4-D com KIN, nas concentrações testadas, promoveu a indução de calos com coloração branco-translúcida de aspecto esponjoso e não friável nos explantes aos 30 dias de cultura (Figura 15A). Verifica-se na Tabela 14, que o tratamento constituído de 2,26 μ M de 2,4-D combinado com 13,94 μ M de KIN foi o único a induzir a formação de calos friáveis, entretanto com crescimento muito lento e rápido escurecimento (Figura 15B).

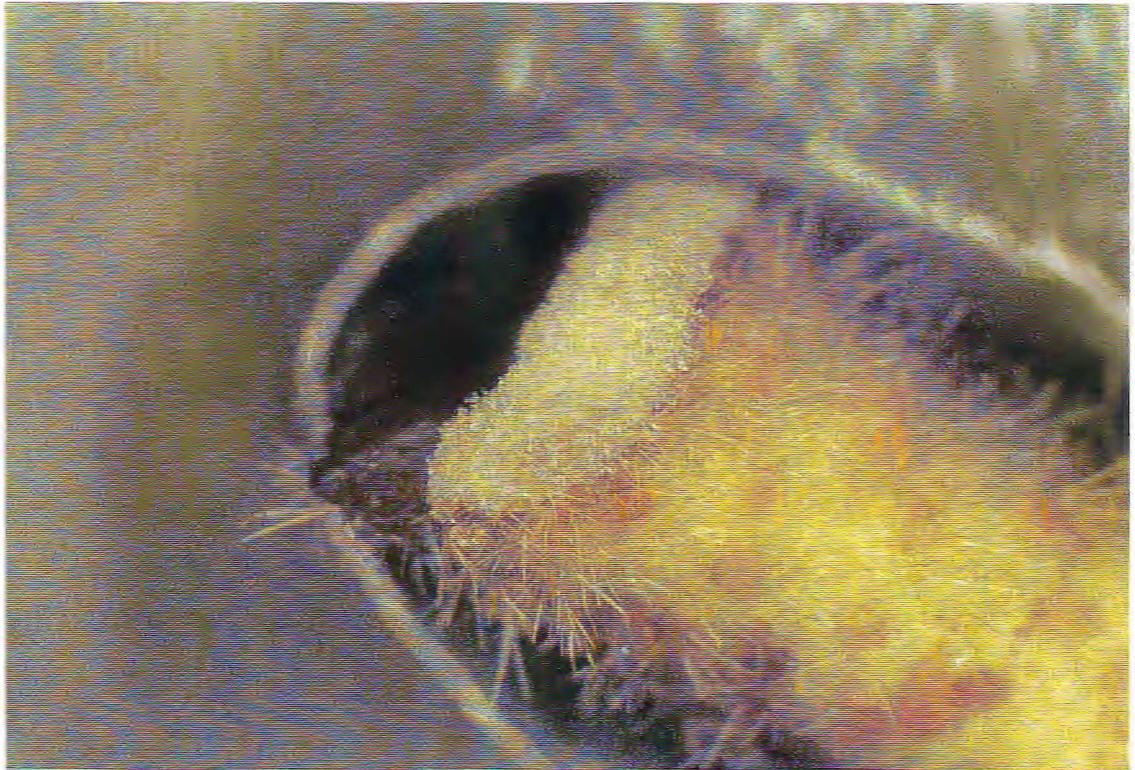
TABELA 14 - Respostas morfogênicas de segmentos caulinares de *Theobroma grandiflorum*, cultivados em meio MS suplementado com diferentes concentrações e combinações de reguladores de crescimento, aos 60 dias de cultura. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2000.

Reguladores de crescimento (μ M)		Nº de explantes com resposta ¹	% de explantes com calo não friável ²	% de explantes com calo friável ²
ANA	KIN			
5,37	11,61	16	100,0	0
5,37	13,94	2	100,0	0
5,37	16,26	4	100,0	0
5,37	18,58	3	100,0	0
2,4-D	KIN			
2,26	11,61	7	100,0	0
2,26	13,94	8	37,5	62,5
2,26	16,26	11	100,0	0
2,26	18,58	3	100,0	0

¹ com calo não friável e/ou calo friável e/ou raízes sobre um total de 30 explantes.

² % sobre o total de explantes com resposta morfogênica.

A)



B)



FIGURA 15 - Calogênese em segmento caulinar de *Theobroma grandiflorum* em meio MS suplementado com ANA ou 2,4-D combinados com KIN. A- formação de calo não friável aos 30 dias de cultura (19X); B- formação de calo friável aos 60 dias de cultura (15X). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2000.

Resultados semelhantes foram obtidos por HALL & COLLIN (1974), que observaram apenas a formação de calos sem regeneração de plântulas em segmentos de ramos ortotrópicos de *Theobroma cacao* L. RODRIGUES (2000) não verificou a formação de calos em segmentos nodais de *Theobroma grandiflorum* em meio suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D. Segundo DUFOUR et al. (1985), o desenvolvimento desorganizado de calos em segmentos caulinares de *Theobroma cacao* L., cultivados em meios para a proliferação de brotos, pode ser devido a fatores endógenos ou ao equilíbrio gasoso inadequado.

Este explante apresentou capacidade limitada de respostas morfogenéticas *in vitro* nas condições do presente estudo.

3.2.5. Ápices caulinares

Não foram verificados o crescimento do meristema apical, a proliferação de brotos e a formação de calos em nenhum dos tratamentos testados. Observou-se apenas a expansão dos primórdios foliares, e, alguns ápices, que apresentaram um reduzido crescimento.

Estes resultados concordam com RODRIGUES (2000) que não observou a formação de calos em ápices caulinares de *Theobroma grandiflorum* e, em parte, com PASSEY & JONES (1983) que detectaram apenas a proliferação de alguns brotos com desenvolvimento reduzido a partir de ápices caulinares de *Theobroma cacao* L. Entretanto, ADU-AMPOMAH et al. (1992), utilizando meristemas apicais de plântulas jovens de *Theobroma cacao* L., obtiveram a alongação nodal e o crescimento de vários brotos em meio líquido MS suplementado com 1 μ M de ZEA combinado com ANA e GA₃.

Apesar deste explante não ter apresentado respostas morfogenéticas no presente trabalho, ele apresenta potencial para a capacidade morfogenética *in vitro*, tendo em vista a sua condição meristemática.

Estudos devem ser conduzidos para a obtenção de resultados mais promissores.

3.3. Indução de culturas embriogênicas

Não foi observada, até os 120 dias de inoculação, a indução de calos embriogênicos nos diferentes tratamentos testados. Entretanto, aos 10 dias de cultura, verificou-se o rápido crescimento dos calos com aspecto friável e de coloração verde clara.

Nas culturas iniciadas a partir de eixos embrionários houve maior percentagem de progressão dos calos, nos diferentes tratamentos testados, quando comparados com segmentos caulinares e de folhas jovens (Tabela 15).

TABELA 15 - Respostas morfogenéticas de calos friáveis iniciados em meio primário a partir de eixos embrionários (EE), segmentos de folhas jovens (SFJ) e segmentos caulinares (SC) de *Theobroma grandiflorum*, cultivados em meio secundário MS suplementado com água de coco (AC); 2iP e diferentes concentrações de ANA, aos 30 dias de cultura. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2000.

Tratamentos	EE	SFJ	SC
	% de explantes com calo friável		
MS	0	0	0
MS + AC	26,5	0	0
MS + AC + 2,69 μ M ANA + 12,30 μ M 2iP	50,0	37,5	0
MS + AC + 5,37 μ M ANA + 12,30 μ M 2iP	62,0	33,3	0
MS + AC + 8,06 μ M ANA + 12,30 μ M 2iP	44,4	12,5	0
MS + AC + 10,74 μ M ANA + 12,30 μ M 2iP	43,0	0	37,5

Não foi observado o crescimento dos calos friáveis em meio MS na ausência de água de coco e de reguladores de crescimento, ocorrendo um rápido escurecimento das culturas. Em contrapartida, nos eixos embrionários, na presença de água de coco, houve a progressão dos calos, sendo potencializada em meio suplementado com ANA e 2iP (Tabela 15). Resultados semelhantes foram obtidos por PENCE et al. (1979), que observaram o aumento do crescimento de calos de *Theobroma cacao* L. em meio MS suplementado com 10 % de água de coco. O efeito estimulatório da água de coco pode ser explicado pelo fato deste aditivo ser rico em glicose e frutose, sais minerais, mio-inositol, citocininas, bem como nucleotídeos e outros compostos orgânicos (TULECKE et al., citados por ELHAG et al., 1987; FERREIRA et al., 1998).

Para os eixos embrionários, apesar de não terem sido detectadas diferenças significativas entre as concentrações de ANA ($P > 0,05$), uma maior percentagem de formação de calos friáveis foi observada com 5,37 μ M de ANA (62 %), havendo uma tendência à redução na formação de calos com o aumento da concentração de ANA (Tabela 15). Em geral, o aumento das concentrações de auxinas promove um aumento na percentagem de calos friáveis, enquanto que, em concentrações mais baixas, observa-se maior frequência de calos compactos (BROWN & CHARLWOOD, 1990). Provavelmente a presença de altos níveis endógenos de auxinas nos explantes, associada à presença de altas concentrações de ANA no meio de cultura, pode ter comprometido o crescimento de calos friáveis.

Diversos trabalhos têm demonstrado a capacidade de indução de embriogênese somática a partir de diversos explantes em meio de cultura suplementado com água de coco. JANICK & WHIPKEY (1988) alcançaram a produção de calos embriogênicos a partir de embriões zigóticos imaturos de *Theobroma grandiflorum* cultivados em meio MS suplementado com 10 % de água de coco e 1 mg.L⁻¹ de 2,4-D. LI et al. (1998) e MARBACH & TEIXEIRA (1999) observaram a regeneração de plântulas de *Theobroma cacao*, a partir de calos embriogênicos induzidos de estaminóides cultivados em meio DKW

suplementado com 2 mg.L^{-1} de 2,4-D e $22,7 \text{ nM}$ de TDZ e com 2 mg.L^{-1} de 2,4-D e 5 % de água de coco, respectivamente.

A ausência de indução de calos embriogênicos observada nas culturas pode estar relacionada com diversos fatores como tipo e o estágio de desenvolvimento dos explantes, meio de cultura, reguladores de crescimento e outros. O estágio de fisiológico do explante é um fator importante, conforme relatado por GUERRA et al. (1999) e está relacionado com o número de receptores das células responsivas para os reguladores de crescimento presentes no meio de cultura.

4. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, nas condições em que foi desenvolvido, pode-se concluir que:

- O ágar a 0,6 % e a vermiculita são substratos eficientes para a conversão de embriões zigóticos de *Theobroma grandiflorum* e a adição de meio de cultura MS e ½ MS é desnecessária para a conversão de embriões zigóticos em plântulas;
- A ativação de uma resposta morfogênica *in vitro*, em especial a calogênese, em *Theobroma grandiflorum* é dependente do tipo e estágio fisiológico do explante e do tipo e concentração de regulador de crescimento no meio de cultura;
- O 2,4-D promove a formação de calos friáveis em eixos embrionários e o TDZ induz alta frequência de calos friáveis e menor oxidação em segmentos de folhas jovens;
- A combinação de 2,4-D e KIN no meio de cultura promove a formação de calos friáveis e de ANA e KIN induz a rizogênese em segmentos cotiledonares. A combinação de 2,4-D e KIN promove a formação de calos friáveis em segmentos caulinares;
- A adição de água de coco, 2iP e ANA no meio secundário estimula o rápido crescimento de calos friáveis em culturas de eixo embrionário de segmento caulinar e de segmentos de folhas jovens, mas não induz culturas embriogenéticas.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos demonstram o potencial do emprego da técnica de cultura de tecidos para a micropropagação de *Euterpe oleracea* Mart. e *Theobroma grandiflorum*, e em programas de melhoramento genético.

A expressão de um modelo de embriogênese somática direta, repetitiva e não sincronizada, em embriões zigóticos maduros, apresenta-se como um resultado com alcance potencial para a micropropagação, resgate de embriões interespecíficos, obtenção de linhagens e conservação *in vitro* do açazeiro, dentre outras aplicações. Ressalta-se também a contribuição no avanço do conhecimento da morfogênese vegetal em palmeiras, principalmente quanto à competência e a determinação celular, bem como dos fatores associados à ativação e controle de um modelo de embriogênese somática.

No entanto, alguns estudos são necessários para o encurtamento do período de conversão dos embriões somáticos, para a sincronização do processo embriogenético e para aclimação das plantas regeneradas. Abordagens experimentais futuras com a utilização de embriões zigóticos imaturos e segmentos de ráquias também deverão ser consideradas.

A capacidade apresentada por diversos explantes de cupuaçuzeiro em formar calos, em meio suplementado com diversos reguladores de crescimento e aditivos, preconiza um estudo mais aprofundado, como a avaliação do estágio fisiológico e dos níveis endógenos de fitormônios nos explantes, para melhor controle da expressão morfogênética *in vitro*.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADU-AMPOMAH, Y. et al. Meristem-tip culture of cocoa (*Theobroma cacao* L.). **Tropical Agriculture**, Port-of-Spain, Trinidad, v.69, n.3, p.268-272, July 1992.

ALEMANNI, L.; BERTHOULY, M.; MICHAUX-FERRIÈRE, N.A. Comparison between *Theobroma cacao* L. zygotic embryogenesis and somatic embryogenesis from floral explants. **In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant**, Oxon, United Kingdom, v.33, n.3, p.163-172, July/Sept. 1997.

ALMEIDA, M. de. **Emprego da cultura *in vitro* para a 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.

ALMEIDA, M. de.; KERBAUY, G.B. Micropropagation of *Bactris gasipaes* (Palmae) through flower bud culture. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.8, n.3, p.215-217, set. 1996.

ALVES, R.M.; CORRÊA, J.R.V.; GOMES, M.R.O. Avaliação preliminar de clones de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*), em áreas de produtores de Tomé-Açu, PA. IN: ENCONTRO DE GENÉTICA DO NORDESTE, 13., 1998, Feira de Santana. **Anais...** Feira de Santana: UEFS, 1998. p.359.

AMMAR, S.; BENBADIS, A. Multiplication végétative du palmier-dattier (*Phoenix dactylifera* L.) par la culture de tissus de jeunes plantes issues de semis. **Comptes Rendus des Seances de l'Académie des Sciences. Serie III:Sciences de la Vie**, Paris, France, v.284, p.1789-1792, 1977.

AMMIRATO, P.V. Patterns of development in culture. In: HENKE, R.R. et al. (Eds.). **Tissue culture in forestry and agriculture**. New York: Plenum, 1985. p.9-29.

ANDREOLI, C. Cultura de embriões. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 1985, Brasília. **Anais...** Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1985. p.25-28.

ARCHIBALD, J.F. Culture *in vitro* of cambial tissue of cocoa. **Nature**, London, v.173, n.4399, p.351-352, Jan./Jun. 1954.

ARIAS, O.M.; HUETE, F.V. Propagación vegetativa *in vitro* de pejibaye (*Bactris gasipaes* H.B.K.). **Turrialba**, San Jose, Costa Rica, v.33, n.2, p.103-108, abr./jun. 1983.

BERTHOULY, M.; ESKES, A. Les biotechnologies appliquées au cacaoyer. In: TEISSON, C. (Ed.). **Biotechnologies végétales: intégration chez les plantes tropicales 1**. Montpellier: CNED-Institut de RENNES, 1995. chapitre 4, p.69-83.

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.207-222.

BLAKE, J. Tissue culture propagation of coconut, date and oil palm. In: DOODS, J.H. (Ed.). **Tissue culture of trees**. London: Croom Helm, 1983. p.23-50.

BRANTON, R.L.; BLAKE, J. Development of organized structures in callus derived from explants of *Cocos nucifera* L. **Annals of Botany**, London, v.52, n.5, p.673-678, Nov. 1983.

BROWN, J.T.; CHARLWOOD, B.V. Organogenesis in callus culture. In: POLLARD, J.W.; WALKER, J.M. (Eds). **Plant cell and tissue culture**. New Jersey: Humana Press, 1990. cap.7, p.65-70.

BUFFARD-MOREL, J.; VERDEIL, J.L.; PANNETIER, C. Embriogenèse somatique du cocotier (*Cocos nucifera* L.) à partir d'explants foliaires: étude histologique. **Canadian Journal of Botanic**, Ottawa, Canada, v.70, n.4, p.735-741, Apr. 1992.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CNPH, 1998. v.1, p.87-132.

CALZAVARA, B.B.G. **Açaizeiro**. Belém: EMBRAPA-CPATU. 1987. 6p. (EMBRAPA-CPATU. Recomendações Básicas, 3).

CALZAVARA, B.B.G.; MULLER, C.H.; KAHWAGE, O.N.C. **O cupuaçuzeiro: cultivo, beneficiamento e utilização do fruto**. Belém: EMBRAPA-CPATU, 1984. 101p. (EMBRAPA-CPATU. Documentos, 32).

CAVALCANTE, P.B. **Frutas comestíveis da Amazônia**. Belém: MPEG, 1991. 230p.

CHATELET, P.; MICHAUX-FERRIÈRE, N.A.; DUBLIN, P. Embryogenic potential in nucellus and inner integument tissue-cultures of immature cacao seeds. **Comptes Rendus des Sceances de l'Academie Sciences. Serie III: Sciences de la Vie**, Paris, France, v.315, n.2, p.55-62, juil. 1992.

CHRISTIANSON, M.L.; WARNICK, D.A. Organogenesis *in vitro* as a developmental process. **HortScience**, Alexandria, Virginia, v.23, p.515-519, 1988.

CID, B.L.P. Regeneração de plantas de *Elaeis oleifera* e de seu híbrido com *Elaeis guineensis* via embriogênese somática. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.22, n.1, p.109-113, jan. 1987.

COLLINS, G.B.; GROSSER, J.W. Culture of embryos. In: VASIL, I.K. (Ed.). **Cell culture and somatic cell genetics of plants**. New York: Academic Press, 1984. v.1, p.241-257.

CONGER, B.V. et al. Direct embryogenesis from mesophyll cells of orchardgrass. **Science**, Washington, v.221, n.4613, p.850-851, 1983.

CORAL, R. da S.P. **A fruticultura paraense**. Belém: Secretaria de Estado de Agricultura, 1998. p.6-9.

CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1986. p.747.

CRESPO, L.E. de C. **Técnicas de clonagem *in vitro* de pupunha (*Bactris gasipaes* H.B.K.)**. 1997. 71f. Dissertação (Mestrado em produção Vegetal)-Universidade Estadual Norte Fluminense, Rio de Janeiro, 1997.

CUATRECASAS, J. Cacao and its allies a taxonomic revision of the genus *Theobroma*. **Cont. from the United States Natural Herbarium**, v.35, n.6, p.375-613, 1964.

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

DEL ROSÁRIO, A.G.; DE GUZMAN, E.V. The status of plant tissue culture of economically important plants. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF TISSUE CULTURE OF ECONOMICALLY IMPORTANT PLANTS, 1982, Singapore. **Proceedings...** Singapore: COSTED/UNESCO/SBIOL., 1982. p.293-294.

DIAS, L.A. dos S. Biotecnologia e melhoramento genético do cacauero (*Theobroma cacao* L.). **Agrotropica**, Itabuna, Bahia, v.7, n.1, p.1-14, jan./abr. 1995.

DRIRA, N.; BENBADIS, A. Multiplication végétative du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) par réversion, em culture *in vitro*, d'ébauches florales de pieds femelles. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.119, n.3, p.227-235, July/Sept. 1985.

DUCKE, A. **As espécies brasileiras do gênero *Theobroma* L.** Belém: Instituto Agrônômico do Norte, 1953. 89p. (Boletim técnico, 8)

DUFOUR, M.; DUBLIN, P. Quelques données sur la multiplication végétative *in vitro* des cacaoyers cultivés (*Theobroma cacao*). **Café Cacao Thé**, Paris, France, v.29, n.4, p.235-244, oct./déc. 1985.

EEUWENS, C.J. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut (*Cocos nucifera*) and date (*Phoenix dactylifera*) palms cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.36, n.1, p.23-28, 1976.

ELHAG, H.M.; WHIPKEY, A.; JANICK, J. Induction of somatic embryogenesis from callus in *Theobroma cacao* in response to carbon source and concentration. **Revista Theobroma**, Itabuna, Bahia, v.17, n.3, p.153-162, jul./ago, 1987.

EL-HENNAWY, H.M.; WALLY, Y.A. Vegetative propagation of date palm *Phoenix dactylifera* L. by explant culture *in vitro*. **Egyptian Journal of Horticulture**, Cairo, v.7, p.211-220, 1980.

ESAN, E.B. Tissue culture studies on cocoa (*Theobroma cacao* L.) In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON CACAO RESEARCH, 15., 1975, Ibadan, Nigéria. **Proceedings...** Nigéria, 1975. p.116-124.

FERREIRA, A.T.; 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. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CNPQ, 1998. v.1, p.21-24.

FIGUEIRA, A.; JANICK, J. Development of nucellar somatic embryos of *Theobroma cacao*. **Acta Horticulturae**, Hague, Netherlands, n.336, p.231-238, 1993.

FIRN, R.D. Growth substance sensitivity: a need for clear ideas, precise terms and purposeful experiments. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.67, p.267-272, 1986.

FISHER, J.B.; TSAI, J.H. *In vitro* growth of embryos and callus of coconut palm. **In Vitro**, Ard More, OK, v.14, p.307-311, 1978.

FLICK, C.E.; EVANS, D.A.; SHARP, W.R. Organogenesis. In: EVANS, D.A. et al. (Eds.). **Handbook of plant cell culture: techniques for propagation and breeding**. New York: Macmillan, 1983. v.1, p.13-81.

FLORES, R. **Calogênese e morfogênese a partir de discos foliares de morangueiro** (*Fragaria x ananassa* Duch.) cv. Vila Nova. 1999. 73f. Dissertação (Mestrado em Ciências)-Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1999. 73p.

FLYNN, W.P.; GLICENSTEIN, L.J.; FRITZ, P.J. *Theobroma cacao* L.: an axillary bud *in vitro* propagation procedure. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, Netherlands, v.20, p.111-117, 1990.

FRIDBORG, G. et al. The effect of activated charcoal on tissue cultures: adsorption of metabolites inhibiting morphogenesis. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.43, n.2, p.104-106, Feb. 1978.

GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v.50, p.151-158, 1968.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa-CNPQ, 1998. v.1, p.183-260.

GUERRA, M.P. **Embriogênese somática em *Euterpe edulis* Mart.** (Palmae). 1989. 233f. Tese (Doutorado em Ciências)-Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1989.

GUERRA, M.P.; HANDRO, W. Somatic embryogenesis and plant regeneration in embryo cultures of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae). **Plant Cell Reports**, New York, v.7, p. 550-552, 1988.

GUERRA, M.P.; HANDRO, W. Somatic embryogenesis in tissue cultures. In: AHUJA, M.R.(Ed.). **Woody plant biotechnology**. New York: Plenum Press, 1991, p.189-196.

GUERRA, M.P.; HANDRO, W. Somatic embryogenesis and plant regeneration in different organs of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae): control and structural features. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v.111, n.1101, p.65-71, Mar. 1998.

GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CNPQ, 1999. v.2, p.533-568.

GUPTA, P.K. et al. Somatic embryogenesis and plants from zygotic embryos of coconut (*Cocos nucifera* L.) *in vitro*. **Plant Cell Reports**, New York, v.3, n.6, p.222-225, 1984.

HALL, T.R.; COLLIN, H.A. Initiation and growth of tissue cultures of *Theobroma cacao*. **Annals of Botany**, London, v.39, n.5, p.555-570, Nov. 1974.

HICKS, G.S. Patterns of organ development in plant tissue culture and the problem of organ determination. **The Botanical Review**, New York, v.46, n.1, p.1-23, Mar. 1980.

HOMMA, A.K.O. **A extração de recursos naturais renováveis: o caso do extrativismo vegetal na Amazônia**. 1989. 575f. Tese (Doutorado em Economia Rural)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1989.

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: EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CNPH, 1998. v.1, p.371-393.

JANICK, J.; WHIPKEY, A. Somatic embryogenesis in *Theobroma grandiflorum*. **HortScience**, Alexandria, Virginia, v.23, p.807, 1988.

JANICK, J.; WRIGHT, D.C.; HASEGAWA, P.M. *In vitro* production of cacao seed lipids. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Geneva, New York, v.107, n.5, p.919-922, 1982.

JARDIM, M.A.G.; OASHI, S.T.; LAMEIRA, O.N. **Cartilha informativa sobre a palmeira açai (*Euterpe oleracea* Mart.)**. Belém: MPEG, 1995. 11p.

KAHN, F. **The palms of eldorado**. Orstom: Editions Champflour/International Palm Society, 1997. p.40-135.

KARUNARATNE, S.; GAMAGE, C.; KOVOOR, A. Leaf maturity, a critical factor in embryogenesis. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.139, n.1, p.27-31, Jan./Mar. 1991.

KARUNARATNE, S.; KURUKULAARACHCHI, C.; GAMAGE, C. A report on the culture of embryos of dwarf coconut, *Cocos nucifera* L. var *nana*, *in vitro*. **Cocos**, Sri Lanka, v.3, p.1-8, 1985.

KERBAUY, G.B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CNPH, 1999. v.2, p.519-531.

KERBAUY, G.B. Cultura de raízes e regeneração de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CNPQ, 1998. v.1, p.161-181.

KONONOWICZ, A.K.; JANICK, J. The influence of carbon source on the growth and development of asexual embryos of *Theobroma cacao*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.61, n.1, p.155-162, Jan. 1984.

KRIKORIAN, A.D.; BERQUAM, D.L. Plant cell and tissue culture: the role of Haberlandt. **The Botanical Review**, New York, v.35, n.1, p.59-88, Mar. 1969.

LEMONS, O.F. de. et al. **Cultura de embriões zigóticos de açaizeiro** (*Euterpe oleracea* Mart.). Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 1999. 15p. (Embrapa Amazônia Oriental. Boletim de Pesquisa, 23).

LHERAS, E.; GIACOMETTI, D.C.; CORADIN, L. Áreas críticas de distribución de palmas en las américas para coleta, evaluación y conservación. In: REUNIÓN DE CONSULTA SOBRE PALMERAS POCO UTILIZADAS DE AMÉRICA TROPICAL, 1983, Turrialba. **Informe...** Turrialba: FAO, 1983. p.67-101.

LI, Z.J. et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration from floral explants of cacao (*Theobroma cacao* L.) using thidiazuron. **In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant**, Oxon, United Kingdom, v.34, n.4, p.293-299, Oct./Dec. 1998.

LINSMAIER, E.M.; SKOOG, F. Organic growth factor requirements of tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.18, p.100-127, 1965.

LIORÉ, C.; OLLAGNIER, M. La culture *in vitro* de tissus chez le palmier à huile. **Oléagineux**, Montpellier, France, v.36, n.3, p.111-112, mars 1981.

LLANO-AGUDELO, B.E.; GONZALEZ-ROSAS, H.; SALAZAR-GARCIA S. *In vitro* culture of mature avocado embryos. **Fruits**, Paris, v.50, n.1, p.59-64, jan./fév. 1995.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tips cultures. **Combined Proceedings International Plant Propagators Society**, v.30, p.421-427, 1980.

LOPES, S.C. **Micropropagação do mogno** (*Swietenia macrophylla* King). 2000. 54f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2000. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2000.

LOPEZBAEZ, O. et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration from flower parts of cocoa *Theobroma cacao* L. **Comptes Rendus des Sciences de l'Académie des Sciences. Serie III:Sciences de la Vie**, Paris, France, v.316, n.6, p.579-584, juin 1993.

LOUTFI, K.; CHLYAH, H. Vegetative multiplication of date palm *in vitro* cultured inflorescences: effect of some growth regulator combinations and organogenetic potential of various cultivars. **Agronomie**, Paris, France, v.18, n.8-9, p.573-580, oct./nov.1998.

LU, C. The use of thidiazuron in tissue cultures. **In Vitro, Cellular and Developmental Biology Plant**, Oxon, United Kingdom, v.29, n.2, p.92-96, Apr./June 1993.

MADHURI, S.; SHANKAR, P.C.; SHARON, M. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf primordia of *Phoenix dactylifera* cv. Yakubi. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v.36, n.5, p.526-529, May 1998.

MARBACH, P.A.S.; TEIXEIRA, J.B. Regeneração de plantas de cacau (*Theobroma cacao* L.) via embriogênese somática. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v.11, p.168-169, jun.1999. Suplemento.

MOK, M.C. et al. Biological and biochemical effects of cytokinin-active phenylurea derivatives in tissue culture systems. **HortScience**, Alexandria, Virginia, v.22, n.6, p.1194-1197, 1987.

MONNIER, M. Culture of zygotic embryos. In: THORPE, T.A. (Ed.) **In vitro embryogenesis in plants**. Calgary: University of Calgary, 1995. p.117-153.

MOORE, T.C. **Biochemistry and physiology of plant hormones**. Berlin: Springer-Verlag, 1979. 197p.

MOREL, G.; WETMORE, R.H. Tissue culture of monocotyledons. **American Journal of Botany**, Ithaca, New York, v.38, n.2, p.138-140, Feb. 1951.

MOTT, R.L. Technology of tree tissue culture. In: CONGER, B.V. (Ed.) **Cloning agricultural plants via in vitro techniques**. Florida: CRC Press, 1981. p.224-225.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, CA, v.25, p.135-166, 1974.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, n.3, p.473-497, Mar. 1962.

NDOUMOU, D.O.; NDZOMO, G.T.; NIEMENAK, N. Phenol content, acidic peroxidase and IAA-oxidase during somatic embryogenesis in *Theobroma cacao* L. **Biologia Plantarum**, Prague, v.39, n.3, p.337-347, June/July 1997.

NOGUEIRA, O.L. **Regeneração, manejo e exploração de açazeiros nativos de várzea do estuário amazônico**. 1997. 149f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas)-Universidade Federal do Pará, Belém, 1997. 149p.

NWANKWO, B.A.; KRIKORIAN, A.D. Morphogenetic potential of embryo and seedling-derived callus of *Elaeis guineensis* Jacq. var. *pisifera* Becc. **Annals of Botany**, London, v.51, n.1, p.65-76, July 1983.

OLIVEIRA, M. do S.P. Açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.). In: EMBRAPA. Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental. (Ed.). **Programa de melhoramento genético e de adaptação de espécies vegetais para a Amazônia Oriental**. Belém, 1999. 137p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 16).

ORCHARD, J.E.; COLLIN, H.A.; HARDWICK, K. Culture of shoot apices of *Theobroma cacao*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.47, n.4, p.207-210, 1979.

O SABOR marajoara. **Beira do Rio**. Belém, n.35, dez. 1992. 15p. Edição especial.

PASQUAL, M.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J.D. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações : introdução: fundamentos básicos**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. p.7-45.

PASSEY, A.L.; JONES, O.P. Shoot proliferation and rooting *in vitro* of *Theobroma cacao* L., type 'melonado'. **The Journal of Horticultural Science**, Ashford Kent, England, v.58, n.4, p.589-592, July/Aug. 1983.

PENCE, V.C. Cryopreservation of immature embryos of *Theobroma cacao*. **Plant Cell Reports**, New York, v.10, n.3, p.144-147, June 1991.

PENCE, V.C.; HASEGAWA, P.M.; JANICK, J. Asexual embryogenesis in *Theobroma cacao* L. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Geneva, New York, v.104, n.2, p.145-148, 1979.

PENCE, V.C.; HASEGAWA, P.M.; JANICK, J. Sucrose-mediated regulation of fatty acid composition in asexual embryos of *Theobroma cacao*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.53, n.3, p.378-384, 1981.

PINEDO PANDURO, M.H. **Organogénesis directa en ápices caulinares de pejibaye** (*Bactris gasipaes* H.B.K.). 1987. 110f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrícolas e Recursos Naturais)-Centro Agronômico Tropical de Investigación y Enseñanza, Turrialba, 1987.

PIOUS, T.; RAVINDRA, M.B. Shoot tip culture in mango: influence of medium, genotype, explant factors, season and decontamination treatments on phenolic exudation, explant survival and axenic culture establishment. **Journal of Horticultural Science**, Geneva, New York, v.72, n.5, p.713-722, Sept./Oct. 1997.

RABÉCHAULT, H.; AHÉE, J.; GUÉNIN, G. Colonies cellulaires et formes embryoides obtenues *in vitro* à partir de cultures d'embryons de palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq. vr. dura Becc.). **Comptes Rendus des Seances de l'Académie des Sciences. Série D: Sciences Naturelles**, Paris, France, v.270, p.3067-3070, 1970.

RABÉCHAULT, H.; MARTIN, J.P. Multiplication végétative du palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) l'aide de cultures de tissus foliaires. **Comptes Rendus des Seances de l'Académie des Sciences. Série D: Sciences Naturelles**, Paris, France, v.283, p.1735-1737, 1976.

REUVENI, O.; LILIEN-KIPNIS, H. **Studies of the *in vitro* culture of date palm** (*Phoenix dactylifera* L.) **tissue and organs**. Bet Dagan: Volcani Institute Agricultural Research, 1974. 40p. (Pamphlet, 145).

REYNOLDS, J.F. Vegetative propagation of palm trees. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. (eds.). **Tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1982. p.182-207.

REYNOLDS, J.F.; MURASHIGE, T. Asexual embryogenesis in callus cultures of palm. **In Vitro**, Ard More, OK, v.15, n.5, p.383-387, May 1979.

RHISS, A.; POULAIN, C.; BEAUCHESNE, G. La culture *in vitro* appliquée à la multiplication végétative du palmier-dattier (*Phoenix dactylifera* L.). **Fruits**, Paris, France, v.34, n.9, p.551-554, sept. 1979.

ROBLES, M.J.M. **Possibilidad de utilizar las técnicas *in vitro* en algunas palmeras de la amazonia peruana**. In: ANEXO, 10, Lima, Peru, p.161-163, 1983.

RODRIGUES, E.F. **Desenvolvimento do eixo embrionário *in vitro* e calogênese de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum.) e estabelecimento do ápice caulinar de bacuri (*Platonia insignis* Martius).** 2000, 70f. Tese (Doutorado em Agronomia)-Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2000.

RODRIGUEZ, J.A.A. Produção de embriões em dendê a partir da cultura de embriões imaturos. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v.1, n.1, p.119-120, 1989.

SCOTT, A.J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Raleigh, v.30, n.3, p.507-512, Sept. 1974.

SHARMA, D.R.; DAERA, S.; CHOWDHURY, J.B. Somatic embryogenesis and plant regeneration in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Khadravi through tissue culture. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, Indian, v.22, p.596-598, 1984.

SHARMA, D.R.; KUMARI, R.; CHOWDHURY, J.B. *In vitro* culture of female date palm (*Phoenix dactylifera* L.) tissues. **Euphytica**, Dordrecht, Netherlands, v.29, n.1, p.169-174, Jan./Mar. 1980.

SHARP, W.R. et al. The physiology on *in vitro* asexual embryogenesis. **Horticultural Reviews**, Westport, CT, v.2, p.268-310, 1980.

SIEGEL, S.; CASTELLAN JR., N.J. **Nonparametric statistics for the behavioral sciences**. New York, Mc Graw-Hill, 245p, 1988.

SIQUEIRA, E.R. de. **Perspectivas da propagação vegetativa do coqueiro por meio da cultura de tecidos**. 1988. 65f. Tese (Doutorado em Ciências Florestais)-Universidade Federal do Paraná, 1988. 65p.

SIQUEIRA, E.R. de.; INOUE, M.T. Controle da oxidação na cultura de tecidos do coqueiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.26, n.7, p.949-953, jul. 1991.

SIQUEIRA, G.C.L. et al. **Açaí: produtos potenciais da Amazônia**. Brasília: MMA/SUFRAMA/SEBRAE/GTA, 1998a. 51p.

SIQUEIRA, G.C.L. et al. **Cupuaçu: produtos potenciais da Amazônia**. Brasília: MMA/SUFRAMA/SEBRAE/GTA, 1998b. 46p.

SKOOG, F.; MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, v.11, p.118-130, 1957.

SMITH, W.K.; THOMAS, J.A. The isolation and *in vitro* cultivation of cells of *Elaeis guineensis*. **Oléagineux**, Montpellier, France, v.28, n.3, p.123-127, mars 1973.

SONDAHL, M.R. et al. Cacao somatic embryogenesis. **Acta Horticulturae**, Hague, Netherlands, n.336, p.245-248, 1993.

SONDAHL, M.R.; TEIXEIRA, J.B. Tissue culture of palms. In: CROCOMO, O.J.; SHARP, W.R.; MELO, M. (Eds.). **Biotechnologia para produção vegetal-Biotechnology for plant production**. Piracicaba: CEBTEC/FEALQ, 1991. p. 205-248.

SOUZA, A.G.C.; GUIMARÃES, R.R.; NUNES, C.D.M. **Melhoramento genético do cupuaçuzeiro** (*Theobroma grandiflorum* (Willd ex Spreng) Schum). Manaus: EMBRAPA-CPAA, 1992.4p (EMBRAPA-CPAA.Pesquisa em andamento, 12).

SOUZA, A.G.C. et al. **Fruteiras da amazônia**. Manaus: EMBRAPA-CPAA, 1996. 204p.

STEIN, M. ***In vitro* cultures of the pejibaye palm** (*Bactris gasipaes* H.B.K.). 1988. 187f. Dissertação (Mestrado)-Ames: Iowa State University, Iowa, 1988.

STEIN, M.; STEPHENS, C. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and activated charcoal on somatic embryogenesis of *Bactris gasipaes* H.B.K. **Turrialba**, San Jose, Costa Rica, v.41, n.2, p.196-201, abr./jun. 1991.

TEIXEIRA, J.B.; SONDAHL, M.R.; KIRBY, E.G. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of oil palm. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Lisse, Netherlands, v.34, n.3, p. 227-233, Sept. 1993.

TEIXEIRA, J.B.; SONDAHL, M.R.; KIRBY, E.G. Somatic embryogenesis from immature inflorescences of oil palm. **Plant Cell Reports**, New York, v.13, n.5, p.247-250, Feb. 1994.

THORPE, T.A. Organogenesis *in vitro*: structural, physiological and biochemical aspects. In: VASIL, I.K. (Ed.). **Perspectives in plant cell and tissue culture**. New York: Academic Press, 1980. p.71-111.

TISSERAT, B. Clonal propagation: palms. In: VASIL, I.K. (Ed.) **Cell culture and somatic cell genetics of plants**. New York: Academic Press, 1984a. v.1, p.74-81.

TISSERAT, B. Date palm. In: SHARP, W.R. (Eds.). **Handbook of plant cell culture: crops species**. New York: Macmillan, 1984b. v.2, p.505-545.

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

TISSERAT, B. Propagation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) *in vitro*. **Journal Experimental Botany**, Oxford, v.30, n.119, p.1275-1283, Dec. 1979.

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; FERREIRA, A.T. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CNPH, 1998. v.1, p.11-20.

VALVERDE, R.; ARIAS, O. Efecto morfogénico del picloram em ápices de pejibaye (*Guilielma gasipaes*) cultivados *in vitro*. **Agronomía Costarricense**, San Jose, Costa Rica, v.13, n.2, p.189-192, ago.-dic. 1989.

VASIL, I.K. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cereals and grasses. In: FUJIWARA, A. (Ed.). **Plant tissue culture**. Tokyo: Mazuren, 1982. p.101-103.

VENTURIERI, G.A. **Cupuaçu**: a espécie, sua cultura, usos e processamento. Belém: Clube do Cupu, 1993. 108p.

VERDEIL, J.L. et al. Embriogenèse somatique du cocotier (*Cocos nucifera* L.): obtention de plusieurs clones de vitroplants. **Oléagineux**, Montpellier, v.47, n.7, p.465-467, juil. 1992.

VERDEIL, J.L. et al. Plant regeneration from cultured immature inflorescences of coconut (*Cocos nucifera* L.): evidence for somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**, New York, v.13, p. 218-221, 1994.

WAREING, P.F.; AL-CHALABI, T. Determination in plant cells. **Biologia Plantarum**, Prague, v.27, p.241-248, 1985.

WAREING, P.F.; PHILLIPS, I.D.J. **Growth and differentiation in plants**. Oxford: Pergamon, 1982. 343p.

WEATHERHEAD, M.A.; BURDON, J.; HENSHAW, G.G. Some effects of activated charcoal as an additive plant tissue culture media. **Zeitschrift fuer Pflanzenphysiologie**, v.89, p.141-147, 1978.

WEN, M.C.; KINSELLA, J.E. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration of *Theobroma cacao*. **Food Biotechnology**, Ithaca, New York, v.5, n.2, p.119-137, 1991.

WHITE, P.R. Controlled differentiation in a plant tissue culture. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, Lawrence, Kansas, v.66, n.8, p.507-513, Nov. 1939.

WILLIAMS, E.S.; MAHESWARAN, B. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany**, London, v.57, n.4, p.443-462, Oct./Dec. 1986.

YEOMAN, M.M. Early development in callus culture. **International Review of Cytology**, v.29, p.383-409, 1970.

YOKOO, E.Y.; RAMOS, L.C.S.; BOVI, M.L.A. **Cultura de tecidos de híbridos e espécies de palmito no instituto agrônomo**. Campinas: IAC, 1992. 24p. (IAC. Boletim científico, 25)

ZIMMERMANN, J.L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **The Plant Cell**, Rockville, MD, v.5, n.10, p.1411-1423, 1993.