

### Boletim de Pesquisa 34 e Desenvolvimento ISSN 0101-5516 Abril, 2002

Embriogênese Somática e Regeneração de Plantas em Açaizeiro





#### República Federativa do Brasil

Fernando Henrique Cardoso Presidente

#### Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Marcus Vinícius Pratini de Moraes Ministro

#### Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa

#### Conselho de Administração

Márcio Fortes de Almeida Presidente

Alberto Duque Portugal Vice-Presidente

Dietrich Gerhard Quast José Honório Accarini Sérgio Fausto Urbano Campos Ribeiral Membros

#### Diretoria-Executiva da Embrapa

Alberto Duque Portugal Diretor-Presidente

Bonifácio Hideyuki Nakasu Dante Daniel Giacomelli Scolari José Roberto Rodrigues Peres Diretores-Executivos

#### **Embrapa Acre**

Ivandir Soares Campos Chefe-Geral

Milcíades Heitor de Abreu Pardo Chefe-Adjunto de Administração

João Batista Martiniano Pereira Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Evandro Orfanó Figueiredo Chefe-Adjunto de Comunicação, Negócios e Apoio



# Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 34

# Embriogênese Somática e Regeneração de Plantas em Açaizeiro

Ana da Silva Ledo Osmar Alves Lameira Ilmarina Campos de Menezes Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

#### Embrapa Acre

Rodovia BR-364, km 14, sentido Rio Branco/Porto Velho

Caixa Postal, 321

Rio Branco, AC, CEP 69908-970

Fone: (68) 212-3200 Fax: (68) 212-3284

http://www.cpafac.embrapa.br sac@cpafac.embrapa.br

#### Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Murilo Fazolin

Secretária-Executiva: Suely Moreira de Melo

Membros: Ana da Silva Ledo, Celso Luís Bergo, Claudenor Pinho de Sá, Cleísa Brasil da Cunha Cartaxo\*, Edson Patto Pacheco, Elias Melo de Miranda, Evaldo Muñoz Braz, Flávio Araújo Pimentel\*, Hélia Alves de Mendonça, João Alencar de Sousa, José Tadeu de Souza Marinho, Judson Ferreira Valentim, Lúcia Helena

de Oliveira Wadt, Luís Cláudio de Oliveira, Marcílio José Thomazini

\*Revisores deste trabalho

Supervisão editorial: Claudia Carvalho Sena / Suely Moreira de Melo Revisão de texto: Claudia Carvalho Sena / Suely Moreira de Melo Normalização bibliográfica: Luiza de Marillac Pompeu Braga Gonçalves

Tratamento de ilustrações: Fernando Farias Sevá Editoração eletrônica: Fernando Farias Sevá

#### 1ª edição

1ª impressão (2002): 300 exemplares

#### Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

#### Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

Embrapa Acre.

Ledo, Ana da Silva.

Embriogênese somática e regeneração de plantas em açaizeiro. / Ana da Silva Ledo, Osmar Alves Lameira e Ilmarina Campos de Menezes. – Rio Branco: Embrapa Acre. 2002.

22 p.: il.; 22 cm. – (Embrapa Acre. Boletim de Pesquisa; 34).

1. Embriogênese. 2. Regeneração artificial. 3. Açaí . 4. Euterpe oleracea. I. Lameira, Osmar Alves. II. Menezes, Ilmarina Campos de. III. Título. IV. Série

CDD 634.9745

#### Sumário

Resumo	5
Abstract	7
Introdução	9
Material e Métodos	10
Material Vegetal	10
Indução de Culturas Embriogenéticas	12
Manutenção e Multiplicação de Culturas	
Embriogenéticas	12
Desenvolvimento, Maturação e Conversão	
de Embriões Somáticos	13
Condições de Cultura	13
Resultados e Discussão	13
Conclusões	20
Referências Bibliográficas	21

### Embriogênese Somática e Regeneração de Plantas em Açaizeiro

Ana da Silva Ledo<sup>1</sup> Osmar Alves Lameira<sup>2</sup> Ilmarina Campos de Menezes<sup>3</sup>

#### Resumo

O objetivo do presente trabalho foi estudar as diferentes respostas morfogenéticas de embriões zigóticos de açaizeiro (Euterpe oleracea Mart.) submetidos a várias condições de cultura in vitro. Os experimentos foram conduzidos em laboratório com material vegetal coletado de plantas de acaí da Embrapa Amazônia Oriental. Belém, PA, Brasil. Verificou-se a expressão de um modelo de embriogênese somática direto, repetitivo e assincronizado em embriões zigóticos maduros cultivados em meio primário MS suplementado com 339,36 ?M de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e transferidos para meio secundário MS na presença de 0.537 ? M de ácido 1-naftalenoacético (ANA) e 12,30 ? M de 2-isopenteniladenina (2iP). A conversão de embriões somáticos em plântulas foi alcançada aos 210 dias da inoculação com a transferência das culturas para um terceiro meio com a concentração de sais e sacarose reduzida à metade e na ausência de reguladores de crescimento.

Termos para indexação: *Euterpe oleracea* Mart., micropropagação, cultura de tecidos, embriões somáticos.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>Eng. agrôn., D.Sc., Embrapa Acre, Caixa Postal 321, 69908-970, Rio Branco, AC, analedo@cpafac.embrapa.br

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup>Eng. agrôn., D.Sc., Embrapa Amazônia Oriental, Caixa Postal 48, 66017-970, Belém, PA, osmar@cpatu.embrapa.br

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup>Eng. agrôn., M.Sc., Embrapa Amazônia Oriental, ilmarina@cpatu.embrapa.br

# Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration of Açai Palm

#### Abstract

The aim of this work was to study the morphogenetic responses of zygotic embryos açai palm (Euterpe oleracea Mart.) submitted to several conditions of in vitro culture. Several research experiments were conducted, in laboratory, using vegetable material collected from açai palm plants at Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, Brazil. It was possible to verify the expression of a direct, repetitive and non-synchronized model of somatic embryogenesis in mature zygotic embryos cultivated in primary MS medium supplemented with 2,4-D (339.36 ?M) and transferred to a secondary MS medium in the presence of NAA (0.537 ?M) and 2iP (12.30 ?M). The conversion of somatic embryos in seedlings was reached with the transfer of the cultures to a third medium with sucrose and mineral salt concentrations reduced to half, without growth regulators starting at 210-day-old.

Index terms: Euterpe oleracea Mart., micropropagation, tissue culture, somatic embryos.

#### Introdução

Dentre as diversas espécies nativas da Amazônia, destaca-se o açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.), tendo em vista suas diferentes possibilidades de uso e seu grande potencial para comercialização de produtos e subprodutos, frutos e palmito, no mercado nacional e internacional. Entretanto, o uso de técnicas inadequadas de propagação e a ausência de material genético melhorado têm contribuído negativamente para a exploração racional e econômica desta espécie (Alves et al., 1998; Oliveira, 1999).

Inúmeras justificativas têm sido reportadas ao uso de técnicas de cultura in vitro em palmeiras como uma prática auxiliar para estudos morfogenéticos e para acelerar programas de melhoramento genético. No caso de palmeiras, os programas de melhoramento são demorados e complexos devido ao longo ciclo, hábito de crescimento e ausência de métodos convencionais de propagação vegetativa. Neste contexto, a cultura de tecidos, quando integrada a um programa de melhoramento, torna-se um instrumento valioso na obtenção de plantas livres de vírus, na propagação vegetativa in vitro para clonagem rápida de genótipos superiores, na preservação e intercâmbio de germoplasma e no melhoramento genético (Ferreira et al., 1998).

Não existem informações sobre a propagação in vitro de açaizeiro; os estudos têm sido direcionados para *Cocos nucifera*, *Phoenix dactilyfera* e *Elaeis guineensis*, que apresentam grande impacto econômico nos mercados internacionais. Em geral, dois processos básicos têm sido utilizados para a cultura de tecidos de palmeiras: a) embriogênese somática e organogênese direta ou indireta; b) reversão de meristemas de inflorescências jovens para o estágio vegetativo (Tisserat, 1987).

O objetivo do presente trabalho foi estudar as respostas morfogenéticas de embriões zigóticos de *E. oleracea* Mart. submetidos a várias condições de cultura in vitro.

#### Material e Métodos

As atividades foram conduzidas no Laboratório de Recursos Genéticos e Biotecnologia da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, conforme fluxograma apresentado na Fig. 1.

#### **Material Vegetal**

Foram utilizados embriões zigóticos maduros excisados de frutos, com peso médio de 2,17 g, obtidos da coleção de germoplama da Embrapa Amazônia Oriental. Os frutos foram lavados em água corrente e imersos em água morna (40°C), para despolpamento. As sementes foram submetidas ao processo de desinfestação em câmara de fluxo laminar, com a imersão em etanol a 70%, por dois minutos, seguida da imersão em solução de hipoclorito de sódio a 2%, por 20 minutos sob agitação, e lavadas quatro vezes em água esterilizada.

#### Coleta e Despolpamento de Frutos

- Lavagem em água corrente.
- Imersão em água morna (40°C).

## Desinfestação das Sementes

- Imersão em etanol a 70% –
  2 min.
- Imersão em NaOCI 2% 20 min.
- Lavagem em H₂O esterilizada
   4 x.

#### Excisão de Embriões Zigóticos - EZs



#### Indução de Culturas Embriogenéticas - CEs

 Inoculação de EZs em meio de cultura MS suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D.

#### Manutenção e Multiplicação de CEs

- Transferência das CEs para meio de cultura MS + 0,537 μM ANA + 12,30 μM 2iP.

#### Desenvolvimento, Maturação e Conversão de Embriões Somáticos

 Transferência das CEs para meio de cultura ½ MS sem regulador de crescimento.

**Fig. 1.** Fluxograma da metodologia adotada para regeneração de plântulas, por embriogênese somática, a partir de embriões zigóticos maduros de *Euterpe oleracea* Mart.

#### Indução de Culturas Embriogenéticas

Os embriões zigóticos, excisados das sementes, foram inoculados em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com 0,6% de ágar, 0,25% de carvão ativado, 3% de sacarose, 500 mg.L<sup>-1</sup> de caseína hidrolisada e com diferentes concentrações de 2,4-D (113,12; 226,24; 339,36; 454,48; 565,61; 678,73 ?M). O meio de cultura teve o pH ajustado para 5,8 e, em seguida, foi submetido à esterilização em autoclave a 120?C durante 15 minutos.

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 morfogenéticas e as porcentagens de explantes com calo, estruturas pró-embriogenéticas e embriões somáticos globulares.

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.

#### Manutenção e Multiplicação de Culturas Embriogenéticas

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

As culturas pró-embriogenéticas 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 ?M de ANA e de 12,30 ?M de 2iP.

Aos 60 dias da transferência, avaliaram-se a freqüência embriogenética obtida pela porcentagem de culturas embriogenéticas em relação ao total de explantes do meio primário (A), o número de embriões somáticos por explante (B) e a eficiência embriogenética (A x B)/100 (Lazzeri et al., citados por Guerra, 1989). As avaliações qualitativas consistiram da caracterização dos estágios embriogenéticos e do comportamento das culturas.

# 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, convertendo-os posteriormente em plântulas, as culturas embriogenéticas foram transferidas para meio terciário aos 150 dias de cultura.

As culturas foram inoculadas em frascos de vidro com capacidade de 200 mL, contendo 40 mL de meio de cultura ½ MS, com 0,6% de ágar e 1% de sacarose, na ausência de reguladores de crescimento.

Aos 60 dias da transferência, avaliaram-se a freqüência embriogenética obtida pela porcentagem de culturas embriogenéticas 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 embriogenéticos e do comportamento das culturas.

#### Condições de Cultura

No período inicial de sete dias, as culturas foram mantidas em sala de crescimento, na ausência de luz para prevenir a oxidação, com temperatura de 26°C ± 2°C, umidade relativa do ar em torno de 70%. Depois desse período, foram mantidas em fotoperíodo de 16 horas de luz branca fria (52 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> de irradiância)/8 horas de escuro.

#### Resultados e Discussão

Foram observadas diferentes respostas morfogenéticas de embriões zigóticos maduros de açaizeiro cultivados in vitro em função da concentração de 2,4-D aos 80 dias de cultura (Tabela 1).

**Tabela 1.** Respostas morfogenéticas de embriões zigóticos maduros de *Euterpe oleracea* Mart., cultivados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D, aos 80 dias de cultura.

2,4-D (μM)	Nº de explantes com resposta <sup>1</sup>	% de conversão em plântulas normais <sup>2</sup>	% de explantes com estruturas granulares <sup>2</sup>	% de explantes com embriões globulares <sup>2</sup>
113,12	36	100,0	0	O
226,24	29	100,0	0	0
339,36	39	Ó	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

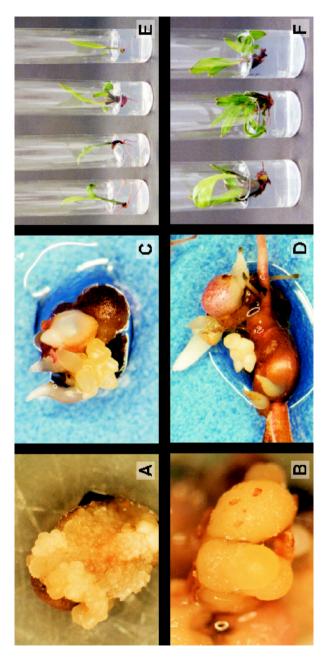
<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>Sobre o total de 45 explantes.

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

A supressão do processo de conversão de embriões zigóticos em plântulas e o aparecimento de estruturas granulares sobre a região do pecíolo cotiledonar, aos 40 dias de cultura, caracterizaram a primeira manifestação morfogenética em embriões zigóticos cultivados em meio de cultura suplementado com 339,36; 454,48 e 565,61 ?M de 2,4-D (Fig. 2A). Não se verificou a iniciação embriogenética em embriões zigóticos cultivados em meio com 678,73 ?M de 2,4-D.

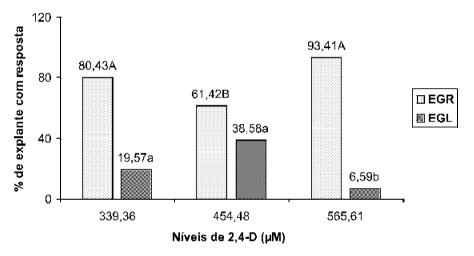
Aos 60 dias de cultura, sobre as estruturas granulares, agregados de embriões somáticos globulares típicos de coloração amarelada (Fig. 2B) foram visualizados, sendo facilmente destacados do tecido matriz.

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup>Porcentagem sobre o total de explantes com resposta morfogenética.



somáticos globulares na região do nó cotiledonar aos 60 dias de cultura (19 x), C) Massa de embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento (12.5 x), D) Formação de embriões somáticos sobre plântula recémregenerada (12.5 x), E) Plântulas desenvolvidas após o isolamento de embriões somáticos aos 240 dias de Fig. 2. A) Estruturas granulares na região do nó cotiledonar aos 40 dias de cultura (15 x), B) Embriões cultura e F) Proliferação de múltiplas plântulas.

Detectaram-se diferenças significativas entre as concentrações de 2,4-D para a porcentagem de embriões zigóticos maduros com estruturas granulares e embriões somáticos (P ? 0,01). As maiores freqüências de embriões somáticos globulares foram verificadas em explantes cultivados em meio com 454,48 e 339,36 ?M de 2,4-D (Fig. 3). Apesar da concentração de 565,61 ?M de 2,4-D ter induzido uma alta freqüência de estruturas granulares embriogenéticas, a porcentagem de explantes com embriões somáticos globulares foi baixa.



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%.

**Fig. 3.** Porcentagem de embriões zigóticos maduros de *Euterpe oleracea* Mart. com estruturas granulares (EGR) e embriões somáticos globulares (EGL) sob diferentes concentracões de 2,4-D aos 80 dias de cultura.

O comportamento morfogenético observado nas culturas de embriões zigóticos maduros de *Euterpe oleracea* Mart. pode ser caracterizado por dois aspectos: a iniciação embriogenética ocorreu diretamente a partir da formação de tecido embriogenético de aspecto granular na região do nó cotiledonar e em nenhum caso verificou-se a iniciação a partir dos tecidos da lâmina cotiledonar (haustório).

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

Apesar dos tratamentos primários com 454,48 e 565,61 ?M de 2,4-D terem induzido a iniciação de estruturas pró-embriogenéticas na fase inicial, verificaram-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 subseqüentes, aos 150 dias de cultura (Tabela 2). 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 2.** Médias da freqüência 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 ?M de ANA e 12,30 ?M de 2iP, aos 150 dias de cultura.

Meio primário (μM 2,4-D)	FRE (%) <sup>1</sup> ( <b>A</b> )	NEŞ (B)	EFE <sup>2</sup> (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

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>Média de culturas embriogenéticas em relação ao total de explantes do meio primário.

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup>Conforme Lazzeri et al., citados por Guerra (1989).

Outro aspecto a ser levantado é que o desenvolvimento embriogenético não foi sincronizado, ou seja, as culturas apresentaram embriões somáticos em diferentes estágios de desenvolvimento (Fig. 2C). Em algumas culturas, verificou-se a formação de embriões somáticos a partir dos primeiros embriões somáticos diferenciados, configurando um modelo embriogenético secundário ou repetitivo de alta freqüência e longa duração. Este mesmo padrão também foi observado por Guerra & Handro (1991 e 1998) em culturas de embriões zigóticos de *Euterpe edulis* Mart.

Os resultados obtidos concordam com Tisserat (1984a, 1984b) o qual 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<sup>-1</sup>) para meio suplementado com ANA e 2iP.

Aos 30 dias após a transferência das culturas para meio ½ MS, na ausência de reguladores de crescimento, detectaram-se o início da maturação dos embriões somáticos e, aos 60 dias, a conversão em plântulas normais. As culturas iniciadas em meio primário suplementado com 339,36 ? M de 2,4-D apresentaram alta freqüência embriogenética, bem como a progressão de embriões para a fase bipolar e a regeneração de plântulas (Tabela 3). Nas culturas inoculadas em meio primário com 454,48 ? M de 2,4-D, observaram-se uma paralisação no desenvolvimento dos embriões na fase globular e intensa oxidação. 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 morfogenética, 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. Observou-se a formação direta de embriões somáticos a partir de embriões diferenciados (Fig. 2C) e sobre plântulas recém-regeneradas (Fig. 2D).

**Tabela 3.** Médias da freqüência 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.

Meio primário (μM 2,4-D)	FRE (%)	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 по estágio globular, sem progressão das culturas

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>Média de culturas embriogenéticas em relação ao total de explantes do meio secundário.

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 comparados 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 (Fig. 2E), sendo observada a formação de múltiplas plântulas, em decorrência da embriogênese direta secundária (Fig. 2F).

Este modelo apresenta a possibilidade de obter 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 conservação in vitro de *Euterpe oleracea* Mart.

#### Conclusões

- ? A expressão de um modelo de embriogênese somática direta, repetitiva e não sincronizada e com alta eficiência e freqüência 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 ½ MS, na ausência de reguladores de crescimento.
- ? A ativação de um modelo de embriogênese somática em Euterpe oleracea Mart. é dependente do tipo e estádio fisiológico do explante e da concentração do regulador de crescimento no meio primário.

#### Referências Bibliográficas

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.

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

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. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1998. v. 1, p. 21-24.

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

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

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

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

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, Sep. 1974.

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

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

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



Acre

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO

