

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GEOMÁTICA**

**CONSERVAÇÃO *in vitro* DE *Euterpe edulis* MARTIUS
ATRAVÉS DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Cleber Witt Saldanha

Santa Maria, RS, Brasil

2007

**CONSERVAÇÃO *in vitro* DE *Euterpe edulis* MARTIUS
ATRAVÉS DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA**

por

Cleber Witt Saldanha

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Geomática, Área de Concentração de Tecnologia da Geoinformação, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Geomática

Orientadora: Profa. Dra. Maisa Pimentel Martins-Corder

Santa Maria, RS, Brasil

2007

Saldanha, Cleber Witt, 1981-

S162c

Conservação *in vitro* de *Euterpe edulis* Martius através da embriogênese somática / por Cleber Witt Saldanha ; orientador Maisa Pimentel Martins-Corder. – Santa Maria, 2007

108 f. ; il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Geomática, RS, 2007.

1. Geomática 2. Palmito 3. Micropropagação 4. Cultura de embriões 5. Conservação de germoplasma 7. Tecnologia da geoinformação I. Martins-Corder, Maisa Pimentel, orient. II. Título

CDU: 634.61

Ficha catalográfica elaborada por
Luiz Marchiotti Fernandes – CRB 10/1160
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Rurais/UFSM

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Geomática**

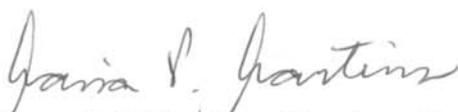
A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a dissertação de mestrado

**CONSERVAÇÃO *in vitro* DE *Euterpe edulis* MARTIUS ATRAVÉS DA
EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA**

elaborada por
Cleber Witt Saldanha

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Geomática

COMISSÃO EXAMINADORA:


Maisa Pimentel Martins-Corder, Dra.
(Presidente/Orientadora)


Dílson Antônio Bisognin, Dr. (UFSM)


Fernando Teixeira Nicoloso, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 23 de novembro de 2007.

A minha mãe
Marelaine (*in memoriam*)

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

A professora Maisa Pimentel Martins pelo profissionalismo na orientação durante a realização do mestrado.

A minha família, pelo apoio durante a realização do mestrado. E principalmente a minha mãe que sempre me incentivou a estudar.

A Universidade Federal de Santa Maria pela oportunidade de realização do curso de mestrado em Geomática.

À PETROBRAS S/A pela concessão da bolsa durante a realização do Mestrado.

Ao Fundo Nacional do Meio Ambiente pelo suporte financeiro na realização de parte deste estudo.

Ao doutorando Douglas A. Steinmacher pela amizade e colaboração na realização deste estudo.

Ao Professor Miguel Pedro Guerra pela oportunidade de realização de parte deste estudo no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal da Universidade Federal de Santa Catarina.

Aos colegas Eudes, Ruter, Enéas, Ezequiel, Thomas e ex-colegas do Laboratório de Biotecnologia Florestal da Universidade Federal de Santa Maria pela amizade e troca de idéias.

A minha namorada Vanessa, pelo apoio e compreensão durante a realização do mestrado.

Aos colegas e professores do Curso de Pós-Graduação em Geomática pela amizade adquirida.

Aos grandes amigos Carlos, Dilnei, Elias, Henrique, Lourenço, Radin e Rodrigo.

Enfim, a todos que contribuíram para a minha formação como pessoa e profissional.

Finalmente, a DEUS pelo dom da vida.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Geomática
Universidade Federal de Santa Maria

CONSERVAÇÃO *in vitro* DE *Euterpe edulis* MARTIUS ATRAVÉS DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

AUTOR: CLEBER WITT SALDANHA

ORIENTADORA: MAISA PIMENTEL MARTINS-CORDER

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 23 de novembro de 2007.

O palmitero (*Euterpe edulis* Mart.), uma espécie característica da Mata Atlântica, foi drasticamente reduzido, devido à ação antrópica em diversas populações. A exploração indiscriminada resultou em erosão genética nas populações, não permitindo mais a manutenção da estrutura demográfica, através da regeneração natural. A única forma de propagação do palmitero é através de produção de sementes, as quais não toleraram armazenamento por longos períodos. Desta maneira, o desenvolvimento de estratégias para a conservação de germoplasma tornou-se necessário. Como o palmitero não apresenta um sistema de propagação vegetativa natural, a técnica de cultura de tecidos mostrou-se adequada tanto para a conservação, quanto para a multiplicação em larga escala de germoplasma. A informação da distribuição geográfica dos recursos genéticos tem sido fundamental na formulação de estratégias de conservação *in situ*, bem como no auxílio para a coleta de material vegetal e estabelecimento de bancos de germoplasma *ex situ*. O objetivo geral do presente estudo foi elucidar alguns aspectos da embriogênese somática, e analisar a germinação *in vitro* de embriões zigóticos imaturos de palmitero, visando à conservação *ex situ* de germoplasma de palmitero. No primeiro estudo, embriões zigóticos e bainhas foliares serviram como fonte de explantes. Embriões zigóticos foram inoculados em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), suplementado com as vitaminas de Morel (MOREL e WETMORE, 1951), 2,4-D (0, 30, 35, 40 mg.L⁻¹), 3 mg.L⁻¹ de 2iP, 0,5 g.L⁻¹ de glutamina, 0,5 g.L⁻¹ de carvão ativado, 30 g.L⁻¹ de glicose ou sacarose e, geleificado com 5 g.L⁻¹ de ágar. O delineamento experimental foi em Blocos ao acaso, em que os tratamentos

constaram de quatro concentrações de 2,4-D, combinados com duas fontes de carboidrato em esquema fatorial (4x2), em 6 repetições. Cada parcela foi constituída por dois tubos de ensaio, com um embrião cada. Bainhas foliares, extraídas de plântulas germinadas *in vitro*, foram inoculadas em meio MS, suplementado com Picloram (72,3 mg.L⁻¹) ou 2,4-D (66,3 mg.L⁻¹), 3 mg.L⁻¹ de 2iP, glutamina (0; 0,29; 0,58; 1,17 g.L⁻¹), 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativado, sendo geleificado com 2,5 g.L⁻¹ de Phytigel. O delineamento foi em Blocos ao acaso, com 8 tratamentos, em 3 repetições. Cada parcela foi constituída por três placas de Petri, com 10 secções transversais das bainhas foliares. Embriões somáticos indiretos foram induzidos a partir de embriões zigóticos, em meio suplementado com 40 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 30 g.L⁻¹ de sacarose. Verificou-se elevada formação de calos em bainhas foliares, utilizando o meio MS suplementado com 1,17 g.L⁻¹ de glutamina e 66,3 mg.L⁻¹ de 2,4-D. No segundo estudo, o objetivo foi elucidar a influência da concentração salina e da sacarose no meio de cultura, durante a germinação de embriões zigóticos, e estudar a influência da adição de diferentes concentrações de Cloreto de cálcio ao meio de cultura MS, na indução de embriogênese somática, em embriões zigóticos imaturos de *E. edulis*. A avaliação da germinação *in vitro* de embriões zigóticos de *E. edulis* ocorreu através da inoculação, em meio de cultura adicionado das vitaminas de Morel, 7 g.L⁻¹ de ágar e 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativado. Os tratamentos foram diferentes concentrações do meio MS (MS e MS/2), combinados com diferentes concentrações de sacarose (20, 30 e 40 g.L⁻¹). Foi utilizado o delineamento em Blocos ao acaso, em 6 repetições, cada repetição foi constituída por cinco tubos de ensaio, contendo um embrião cada. Para a indução de embriogênese somática, embriões zigóticos imaturos foram extraídos e inoculados em meio de cultura MS, suplementado com as vitaminas de Morel, 7 g.L⁻¹ de ágar, 0,5 g.L⁻¹ de glutamina, 3 mg.L⁻¹ de 2iP, 100 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativado, além de diferentes concentrações de Cloreto de cálcio (0, 2, 4, 8, 12 mM). Utilizou-se o delineamento estatístico em Blocos ao acaso, em 6 repetições. Cada parcela foi constituída por um frasco, contendo quatro embriões zigóticos imaturos. Para a conversão dos embriões somáticos em plântulas, foram empregados o meio de cultura MS completo, e o com a metade da concentração salina original (MS/2). Verificou-se que a germinação de embriões zigóticos de palmitero não foi afetada pela concentração salina do meio de cultura e de sacarose. Entretanto, o crescimento em altura e a produção de massa fresca das plântulas foram afetados

pelos tratamentos. O aumento da concentração de sacarose, de 20 para 40 g.L⁻¹, no meio de cultura, resultou em acréscimo na massa fresca das plântulas. A composição dos diferentes meios de cultura não influenciou o número médio de raízes por plântula de palmitero. A indução de embriogênese somática em embriões zigóticos imaturos de *E. edulis* não foi influenciada significativamente pela adição de diferentes concentrações de Cloreto de cálcio ao meio de cultura, aos 60 dias. Entretanto, foram observadas diferenças significativas entre as diversas concentrações de Cloreto de cálcio, quanto ao número de embriões somáticos formados, aos 150 dias. O aumento na concentração de Cloreto de cálcio, no meio de cultura, resultou em decréscimo no número médio de embriões somáticos de palmitero produzidos. Os meios de cultura MS e MS/2 não diferiram significativamente, quanto à capacidade de germinação dos embriões somáticos. O processo de indução de embriogênese somática, em embriões zigóticos imaturos de *E. edulis*, ocorreu diretamente a partir do nó cotiledonar. O presente estudo evidenciou que a suplementação do meio de cultura (MS ou MS/2) com sacarose (30 ou 40 g.L⁻¹) foi necessária para o desenvolvimento das plântulas de palmitero, oriundas de embriões zigóticos imaturos. Resultados confirmaram a possibilidade de propagar a palmeira *E. edulis* através da embriogênese somática direta, pois foram produzidas plântulas completas, além de demonstrarem a importância da suplementação do meio de cultura com uma fonte de nitrogênio orgânico, na morfogênese *in vitro* de bainhas foliares de palmitero.

Palavras-chave: palmitero, micropropagação, cultura de embriões, conservação de germoplasma.

ABSTRACT

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Geomática
Universidade Federal de Santa Maria

***IN VITRO* CONSERVATION OF *Euterpe edulis* MARTIUS THROUGH SOMATIC EMBRYOGENESIS**

AUTOR: CLEBER WITT SALDANHA

ORIENTADORA: MAISA PIMENTEL MARTINS-CORDER

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 23 de novembro de 2007.

Heart of palm (*Euterpe edulis* Martius) is a characteristic species of Atlantic Forest. Presently, natural populations are being drastically reduced due to human action. This system of exploitation resulted in substantial genetic erosion in the populations and did not permitted the maintenance of the demographic structure through natural regeneration. The only way of heart of palm propagation was through seeds that do not tolerate storage for a long time. Then, the development of strategies for germplasm conservation has become necessary. Heart of palm does not present a natural system of vegetative propagation, then the technique of culture of tissues showed to be adequated for the conservation and multiplication of germplasm in large scale. The information of geographic distribution of genetic resources is fundamental in the formulation of strategies of *in situ* conservation and also to help in the collection of vegetal material and to establish *ex situ* germplasm banks. The main goal of this study was to elucidate some aspects of somatic embryogenesis and analyze the *in vitro* germination of immature zygotic embryos of heart of palm, aiming the *ex situ* conservation of germplasm of this species. In the first study, zygotic embryos and leaf sheaths were the explant sources. Zygotic embryos were inoculated in MS culture medium (MURASHIGE and SKOOG, 1962) supplemented with Morel vitamins (MOREL and WETMORE, 1951) 2,4-D (0, 30, 35, 40 mg.L⁻¹), 3 mg.L⁻¹ of 2iP, 0.5 g.L⁻¹ of glutamine, 0.5 g.L⁻¹ of activated charcoal, 30 g.L⁻¹ of glucose and 5 mg.L⁻¹. The delineate used in this study was in Random Blocks, in that the treatments consisted of four concentrations of 2,4-D, combined with two sources of carbohydrate in factorial scheme (4x2), in six repetitions. Each parcel was constituted by two test tubes, each one with one embryo. Leaf sheaths

extracted of *in vitro* germinated plants were inoculated in MS medium supplemented with Picloram (72.3 mg.L^{-1}) or 2,4-D (66.3 mg.L^{-1}), 3 mg.L^{-1} of 2iP, glutamine (0; 0.29; 0.58; 1.17 g.L^{-1}), 1.5 g.L^{-1} de activated charcoal and 2.5 g.L^{-1} of Phytigel. The delineate was in Random Blocks with eight treatments and three repetitions. Each parcel was constituted by three Petri plates in ten transversal sections of leaf sheaths. Indirect somatic embryos were induced from zygotic embryos in a medium supplemented with 40 mg.L^{-1} of 2,4-D and 30 g.L^{-1} of sucrose. It was verified a high formation of leaf sheaths by using MS medium supplemented with 1.17 g.L^{-1} of glutamine and 66.3 mg.L^{-1} of 2,4-D. In the second study, the objective was to elucidate the influence of saline concentration and of sucrose in the culture medium during the germination of zygotic embryos and to study the influence of the addition of different concentration of Calcium chloride to the MS medium of culture in the induction of somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of *E. edulis*. The evaluation of germination *in vitro* of zygotic embryos of *E. edulis* occurred through the inoculation in medium of culture added by Morel vitamins, 7 g.L^{-1} of agar and 1.5 g.L^{-1} of activated charcoal. The treatments were different concentrations of the mediums MS (MS and MS/2) combined with different concentrations of sucrose (20, 30 and 40 g.L^{-1}). It was used the Random Blocks Delineate, with six repetitions, each one constituted by five test tubes with one embryo per tube. For the induction of somatic embryogenesis, immature zygotic embryos were extracted and inoculated in a culture medium MS supplemented with Morel Vitamins, 7 g.L^{-1} of agar, 0.5 g.L^{-1} of glutamine, 3 mg.L^{-1} of 2iP, 100 mg.L^{-1} of 2,4-D and 1.5 g.L^{-1} of activated charcoal and different concentrations of calcium chloride (0, 2, 4, 8, 12 mM). It was used the statistical delineate in Random Blocks with six repetitions. Each parcel was constituted by one flask containing four immature zygotic embryos. For the conversion of the somatic embryos in seedlings it was used the complete medium of culture MS and the medium with the half of original saline concentration (MS/2). It was verified that the concentration was not affected by the saline concentration of the medium culture and of sucrose. But the growing in height and the production of fresh mass of the seedlings were affected by the treatments. The increasing of concentration of sucrose of 20 to 40 g.L^{-1} in the medium culture resulted in an increasing in the fresh mass of the seedlings. The composition of the different mediums of culture did not influence the mean number of roots per seedling of heart of palm. The induction of somatic embryogenesis in immature zygotic embryos was

not significantly influenced by the addition of different concentrations of calcium chloride to the medium, after 60 days. But, they were observed significant differences among the concentrations of Calcium chloride for the number of somatic embryos formed, after 150 days. The increasing on the concentration of Calcium chloride in the medium of culture resulted in a decrease in the mean number of somatic embryos produced per experimental unit. Both medium MS and MS/2 did not differ significantly in the capacity of germination of the somatic embryos. The process of induction of somatic embryogenesis in the immature zygotic embryos of *E. edulis* occurred directly from the cotyledonary node of the embryo. The present study evidenced that the supplementation of the medium of culture (MS or MS/2) with sucrose (30 or 40 g.L⁻¹) was necessary for the growing of the seedlings of heart of palm originated from immature zygotic embryos. The results confirmed the possibility to propagate the palm *E. edulis* through direct somatic embryogenesis, because they were produced complete seedlings, and the importance of supplementation of the medium of culture with a source of organic nitrogen in the *in vitro* morphogenesis of leaf sheaths of heart of palm.

Key-words: heart of palm, micropropagation, culture of embryos, germplasm conservation.

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

Figura 1 - Distribuição mundial da Família Arecaceae (em vermelho). A) Arecoideae; B) Calamoidae; C) Coryphoideae; D) Ceroxyloideae e Phytelephantoideae; E) Nypoideae.....19

Figura 2 - Distribuição geográfica das populações de palmitreiro (*Euterpe edulis* Mart.) no território brasileiro.....20

Figura 3 - Aspectos morfológicos do palmitreiro (*Euterpe edulis* Mart.). A) Aspecto geral do palmitreiro na floresta Estacional Decidual, em Santa Cruz do Sul (RS). B) Indivíduo de palmitreiro com frutos maduros. C) Detalhe da inflorescência monóica, masculina (seta estreita) e feminina (seta larga). D) Frutos verdes. E) Frutos maduros.....21

Figura 4 - Processo de dois ciclos para a indução e modulação da embriogênese somática (Adaptado de Guerra et al., 1999).....27

Capítulo I

Figura 1 - Embriogênese somática *in vitro* de embriões zigóticos imaturos de palmitreiro (*Euterpe edulis* Mart.). A) Frutos verdes. B) Embriões zigóticos recém excisados. C) Cultura de calos compactos embriogênicos com coloração amarelada e intensa pigmentação de antocianina na região do nó cotiledonar. D) Tecido haustorial com coloração branca e aspecto esponjoso. E) Embriões somáticos (seta) desenvolvidos sobre tecido embriogênico friável em meio de cultura MS com 3 mg.L⁻¹ de 2iP e 40 mg.L⁻¹ de 2,4-D, aos 240 dias após a inoculação. F) Radícula em embrião somático começando a germinar, aos 280 dias. G) Plântula somática com eixo radicular e parte aérea, aos 300 dias.....67

Figura 2 - Porcentagem de indução de calos a partir de explantes de bainhas foliares de palmitreiro (*Euterpe edulis* Mart.) em meio de cultura MS suplementado com diferentes concentrações de glutamina e diferentes fontes de auxina [Picloram (72,3 mg.L⁻¹) ou 2,4-D (66,3 mg.L⁻¹)], aos 60 dias. ^b Valores de 0; 0,29; 0,58; 1,17 g.L⁻¹ equivalentes respectivamente a 0, 2, 4 e 8 mM de glutamina. As médias dos tratamentos são apresentadas com desvio padrão (\pm).....68

Figura 3 - Morfogênese *in vitro* de bainhas foliares de palmitreiro (*Euterpe edulis* Mart.). A) Plântula utilizada para a retirada das bainhas foliares (explantes). B) Eixo caulinar depois de retirada das folhas mais externas. C) Nódulo com intensa pigmentação de antocianina (seta), aos 60 dias. D) Tecido do meristema com aspecto intumescido (seta estreita) e nódulo com aspecto amarelado (seta larga), aos 60 dias.....71

Capítulo II

Figura 1 - Aspecto morfológico de plântula oriunda da germinação *in vitro* de embriões zigóticos imaturos de palmitreiro (*Euterpe edulis* Mart.) em diferentes meios de cultura, aos 120 dias. ^a40 g.L⁻¹ de sacarose; ^b40 g.L⁻¹ de sacarose.....87

Figura 2 - Número de embriões somáticos induzidos a partir de embriões zigóticos imaturos de palmitreiro (*Euterpe edulis* Mart.) em meio de cultura MS suplementado com diferentes concentrações de Cloreto de cálcio (CaCl₂), aos 150 dias após a inoculação.....90

Figura 3 - Processo de embriogênese somática de palmitreiro (*Euterpe edulis* Mart.). A) Embriões somáticos após 140 dias da inoculação dos embriões zigóticos imaturos em 100 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 3 mg.L⁻¹ de 2iP. B) Detalhe de um embrião somático, aos 140 dias. C) Embriões somáticos em vários estágios de desenvolvimento. D) embrião somático 10 dias após a inoculação em meio MS/2. E) Primórdio radicular (seta estreita) e plúmula (seta larga), aos 20 dias. F) Aos 40 dias. G) Plântula zigótica na esquerda e somática na direita com presença de haustório (seta), aos 60 dias. H) Plântula somática, aos 120 dias. I) Plântula zigótica na esquerda e somática na direita, após 150 dias de inoculação dos embriões em meio de cultura MS/2. J) Plântula somática aclimatizando em substrato (solo:casca de pinus: serragem), aos 60 dias.....91

LISTA DE TABELAS

Revisão de Literatura

Tabela 1 - Exemplo de palmeiras propagadas via embriogênese somática usando o meio de cultura MS.....28

Tabela 2 - Meios nutritivos usados na propagação de diferentes espécies lenhosas através de embriogênese somática.....29

Tabela 3 - Exemplo de palmeiras propagadas *in vitro* através da cultura de embriões zigóticos.....40

Capítulo I

Tabela 1 - Efeito de diferentes auxinas na formação de calos e acúmulo de antocianina em explantes de bainhas foliares de palmitreiro (*Euterpe edulis* Mart.) cultivados *in vitro*, 60 dias após a inoculação.....70

Capítulo II

Tabela 1 - Efeito de diferentes meios de cultura (MS e MS/2) e concentrações de sacarose na germinação *in vitro* de embriões zigóticos imaturos (aos 40 dias após a inoculação) e massa fresca, altura e número de raízes (aos 120 dias após a inoculação) de plântulas de palmitero (*Euterpe edulis* Mart.). Valores do teste *F*, obtido para os blocos e diferentes tratamentos.....86

Tabela 2 - Valores do teste *F*, obtido para os blocos e os tratamentos na indução de embriões somáticos, a partir de embriões zigóticos imaturos de palmitero (*Euterpe edulis* Mart.), em meio de cultura MS, suplementado com diferentes concentrações de Cloreto de cálcio (CaCl₂), e na germinação *in vitro* de embriões somáticos de palmitero em meio MS e MS/2.....90

LISTA DE ABREVIATURAS

MS	Murashige e Skoog, 1962
Y3	Eeuwens, 1976
LPm	Von Arnold e Eriksson, 1981
Morel	Morel e Wetmore, 1951
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
2iP	Isopenteniladenina
°C	Grau Celsius
g.L ⁻¹	Gramas por litro
min	Minutos
s	Segundo
mM	Milimolar
μM	Micromolar
cm	Centímetro
%	Porcentagem
mg	Miligrama
mm	Milímetro
μm	Micrômetro
h	Hora
mol	Mol
WPM	Lloyd e McCown, 1981
m	Metro
kg	Kilograma
ANA	Ácido naftaleno acético
BAP	6-Benzilaminopurina
CO ₂	Dióxido de carbono
NaH ₂ PO ₄	Fosfato de sódio monobásico

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	16
2 OBJETIVOS.....	18
2.1 Objetivo Geral	18
2.2 Objetivos Específicos	18
3 REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1 Descrição da espécie	19
3.2 Técnica de Embriogênese somática	24
3.2.1 Fatores que afetam a embriogênese somática	27
3.2.2 Aplicações práticas da embriogênese somática.....	33
3.3 Condições para a cultura <i>in vitro</i> de embriões	37
3.4 Informações geográficas na coleta de germoplasma	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

CAPÍTULO I

Morfogênese *in vitro* de embriões zigóticos e bainhas foliares de *Euterpe edulis* Mart. (Arecaceae)

1 INTRODUÇÃO.....	60
2 MATERIAL E MÉTODOS	62
2.2 Embriões zigóticos	63
2.3 Bainhas foliares.....	64
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
3.1 Embriões zigóticos	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

CAPÍTULO II

Germinação *in vitro* e embriogênese somática direta em embriões zigóticos imaturos de *Euterpe edulis* Mart. (Arecaceae)

2 MATERIAL E MÉTODOS	82
2.1 Material vegetal	82
2.2 Germinação <i>in vitro</i> de embriões zigóticos.....	82
2.3 Indução de embriogênese somática.....	83
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	85
3.1 Germinação <i>in vitro</i> de embriões zigóticos.....	85
3.2 Indução de embriogênese somática.....	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	99

1 INTRODUÇÃO GERAL

A fragmentação de biomas e ecossistemas ocasionou a transformação de uma grande extensão de habitats, em numerosas manchas isoladas, as quais representam um sério problema, pois um grande número de espécies foram perdidas ou ameaçadas de extinção (FAHRIG, 2003). As mudanças ambientais causadas pelas ações antrópicas tem representado graves ameaças para a sobrevivência das espécies arbóreas, desfavorecendo as interações entre fauna e flora. Diminuindo tais interações, reduz-se, conseqüentemente, a variação genética das populações e dificultando a produção sustentável, portanto, de forma que representa uma importante implicação social e econômica (LIPOW et al., 2004), fazendo com que a conservação fosse considerada um ponto crítico, para garantir a sua contínua disponibilidade (AMARAL et al., 2004).

O palmitero (*Euterpe edulis* Martius) foi intensamente explorado, acarretando uma drástica redução nas áreas de ocorrência natural. A exploração irracional de populações naturais fez com que a espécie fosse encontrada apenas em áreas restritas da Mata Atlântica (REIS et al., 2000a).

A extração indiscriminada do palmito, em palmeiras adultas de *E. edulis*, teve conseqüências para a dinâmica populacional. A maioria das sementes necessárias para a contínua reposição da população, depende de plantas adultas que devido a sua morte resulta no empobrecimento do banco de sementes. Além da baixa produção de sementes por essas populações, as sementes do palmitero são recalcitrantes, apresentando baixa longevidade e sensibilidade à desidratação (MARTINS et al., 2004). Desta maneira, a exploração indiscriminada representa uma ameaça para a sustentabilidade das populações naturais de palmitero (REIS e KAGEYAMA, 2000). Portanto, tornou-se necessário o desenvolvimento de estratégias para a conservação da espécie.

A conservação *in situ* e a *ex situ* tem sido as estratégias básicas empregadas na conservação da biodiversidade (ENGELMANN e ENGELS, 2002). A conservação *in situ* foi definida como a conservação de ecossistemas e habitat naturais, e a manutenção e recuperação de espécies em populações viáveis, servindo como uma fonte contínua de germoplasma para a conservação *ex situ* (SAXENA et al., 2003). A

conservação *ex situ* se refere quando o germoplasma é mantido fora de seu habitat natural, que, geralmente, pode ser realizada em jardins botânicos, em jardins particulares, em estações de pesquisa, no campo, no armazenamento de sementes (ortodoxas) ou através do armazenamento *in vitro* de tecidos de plantas (OLORODE, 2004). A conservação *ex situ* consiste de três estágios: a coleta do material (sementes ou partes vegetativas), o armazenamento e manutenção em um banco de germoplasma, e a regeneração para assegurar a contínua viabilidade (LAWRENCE, 2002).

As técnicas de conservação *in vitro* apresentam potencial para coleta, multiplicação, intercâmbio e conservação de recursos genéticos de espécies com sementes recalcitrantes, espécies que se propagam exclusivamente por vias vegetativas e espécies ameaçadas de extinção (ENGELMANN, 1997). Alguns estudos relataram a propagação *in vitro* de palmito através da técnica de embriogênese somática (GUERRA e HANDRO, 1991a; GUERRA e HANDRO, 1991b; GUERRA e HANDRO, 1998; GUERRA et al., 2000). Devido à dificuldade das palmeiras responderem à cultura de tecidos, necessitou-se de estudos complementares sobre a morfogênese *in vitro*.

Freqüentemente, o palmito não respondeu aos métodos convencionais de propagação vegetativa (GUERRA et al., 2000). Dessa maneira, o uso de técnicas para conservação e multiplicação de germoplasma de palmito foi uma alternativa. Dentre essas técnicas, destaca-se a embriogênese somática *in vitro*. A regeneração através da embriogênese somática tem sido uma ferramenta fundamental para a cultura de tecidos de plantas, apresentando ampla escala de propagação, também auxiliando programas de conservação de germoplasma. Adicionalmente, esta técnica foi considerada um sistema adequado para a produção de sementes sintéticas (KIM et al., 2005), e no fornecimento de embriões somáticos para serem criopreservados (RAO, 2004).

Como ferramenta auxiliar aos programas de conservação de germoplasma vegetal, a informação da distribuição geográfica dos recursos genéticos colaborou na formulação de estratégias de conservação *in situ*, bem como auxiliou na coleta de material vegetal e no estabelecimento de bancos de germoplasma *ex situ* (RAVIKANTH et al., 2002).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente estudo teve como objetivo desenvolver a técnica de embriogênese somática e, comparativamente, estudar a germinação *in vitro* de embriões zigóticos imaturos de palmitreiro (*E. edulis*), visando à utilização na conservação *ex situ* de germoplasma de palmitreiro.

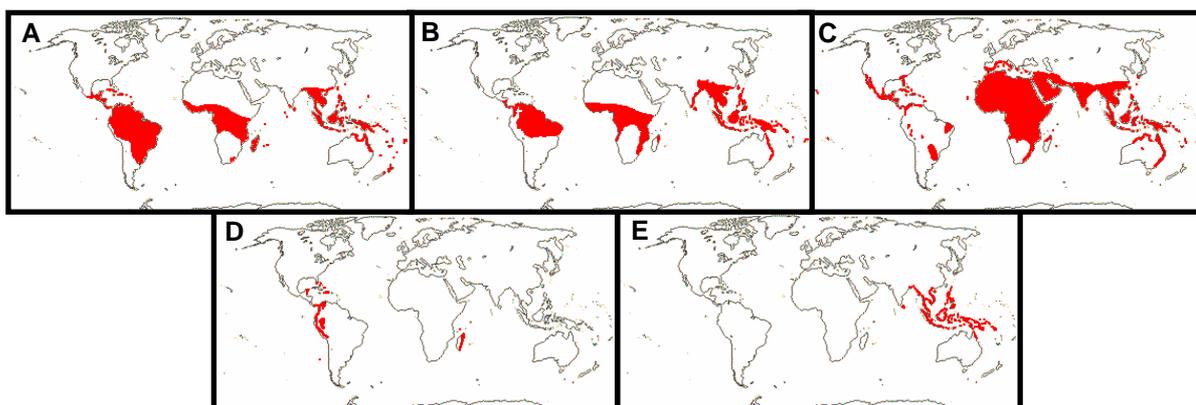
2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar a morfogênese *in vitro* durante a indução de embriogênese somática, induzida a partir de diferentes tecidos de palmitreiro.
- Analisar a germinação *in vitro* de embriões zigóticos imaturos de palmitreiro, em diferentes concentrações do meio de cultura, para a obtenção de explantes assépticos.
- Verificar o efeito da adição de cálcio na indução de embriogênese somática, em embriões zigóticos imaturos de palmitreiro.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Descrição da espécie

A família Palmae ou Arecaceae foi descrita como um dos mais interessantes e importantes grupos de plantas tropicais, as quais pertencem à ordem Arecales, constituída por cerca de 2.800 espécies, distribuídas em 5 subfamílias (Figura 1). No geral, foram atribuídos as palmeiras um alto valor etnobotânico e econômico, por serem simbólicas em algumas culturas, e pelo grande número de produtos que são extraídos das mesmas (TOMLINSON, 1979).

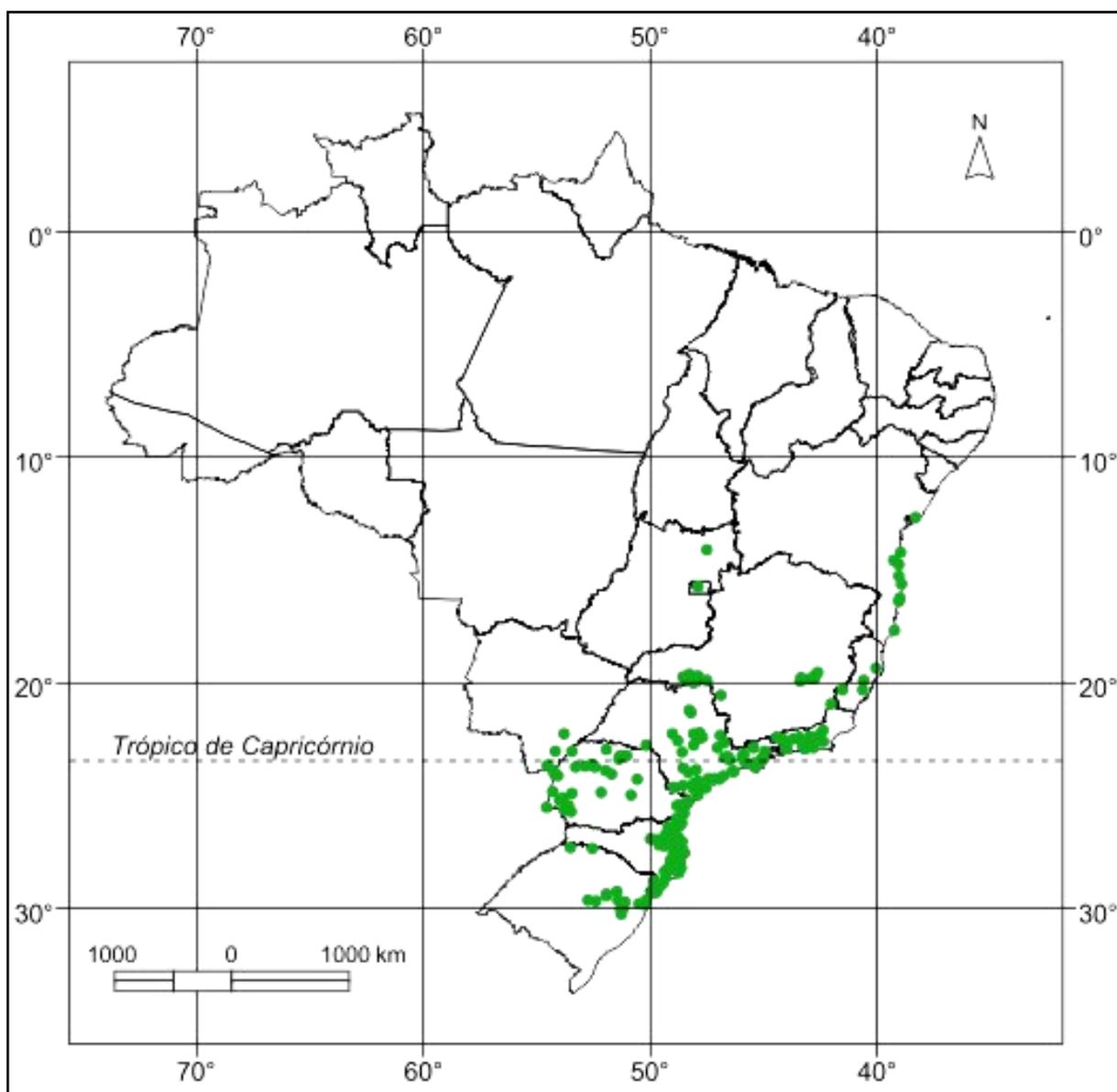


Fonte: Angiosperm Phylogeny Group, 2007.

Figura 1 - Distribuição mundial da Família Arecaceae (em vermelho). A) Arecoideae; B) Calamoidae; C) Coryphoideae; D) Ceroxyloideae e Phytelphantoideae; E) Nypoideae.

A palmeira *E. edulis* Martius pertence à família Palmae (Arecaceae), possui o estipe simples, cresce até 20 m de altura, e é popularmente conhecida como: palmiteiro, juçara, jìçara, ripa, entre outros (LORENZI e MELLO FILHO, 2001; CARVALHO, 2003). Foi reportado que a espécie é característica da Mata Atlântica, sendo encontrada no litoral brasileiro, do sul da Bahia até o Rio Grande do Sul (Figura 2), ocorrendo também em florestas do interior dos Estados de Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Distrito Federal e Rio Grande do Sul (CARVALHO, 2003). A espécie ocorre predominantemente nos estratos médios das florestas

(REIS et al., 2000a). Foi descrito que inicialmente o palmiteiro é uma espécie de sombra (esciófila). Em florestas tropicais, o palmiteiro ocorre entre cinco e 1.200 m de altitude (CARVALHO, 2003).



Fonte: Carvalho (2003).

Figura 2 - Distribuição geográfica das populações de palmiteiro (*Euterpe edulis* Mart.) no território brasileiro.

A inflorescência do palmiteiro é composta por uma raque central, da qual partem ramificações (chamada de ráquila), as quais sustentam as flores (MANTOVANI e MORELLATO, 2000). Em cada ráquila da inflorescência, estão dispostas flores unissexuadas, formando um conjunto chamado de tríade, em que se encontra uma flor feminina no meio de duas flores masculinas (Figura 3) (HENDERSON, 2000).



Fonte: Laboratório de Biotecnologia Florestal, UFSM. 2006.

Figura 3 - Aspectos morfológicos do palmito (*Euterpe edulis* Mart.). A) Aspecto geral do palmito na floresta Estacional Decidual, em Santa Cruz do Sul (RS). B) Indivíduo de palmito com frutos maduros. C) Detalhe da inflorescência monóica, masculina (seta estreita) e feminina (seta larga). D) Frutos verdes. E) Frutos maduros.

O palmitheiro apresenta frutos drupáceos, esféricos, de cor arroxeadada a preta, quando maduros, com mesocarpo carnoso muito fino. O embrião lateral é envolvido pelo endosperma carnoso e branco (REITZ et al., 1988). Foi relatado que a frutificação do palmitheiro em fase adulta é abundante, podendo produzir de 6 a 8 kg de frutos por ano (KALIL FILHO et al., 2002). O fruto serve para a alimentação da fauna. Os principais animais dispersores de sementes são: os araçarís (*Baillonius bailoni*), a gralha azul (*Cyanocorax caeruleos*), os tucanos (*Ramphastos dicolorus*), os morcegos (*Artibeus lituratus* e *Platyrrhinus lineatus*), os jacus (*Penelope obscura*), as antas (*Tapirus terrestris*), o veado do mato (*Ozotocercus bezoarticus*), os porcos do mato (*Tayassu pecari*) (REIS e KAGEYAMA, 2000; CARVALHO, 2003). Existe uma enorme gama de espécies de insetos que visitam as inflorescências de *E. edulis* à procura de néctar e pólen: Diptera (moscas), Hymenoptera (Vespidae, Apidae, Anthophoridae e Halictidae), Coleoptera e Lepidoptera (MANTOVANI e MORELLATO, 2000). Os níveis de interação (polinização, dispersão de sementes) da fauna com o palmitheiro são descritos como um processo fundamental, para a sobrevivência e a manutenção da dinâmica das populações naturais da espécie (REIS e KAGEYAMA, 2000).

O palmitheiro propaga-se exclusivamente por sementes, que perdem o poder germinativo com grande facilidade. A germinação natural das sementes ocorre de maneira lenta, iniciando a emergir no substrato entre 30 e 170 dias após a semeadura (CARVALHO, 2003). A demora na germinação é devido à barreira mecânica exercida pelo endocarpo, dificultando a absorção de água, pois, embora seja bastante rudimentar, o embrião da semente do palmitheiro está totalmente formado e apto para germinar, na época de maturação dos frutos (BOVI e CARDOSO, 1976).

Atualmente, a Mata Atlântica encontra-se restrita a aproximadamente 98.000 Km² de remanescentes, representando 7,6% da extensão original. Os últimos remanescentes de floresta encontram-se sob intensa pressão antrópica (MORELLATO e HADDAD, 2000). A exploração indiscriminada do palmitheiro resultou em uma substancial erosão genética nas populações, dificultando a manutenção da estrutura demográfica, através da regeneração natural, sendo que, em casos extremos, a espécie pode até ser eliminada localmente (REIS et al., 2000b).

O palmito, oriundo de folhas jovens, meristema apical e tecido sub-apical, é considerado um produto com alto valor econômico e com boa aceitação no mercado nacional e internacional. O palmito alcança, em média, de 50 a 60 cm de comprimento por 6 cm de diâmetro (ANDRADE e PEREIRA, 1997).

O palmitreiro pode fornecer diversos produtos e utilizações. Os frutos do palmitreiro são empregados na indústria alimentícia como fonte de suco, pois, a polpa possui características nutricionais semelhantes ao fruto de *E. oleracea* (SILVA et al., 2004). Também possui potencial apícola, paisagístico, artesanal, além de poder ser utilizado na produção de ração para animais (CARVALHO, 2003). O estipe pode ser usado em construções rurais (KALIL-FILHO et al., 2002).

Devido ao ciclo relativamente curto do palmitreiro, em relação a espécies arbóreas nativas, essa palmeira possui grande potencial para ser manejada em regime de rendimento sustentado, sendo uma importante fonte de renda ao agricultor, e mantendo o seu papel ecológico no ecossistema ao qual pertence (PEREIRA, 2000). A exploração sustentada de populações naturais de *E. edulis* tem sido a melhor forma de preservar essa espécie e o ecossistema em que se encontra (CHEDIACK e BAQUEIRO, 2005).

A exploração do palmitreiro no passado foi uma atividade de grande importância social nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, constituindo uma fonte de renda para um grande número de comunidades, que vivem em áreas da Mata Atlântica (FANTINI et al., 1997). Esses mesmos autores ressaltaram que, devido à ausência do emprego de técnicas de manejo, essa atividade foi considerada como predatória, tendo forte impacto econômico e social. Do ponto de vista ecológico, os efeitos da exploração indiscriminada foram danosos, pois o palmitreiro apresentou a interação interrompida com um amplo número de espécies da fauna (REIS e KAGEYAMA, 2000). O palmitreiro apresenta amplo potencial para tornar produtivas florestas secundárias, sendo uma fonte econômica complementar para o agricultor. Devido à produção de frutos durante seis meses do ano, e ao fato de estes serem fonte alimentícia para a fauna, a espécie representa um fator positivo para o aumento da biodiversidade em florestas secundárias (NODARI et al., 2000).

3.2 Técnica de Embriogênese somática

A cultura de tecidos compreende diversas técnicas. Dentre essas, destaca-se a micropropagação, que tem como objetivo a regeneração de plantas *in vitro*. Conforme o tipo de explante utilizado, a micropropagação é conduzida através da multiplicação de gemas axilares ou adventícias, ou via embriogênese somática. Em comparação aos diferentes sistemas de micropropagação, a técnica de embriogênese somática apresenta vantagens, devido ao elevado potencial de multiplicação, à possibilidade de automação do processo, e à diminuição de ocorrência de variação somaclonal (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1999; GUERRA et al., 1999). A cultura de tecidos permite a propagação de material vegetal, com elevadas taxas de multiplicação em ambiente asséptico. A miniaturização dos explantes permite a redução de espaço e, conseqüentemente a redução dos custos para a manutenção de coleções de germoplasma (ENGELMANN, 1997).

A morfogênese *in vitro* ocorre através de dois padrões distintos: a organogênese e a embriogênese somática. Na organogênese, ocorre a formação de gemas que evoluem para eixos caulinares, os quais são posteriormente induzidos para iniciação e crescimento radicular (GUERRA et al., 2000). A embriogênese somática foi descrita como o crescimento de estruturas bipolares em um eixo radical-apical (embriões somáticos), a partir de células haplóides ou diplóides, sem a fusão de gametas. A embriogênese somática inicia com a formação de células com capacidade embriogênica, seguida pela formação do embrião somático, maturação, germinação e regeneração completa de plântulas (VON ARNOLD et al., 2002). A embriogênese somática foi considerada como a opção mais apropriada para a regeneração de espécies florestais (MARTINEZ-RUIZ et al., 2003), incluindo várias espécies de palmeiras (STEINMACHER et al., 2007a,b,c; SANÉ et al., 2006; EKE et al., 2005; LEDO et al., 2002a,b; GUERRA e HANDRO, 1998).

Estudos relacionados aos aspectos bioquímicos, fisiológicos e morfológicos, para o desenvolvimento de tecnologias com alta eficiência, para a aplicação prática, foram desenvolvidos através do emprego da embriogênese somática (JIMÉNEZ, 2001).

Em condições *in vitro*, os embriões somáticos desenvolvem-se através de estágios similares aos observados na embriogênese zigótica, exceto pelo fato de

que os embriões somáticos não se tornaram dormentes e não são revestidos pelos integumentos e pelo endosperma (DODEMAN et al., 1997). Os embriões somáticos não possuem conexão vascular com os tecidos do explante inicial, ao contrário dos propágulos resultantes do processo de organogênese (GUERRA et al., 1999).

Dois padrões básicos de expressão da embriogênese somática têm sido observados *in vitro*, o padrão indireto e o direto (GUERRA et al., 2000). No padrão direto, os embriões somáticos originaram-se de tecidos matrizes, sem estágio intermediário de formação de calos. No modelo indireto, os embriões somáticos se formaram a partir de um tecido denominado calo, que apresenta células em diversos estágios de diferenciação e, conseqüentemente, diferentes graus de determinação (GUERRA et al., 1999). Esses mesmos autores relataram que células-mãe embriogênicas apresentam uma série de características comuns ao comportamento de células embrionárias, tais como: tamanho pequeno (100-200 μm), conteúdo citoplasmático denso, núcleos grandes com nucléolos proeminentes, vacúolos pequenos e presença de grãos de amido.

Em *Phoenix dactylifera*, o modelo de embriogênese somática indireta foi observado em meio de cultura MS, suplementado com ANA (53,7 μM), 2iP (7,4 μM) e transferidos para meio MS adicionado de nitrato de prata (AL-KHAYRI e AL-BAHRANY, 2004). Estudos histológicos do processo de embriogênese somática, induzida a partir de embriões zigóticos de *E. edulis*, revelaram que os embriões somáticos formaram-se diretamente na superfície do nó cotiledonar, ou a partir de tecidos subepidérmicos, sem a formação de calo (GUERRA e HANDRO, 1998). Por outro lado, em *Bactris gasipaes*, a indução de embriões somáticos, empregando embriões zigóticos maduros como fonte de explante, seguiu o modelo indireto (STEINMACHER et al., 2007b).

Uma estratégia geral a ser empregada para a indução e a modulação da embriogênese somática foi sugerida por GUERRA et al. (1999) (Figura 4). Foi relatado que o primeiro passo nessa estratégia consiste em determinar a melhor fonte de explantes. No primeiro ciclo, com explante juvenil ou embrionário, por exemplo, um embrião zigótico imaturo é excisado e inoculado em meio de cultura suplementado com a auxina 2,4-D. As culturas são normalmente mantidas no escuro, e geram complexos ou massas celulares pró-embrionárias. Por embriogênese repetitiva, representada por clivagem ou gemação, os complexos pró-embrionários resultam em um ciclo repetitivo de divisões celulares, formando

complexos celulares suspensor-embriionários, no caso de gimnospermas; e de embriões somáticos globulares, no caso de angiospermas. No segundo ciclo, os pró-embriões são estimulados a prosseguir o desenvolvimento pela retirada das auxinas do meio, ou pela inclusão de ácido abscísico, de citocininas e de agentes que promovam estresse osmótico. O ciclo de maturação forma embriões somáticos que são convertidos em plantas, ou que podem ser encapsulados para a obtenção de sementes sintéticas.

A embriogênese somática *in vitro* é controlada por vários fatores, que atuam de maneira direta ou indireta nas respostas obtidas. Dentre os quais, o genótipo da planta doadora de explantes e a fonte de auxina são responsáveis pela aquisição de competência embriogênica do explante (GUERRA et al., 2001). Além disso, AMMIRATO (1983) relatou que o meio de cultura, a fonte de carboidrato, e a presença ou ausência de carvão ativado e condições ambientais são fatores determinantes na iniciação de culturas embriogênicas.

As primeiras descrições da técnica de embriogênese somática foram realizadas a partir de culturas de cenoura (*Daucus carota*), por Steward et al. (1958) e Reinert (1958) (GUERRA et al., 1999). Até o momento, a embriogênese somática foi relatada em mais de 150 espécies florestais (DUNSTAN et al., 1995). A aprimoração da técnica de embriogênese somática permitiu o emprego de embriões somáticos na produção de sementes sintéticas e na regeneração de plantas geneticamente modificadas, de plantas poliplóides e de híbridos somáticos. Também existe a possibilidade de uso da embriogênese somática na criopreservação de células (VICIENT e MARTINEZ, 1998).

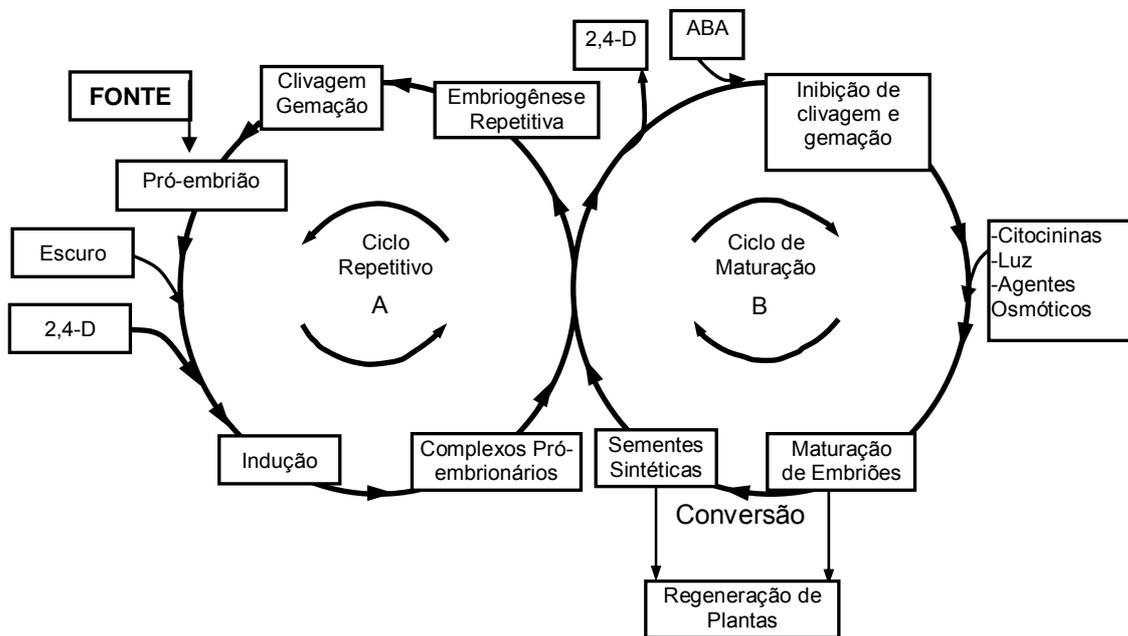


Figura 4 - Processo de dois ciclos para a indução e modulação da embriogênese somática (Adaptado de GUERRA et al., 1999).

3.2.1 Fatores que afetam a embriogênese somática

Os meios nutritivos devem fornecer as substâncias essenciais para o crescimento das culturas. Vários meios nutritivos, com diferentes concentrações de sais, foram descritos no desenvolvimento da técnica de embriogênese somática. Os meios MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), B5 (GAMBORG, 1968), SH (SCHENK e HILDEBRANT, 1972) apresentam efeitos positivos na embriogênese somática de espécies de plantas (GUERRA et al., 1999). O meio de cultura Y3 (EEUWENS, 1976) foi empregado com sucesso na cultura de tecidos de palmeiras (TISSERAT, 1984). Contudo, vários estudos de embriogênese somática em palmeiras utilizaram o meio MS (Tabela 1).

Os meios de cultura são normalmente compostos por macro e micronutrientes em diferentes proporções, vitaminas, aminoácidos, fontes de carbono e reguladores de crescimento, além de outras substâncias como inositol, sorbitol e ágar (SLATER et al., 2003). Esses autores relataram que a composição do meio de cultura baseia-se na demanda nutricional das plantas quanto aos nutrientes minerais, com

modificações para atender às necessidades específicas *in vitro*. Para complementar os compostos sintetizados pelas células, outras substâncias orgânicas são acrescentadas ao meio de cultura, visando suprir as necessidades metabólicas, energéticas e estruturais, tais como, aminoácidos e carboidratos. A demanda nutricional, para a indução de embriogênese somática, varia entre espécies lenhosas, fato que leva às diferenças entre formulações salinas dos meios de cultura (DUNSTAN et al., 1995). Diversos estudos utilizaram formulações salinas diferentes para a propagação através da embriogênese somática de espécies lenhosas (Tabela 2).

Em *Cocos nucifera*, a iniciação da embriogênese somática foi atribuída a substâncias específicas como o NH_4^+ , o Ca^{2+} , o Mg^{2-} e a sacarose, pois apresentaram um alto acúmulo por grama de matéria seca, nas células embriogênicas (DUSSERT et al., 1995). Geralmente, na técnica de embriogênese somática, devem ser utilizados pelo menos dois diferentes meios de cultura. O primeiro meio, tem o objetivo de induzir a embriogênese somática; e o segundo, permite o crescimento dos embriões formados. As condições de cultura que favorecem a primeira etapa da embriogênese somática geralmente inibem a segunda (GUERRA et al., 1999).

Tabela 1 - Espécies de palmeiras propagadas através da técnica embriogênese somática, utilizando o meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962).

Espécie	Referência
<i>Areca catechu</i>	Karun et al. (2004)
<i>Bactris gasipaes</i>	Steinmacher et al. (2007a,b,c)
<i>Cocos nucifera</i>	Verdeil et al. (2001)
<i>Elaeis guineensis</i>	Rajesh et al. (2003)
<i>Euterpe edulis</i>	Guerra et al. (2000)
<i>Hyophorbe lagenicaulis</i>	Sarasan et al. (2002)
<i>Phoenix canariensis</i>	Huong et al. (1999)
<i>Phoenix dactylifera</i>	Sane et al. (2006), Eke et al. (2005), Al-Khayri (2001)

Tabela 2 - Meios de cultura empregados na propagação de diferentes espécies lenhosas através da técnica de embriogênese somática.

Espécie	Meio nutritivo	Referência
<i>Abies alba</i> x <i>Abies cephalonica</i>	DCR (Gupta e Durzan, 1985) IC (Berthouly e Michaux-Ferriere 1996)	Salaj e Salaj (2004)
<i>Coffea Arabica</i>	MSG (Beewar et al., 1988)	Maciel et al. (2003)
<i>Cryptomeria japonica</i>	LPm (von Arnold e Eriksson, 1981)	Igasaki et al. (2003)
<i>Feijoa sellowiana</i>	WPM (Lloyd e McCown, 1981)	Guerra et al. (2001)
<i>Ocotea catharinensis</i>	SLM (Litvay et al., 1985)	Catarina et al. (2004)
<i>Picea glauca</i>	HLM-1 (Tremblay, 1990)	Barrett et al. (1997)
<i>Picea mariana</i> e <i>Picea glauca</i>		Iraqi e Tremblay (2001)

Freqüentemente os tecidos e órgãos cultivados *in vitro* demandam suprimentos exógenos de fitoreguladores para alcançarem níveis adequados de crescimento (DROUAL et al., 1998). Foi reportado que, para a indução de embriogênese somática, a adição de fitoreguladores ao meio de cultura é necessária. O tipo e a concentração de fitoreguladores utilizados variam de acordo com a necessidade de cada espécie (AKHTAR et al., 2000). Na indução de embriogênese somática, vários autores descreveram que é essencial a exposição do explante a uma auxina sintética, como o 2,4-D (Ácido 2,4-diclorofenoxiacético). No estágio de indução, a presença de 2,4-D é fundamental na proliferação das células (KRIKORIAN et al., 1987). A embriogênese somática em *C. nucifera* foi induzida pela redução gradual da concentração de auxina no meio de cultura, e pela adição de ácido abscísico (FERNANDO e GAMAGE, 2000).

Foi relatado que a inoculação de embriões zigóticos maduros de *E. oleracea* em meio MS, acrescentado de 2,4-D, e com posterior transferência para meio MS, adicionado de ANA e 2iP, expressou um modelo direto, repetitivo e assincrônico de embriogênese somática (LEDO et al., 2002b). Em *E. edulis*, o balanço e a concentração da auxina (2,4-D) e citocinina 2iP (Isopenteniladenina) afetaram a indução e a expressão de um modelo de embriogênese somática (GUERRA e HANDRO, 1998). Em *Ocotea odorifera*, culturas embriogênicas foram induzidas a partir de eixos embrionários, em meio de cultura MS, contendo 72-144 µM de 2,4-D (SANTA-CATARINA et al., 2001). A utilização de ANA (10µM), combinado com

BAP (10 μ M), promoveu a indução de embriogênese somática em explantes foliares, retirados de brotações epicórmicas de *Quercus suber* (HERNÁNDEZ et al., 2003).

A indução de embriogênese em células somáticas não é exclusivamente dependente do uso de fitoreguladores; fatores como choques térmicos, variações de pH e utilização de outros aditivos químicos podem também induzir competência embriogenética (GUERRA et al., 1999).

O nitrogênio parece ser um elemento regulador do crescimento em plantas (CÁNOVAS et al., 1998). Os aminoácidos e amidas são fontes de nitrogênio orgânico que são utilizados, em meios de cultura para a indução de embriogênese somática. Esses compostos são reportados como sendo estimulantes do crescimento em culturas de células e tecidos vegetais. Em alguns casos, são fundamentais para a formação de calos e embriões somáticos (KIRBY et al., 1987). Em *C. nucifera* e *P. dactylifera* o crescimento de calos foi estimulado pela adição de uma mistura dos aminoácidos: glutamina, arginina e aspargina (EEUWENS apud KIRBY et al., 1987). Em *Pinus strobus*, a adição de glutamina (7,3 g.L⁻¹) ao meio de cultura aumentou a produção de embriões somáticos maduros, quando comparada com a concentração de 1,7 g.L⁻¹ de glutamina (GARIN et al., 2000). A adição do aminoácido prolina (2,5 mM) ao meio de cultura foi fundamental para a iniciação de embriogênese somática em *Medicago arborea* (HITA et al., 2003). O crescimento de culturas embriogênicas de *Picea glauca* foi influenciado pela fonte de nitrogênio, porém não incrementou o número de embriões somáticos maduros produzidos (BARRETT et al., 1997). Em embriões zigóticos de *F. sellowiana*, a embriogênese somática foi estimulada quando adicionado ao meio de cultura LPM 8 mM de glutamina (DAL VESCO e GUERRA, 2001).

A contínua síntese de proteínas, ácidos nucléicos e substâncias de reserva, durante a divisão celular, são relacionadas com a adição de nitrogênio ao meio de cultura (MERKLE et al., 1995). Os aminoácidos tem sido a fonte de nitrogênio orgânico mais utilizado em meios de cultura, para a indução de embriogênese somática. Em alguns casos, são fundamentais para a formação de calos e embriões somáticos (KIRBY et al., 1987).

As vitaminas são relatadas como substâncias nitrogenadas, requeridas em pequenas concentrações no meio de cultura, para exercerem funções catalíticas nos sistemas enzimáticos. Células vegetais crescendo *in vitro* são capazes de sintetizar

vitaminas essenciais, porém em quantidades insuficientes, conseqüentemente necessitando de suplementação para aumentar o crescimento (AL-KHAYRI, 2001).

A regeneração *in vitro* foi relatada como dependente da fonte de material vegetal (ZIV, 2000). O estágio do desenvolvimento e as condições fisiológicas do explante também desempenham papel fundamental na aquisição de competência embriogênica, determinando o requerimento por auxina ou por outro fitoregulador, para a iniciação de embriogênese somática (VON ARNOLD et al., 2002). A freqüência de iniciação de tecidos somáticos em *Larix leptolepis* variou com a época de coleta de explante (KIM et al., 1999). Em *Araucaria angustifolia*, a indução de culturas embriogênicas foi dependente do estágio de desenvolvimento do explante e do genótipo (SANTOS et al., 2002). Em *Picea abies* foram observadas diferentes taxas de iniciação de embriogênese somática, em segmentos retirados de diferentes posições de embriões zigóticos (RAMAROSANDRATANA e STADEN, 2003). Em *B. gasipaes*, a capacidade de resposta do explante variou, com a localização do explante na planta matriz, sendo que explantes próximos do meristema apresentaram melhores respostas embriogênicas (STEINMACHER et al. 2007c).

Geralmente, quase todos os tecidos vegetais são usados na indução de embriogênese somática: inflorescências, embriões zigóticos e bainhas foliares de *E. edulis* (GUERRA et al., 2000) e de *B. gasipaes* (STEINMACHER et al., 2007 a,b,c), embriões zigóticos imaturos de *F. sellowiana* (DAL VESCO e GUERRA, 2001), plúmulas de embriões zigóticos maduros de *C. nucifera* (FERNANDO et al., 2003), radículas de *H. lagenicaulis* (SARASAN et al., 2002), ovários não fertilizados de *C. nucifera* (PERERA et al., 2007), dentre outros. Explantes juvenis mostraram-se mais responsivos que os originados de tecidos adultos. Este fato ocorre, porque os tecidos adultos apresentam-se mais diferenciados e possuem maior determinação celular (RAEMAKERS et al., 1995).

A concentração de uma substância específica, presente em um compartimento celular que contenha receptores para aquela substância, pode determinar a magnitude de alguns processos regulatórios na célula. Os fitoreguladores podem não influenciar as respostas da planta exclusivamente através de mudanças na sua concentração, porém a regulação também é exercida através de mudanças na sensibilidade das células responsivas. Estes aspectos analisados em conjunto mostram que determinados explantes podem responder a embriogênese somática enquanto que outros não, e explicam as razões pelas quais

os explantes de mesma origem, coletados em diferentes períodos, podem apresentar respostas diferentes à indução embriogênica (GUERRA et al., 1999).

Para o estabelecimento de culturas *in vitro*, torna-se necessário a utilização de uma fonte de energia metabólica. A adição de uma fonte de carbono ao meio de cultura se deve ao fato de que os explantes não encontram condições adequadas de iluminação e concentração de CO₂ e, em alguns casos, não apresentam teores de clorofila suficientes para realizar fotossíntese que sustente o crescimento (CALDAS et al., 1998). A sacarose é o carboidrato mais utilizado nos meios nutritivos para a embriogênese somática, embora outros mono e dissacarídeos sejam empregados. A concentração de sacarose interfere na iniciação e diferenciação dos embriões somáticos, visto que o metabolismo nas plantas é controlado por um grupo de genes, cujas respostas são moduladas conforme a variação da concentração (GUERRA et al., 1999). Além da sacarose, outros carboidratos como a glicose, a maltose, a galactose e o sorbitol também são usados (SLATER et al., 2003). Em cultura de tecidos vegetais normalmente se utiliza açúcares adicionados ao meio de cultura (IRAQI e TREMBLAY, 2001).

De maneira geral, concentrações de sacarose de 3% (p/v) apresentam resultados satisfatórios para a iniciação e diferenciação de embriões somáticos de espécies arbóreas. Vários estudos relataram a indução de embriogênese somática usando 3% (p/v) de sacarose em diversas espécies, como: *B. gasipaes* (STEINMACHER et al., 2007abc); *P. dactylifera* (AL-KHAYRI e AL-BAHRANY, 2004); *Areca catechu* (KARUN et al., 2004); *Phlox paniculata* (JAIN et al., 2002); *E. oleracea* (LEDO et al., 2002ab); *F. sellowiana* (GUERRA et al., 2001); *E. edulis* (GUERRA et al., 2000).

A sacarose apresenta rápida hidrólise, de modo a aumentar o conteúdo de hexoses e de substâncias de reserva da célula, levando ao crescimento celular. A maltose apresenta baixo suprimento endógeno de hexoses. Conseqüentemente, isso explicou a rápida proliferação celular de culturas embriogênicas de *Hevea brasiliensis*, que foram submetidas ao tratamento com sacarose (BLANC et al., 2002). A hidrólise da sacarose resulta em um aumento de pressão osmótica no meio de cultura. Em *P. glauca* e *P. mariana*, esse evento não promoveu o aumento da produção de embriões somáticos (IRAQI e TREMBLAY, 2001).

Para aperfeiçoar a frequência e a qualidade morfológica dos embriões somáticos em plantas, vários tratamentos podem ser aplicados, tais como: a fonte e

a concentração de fitoreguladores; a fonte de explante; a composição do meio de cultura; o ambiente de cultura e o potencial osmótico (PHILLIPS, 2004).

O processo em que as células somáticas adquirem competência embriogênica envolve a reprogramação e a mudança de expressão de genes (FÉHER et al., 2003). Vários genes foram identificados no processo de embriogênese somática: *LEC2* (Iniciação da embriogênese somática); *WUS*, *SERK*, *LEC1* (Envolvidos na transição das células somáticas para o estado embriogênico); *CLV*, *WUS* (Direcionam as células-tronco a uma rota específica); *CLV1*, *CLV3*, *STM* (Regulam o desenvolvimento do meristema apical vegetativo) e *LEC1*, *FUS3*, *ABI3* (Regulam a maturação do embrião) (PHILLIPS, 2004).

3.2.2 Aplicações práticas da embriogênese somática

No melhoramento tradicional de plantas os ganhos genéticos aditivos são rapidamente perdidos, principalmente quando as plantas são propagadas através de sementes. A segregação resulta em uma alta heterozigose na população, sendo a propagação vegetativa uma alternativa para capturar tais ganhos genéticos (MAXIMOVA et al., 2002). A clonagem de espécies florestais oferece vantagens significativas para a produtividade florestal devido aos ganhos genéticos, os quais são obtidos através da seleção e posterior propagação massal dos indivíduos geneticamente superiores através da cultura de tecidos (SUTTON, 2002).

A cultura de tecidos oferece muitas oportunidades para a propagação vegetativa massal e desenvolvimento de clones superiores de árvores. A principal vantagem comercial dos sistemas de cultura de tecidos para espécies arbóreas é o potencial para produzir centenas de cópias de genótipos superiores. As técnicas de cultura de tecidos podem ser aplicadas para o estabelecimento de plantios de espécies florestais através de indivíduos superiores identificados em programas de melhoramento que sejam propagados vegetativamente (SOBROSA e CORDER, 2003).

A principal aplicação comercial da embriogênese somática em espécies florestais tem sido a multiplicação massal de genótipos superiores (SUTTON, 2002). Além disso, a técnica tem sido principalmente empregada na produção de sementes sintéticas (KIM et al., 2005), na criopreservação (RAO, 2004), na regeneração de protoplastos (JIMÉNEZ, 2001) e no desenvolvimento de sistemas de transformação genética (MAXIMOVA et al., 2002).

O emprego da técnica de embriogênese somática possibilita a produção de embriões *in vitro*, os quais são estruturalmente semelhantes aos embriões zigóticos, tornando-se vantajoso combinar a eficiência e o baixo custo das sementes sintéticas como fonte de propágulos com a produção clonal massal *in vitro* de embriões a partir de células somáticas. As técnicas que visam o emprego de embriões somáticos como sementes funcionais são conhecidas como tecnologia de sementes sintéticas ou artificiais. Esta técnica apresenta várias vantagens como: a produção de grande quantidade de propágulos em curto espaço de tempo, a manutenção da identidade clonal, a semeadura direta a campo, eliminando estruturas caras de aclimatização, sementeiras e viveiros, aliado ao baixo custo por planta (GUERRA et al., 1999). O conhecimento dos eventos morfogênicos e histológicos que ocorrem durante a embriogênese somática tornam possível a eficiência deste método, sendo pré-requisito para o sucesso no emprego de métodos biotecnológicos na produção de sementes sintéticas (KÄRKÖNEN, 2000). Através da técnica de sementes sintéticas os embriões somáticos podem ser encapsulados em Alginato de sódio, permitindo assim o armazenamento em baixas temperaturas e o posterior cultivo de maneira semelhante à semente produzida naturalmente (GUERRA et al., 2001).

Há vários sistemas de encapsulação de embriões somáticos, porém o Alginato de sódio é usado com maior frequência, pois possui uma viscosidade moderada, uma baixa toxicidade e uma geleificação rápida (GONZÁLEZ e MENDOZA, 1998). Em goiabeira serrana (*F. sellowiana*), a adição dos sais de MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e sacarose ao Alginato de sódio resultou em 88% de contaminação das sementes sintéticas, quando comparadas às cápsulas isentas destas substâncias. O uso de KNO_3 (100 mM) permitiu a despolimerização e a abertura de 81% das sementes sintéticas em comparação aos valores de 0% para o tratamento com água (GUERRA et al., 2001). A encapsulação de embriões somáticos de *Robinia pseudoacacia* reduziu a conversão dos embriões em plântulas, aos 45 dias este valor chegou a 45% (HAN e PARK, 1999).

O uso da tecnologia das sementes sintéticas vem evoluindo no setor florestal, permitindo a produção de sementes idênticas geneticamente, ao contrário de sementes naturais (VICIENT e MARTÍNEZ, 1998). Embriões somáticos de *Paulownia elongata* apresentaram 53% de germinação após 5 semanas envolvidos por cápsulas com 3% de Alginato de sódio preparado nos sais do meio de cultura MS e submersas por 30 min em 50mM de CaCl_2 (IPEKCI e GOZUKIRMIZI, 2003). O estudo demonstrou que o armazenamento das sementes sintéticas em 4°C foi viável, pois, após dois meses de armazenamento 42% dos embriões somáticos encapsulados germinaram. De acordo com esses autores, a embriogênese somática aliada à tecnologia de sementes sintéticas pode ser empregada com sucesso em *Paulownia elongata*.

Em espécies florestais, a produção de sementes sintéticas em laboratório pode ocorrer ao longo do ano e não depender de perdas por condições climáticas desfavoráveis, ataque de pragas e doenças e anos de baixa produção, aspectos estes comumente associados com a produção de sementes principalmente em espécies de interesse florestal (GUERRA et al., 1999).

A integração entre a criopreservação e a embriogênese somática em um programa de melhoramento genético vem reforçar a ligação entre um programa de melhoramento e a propagação massal (HÖGBERG et al., 1998). Para a silvicultura clonal, a criopreservação facilita a recuperação de genótipos elite que foram selecionados através de testes a campo, para subsequente estabelecimento de bancos de clones para aplicações comerciais. Assim, o banco de clones mantido *in vitro* através da criopreservação é efetivamente equivalente a um pomar de sementes (CYR e KLIMASZEWSKA, 2002).

A criopreservação de culturas embriogênicas de espécies arbóreas tem sido uma maneira de evitar a perda do potencial embriogênico durante a sub-cultura em longo prazo, evitando também a variação somaclonal causada pela manutenção das culturas embriogênicas no meio de cultura com reguladores de crescimento (HÄGGMAN et al., 1998). A criopreservação de embriões somáticos tem sido uma alternativa para a conservação de germoplasma por períodos prolongados, visto que os embriões após o armazenamento podem germinar e desenvolver-se em plântulas com vigor semelhante ao de plântulas zigóticas (TESSERAU et al., 1994). Culturas embriogênicas de *Quercus robur* após a criopreservação apresentaram em média 62% de sobrevivência, os procedimentos de criopreservação consistiram em

pré-cultura por três dias em meio com 0,3 M de sacarose, seguida pela aplicação da solução de PVS2 por 60-90 minutos e imersão das culturas em nitrogênio líquido (MARTÍNEZ et al., 2003). Embriões somáticos de *Theobroma cacao* conservaram a viabilidade após a criopreservação quando encapsulados em Alginato de sódio e pré-cultivados durante sete dias em 1M de sacarose e submetidos a quatro horas de exposição à sílica gel antes da criopreservação (FANG et al., 2004).

Para a obtenção de híbridos somáticos tem sido utilizada a técnica de fusão de protoplastos. Na maioria dos casos os protoplastos são obtidos de mesófilos foliares e de suspensões foliares. A regeneração dos protoplastos pode ser através da embriogênese somática (MROGINSKI et al., 2004).

A adição de características através da transformação genética em espécies florestais requer um sistema de cultura de tecidos que permita a transformação de células individuais e, subsequente regeneração. A embriogênese somática atende esse critério de regeneração a partir de uma célula, apresentado potencial para a transformação de culturas embriogênicas ou embriões somáticos competentes para a embriogênese secundária (CYR e KLIMASZEWSKA, 2002). O potencial de aplicação na área florestal inclui a produção de biomassa, manipulação da composição de lignina, resistência a insetos, tolerância a herbicidas, controle do florescimento e fitoremediação (HALPIN e BOERJAN, 2003).

Em coníferas os passos geralmente adotados na obtenção de embriões somáticos para o estabelecimento de linhagens embriogênicas de genótipos superiores são: extração dos embriões de sementes oriundas de polinizações controladas e inoculação em meio de cultura para induzir a formação de culturas embriogênicas. As culturas embriogênicas podem ser armazenadas através da criopreservação ou usadas para a produção de embriões somáticos maduros. A germinação dos embriões somáticos ocorre *in vitro* por um período de 6-14 semanas (SUTTON, 2002).

Em um programa de melhoramento genético de *P. abies*, foram observadas diferenças significativas quanto ao potencial de proliferação e maturação de embriões somáticos entre progenitores masculinos. Diferenças entre o potencial embriogênico de linhagens celulares dentro de famílias foram consideráveis, entretanto, diferenças significativas não foram encontradas entre famílias (HÖGBERG et al., 1998). Os mesmos autores reportaram que em um programa de melhoramento de *P. abies* ganhos de 3 anos foram obtidos através do uso

embriogênese somática ao invés de estaquia. Em coníferas o estabelecimento de florestas clonais usando a técnica de embriogênese somática permitiu ganhos genéticos de 40-60% em volume, através da seleção dentro de famílias (SUTTON, 2002).

Em *Trifolium pratense* estudos realizados com base em cruzamentos controlados indicaram que a embriogênese somática foi controlada por dois locos gênicos complementares. A característica foi altamente herdável, indicando que pode ser incorporada em outras fontes de germoplasma de *T. pratense* que não possuem capacidade embriogênica (McLEAN e NOWAK, 1998). Em *Gossypium hirsutum* após três gerações de seleção de indivíduos com capacidade embriogênica, foi possível selecionar uma linhagem com alta frequência embriogênica (100%) (KUMAR et al., 1998). O desenvolvimento e diferenciação em plantas são regulados diretamente ou indiretamente por mudanças na expressão de genes, especialmente durante a embriogênese (CAIRNEY e PULLMAN, 2007).

3.3 Condições para a cultura *in vitro* de embriões

A cultura de embriões fora da semente foi reportada pela primeira vez por Hannig, em 1904. Desde então, esta técnica tem sido utilizada em diversas espécies de plantas. Usando técnicas assépticas, Hannig obteve plântulas através da cultura de embriões maduros de *Raphanus sativus*, *R. landra*, *R. caudatus* e *Cochlearia danica*, em um meio de cultura com sais e suplementação com sacarose (RAGHAVAN, 2003). A primeira aplicação prática da técnica de cultura de embriões foi descrita por KNUDSON (1922), sendo que, nesse estudo, foram determinados os padrões de germinação *in vitro* de embriões de orquídeas, além da conversão dos mesmos em plântulas (RAGHAVAN, 2003).

A cultura de embriões *in vitro* tem sido aplicada no melhoramento genético de espécies vegetais, que apresentavam problemas de dormência de sementes (ANDRADE, 2002). Adicionalmente, a cultura de embriões zigóticos *in vitro* foi amplamente utilizada, em estudos que elucidaram os fatores relacionados ao desenvolvimento embrionário de plantas (KANCHANAPOOM et al., 2001). A cultura *in vitro* de embriões tem sido um pré-requisito para a aplicação e o sucesso de

diversas técnicas *in vitro*, como a organogênese e a embriogênese. Um dos problemas, que tem sido encontrado na cultura *in vitro* de embriões de plantas, é a alta taxa de oxidação dos mesmos. O uso de carvão ativado no meio de cultura evita taxas elevadas de oxidação (KANCHANAPOOM et al., 2001). O uso de técnicas para a coleta, a troca e a conservação *in vitro* de germoplasma de palmeiras requer protocolos eficientes para a germinação *in vitro* dos embriões, o desenvolvimento de plântulas e a aclimatização, a fim de que se obtenham plantas adaptadas às condições de campo (ENGELMANN e BATUGAL, 2002).

O sucesso na produção de plantas, a partir da cultura de embriões, depende principalmente do estágio de maturação do embrião, e da composição do meio de cultura (SHARMA et al., 1996). Embriões maduros são praticamente autotróficos, podendo germinar e crescer em meio de cultura inorgânico, sem a necessidade de suplementação com uma fonte de energia. Foi relatado que, quanto mais jovem for o embrião, maior é a exigência nutricional para que ocorra o desenvolvimento e o crescimento. Um importante aspecto da cultura de embriões imaturos é a definição de um meio de cultura que promova o crescimento e o desenvolvimento *in vitro* (HU e FERREIRA, 1998). Estes meios nutritivos fornecem as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro* (CALDAS et al., 1998).

Os principais fatores que afetam a cultura de embriões são: a desinfestação da semente, a excisão do embrião, a composição do meio de cultura (formulações salinas, carboidratos, nitrogênio, extratos naturais, balanço hormonal, pH), as condições de incubação (luz, temperatura) e a aclimatização (HU e FERREIRA, 1998).

A adição de carboidratos (frutose, sacarose, maltose, glicose) ao meio de cultura tem sido considerada determinante no desenvolvimento *in vitro* de embriões zigóticos de plantas, devido à fonte de carbono e à regulação osmótica do meio de cultura (SLESACK e PRZYWARA, 2003). A sacarose (20 a 40 g.L⁻¹) é a fonte de carbono mais utilizada na cultura de tecidos e órgãos vegetais, devido à rapidez na absorção *in vitro*, quando comparada a outras fontes de carbono (FERREIRA et al., 2002). O estabelecimento da concentração adequada de sacarose e o uso de carvão ativado foram críticos no sucesso da cultura *in vitro* de embriões zigóticos de *C. nucifera*, em meio MS. O sucesso no uso de carvão ativado (2 g.L⁻¹) foi atribuído

à adsorção de substâncias que dificultavam a germinação do embrião de *C. nucifera* (ASSY-BAH e ENGELMANN, 1993).

O desenvolvimento *in vitro* de embriões zigóticos maduros de *E. oleracea* foi realizado com sucesso em meio de cultura MS (modificado pela presença de $0,17 \text{ g.L}^{-1}$ de NaH_2PO_4), em diferentes concentrações de ANA e BAP. O maior comprimento da parte aérea foi induzido pela presença de $2,68 \mu\text{M}$ de ANA, combinado com $1,11$; $1,55$ e $2,22 \mu\text{M}$ de BAP. As concentrações de ANA e BAP não alteraram a porcentagem da conversão de embriões e do número de raízes por plântula de *E. oleracea* (LEDO et al., 2001).

Em *Mauritia flexuosa*, embriões zigóticos foram cultivados com sucesso, para a avaliação da viabilidade, em meio de cultura WPM, acrescido de 2% de sacarose, 0,3% de carvão ativado e 0,7% de ágar (SPERA et al., 2001). Em *Givotia rottleriformis*, o meio de cultura MS suplementado com 30 g.L^{-1} de sacarose apresentou as melhores condições para a germinação de zigóticos e crescimento das plântulas quando comparado com as demais concentrações (7,5; 15, 30 e 40 g.L^{-1}) (RAMBABU et al., 2006).

O resgate *in vitro* de embriões imaturos necessita de um meio de cultura que proporcione o crescimento e desenvolvimento. O uso de um meio de cultura inadequado resulta na necrose dos embriões, na formação de calos e na germinação prematura (GEERTS et al., 1999). Em diversas espécies de palmeiras foi relatada a cultura *in vitro* de embriões zigóticos, utilizando diferentes tipos de meios de culturas (Tabela 3).

O cultivo *in vitro* de sementes ou embriões, em condições controladas, como quanto à disponibilidade de água, à temperatura, à luminosidade e à composição atmosférica, pode maximizar o processo de germinação. Além disso, a presença de fitoreguladores e de fontes exógenas de carboidratos, no meio de cultura, possibilita contornar fatores que inibem a germinação, como a presença de inibidores químicos, a imaturidade de embriões e o baixo acúmulo de reservas nutritivas. Por sua vez, o suprimento externo dessas substâncias tem a capacidade de incrementar a porcentagem de germinação ou fazer com que o processo seja mais efetivo, rápido e uniforme (HU e FERREIRA, 1998). A cultura de embriões tem sido utilizada como uma ferramenta para elucidar aspectos fundamentais da nutrição, da embriogênese e do resgate de híbridos (MONNIER, 1995). Além disso, como uma alternativa para

a quebra de dormência, multiplicação e a conservação de germoplasma de espécies arbóreas (RAMBABU et al., 2006).

Tabela 3 - Espécies de palmeiras propagadas *in vitro* através da cultura de embriões zigóticos.

Espécie	Meio de cultura	Referência
<i>Bactris gasipaes</i>	MS, Y3	Steinmacher (2005)
<i>Bactris major</i>	MS	Tzec-Simá et al. (2006)
<i>Cocos nucifera</i>	Y3	Fuentes et al. (2005)
<i>Cocos nucifera</i>	MS	López-Villalobos et al. (2001)
<i>Desmoncus orthacanthos</i>	MS	Tzec-Simá et al. (2006)
<i>Elaeis guineensis</i>	Y3	Kanchanapoom et al. (2001)
<i>Euterpe oleracea</i>	MS modificado	Ledo et al. (2001a)
<i>Hyophorbe lagenicaulis</i>	MS	Sarasan et al. (2002)
<i>Mauritia flexuosa</i>	WPM	Spera et al. (2001)
<i>Syagrus oleracea</i>	MS	Melo et al. (2001)

A cultura de embriões zigóticos, em um meio de cultura com composição química conhecida, representa uma importante função, para identificar os requerimentos essenciais para o crescimento continuado, a diferenciação e a morfogênese dos embriões. Usando esta técnica diversas pesquisas foram conduzidas focando aspectos como à composição de carboidratos e de nitrogênio no meio de cultura e o efeito de fitoreguladores na morfogênese dos embriões (RAGHAVAN, 2003).

3.4 Informações geográficas na coleta de germoplasma

A coleta de informações acerca da distribuição geográfica de recursos minerais, de animais e de plantas sempre foi uma parte importante das atividades das sociedades organizadas (CÂMARA E DAVIS, 2001). Atualmente, a coleta de informações geográficas foi descrita como a atividade que utiliza três tecnologias básicas, para o gerenciamento de variáveis geoambientais: o sensoriamento remoto, o *software* de SIG (Sistema de Informação geográfica) e o sistema de

posicionamento global (GPS) (GREENE et al., 1999a). O sensoriamento remoto facilitou extraordinários avanços no modelamento, no mapeamento e no entendimento dos ecossistemas. O uso de GPS, para registrar latitude e longitude de locais de coleções de germoplasma, auxilia em coletas posteriores de germoplasma (GREENE et al., 1999b).

Na década de 90, os sistemas de informações geográficas passaram a ser aplicados em programas de conservação de recursos genéticos vegetais. Um sistema de informações geográficas foi descrito como um sistema de gerenciamento de uma base de dados, que pode, simultaneamente, unir dados digitais espaciais com dados não espaciais (GEPTS, 2006). O mapeamento acurado da distribuição espacial de germoplasma de *Phaseolus vulgaris* foi essencial para intervenções conservacionistas (JONES et al., 1997).

Com o advento dos procedimentos de análise de informações geográficas, tornaram-se crescentes e sofisticadas as técnicas de localização geográfica e de caracterização de ambientes com maior disponibilidade de recursos genéticos vegetais (GUARINO et al., 2002). Informações geográficas foram usadas no manejo de recursos genéticos, como: em levantamentos ecogeográficos, em explorações de campo, no manejo e monitoramento de reservas, na avaliação de germoplasma e no uso dos recursos genéticos (GUARINO et al., 2002).

O conhecimento do local de origem do germoplasma (local de coleta) passou a ser de grande importância para a caracterização (MELO et al., 2002). A variação na distribuição geográfica das plantas foi associada com as variações ecológicas, sendo que, dentre os fatores geográficos, pode-se destacar a latitude, a altitude, a temperatura e a disponibilidade de umidade do local de ocorrência das espécies (RAO e RODGKIN, 2002). Através do SIG, foi possível elaborar, armazenar e compor informações de mapas que descrevessem condições ambientais abrangentes, além de identificar condições ecogeográficas específicas do local de coleta do germoplasma (GUARINO et al., 2002).

Atualmente, foram desenvolvidos procedimentos usando SIG para relacionar a distribuição geográfica com a diversidade genética de espécies vegetais (JONES et al., 2002; HIJMANS et al., 2001). Diferentes populações de *Melia volkensii* tiveram a diversidade genética avaliada através de RAPD (DNA polimórfico amplificado ao acaso), assistida pela localização geográfica das populações (GPS), o que permitiu associar a variação genética a variações ecogeográficas (RUNO et al., 2004).

Softwares como o DIVA-GIS e o Flora-Map permitiram executar procedimentos para a análise da ligação entre as informações geográficas e a distribuição de espécies ou a diversidade genética intra-específica (JONES et al., 2002; HIJMANS et al., 2001). O Flora-Map foi descrito como um programa SIG, desenvolvido pelo Laboratório GIS, do Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), principalmente para a predição de áreas de distribuição de organismos no seu habitat natural, quando há pouco ou nenhum conhecimento da ecologia da espécie (RODRIGUEZ et al., 2005). Esses SIGs, em geral, permitem identificar áreas potenciais para as coletas de germoplasma, a predição e a comparação de adaptação climática em outras áreas (BERGER et al., 2003).

Em *Capsicum flexuosum*, o uso do software Flora-Map, para a predição de ocorrência de populações naturais no território do Paraguai, auxiliou na localização de novas populações para a coleta de germoplasma e a conservação *ex situ* (JARVIS et al., 2005). JARVIS et al. (2003) analisaram, através do SIG Flora-Map, a origem de 2.175 observações georreferenciadas de ocorrência de *Arachis* spp. selvagem na América do Sul. Foram encontrados 48 pontos dentro de parques nacionais, sendo que a maioria foi localizada ao longo de estradas. Em bancos de germoplasma de sementes, informações geográficas foram usadas para maximizar o tempo de coleta, estabelecendo a distância e a localização desses pontos de coleta (LININGTON et al., 2003).

A combinação de técnicas tradicionais de coleta de germoplasma com informações geográficas e técnicas moleculares foi descrita como uma importante ferramenta para resolver questões como: se indivíduos das mesmas espécies ocupam nichos diferentes, a existência de relação taxonômica e genética entre populações de diferentes regiões geográficas e quais são as áreas potenciais de ocorrência das espécies (JONES et al., 1997). Sistemas de informações geográficas foram usados para o modelamento espacial da distribuição e da frequência das espécies da vegetação nativa de New South Wales, definindo áreas prioritárias para a conservação da biodiversidade (PRESSEY et al., 2000).

Os sistemas de informações geográficas têm sido considerados como ferramentas de amplo potencial, para as atividades que envolvem o planejamento, o monitoramento, e o desenvolvimento de estratégias para a conservação de ecossistemas (XAVIER-da-SILVA et al., 2001). A combinação de informações geográficas e biotecnologias tem sido consideradas promissoras, para realçar os

padrões de distribuição da diversidade genética de indivíduos ou grupos, e para explorar simultaneamente relações entre características genômicas e propriedades do ambiente (JOOST e CONSORTIUM, 2005).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKHTAR, N. et al. Somatic embryogenesis in tropical fruit trees. In: JAIN, S. M.; GUPTA, P. K.; NEWTON, R. J. (Eds.). **Somatic embryogenesis in woody plants**. Kluwer Academic Publishers, 2000, p.93-31.

AL-KHAYRI J. M. Optimization of biotin and thiamine requirements for somatic embryogenesis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). **In Vitro Cellular and Development Biology**, Heidelberg, v.37, n.4, p.453-456, 2001.

AL-KHAYRI, J. M.; AL-BAHRANY, A. M. Genotype-dependent *in vitro* response of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars to silver nitrate. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.99, n.2, p.153-162, 2004.

AMARAL, W.; THOMSON, L; YANCHUK, A. Conservation of genetic resources in their natural environment. In: FAO, FLD, IPGRI. **Forest genetic resources conservation and management: Overview, concepts and some systematic approaches**. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, v.1, 2004. p.1-4.

AMMIRATO, P. V. Embryogenesis. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. (Eds.). **Handbook of plant cell culture**. New York: Macmillan Publisher Co.1983, p.82-123.

ANDRADE, A. C. S. de; PEREIRA, T. S. Comportamento de armazenamento de sementes de palmito (*Euterpe edulis* Mart.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.32, n.10, p.987-991, 1997.

ANDRADE, S. R. M. de. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2002. 14 p.

ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. Disponível em: <<http://www.mobot.org/mobot/research/APweb>>. Acessado em 18 de junho de 2007.

ASSY-BAH, B.; ENGELMANN, F. Medium-term conservation of mature embryos of coconut. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.33, n.1, p.19-24, 1993.

BARRETT, J. D.; PARK, Y. S.; BONGA, J. M. The effectiveness of various nitrogen sources in white spruce [*Picea glauca* (Moench) Voss] somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v.16, n.6, p.411-415, 1997.

BERGER, J.; ABBO, J.; TURNER, N. C. Ecogeography of annual wild cicer species: The poor state of the world collection. **Crop Science**, Madison, v.43, p.1076-1090, 2003.

BLANC, G. et al. Differential carbohydrate metabolism conducts morphogenesis in embryogenic callus of *Hevea brasiliensis* (Müll. Arg.). **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v.53, n.373, p.1453-1462, 2002.

BOVI, M. L. A.; CARDOSO, M. Germinação de Sementes de Palmitreiro (*Euterpe edulis* Mart.) I. **Bragantia**, Campinas, v.35, n.6, p.23-29, 1976

CAIRNEY, J.; PULLMAN, G. S. The cellular and molecular biology of conifer embryogenesis. **New Phytologist**, London, v.176, p.511-536, 2007.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CNPq, v.1, p.87-132, 1998.

CÂMARA, G.; DAVIS, C. Introdução. In: CÂMARA, G.; DAVIS, C.; MONTEIRO, A. M. V. **Introdução a ciência da geoinformação**. São José dos Campos: INPE, 2001, 344p.

CÁNOVAS, F. M. et al. Molecular physiology of glutamine and glutamate biosynthesis in developing seedlings of conifers. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.103, n.2, p.287-294, 1998.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies Arbóreas Brasileiras**. Colombo: Embrapa Florestas, 2003. 1039p.

CATARINA, C. S. et al. Repetitive somatic embryogenesis of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae): effect of somatic embryo developmental stage and dehydration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.78, n.1, p.55-62, 2004.

CHEDIACK, S. E.; BAQUEIRO, M. F. Extração e conservação do palmito. In: GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I. de G. **Mata Atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas**. São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica - Belo Horizonte: Conservação Internacional, 2005. p.406-412.

CYR, D. R; KLIMASZEWSKA, K. Conifer somatic embryogenesis: II. Applications. **Dendrobiology**, Kórnik, v.48, p.41-49, 2002.

DAL VESCO, L. L.; GUERRA, M. P. The effectiveness of nitrogen sources in *Feijoa* somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.64, n.1, p.19-25, 2001.

DODEMAN, V. L.; DUCREUX, G.; KREIS, M. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v.48, n.313, p.1493-1509, 1997.

DROUAL, A. M. et al. Autonomy to plant growth regulators and gene expression in Periwinkle cultures *in vitro*. **Journal of Plant Physiology**, Irvine, v.153, n.5-6, p.623-630, 1998.

DUNSTAN, D. I.; TAUTORUS, T. E; THORPE, T. A. Somatic embryogenesis in woody plants. In: THORP, T.A. (ed.) ***In vitro* embryogenesis in plants**. Dordrech: Kluwer Academic, 1995. p.471-538.

DUSSERT, S.; VERDEIL, J. L.; BUFFARD-MOREL, J. Specific nutrient uptake during initiation of somatic embryogenesis in coconut calluses. **Plant Science**, Limerick, v.111, p. 229-236, 1995.

EKE, C. R.; AKOMEAH, P.; ASEMOTA, O. Somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) from apical meristem tissues from 'zebia' and 'loko' landraces. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.4, n.3, p.244-246, 2005.

ENGELMANN, F. *In vitro* conservation methods. In: CALLOW, J. A.; FORD-LLOYD, B. V.; NEWBURY, H. J. (Eds.). **Biotechnology and plant genetic resources**. Wallingford: CAB International, 1997. p.119-161.

ENGELMANN, F.; BATUGAL, P. A. Background on the development and implementation of the coconut embryo *in vitro* culture project. In: ENGELMANN, F.; BATUGAL, P. A.; OLIVER, J. (Ed.). **Coconut embryo in vitro culture**. Malaysia: IPGRI-APO, 2002, v.2, p.1-4.

ENGELMANN, F.; ENGELS, J. M. M. Technologies and Strategies for *ex situ* conservation. In: ENGELS, J. M. M. et al. (Eds.). **Managing Plant Genetic Diversity**. Oxford: IPGRI, 2002, p.89-103.

FAHRIG, L. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. **Annual Reviews of Ecology, Evolution and Systematics**, Palo Alto, v.34, p.487-515, 2003.

FANG, J. Y.; WETTEN, A.; HADLEY, P. Cryopreservation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) somatic embryos of long-term germplasm storage. **Plant Science**, Limerick, v.166, p.669-675, 2004.

FANTINI, A. C. et al. Estimativa da produção de palmito em plantas de palmiteiro (*Euterpe edulis* Martius) a partir de características fenotípicas. **Revista Árvore**, Viçosa, v.21, n.1, p.49-57, 1997.

FEHER, A.; PASTERNAK, T. P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.74, p.201-228, 2003.

FERNANDO, S. C.; GAMAGE, C. K. A. Abscisic acid induced somatic embryogenesis in immature embryo explants of coconut (*Cocos nucifera* L.). **Plant Science**, Limerick, v.151, n.2, p.193-198, 2000.

FERNANDO, S. C. et al. Histological analysis of plant regeneration from plumule explants of *Cocos nucifera*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.72, n.3, p.281-284, 2003.

FERREIRA, M. das G. R. et al. Resposta de eixos embrionários de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.) à concentração de sais, doses de sacarose e renovação do meio de cultivo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24, n.1, p.246-248, 2002.

FUENTES, G. et al. Exogenous sucrose can decrease *in vitro* photosynthesis but improve field survival and growth of coconut (*Cocos nucifera* L.) *in vitro* plantlets. **In Vitro Cellular and Development Biology**, Heidelberg, v.41. n.1, p.69-76, 2005.

GARIN, É. et al. Effect of sugars, amino acids, and culture technique on maturation of somatic embryos of *Pinus strobus* on medium with two gellan gum concentrations. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.62, n.1, p.27-37, 2000.

GEERTS, P.; MERGEAI, G.; BAUDOIN, J. P. Rescue of early heart-shaped embryos and plant regeneration of *Phaseolus polyanthus* Greenm. and *Phaseolus vulgaris* L. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment**, Gembloux, v.3, n.3, p.141-148, 1999.

GEPTS, P. Plant Genetic Resources Conservation and Utilization: The Accomplishments and Future of a Societal Insurance Policy. **Crop Science**, Madison, v.46, p.2278-2292, 2006.

GONZÁLEZ, E. A. J.; MENDOZA, E. Q. Semilla artificial. In: PEREZ PONCE, J. N. et al. **Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología**, Santa Clara, v.1, p.225-240, 1998.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI / EMBRAPA-CNPQ, v.1, p.183-260, 1999.

GREENE, S.L.; HART, T.C.; AFONIN, A. Using geographic information to acquire wild crop germplasm for *ex situ* collections: I. Map development and field use. **Crop Science**, Madison, v.39, n.3, p.836-842, 1999a.

GREENE, S. L.; HART, T. C.; AFONIN, A. Using geographic information to acquire wild crop germplasm for *ex situ* collections: II. Post-collection analysis. **Crop Science**, Madison, v.39, n.3, p.843-849, 1999b.

GUARINO, L. et al. Geographic information systems and the conservation and use of plant genetic resources. In: ENGELS, J. M. M.; RAO, V. R.; BROWN, A. H. D.; JACKSON, M. T. (Eds.). **Managing Plant Genetic Diversity**. IPGRI, 2002, p.387-404.

GUERRA, M. P. et al. Embriogênese somática e micropropagação do palmitreiro. **Sellowia**, Itajaí, v.49-52, p.150-162, 2000.

GUERRA, M. P. et al. Somatic embryogenesis in goiabeira serrana: genotype response, auxinic shock and synthetic seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v.13, n.2, p.117-128, 2001.

GUERRA, M. P.; HANDRO, W. Micropropagação do palmitreiro (*Euterpe edulis* Mart.). In: CROCOMO, O. J.; SHARP, W. R.; MELO, M. (Eds.). **Biotecnologia para produção vegetal**. CEBTEC/FEALQ, Piracicaba, 1991a. p.345-354.

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.1, p.65-71, 1998.

GUERRA, M. P.; HANDRO, W. Somatic embryogenesis in tissue cultures of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae). In: AHUDA, M. R. (Ed.) **Woody Plant Biotechnology**. Plenum Press, New York, 1991b. p.189-196.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa-SPI, Embrapa-CNPq, v.2, p.533-568, 1999.

HÄGGMAN, H. M.; RYNNÄNEN, L. A.; ARONEN, T. S.; KRAJNAKOVA, J. Cryopreservation of embryogenic cultures of Scots pine. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.54, p.45-53, 1998.

HALPIN, C.; BOERJAN, W. Stacking transgenes in forest trees. **Trends in Plant Science**, London, v.8, n.8, p.363-365, 2003.

HAN, K. H.; PARK, Y. G. Somatic embryogenesis in Black Locust (*Robinia pseudoacacia* L.). In: JAIN, S. M.; GUPTA, R. J.; NEWTON, R. J. (eds.) **Somatic Embryogenesis in Woody Plants**, Dordrecht, v. 5, p. 149-161, 1999.

HERNÁNDEZ, I.; CELESTINO, C.; TORIBIO, M. Vegetative propagation of *Quercus suber* L. by somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v.21, n.8, p.759-764, 2003.

HENDERSON, A. The genus *Euterpe* in Brazil. **Sellowia**, Itajaí, v.49-52, p.1-22, 2000.

HIJMANS, R. J. et al. Computer tools for spatial analysis of plant genetic resources data: 1. DIVA-GIS. **Plant Genetic Resources Newsletter**, Rome, n.27, p.15-19, 2001.

HITA, O. et al. Improvement of somatic embryogenesis in *Medicago arborea*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.72, n.1, p.13-18, 2003.

HÖGBERG, K. A. et al. Integration of somatic embryogenesis in a tree breeding programme: a case study with *Picea abies*. **Canadian Journal of Forest Research**, Vancouver, v.28, n.10, p.1536-1545, 1998.

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

HUONG, L. T. L. et al. Somatic embryogenesis in Canary Island date palm. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.56, n.1, p.1-7, 1999.

IGASAKI, T. et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of *Cryptomeria japonica* D. Don. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v.22, n.4, p. 239-243, 2003.

IPEKCI, Z.; GOZUKIRMIZI, N. Direct somatic embryogenesis and synthetic seed production from *Paulownia elongata*. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v.22, n.1, p.16-24, 2003.

IRAQI, D.; TREMBLAY, F. M. The role of sucrose during maturation of black spruce [*Picea mariana* (Mill.) BSP] and white spruce [*Picea glauca* (Moench) Voss] somatic embryos. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.111, n.3, p.381-388, 2001.

JAIN, A.; ROUT, G. R.; RAINA, S. N. Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of *Phlox paniculata* Linn. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.94, n1-2, p. 137-143, 2002.

JARVIS, A. et al. Biogeography of wild *Arachis*: assessing conservation status and setting future priorities. **Crop Science**, Madison, v.43, n.3, p.1100-1108, 2003.

JARVIS, A. et al. Use of GIS for optimizing a collecting mission for a rare wild pepper (*Capsicum flexuosum* Sendtn.) in Paraguay. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, n.52, p.671-682, 2005.

JIMÉNEZ, V. M. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on to the role of endogenous hormones. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v.13, n.2, p.196-223, 2001.

JONES, P. G.; GUARINO, L.; JARVIS, A. Computer tools for spatial analysis of plant genetic resources data: 2. FloraMap. **Plant Genetic Resources Newsletter**, Rome, n.130, p.1-6, 2002.

JONES, P. G.; BEEBE, S. E.; TOHME, J. The use of geographical information systems in biodiversity exploration and conservation. **Biodiversity and Conservation**, Dordrecht, v.6, n.7, p.947-958, 1997.

JOOST, S.; CONSORTIUM, E. Combining biotechnologies and giscience to contribute to sheep and goat genetic resources conservation. **The Role of Biotechnology**, Villa Gualiano, Turin, Italy (5-7 March), p.109-116, 2005.

KALIL FILHO, A. N. et al. Espécies Recomendadas Para a Restauração da Mata Atlântica. In: GALVÃO, A. P. M.; MEDEIROS, A. C. de S. **Restauração da Mata Atlântica em Áreas de sua Primitiva Ocorrência Natural**. Colombo: Embrapa Florestas, 2002. p.77-133.

KANCHANAPOOM, K.; CHOURKAEW, B.; PATCHARAPISUTSIN, W. Beneficial of activated charcoal on embryo culture of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, Thailand, v.23, n.3, p.317-323, 2001.

KÄRKÖNEN, A. Anatomical study of zygotic and somatic embryos of *Tilia cordata*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.61, n.3, p.205-214, 2000.

KARUN, A. et al. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from leaf and inflorescence explants of arecanut (*Areca catechu* L.). **Current Science**, Bangalore, v.86, n.12, p.1623-1628, 2004.

KIM, Y. W. et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of Japanese larch (*Larix leptolepis*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.55, n.2, p.95-101, 1999.

KIM, T. D.; ANBAZHAGAN, V. R.; PARK, J. I. Somatic embryogenesis in *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. **In Vitro Cellular and Development Biology**, Heidelberg, v.41, n.3, p. 253-257, 2005.

KIRBY, E. G.; LEUSTEK, T.; LEE, M. S. Nitrogen Nutrition. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. (Eds.) **Cell and Tissue Culture in Forestry**. Dordrecht: Canadian Forestry Service and University of California. 1987. v.1, p.67-88.

KRIKORIAN, A. D.; KELLY, K.; SMITH, D. L. Hormones in tissue culture and micropropagation. In: DAVIES, P. J. (Ed.). **Plant hormones and their role in plant growth and development**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1987, p.593-613.

KUMAR, S.; SHARMA, P.; PENTAL, D. A genetic approach to in vitro regeneration of non-regenerating cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cultivars. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v.18, p.59-63, 1998.

LAWRENCE, M. J. A comprehensive collection and regeneration strategy for *ex situ* conservation. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 49, n. 2, p.199-209, 2002.

LEDO, A. da S. et al. Cultura *in vitro* de embriões zigóticos de açazeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.3, p.468-472, 2001.

LEDO, A. da S. et al. Somatic embryogenesis from zygotic embryos of *Euterpe oleracea* Mart. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24, n.3, p.601-603, 2002a.

LEDO, A. da S.; LAMEIRA, O. A.; MENEZES, I. C. de. **Embriogênese somática e regeneração de plantas em açazeiro**. Rio Branco: Embrapa Acre, 2002b. 22 p.

LININGTON, S. H.; TENNER, C.; SMITH, R. D. Seed banks: *ex situ* is not out of place. **The Biologist**, London, v.50, n.5, p.202-207, 2003.

LIPOW, S. R. et al. Gap analysis of conserved genetic resources of forest trees. **Conservation Biology**, Malden, v.18, n.2, p.412-423, 2004.

LÓPEZ-VILLALOBOS, A.; DODDS, P. F.; HORNUNG, R. Changes in fatty acid composition during development of tissues of coconut (*Cocos nucifera* L.) embryos in the intact nut and *in vitro*. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v.52, n.358, p.933-942, 2001.

LORENZI, H.; MELLO FILHO, L. E. de. **As plantas tropicais de R. Burle Max**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2001, 504 p.

MACIEL, A. L. de R. et al. Embriogênese somática indireta em explantes foliares de *Coffea arabica* L. cv. obata. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v.27, n.1, p.107-116, 2003.

MANTOVANI, A; MORELLATO, P. Fenologia da floração, frutificação, mudança foliar e aspectos da biologia floral. **Sellowia**, Itajaí, v.49-52, p.23-38, 2000.

MARTÍNEZ, M. T.; BALLESTER, A.; VEITEZ, A. M. Cryopreservation of embryogenic cultures of *Quercus robur* desiccation and vitrification procedures. **Cryobiology**, York, v.46, n.2, p.182-189, 2003.

MARTINEZ-RUIZ, R. et al. Aplicación de la biotecnología en los recursos genéticos forestales. **Revista Chapingo**, Texcoco, v.9, n.1, p.17-34, 2003.

MARTINS, C. C. et al. Temporary storage of jussara palm seeds: effects of time, temperature and pulp on germination and vigor. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, n.2, p. 271-276, 2004.

MAXIMOVA, S. N. et al. Efficiency, genotypic variability, and cellular origin of primary and secondary somatic embryogenesis of *Theobroma cacao* L. **In Vitro Cellular Development Biology**, Heidelberg, v.38, p.252-259, 2002.

MCLEAN, N. L.; NOWAK, J. Inheritance of somatic embryogenesis in red clover (*Trifolium pretense* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.97, p.557-562, 1998.

MELO, B de. et al. Diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e desenvolvimento das plântulas na cultura *in vitro* de embriões da guarirrobeira [*Syagrus oleracea* (MART.) BECC.]. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v.25, n.6, p.1301-1306, 2001.

MELO, L. A. M. P. de; BURLE, M. L.; NORONHA, S. E. de. **Sistema de informação geográfica aplicado a recursos genéticos**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2002, 39 p.

MERKLE, S. A.; PARROT, W. A.; WILLIAMS, E. G. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In: THORP, T.A. (ed.) **In vitro embryogenesis in plants**. Dordrech: Kluwer Academic, 1995. p.150-203.

MONNIER, M. Culture of zygotic embryos. In: THORPE, T.A. **In vitro embryogenesis in plants**. Kluwer Academic Publishers, 1995. p.117-153.

MORELLATO, L. P. C.; HADDAD, C. F. B. Introduction: The Brazilian Atlantic Forest. **Biotropica**, Lawrence, v.32, n.4b, p.786-792, 2000.

MROGINSKI, L.; SANSBERRO, P.; FLASCHLAND, E. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. In: ECHENIQUE, V. et al. **Biotecnología y Mejoramiento Vegetal**. Buenos Aires: INTA, p.35-42, 2004.

NODARI, R. O. et al. Restauração de populações de *Euterpe edulis* Martius (Arecaceae) na Mata Atlântica. **Sellowia**, Itajaí, v.49-52, p. 189-201, 2000.

OLORODE, O. Conservation of plant genetic resources. **African Journal Traditional Complementary and Alternative Medicines**, Ile-Ife, v. 1, p. 4-14, 2004.

PEREIRA, L. B. A economicidade do palmitero (*Euterpe edulis* Martius) sob manejo em regime de rendimento sustentado. **Sellowia**, Itajaí, v.49-52, p.225-234, 2000.

PERERA, P. I. P. et al. Unfertilized ovary: a novel explant for coconut (*Cocos nucifera* L.) somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v.26, n.1, p.21-28, 2007.

PHILLIPS, G. C. *In vitro* morphogenesis in plants - recent advances. **In Vitro Cellular and Development Biology**, Heidelberg, v.40, n.4, p. 342-345, 2004.

PRESSEY, R. L. et al. Using abiotic data for conservation assessments over extensive regions: quantitative methods applied across New South Wales, Australia. **Biological Conservation**, London, v.96, n.1, p.55-82, 2000.

RAEMAKERS, C. J. J.; JACOBSEN, E.; VISSER, R. G. F. Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. **Euphytica**, Dordrecht, v.81, n.1, p.93-107, 1995.

RAGHAVAN, V. One hundred years of zygotic embryo culture investigations. **In Vitro Cellular and Development Biology**, Heidelberg, v.39, n.5, p.437-442, 2003.

RAJESH, M. K. et al. Plant regeneration from embryo-derived callus of oil palm - the effect of exogenous polyamines. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.75, n.1, p. 41-47, 2003.

RAMAROSANDRATANA, A. V.; STADEN, J. V. Tissue position, explant orientation and naphthaleneacetic acid (NAA) affect initiation of somatic embryos and callus proliferation in Norway spruce (*Picea abies*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.74, n.3, p.249-255, 2003.

RAMBABU, M. et al. *In vitro* zygotic embryo culture of an endangered forest tree *Givotia rottleriformis* and factors affecting its germination and seedling growth. **In Vitro Cellular and Development Biology**, Heidelberg, v.42, n.5, p.418-421, 2006.

RAO, N. K. Plant genetic resources: advancing conservation and use through biotechnology. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.3, n.2, p.136-145, 2004.

RAO, V. R.; RODGKIN, T. Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.68, n.1, p.1-19, 2002.

RAVIKANTH, G.; GANESHAIAH, K. N.; UMA SHAANKER, R. Identification of hot spots of species richness and genetic variability in rattans: an approach using geographical information systems (GIS) and molecular tools. **Plant Genetic Resources Newsletter**, Rome, v.132, p.17-21, 2002.

REIS, A.; KAGEYAMA, P. Y. Dispersão de sementes de *Euterpe edulis* Martius Palmae. **Sellowia**, Itajaí, v.49-52, p.60-92, 2000.

REIS, M. S. dos et al. Distribuição geográfica e situação atual das populações na ocorrência de *Euterpe edulis* Martius. **Sellowia**, Itajaí, v.49-52, p.324-335, 2000a.

REIS, M. S. dos et al. Management and Conservation of Natural Populations in Atlantic Rain Forest: The Case Study of Palm Heart (*Euterpe edulis* Martius). **Biotropica**, Lawrence, v.32, n.4, p.894-902, 2000b.

REITZ, R.; KLEIN, M.; REIS, A. **Projeto madeira do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Companhia Rio-grandense de Artes Gráficas, 1988. 522p.

RODRIGUEZ, D. et al. Áreas potenciales para colectas del Género *Vasconcellea* Badillo en Venezuela. **Bioagro**, Barquisimeto, v.17, n.1, p.3-10, 2005.

RUNO, M. S.; MULUVI, G. M.; ODEE, D. W. Analysis of genetic structure in *Melia volkensii* (Gurke.) populations using random amplified polymorphic DNA. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.3, n.8, p.421-425, 2004.

SALAJ, T.; SALAJ, J. Somatic embryo formation on mature *Abies alba* x *Abies cephalonica* zygotic embryo explants. **Biologia Plantarum**, Prague, v.47, n.1, p.7-11, 2004.

SANÉ, D. et al. Histocytological analysis of callogenesis and somatic embryogenesis from cell suspensions of date palm (*Phoenix dactylifera*). **Annals of Botany**, London, v.98, n.2, p.301-308, 2006.

SANTA-CATARINA, C.; MACIEL, S. da C.; PEDROTTI, E. Germinação *in vitro* e embriogênese somática a partir de embriões imaturos de canela sassafrás (*Ocotea odorifera* Mez). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.24, n.4, p.501-510, 2001.

SANTOS, A. L. W. dos et al. Somatic embryogenesis in Parana Pine (*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.45, n.1, p.97-106, 2002.

SARASAN, V.; RAMSAY, M. M.; ROBERTS, A. V. *In vitro* germination and induction of direct somatic embryogenesis in 'Bottle Palm' [*Hyophorbe lagenicaulis* (L. Bailey) H.E. Moore], a critically endangered Mauritian palm. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v.20, n.12, p.1107-1111, 2002.

SAXENA, S. et al. Costs of conservation of agrobiodiversity in India. In: VIRCHOW, D. (Ed.). **Efficient conservation of crop genetic diversity**. Springer-Verlag, 2003, p.137-174.

SHARMA, D. R.; KAUR, R.; KUMAR, K. Embryo rescue in plants: a review. **Euphytica**, Dordrecht, v.89, n.3, p.325-337, 1996.

SILVA, M. das G. C. P. C.; BARRETTO, W. de S.; SERÔDIO, M. H. Caracterização química da polpa dos frutos de juçara e de açaí. In: XVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 22., 2004, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis, 2004. 1CD-ROM.

SLATER, A.; SCOTT, N.; FOWLER, M. **Plant Biotechnology: the genetic manipulation of plants**. Oxford: Oxford University Press, 2003, 346p.

SLESÁK, H.; PRZYWARA, L. The effect of carbohydrate source on the development of *Brassica napus* L. immature embryos *in vitro*. **Acta Biologica Cracoviensia**, Cracow, v.45, n.2, p.183-190, 2003.

SOBROSA, R. C.; CORDER, M. P. M. Efeito do genótipo sobre o potencial para produção de gemas e raízes adventícias em *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden *in vitro*. **Floresta e Ambiente**, Seropédica, v.10, n.1, p.58-68, 2003.

SPERA, M. R. N.; CUNHA, R. da; TEIXEIRA, J. B. Quebra de dormência, viabilidade e conservação de sementes de buriti (*Mauritia flexuosa*). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, n.12, p.1567-1572, 2001.

STEINMACHER, D. A. **Germinação *in vitro*, criopreservação e embriogênese somática em Pupunha**. 2005. 146f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

STEINMACHER, D. A.; CLEMENT, C. R.; GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis from immature peach palm inflorescence explants: towards development of an efficient protocol. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.89, n.1, p.15-22, 2007a.

STEINMACHER, D. A. et al. Somatic embryogenesis from peach palm zygotic embryos. **In Vitro Cellular and Development Biology**, Heidelberg, v.43, n.2, p.124-132, 2007b.

STEINMACHER, D. A. et al. Somatic embryogenesis in Peach Palm using the Thin Cell Layer Technique: Induction, Morpho-histological Aspects and AFLP Analysis of Somaclonal Variation. **Annals of Botany**, London, v.100, n.4, p.699-709, 2007c.

SUTTON, B. Commercial delivery of genetic improvement to conifer plantations using somatic embryogenesis. **Annals of Forest Science**, Les Ulis, v.59, p.657-661, 2002.

TESSERAU, H.; FLORIN, B.; MESCHINE, M. C.; THIERRY, C.; PÉTIARD, D. Cryopreservation of somatic embryos: a tool for germplasm storage and commercial delivery of selected plants. **Annals of Botany**, London, v.74, p.547-555, 1994.

TISSERAT, B. Date palm. In: SHARP, W. R.; EVANS, D. A.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. (Eds.). **Handbook of plant cell culture**. New York: Macmillan. v.2, 1984, p.505-545.

TOMLINSON, P. B. Systematics and ecology of the palmae. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v.10, p.85-107, 1979.

TZEC-SIMÁ, M. A.; ORELLANA, R.; ROBERT, M. L. *In vitro* rescue of isolated embryos of *Bactris major* jacq. and *Desmoncus orthacanthos* mart., potentially useful native palms from the Yucatan Peninsula (Mexico). **In Vitro Cellular and Development Biology**, Heidelberg, v.42. n.1, p.54-58, 2006.

VERDEIL, J. L. et al. Ultrastructural changes in coconut calli associated with the acquisition of embryogenic competence. **Annals of Botany**, London, v.88, p.9-18, 2001.

VICIENT, C. M.; MARTÍNEZ, F. X. The potential uses of somatic embryogenesis in agroforestry are not limited to synthetic seed technology. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v.10, n.1, p.1-12, 1998.

VON ARNOLD, S. et al. Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.69, n.3, p.233-249, 2002.

ZIV, M. Bioreactor Technology for Plant Micropropagation. **Horticultural Reviews**, New York, v.24, p.1-30, 2000.

XAVIER-DA-SILVA, J. et al. Índices de geodiversidade de SGI em estudos de biodiversidade. In: GARAY, I.E.G.; DIAS, B.F.S. (Eds.). **Conservação da biodiversidade em ecossistemas tropicais: avanços conceituais e revisão de novas metodologias de avaliação e monitoramento**. Petrópolis: Editora Vozes, 2001, p.299-316.

CAPITULO I

Morfogênese *in vitro* de embriões zigóticos e bainhas foliares de *Euterpe edulis* Mart. (Arecaceae)

Morfogênese *in vitro* de embriões zigóticos e bainhas foliares de *Euterpe edulis* Mart. (Arecaceae)¹

RESUMO - Como o palmitheiro não apresenta um sistema de propagação vegetativa natural, a técnica de cultura de tecidos mostrou-se adequada tanto para a conservação e multiplicação em larga escala de germoplasma, dessa espécie ameaçada de extinção. O presente estudo visou aprimorar as condições de cultivo, e descrever os principais eventos morfogênicos *in vitro* em embriões zigóticos e bainhas foliares de *E. edulis*, visando desenvolver e adaptar um protocolo de embriogênese somática. Embriões zigóticos foram inoculados em meio MS, suplementado com 2,4-D (0, 30, 35, 40 mg.L⁻¹), 3 mg.L⁻¹ de 2iP, 0,5 g.L⁻¹ de glutamina, 0,5 g.L⁻¹ de carvão ativado; 30 g.L⁻¹ de glicose ou sacarose, e geleificado com 5 g.L⁻¹ de ágar. Bainhas foliares, extraídas de plântulas germinadas *in vitro*, foram inoculadas em meio MS, suplementado com Picloram (72,3 mg.L⁻¹) ou 2,4-D (66,3 mg.L⁻¹), 3 mg.L⁻¹ de 2iP, glutamina (0; 0,29; 0,58; 1,17 g.L⁻¹), 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativado, e geleificado com 2,5 g.L⁻¹ de Phytigel. Embriões somáticos indiretos foram induzidos a partir de embriões zigóticos, em meio suplementado com 40 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 30 g.L⁻¹ de sacarose. A maior porcentagem de formação de calos, em bainhas foliares, ocorreu em meio MS suplementado com 1,17 g.L⁻¹ de glutamina e 66,3 mg.L⁻¹ de 2,4-D. O estudo demonstrou a possibilidade de propagação do palmitheiro, através da embriogênese somática, além da importância da suplementação do meio de cultura com uma fonte de nitrogênio orgânico, na morfogênese *in vitro* de bainhas foliares.

Palavras-chave: palmitheiro, cultura de tecidos, reguladores de crescimento, embriogênese somática.

***In vitro* morphogenesis in zygotic embryos and leaf sheaths of *Euterpe edulis* Mart. (Arecaceae)**

ABSTRACT - Heart of palm does not present a natural way of vegetative propagation, so the technique of culture of tissues showed to be adequated for the conservation and multiplication in large scale of germplasm of this endangered species. The present study aimed to improve the conditions of culture and describe

¹ Publicado na **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.6, n.3, p.228-235, 2006.

the principal *in vitro* morphogenic events in zygotic embryos and leaf sheaths of *E. edulis*, with the objective to develop and adapt a protocol for somatic embryogenesis. Zygotic embryos were inoculated in MS culture medium supplemented with 2.4-D (0, 30, 35, 40 mg.L⁻¹), 3 mg.L⁻¹ 2iP, 0.5 g.L⁻¹ glutamine, 0.5 g.L⁻¹ activated charcoal; 30 g.L⁻¹ glucose or sucrose and gelled with 5 g.L⁻¹ Agar. Leaf sheaths extracted from plantlets germinated *in vitro* were inoculated on MS culture medium supplemented with Picloram (72.3 mg.L⁻¹) or 2.4-D (66.3 mg.L⁻¹), 3 mg.L⁻¹ 2iP, glutamine (0; 0.29; 0.58; 1.17 g.L⁻¹), 1.5 g.L⁻¹ activated charcoal and gelled with 2.5 g.L⁻¹ Phytigel®. Indirect somatic embryos were induced from zygotic embryos on culture medium with 40 mg.L⁻¹ 2.4-D and 30 g.L⁻¹ sucrose. The highest percentage of callus formation on leaf sheaths occurred in MS culture medium supplemented with 1.17 g.L⁻¹ glutamine and 66.3 mg.L⁻¹ 2.4-D. This study demonstrated the possibility of propagation of heart of palm through somatic embryogenesis and the importance of supplementation of the medium of culture with a source of organic nitrogen in the *in vitro* morphogenesis of leaf sheaths of heart of palm.

Keywords: heart of palm, tissue culture, growth regulators, somatic embryogenesis

1 INTRODUÇÃO

Euterpe edulis Martius pertence à família Palmae (Arecaceae). Possui o estipe simples, em média com 5 a 10 m de altura. É popularmente conhecida como palmitero juçara, juçara ou ripa (CARVALHO, 2003). É encontrada do sul da Bahia até o Rio Grande do Sul, junto ao litoral. Também ocorre nas florestas do interior nos estados de Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e Distrito Federal (CARVALHO, 2003). Predominantemente, aparece no estrato médio da floresta (REIS et al., 2000).

O valor econômico do palmitero está relacionado com a produção do palmito, um alimento de alto valor dietético, composto pelo ápice caulinar que se encontra envolvido por um conjunto de folhas adultas, sendo considerado botanicamente

como a gema apical responsável pelo desenvolvimento da palmeira. Para obter o palmito é necessário cortar a palmeira, acarretando na morte da mesma (CARVALHO, 2003).

As populações naturais de palmitreiro foram drasticamente reduzidas, devido à ação antrópica, sendo que, atualmente, são encontradas apenas em áreas restritas da Mata Atlântica. A exploração extrativista e clandestina foi considerada uma ameaça para a sustentabilidade das populações naturais de palmitreiro (REIS e KAGEYAMA, 2000). Contudo, a espécie possui grande potencial, para ser manejada em regime de rendimento sustentado por seu ciclo relativamente curto, oferecendo uma importante fonte de renda ao agricultor (PEREIRA, 2000). A importância ecológica do palmitreiro relacionou-se com os níveis de interação dentro das comunidades florestais, uma vez que o seu fruto foi considerado fonte de alimento para aves e mamíferos, como roedores, marsupiais, primatas e morcegos (REIS e KAGEYAMA, 2000).

A propagação do palmitreiro é fundamental para a manutenção e a ampliação das populações remanescentes. A regeneração natural da espécie não foi suficiente para recompor estas populações (REIS et al., 2000). A propagação do palmitreiro ocorre exclusivamente por sementes, as quais perdem o poder germinativo em poucos meses (CARVALHO, 2003). Por se tratar de sementes recalcitrantes, a redução do teor de umidade em sementes de palmitreiro, abaixo de 28%, ocasiona a perda de viabilidade e, conseqüentemente, queda nas taxas de germinação, dificultando seu armazenamento por períodos prolongados (REIS et al., 1999).

Como o palmitreiro não apresenta um sistema de propagação vegetativa natural (rebentos ou afilhos) e não responde aos métodos convencionais de propagação vegetativa (GUERRA et al., 2000), a técnica de cultura de tecidos mostrou-se adequada tanto para a sua conservação, como para a multiplicação em larga escala de germoplasma. A embriogênese somática é a única técnica de propagação agâmica capaz de regenerar o palmitreiro. A embriogênese somática foi descrita como a técnica que compreende o desenvolvimento de estruturas bipolares com um eixo radical-apical (embriões somáticos) a partir de células haplóides ou diplóides, recapitulando os eventos morfogênicos do desenvolvimento de um embrião zigótico (GUERRA et al., 1999).

A técnica de embriogênese somática tem sido utilizada para a propagação massal de genótipos superiores. Além disso, tem sido amplamente aplicada em

estudos básicos relacionados com o controle fisiológico, genético e bioquímico do desenvolvimento embrionário (YEUNG, 1995).

O estudo da cultura *in vitro* de palmeiras geralmente está relacionado com a rápida propagação, cultura de embriões e estudos fisiológicos do crescimento e do desenvolvimento, sendo que a rápida propagação ocorre através da organogênese ou da embriogênese somática (TISSERAT, 1984). A cultura *in vitro* de espécies florestais tem sido utilizada com bastante sucesso para a propagação de genótipos em espécies com importância econômica, entretanto, a cultura *in vitro* vem desempenhando papel fundamental no fornecimento de material e na regeneração de plantas na área de transformação genética (MERKLE e DEAN, 2000).

A regeneração *in vitro*, através da embriogênese somática, foi relatada primeiramente em *E. edulis*, por GUERRA e HANDRO (1991a,b). Posteriormente, os estudos de GUERRA e HANDRO (1998) e GUERRA et al. (2000) apontaram a embriogênese somática como a rota mais indicada para a regeneração *in vitro* de palmitero.

Deste modo, o presente estudo objetivou aprimorar as condições de cultivo, e descrever os principais eventos morfogênicos *in vitro*, em embriões zigóticos e bainhas foliares de *E. edulis*, visando desenvolver e adaptar um protocolo de embriogênese somática.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local de estudo

Este estudo foi conduzido nas dependências do Laboratório de Biotecnologia Florestal (BIOFLOR/UFSM) da Universidade Federal de Santa Maria (RS).

2.2 Embriões zigóticos

Os frutos verdes de palmitheiro, com endosperma semi-gelatinoso (Figura 1A), foram colhidos em uma população plantada de *E. edulis*, no município de Santa Maria (Rio Grande do Sul). Em câmara de fluxo laminar, os frutos foram desinfestados com a imersão em solução composta por Agrimicina 1,5 g.L⁻¹, Hipoclorito de sódio 20% (v/v), Captan 4 g.L⁻¹, Benlate 0,7 g.L⁻¹, durante 15 minutos, sob agitação, e, posteriormente, foram enxaguados em água bidestilada estéril, por quatro vezes, e secos em placas de Petri, contendo discos estéreis de papel filtro.

Os embriões zigóticos (Figura 1B), que foram retirados dos frutos, foram inoculados em tubos de ensaio (25×150 mm) contendo 10 mL de meio de cultura MS [MURASHIGE e SKOOG, 1962 (Anexo I)], suplementado com as vitaminas de Morel [MOREL e WETMORE, 1951 (Anexo II)], 5 g.L⁻¹ de ágar, 0,5 g.L⁻¹ de glutamina, 3 mg.L⁻¹ de 2iP e 0,5 g.L⁻¹ de carvão ativado, além de diferentes concentrações de 2,4-D, conforme recomendações de GUERRA et al. (2000). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8, antes da adição do geleificante, e, em seguida, submetido à esterilização em autoclave a 127°C e 2 atmosfera (Anexo III), durante 15 min.

Para a indução de embriogênese somática foram testadas quatro concentrações de 2,4-D (0; 30; 35; 40 mg.L⁻¹), combinadas com glicose ou sacarose (30 g.L⁻¹). Para a maturação dos embriões somáticos, foi utilizado o meio de cultura MS, adicionado das vitaminas de Morel e 2iP (3 mg.L⁻¹). Para a conversão dos embriões somáticos em plântulas, foi utilizado o meio de cultura MS, com 50% da concentração salina original (MS/2) e as vitaminas de Morel, sem a adição de ANA, conforme GUERRA et al. (2000). A porcentagem de calos induzidos foi avaliada aos 90 dias após a inoculação.

O delineamento experimental foi em Blocos ao acaso, em que os tratamentos constaram de quatro concentrações de 2,4-D, combinados com duas fontes de carboidrato em esquema fatorial (4x2), totalizando 8 tratamentos, em 6 repetições. Cada parcela foi constituída por dois tubos de ensaio, com um embrião cada. Foi utilizado o delineamento em Blocos ao acaso devido a possibilidade de variações dentro da sala de incubação.

Para a indução da embriogênese somática (240 dias), da maturação (30 dias) e da conversão dos embriões somáticos (30 dias) não foram realizados subcultivos.

Na fase de indução as culturas foram mantidas em sala de crescimento, com temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, e ausência de luz. Durante a maturação e germinação os embriões somáticos, as culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura igual a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas. Os resultados de porcentagem de calos formados nos explantes, nos diferentes tratamentos foram transformados em *arco seno* \sqrt{x} , e submetidos à análise de variância, em nível de 5% de significância.

2.3 Bainhas foliares

Embriões de palmitreiro foram extraídos de frutos maduros e germinados *in vitro*. Para a germinação *in vitro*, foi utilizado meio de cultura MS com 50% da concentração salina original (MS/2), suplementado com vitaminas de Morel, 30 g.L^{-1} de sacarose, $1,5\text{ g.L}^{-1}$ de carvão ativado e 7 g.L^{-1} de ágar. As culturas foram mantidas em sala de incubação, com temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas de luz e intensidade de $50\text{-}60\ \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Bainhas foliares com aproximadamente 7 cm de altura foram isoladas de plântulas oriundas da germinação *in vitro* de embriões zigóticos.

Secções transversais das bainhas foliares ($1\pm 0,5\text{mm}$) foram inoculadas em placas de Petri (diâmetro= 10 cm) contendo 30 mL de meio de cultura MS, suplementado com as vitaminas de Morel, 30 g.L^{-1} de sacarose, $1,5\text{ g.L}^{-1}$ de carvão ativado, $2,5\text{ g.L}^{-1}$ de Phytigel, 3 mg.L^{-1} de 2iP e diferentes concentrações de glutamina (0; 0,29; 0,58; $1,17\text{ g.L}^{-1}$) em combinação com Picloram ($72,3\text{ mg.L}^{-1}$) e 2,4-D ($66,3\text{ mg.L}^{-1}$). As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ e na ausência de luz.

O delineamento experimental foi em Blocos ao acaso, com os tratamentos compostos por duas fontes de auxina e quatro concentrações de glutamina, em esquema fatorial (2x4), totalizando 8 tratamentos, em 3 repetições. Cada parcela foi

constituída por três placas de Petri, com 10 segmentos transversais de bainhas foliares.

As avaliações foram feitas através da contagem da formação, aos 60 dias, após a inoculação. Para a análise de variância, os valores foram transformados. As porcentagens de calos (nódulos) na base dos explantes, e também a porcentagem de calos com pigmentação de antocianina foram transformados em *arco seno* \sqrt{x} e, submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey, em nível de 5% de significância.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Embriões zigóticos

A embriogênese somática, a partir de embriões zigóticos de *E. edulis*, seguiu um modelo indireto, com a formação de calos, seguida pela indução de tecidos embriogênicos. Aos 90 dias, os embriões zigóticos inoculados em meio de cultura, suplementado com 40 mg.L⁻¹ de 2,4-D (com glicose ou sacarose), produziram calos compactos, com coloração amarelada, e intensa pigmentação de antocianina na região do nó cotiledonar (Figura 1C). Estes resultados coincidiram com aqueles reportados por GUERRA et al. (2000), no quais se observou que embriões zigóticos de *E. edulis*, cultivados em meio de cultura MS, contendo altos níveis de 2,4-D (100 mg.L⁻¹), tiveram a germinação inibida, sendo que os tecidos embrionários sofreram expansão. Na testemunha (0 mg.L⁻¹ de 2,4-D) observou-se uma germinação normal nos embriões zigóticos, a qual correspondeu à emissão de primórdios foliares e radiculares, e ao desenvolvimento do haustório.

Não houve diferença significativa entre as fontes de carboidrato, na formação de calos [glicose (\bar{x} = 46%), e a sacarose (\bar{x} = 42%)], na indução de calos. Os demais tratamentos apresentaram como respostas morfogênicas apenas uma intensa formação de tecido haustorial (correspondente à lâmina cotiledonar), com coloração branca e aspecto esponjoso (Figura 1D).

Aos 240 dias, foi observado que as culturas mantidas em meio suplementado com $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de carvão ativado e 40 mg.L^{-1} de 2,4-D apresentaram características embriogênicas, gerando estruturas globulares e translúcidas (Figura 1E), notadamente nas regiões do calo em contato com o meio de cultura. A iniciação direta de embriões somáticos de *E. edulis* foi observada sobre os tecidos do pecíolo cotiledonar de embriões zigóticos, inoculados em meio de cultura MS, complementado com carvão ativado ($1,5 \text{ g.L}^{-1}$) e 100 mg.L^{-1} de 2,4-D (GUERRA et al., 2000). As características do modelo embriogenético, observado no presente estudo, são similares àquelas reportadas por GUERRA e HANDRO (1998).

A discordância entre a concentração adequada de 2,4-D para a indução da embriogênese somática de palmitreiro, neste estudo (40 mg.L^{-1}) e aquela relatada por GUERRA et al. (2000) (100 mg.L^{-1}), foi atribuída à diferença na concentração de carvão ativado suplementado ao meio de cultura, sendo que no presente estudo usou-se $0,5 \text{ g.L}^{-1}$, e GUERRA et al. (2000) empregaram $1,5 \text{ g.L}^{-1}$. O carvão ativado pode adsorver diversas substâncias presentes no meio de cultura, dentre essas, os fitoreguladores (EYMAR et al., 2000). Correlações foram encontradas entre os níveis de carvão ativado presentes no meio de cultura e o total de 2,4-D livre e disponível (TOERING e PULLMAN, 2005).

Dentre os fatores que afetaram a indução e a expressão da embriogênese somática do palmitreiro, salientam-se as condições fisiológicas da planta matriz, o estágio de desenvolvimento do explante, a composição do meio de cultura, e o tipo, balanço e concentração dos fitoreguladores, principalmente as auxinas (GUERRA e HANDRO, 1998). A intensa formação de tecido haustorial em menores concentrações de 2,4-D sugeriu que, no presente estudo, a auxina teve papel fundamental na supressão da germinação e na aquisição da competência embriogenética dos tecidos do explante.

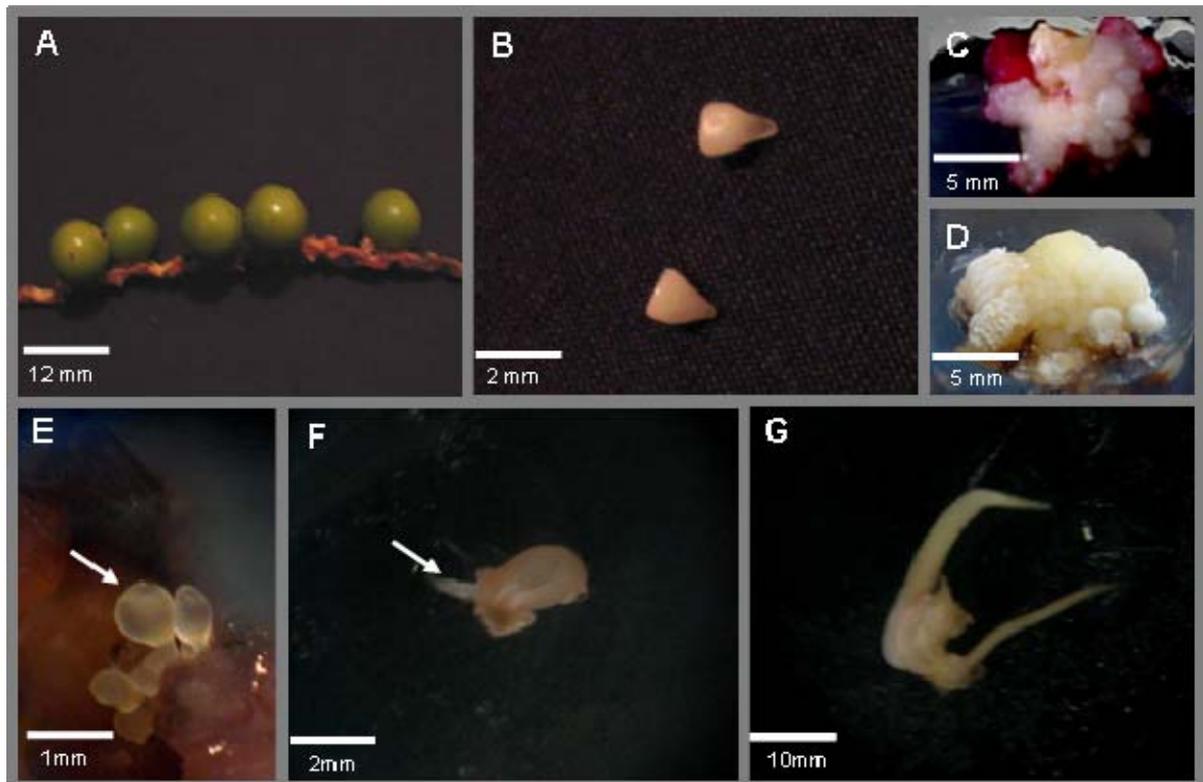


Figura 1 - Embriogênese somática *in vitro* de embriões zigóticos imaturos de palmeiro (*Euterpe edulis* Mart.). A) Frutos verdes. B) Embriões zigóticos recém excisados. C) Cultura de calos compactos embriogênicos com coloração amarelada e intensa pigmentação de antocianina na região do nó cotiledonar. D) Tecido haustorial com coloração branca e aspecto esponjoso. E) Embriões somáticos (seta) desenvolvidos sobre tecido embriogênico friável em meio de cultura MS com 3 mg.L^{-1} de 2iP e 40 mg.L^{-1} de 2,4-D, aos 240 dias após a inoculação. F) Radícula em embrião somático começando a germinar, aos 280 dias. G) Plântula somática com eixo radicular e parte aérea, aos 300 dias.

Aos 240 dias após a inoculação, as culturas embriogênicas contendo embriões somáticos globulares e tecido embriogênico friável foram transferidas para meios de cultura MS sem carvão ativado e suplementado com 3 mg.L^{-1} de 2iP,. Os embriões somáticos globulares progrediram para estágios bipolares, após a transferência para o meio de cultura, em um período de 30 dias. Quando os embriões somáticos foram transferidos para meio de cultura MS/2 com $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ de carvão ativado e livre de fitoreguladores, após 10 dias, verificou-se que embriões somáticos maduros emitiram radícula (Figura 1F), seguida pela emissão da parte aérea e da formação completa da plântula, aos 300 dias após a inoculação (Figura 1G). GUERRA e HANDRO (1998) relataram que, em 180 dias, obtiveram plântulas completas, oriundas de embriões somáticos, induzidos a partir de embriões zigóticos

imaturos de *E. edulis*. Entretanto, os autores relataram que o processo de embriogênese somática em embriões maduros de *E. edulis* foi mais demorado, começando 90 dias após a inoculação.

3.2 Bainhas foliares

A formação de calos em bainhas foliares de plântulas jovens de palmiteiro foi favorecida significativamente pelas fontes de auxina Picloram e 2,4-D ($p < 0,05$), porém não ocorreram diferenças significativas entre as diferentes concentrações de glutamina (Figura 2).

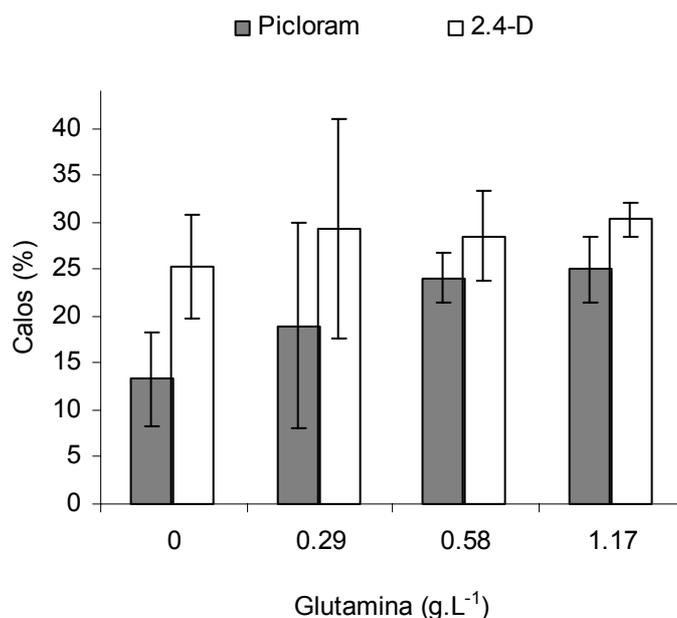


Figura 2 - Porcentagem de indução de calos, a partir de explantes de bainhas foliares de palmiteiro (*Euterpe edulis* Mart.), em meio de cultura MS suplementado com diferentes concentrações de glutamina e diferentes fontes de auxina [Picloram (72,3 mg.L⁻¹) ou 2,4-D (66,3 mg.L⁻¹)], aos 60 dias. As médias dos tratamentos foram apresentadas com desvio padrão (\pm).

As análises morfológicas revelaram que a proliferação celular dos tecidos de bainhas foliares ocorreu a partir de regiões adjacentes aos feixes vasculares, gerando a formação de nódulos (Figura 3), após 30 dias em cultura. Os mesmos eventos morfogênicos a partir de folhas jovens de palmiteiro foram observados por

GUERRA e HANDRO (1998). Esse padrão de resposta morfogênica *in vitro* não parece ser exclusivo das monocotiledôneas, uma vez que os tecidos embriogênicos formaram-se a partir de células parenquimáticas, com alta atividade mitótica em explantes foliares de *Coffea arabica* (QUIROZ-FIGUEROA et al., 2002).

No presente estudo, a adição de 66,3 mg.L⁻¹ de 2,4-D ao meio de cultura resultou em uma maior taxa de indução de calos em bainhas foliares, em comparação com as taxas observadas no meio suplementado com 72,3 mg.L⁻¹ de Picloram (Tabela 1). Esses resultados foram similares àqueles observados por GUERRA e HANDRO (1998), os quais ressaltaram que o 2,4-D foi essencial para a indução de calos em segmentos de bainha foliar de palmitreiro. No entanto, outros estudos utilizando palmeiras relataram que o Picloram promoveu respostas morfogênicas similares (KARUN et al., 2004; GOH et al., 2000).

A porcentagem de calos friáveis, mostrando a presença de antocianina, foi de 11% em resposta ao meio de cultura suplementado com Picloram, e 3,1% em resposta ao 2,4-D (Tabela 1). Durante a indução de embriogênese somática em embriões zigóticos de palmitreiro, ocorreu intensa pigmentação de antocianina no pecíolo cotiledonar, de onde surgiram os embriões somáticos (GUERRA e HANDRO 1991a). O acúmulo de antocianina poderia estar relacionado a outros fatores como a luz, a fonte de nitrogênio no meio de cultura, o tipo de açúcar, o estresse osmótico, a temperatura e as fontes de fitoregulador (ZHANG et al. apud IKRAM-UL-HAQ e ZAFAR, 2004). Em culturas embriogênicas de *Gossypium hirsutum*, a produção de antocianina foi um forte indicador de estresse fisiológico, causado pela adição de diferentes fontes de nitrogênio ao meio de cultura (IKRAM-UL-HAQ e ZAFAR, 2004).

A indução da embriogênese somática em palmeiras, a partir de explantes foliares, foi reportada em várias espécies como: *Areca catechu* (KARUN et al., 2004), *Phoenix dactylifera* (AL-KHAYRI e AL-BAHRANY, 2004), *Calamus spp.* (GOH et al., 2000), *E. edulis* (GUERRA et al., 2000; GUERRA e HANDRO, 1998). Em bases foliares de *E. edulis*, inoculadas em meio MS líquido (sem carvão ativado), suplementado com 2,4-D ou ANA (10 e 20 mg.L⁻¹) e 2iP (3 mg.L⁻¹), houve à expansão das lâminas foliares e o surgimento de estruturas nodulares, aos 30 dias em cultura (GUERRA et al., 2000). Na palmeira *Phoenix dactylifera* foram induzidos calos, quando primórdios foliares foram inoculados por 12 semanas em meio de cultura com 2,4-D (100 mg.L⁻¹) e 2iP (3 mg.L⁻¹), com 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativado (AL-KHAYRI e AL-BAHRANY, 2004).

Tabela 1 - Efeito de diferentes auxinas na formação de calos e acúmulo de antocianina em explantes de bainhas foliares de palmitero (*Euterpe edulis* Mart.) cultivados *in vitro*, 60 dias após a inoculação.

Fonte de auxina	Formação de calos (%)	Calos com antocianina (%)
2,4 - D (66,3 mg.L ⁻¹)	28,4a*	3,1b*
Picloram (72,3 mg.L ⁻¹)	20,3b	10,7a

* Médias seguidas por letras distintas diferem pelo teste de Tukey a 5%. Coeficiente de variação para a formação de calos (CV%): 15,7%; e coeficiente de variação para calos com acúmulo de antocianina (CV%): 9,5%.

No presente estudo, verificou-se que a presença de 1,17 g.L⁻¹ de glutamina, combinada com 66,3 mg.L⁻¹ de 2,4-D proporcionou a maior porcentagem de indução de calos em bainhas foliares (Figura 2). O nitrogênio presente no meio de cultura foi considerado determinante no sucesso da embriogênese somática de espécies vegetais (GUERRA et al. 1999). A suplementação do meio de cultura com uma fonte de nitrogênio orgânico foi um fator preponderante para a indução da embriogênese somática, em várias espécies florestais (KIRBY et al., 1987). No presente estudo, o aumento da concentração de glutamina como fonte de nitrogênio orgânico no meio de cultura resultou em incremento na taxa de indução de calos em bainhas foliares de palmitero. Em outros sistemas embriogênicos, como o de *Feijoa sellowiana*, a glutamina suplementada ao meio de cultura LPm (VON ARNOLD e ERIKSSON, 1981) aumentou o número de embriões somáticos a partir de embriões zigóticos imaturos (DAL VESCO e GUERRA, 2001). Os aminoácidos, como fontes de nitrogênio orgânico, foram mais utilizados em meios de cultura para a indução de embriogênese somática; sendo que, em alguns casos, foram fundamentais para a formação de calos e embriões somáticos (KIRBY et al., 1987). A glutamina, além de ser precursora na síntese de outros aminoácidos, é também um dos primeiros precursores da cadeia de reações para a síntese de poliaminas, intermediada pela síntese de ornitina (TAIZ e ZEIGER, 2002). As poliaminas exercem várias funções no reino vegetal, e são frequentemente derivadas da descarboxilação de aminoácidos (BAGNI e BIONDI, 1987). Os mesmos autores relataram que os níveis de poliamina e as taxas de crescimento dos tecidos vegetais mostraram correlação positiva, sugerindo participação nos mecanismos de controle da divisão celular. Adicionalmente, resultados apontaram para influência positiva de poliaminas

(exógenas e endógenas) na morfogênese *in vitro*. A aplicação exógena de poliaminas aumentou significativamente a taxa de embriogênese somática em calos derivados de embriões zigóticos em *Elaeis guineensis* (RAJESH et al., 2003). No presente estudo, a suplementação do meio de cultura com glutamina pode, entre outros, ter resultado no incremento do metabolismo de poliaminas, influenciando a morfogênese *in vitro* dos explantes.

Diferentes respostas morfogênicas foram observadas entre bainhas foliares, retiradas de diversas posições na plântula de palmiteiro. Os explantes retirados da região subapical, apresentaram intensa oxidação e os da região apical apresentaram intumescimento, após 30 dias, em meio de cultura MS, com 2,4-D ($66,3 \text{ mg.L}^{-1}$) ou Picloram ($72,3 \text{ mg.L}^{-1}$). Adicionalmente, uma intensa proliferação de calos foi observada na base desses explantes (Figura 3C), aos 60 dias em cultura. Os explantes sem pigmentação de clorofila responderam com a formação de nódulos. Quando os explantes foram retirados de tecidos clorofilados e, portanto, mais diferenciados, foi observada intensa oxidação, aos 30 dias após a inoculação. A regeneração de plantas *in vitro* dependeu da fonte de material vegetal, sendo que, normalmente explantes juvenis de mais de 80 gimnospermas e angiospermas mostraram-se mais responsivos que os originados de tecidos adultos (RAEMAKERS et al., 1995). No presente estudo, explantes com bainhas foliares de palmiteiro pouco diferenciadas apresentaram respostas morfogenéticas. Diferentes taxas de iniciação de calos foram observadas, em segmentos extraídos de diferentes porções de eixos embrionários de *Cocos nucifera*, em resposta à competência regenerativa dos tecidos dos explantes (GOMES et al., 2004).



Figura 3 - Morfogênese *in vitro* de bainhas foliares de palmiteiro (*Euterpe edulis* Mart.). A) Plântula utilizada para a retirada das bainhas foliares (explantes). B) Eixo caulinar depois de retirada das folhas mais externas. C) Nódulo com intensa pigmentação de antocianina (seta), aos 60 dias. D) Tecido do meristema com aspecto intumescido (seta estreita), e nódulo com aspecto amarelado (seta larga), aos 60 dias.

Os resultados obtidos, no presente estudo, mostraram que a iniciação de embriões somáticos, a partir de embriões zigóticos de *E. edulis*, foi dependente de elevadas concentrações 2,4-D no meio de cultura. A concentração de 2,4-D para a indução de embriogênese somática em embriões zigóticos de *E. edulis* foi menor quando comparada com outros estudos que descrevem esta rota morfogenética na regeneração *in vitro* de palmitero. Em bainhas foliares a maior taxa de indução de calos foi dependente da fonte de auxina (2,4-D) e da adição de elevadas concentrações de glutamina (1,17 g.L⁻¹) ao meio de cultura.

O desenvolvimento de protocolo de embriogênese somática para *E. edulis* mostrou-se fundamental para o estabelecimento de programas para a conservação e o melhoramento genético. Os resultados obtidos apontaram para o potencial de emprego deste modelo morfogenético para o palmitero, visto que foi possível a regeneração completa de plântulas, através da embriogênese somática. GUERRA e HANDRO (1998) apontaram esta rota morfogenética como sendo a principal para a regeneração *in vitro* de *E. edulis*. Os resultados obtidos para a indução de embriogênese somática em embriões zigóticos estiveram conforme resultados reportados por GUERRA e HANDRO (1998), pois apenas em altas concentrações de 2,4-D foi possível a indução de embriões somáticos. Entretanto, para bainhas foliares foi demonstrado no presente estudo que a suplementação do meio de cultura com uma fonte de nitrogênio orgânico possibilitou respostas morfogenéticas superiores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-KHAYRI, J. M.; AL-BAHRANY, A. M. Genotype-dependent *in vitro* response of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars to silver nitrate. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.99, n.2, p.153-162, 2004.

BAGNI, N.; BIONDI, S. Polyamines. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. (Eds.) **Cell and Tissue Culture in Forestry**. Dordrecht: Canadian Forestry Service and University of California, v.1, 1987, p.113-124.

CARVALHO, P .E. R. **Espécies Arbóreas Brasileiras**. Embrapa Florestas, Colombo. 2003. 1039p.

DAL VESCO, L. L.; GUERRA, M. P. The effectiveness of nitrogen sources in *Feijoa* somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.64, n.1, p.19-25, 2001.

EYMAR, E. et al. Effect of activated charcoal and 6-benzyladenine on *in vitro* nitrogen uptake by *Lagerstroemia indica*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.63, n.1, p.57-65, 2000.

GOH, D. K. S.; MONTEUUIS, O.; BOM, M. C. Somatic embryogenesis in rattan (*Calamus spp.*). In: JAIN, S. M.; GUPTA, P. K. ; NEWTON, R. J. (Eds.). **Somatic embryogenesis in woody plants**. Kluwer Academic Publishers, 2000. p.569-585.

GOMES, K. K. P. et al. Indução de calo a partir de eixo embrionário de coqueiro (*Cocos nucifera* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.26, n.1, p.124-126, 2004.

GUERRA, M. P. et al. Embriogênese somática e micropropagação do palmitreiro. **Sellowia**, Itajaí, v.49-52, p.150-162, 2000.

GUERRA, M. P.; HANDRO, W. Micropropagação do palmitreiro (*Euterpe edulis* Mart.). In: CROCOMO, O. J.; SHARP, W. R.; MELO, M. (Eds.). **Biotecnologia para produção vegetal**. CEBTEC/FEALQ, Piracicaba, 1991a. p.345-354.

GUERRA, M. P.; HANDRO, W. Somatic embryogenesis in tissue cultures of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae). In: AHUDA, M. R. (Ed.) **Woody Plant Biotechnology**. Plenum Press, New York, 1991b. 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.1, p.65-71, 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. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Embrapa-SPI / Embrapa-CNPQ, Brasília, v.2, 1999. p.533-568.

IKRAM-UL-HAQ; ZAFAR, Y. Effect of nitrates on embryo induction efficiency in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.3, n.6, p.319-323, 2004.

KARUN, A. et al. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from leaf and inflorescence explants of arecanut (*Areca catechu* L.). **Current Science**, Bangalore, v.86, n.12, 1623-1628, 2004.

KIRBY, E. G.; LEUSTEK, T.; LEE, M. S. Nitrogen Nutrition. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. (Eds.) **Cell and Tissue Culture in Forestry**. Dordrecht: Canadian Forestry Service and University of California, v.1, 1987. p.67-88.

MERKLE, S. A.; DEAN, J. F. D. Forest biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, Oxford, v.11, p.298-302, 2000.

MOREL, G. M.; WETMORE, R. H. Fern callus tissue culture. **American Journal of Botany**, Saint Louis, v.38, n.2, p.141-143, 1951.

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

PEREIRA, L. B. A economicidade do palmitreiro (*Euterpe edulis* Martius) sob manejo em regime de rendimento sustentado. **Sellowia**, Itajaí, v.49-52, p.225-234, 2000.

QUIROZ-FIGUEROA, F. R. et al. Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v.20, n.12, p.1141-1149, 2002.

RAEMAKERS, C. J. J; JACOBSEN, E.; VISSER, R. G. F. Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. **Euphytica**, Dordrecht, v.81, n.1, p.93-107, 1995.

RAJESH, M. K. et al. Plant regeneration from embryo-derived callus of oil palm - the effect of exogenous polyamines. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.75, n.1, p.41-47, 2003.

REIS, M. S. et al. Distribuição geográfica e situação atual das populações na área de ocorrência de *Euterpe edulis* Martius. **Sellowia**, Itajaí, v.49-52, p.324-335, 2000.

REIS, A.; KAGEYAMA, P.Y. Dispersão de sementes de *Euterpe edulis* Martius Palmae. **Sellowia**, Itajaí, v.49-52, p.60-92, 2000.

REIS, A. et al. Efeito de diferentes níveis de dessecação na germinação de sementes de *Euterpe edulis* Martius Arecaceae. **Insula**, Florianópolis, v.28, p.31-42, 1999.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 3^oed. Sunderland: Sinauer Associates. 2002. 690p.

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

TOERING, A.; PULLMAN, G. S. Modeling available 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in a tissue culture medium containing activated carbon. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.82, n.2, p.179-188, 2005.

YEUNG, E. C. Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. In: THORPE, T. A. (Ed.) **In vitro embryogenesis in plants**. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1995. p.205-247.

CAPITULO II

Germinação *in vitro* e embriogênese somática direta em embriões zigóticos imaturos de *Euterpe edulis* Mart. (Arecaceae)

Germinação *in vitro* e embriogênese somática direta em embriões zigóticos imaturos de *Euterpe edulis* Mart. (Arecaceae)

RESUMO - O palmitreiro (*Euterpe edulis*) é uma espécie característica da Mata Atlântica, que se apresenta, atualmente, ameaçada de extinção. O desenvolvimento de estratégias para a conservação de germoplasma desta espécie torna-se necessário. Uma das formas de conservação *in vitro* de germoplasma pode ser tanto através da cultura *in vitro* de embriões zigóticos ou através da embriogênese somática. Os objetivos do presente estudo foram elucidar a influência da concentração salina e da sacarose no meio de cultura, durante a germinação de embriões zigóticos e estudar a influência da adição de diferentes concentrações de Cloreto de cálcio ao meio de cultura MS na indução de embriogênese somática, em embriões zigóticos imaturos de *E. edulis*. Para avaliar a germinação *in vitro* de embriões zigóticos, foram inoculados em meio de cultura MS, adicionado das vitaminas de Morel, 7 g.L⁻¹ de ágar e 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativado. Os tratamentos consistiram de diferentes concentrações do meio MS (MS e MS/2), combinadas com diferentes concentrações de sacarose (20, 30 e 40 g.L⁻¹). Foi utilizado o delineamento em Blocos ao acaso, em 6 repetições, sendo cada repetição constituída por cinco tubos de ensaio, contendo um embrião cada. Para a indução de embriogênese somática, embriões zigóticos imaturos foram extraídos e inoculados em meio de cultura MS, suplementado com as vitaminas de Morel, 7 g.L⁻¹ de ágar, 0,5 g.L⁻¹ de glutamina, 3 mg.L⁻¹ de 2iP, 100 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativado e diferentes concentrações de Cloreto de cálcio (0, 2, 4, 8, 12 mM). Utilizou-se o delineamento estatístico em Blocos ao acaso, com 6 repetições. Cada parcela foi constituída por um frasco, contendo quatro embriões zigóticos imaturos. Para a conversão dos embriões somáticos em plântulas, usou-se duas concentrações de sais minerais do meio de cultura MS (50 e 100%). Verificou-se que a germinação de embriões zigóticos de palmitreiro não foi afetada pela concentração salina do meio de cultura e de sacarose. Entretanto, o crescimento em altura e a produção de massa fresca das plântulas foram afetados pelos tratamentos. O aumento da concentração de sacarose, de 20 para 40 g.L⁻¹, no meio de cultura resultou em acréscimo na massa fresca das plântulas. A composição dos diferentes meios de cultura não influenciou o número médio de raízes por plântula de palmitreiro. A indução de embriogênese somática em embriões zigóticos imaturos de

E. edulis não foi influenciada pela adição de diferentes concentrações de Cloreto de cálcio ao meio de cultura, aos 60 dias. Entretanto, foram observadas diferenças entre as diversas concentrações de Cloreto de cálcio, quanto ao número de embriões somáticos formados, aos 150 dias. O aumento na concentração de Cloreto de cálcio, resultou em decréscimo no número médio de embriões somáticos produzidos. A concentração de sais do meio MS não afetou à capacidade de germinação dos embriões somáticos. O processo de indução de embriogênese somática, em embriões zigóticos imaturos de *E. edulis*, ocorreu diretamente a partir do nó cotiledonar. O presente estudo evidenciou que a suplementação do meio de cultura (MS ou MS/2) com sacarose (30 ou 40 g.L⁻¹) foi necessária, para o desenvolvimento das plântulas de palmitero oriundas de embriões zigóticos imaturos. Os resultados confirmaram a possibilidade de propagar a palmeira *E. edulis* através da embriogênese somática direta, pois foram produzidas plântulas completas.

Palavras-chave: palmitero, germinação *in vitro*, micropropagação, Cloreto de cálcio.

***In vitro* germination and direct somatic embryogenesis in immature zygotic embryos of *Euterpe edulis* Martius (Arecaceae)**

ABSTRACT - Heart of palm (*Euterpe edulis*) is a characteristic species of Atlantic Forest that presently is threatened to extinction. Then, the development of strategies for germplasm conservation of this species becomes necessary. The *in vitro* conservation of germplasm could be realized by different ways like by the culture *in vitro* of zygotic embryos and by somatic embryogenesis. The aim of this study was to clear the influence of saline and of sucrose concentration in a culture medium during the germination and to study the influence of the addition of different concentrations of calcium chloride to the medium of culture MS in the induction of somatic embryogenesis in immature zygotic embryos of *E. edulis*. The evaluation of germination *in vitro* of zygotic embryos of *E. edulis* occurred through the inoculation in medium of culture MS added by Morel vitamins, 7 g.L⁻¹ of agar and 1.5 g.L⁻¹ of activated charcoal. The treatments were different concentrations of the mediums MS (MS and MS/2) combined with different concentrations of sucrose (20, 30 and 40 g.L⁻¹). It was used the Random Blocks Delineate, with six repetitions, each one

constituted by five test tubes with one embryo per tube. For the induction of somatic embryogenesis, immature zygotic embryos were extracted and inoculated in a culture medium MS supplemented with Morel Vitamins, 7 g.L⁻¹ of agar, 0.5 g.L⁻¹ of glutamine, 3 mg.L⁻¹ of 2iP, 100 mg.L⁻¹ of 2,4-D and 1.5 g.L⁻¹ of activated charcoal and different concentrations of calcium chloride (0, 2, 4, 8, 12 mM). It was used the statistical delineate in Random Blocks with six repetitions. Each parcel was constituted by one flask containing four immature zygotic embryos. For the conversion of the somatic embryos in seedlings they were used two saline concentrations of the medium culture MS (50 and 100%). It was verified that the concentration was not affected by the saline concentration of the medium culture and of sucrose. But the growing in height and the production of fresh mass of the seedlings were affected by the treatments. The increasing of concentration of sucrose of 20 to 40 g.L⁻¹ in the medium culture resulted in the increasing in the fresh mass of the seedlings. The composition of the different mediums of culture did not influence the mean number of roots per seedling of heart of palm. The induction of somatic embryogenesis in immature zygotic embryos was not significantly influenced by the addition of different concentrations of calcium chloride to the medium, after 60 days. But, they were observed significant differences among the concentrations of calcium chloride for the number of somatic embryos formed, after 150 days. The increasing on the concentration of calcium chloride in the medium of culture resulted in a decrease in the mean number of somatic embryos produced. The salt concentration of the medium MS did not affected the germination capacity of the somatic embryos. The process of induction of somatic embryogenesis in the immature zygotic embryos of *E. edulis* occurred directly from the cotyledonal node of the embryo. The present study evidenced that the supplementation of the medium of culture (MS or MS/2) with sucrose (30 or 40 g.L⁻¹) was necessary for the growing of the seedlings of heart of palm originated from immature zygotic embryos. The results confirmed the possibility to propagate the palm *E. edulis* through direct somatic embryogenesis, because they were produced complete seedlings.

Keywords: heart of palm, *in vitro* germination, micropropagation, Calcium chloride.

1 INTRODUÇÃO

O palmiteiro (*Euterpe edulis*) tem sido propagado exclusivamente por sementes, as quais perdem o poder germinativo em poucos meses de armazenamento, dificultando a conservação em longo prazo (CARVALHO, 2003). Atualmente, suas populações apresentam alta vulnerabilidade devido à extração de seu principal produto comercial, o palmito (REIS et al., 2000). Desta maneira, o desenvolvimento de estratégias para a conservação de germoplasma desta espécie faz-se necessário.

A propagação *in vitro* de palmeiras despertou interesse por facilitar à produção de mudas de material elite em escala comercial, por produzir plantas livres de patógenos e por acelerar programas de melhoramento (LEDO et al., 2001). Dentre as técnicas de propagação *in vitro*, podem-se destacar as técnicas de cultura de embriões e de embriogênese somática (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1999).

A técnica de cultura de embriões foi amplamente empregada para resgatar embriões que geralmente seriam abortados e para superar a dormência de sementes recalcitrantes (RAGHAVAN, 2003). Adicionalmente, a cultura *in vitro* de embriões zigóticos de palmeiras foi considerada auxiliar ao intercâmbio de germoplasma (BAH et al., 1991; LEDO et al. 2007). A cultura de embriões em espécies vegetais foi aplicada com sucesso em programas de melhoramento genético, principalmente na cultura de embriões imaturos, com o objetivo de produzir plântulas mais rapidamente, do que no método tradicional de germinação de sementes (LIU et al., 2004). Vários estudos descreveram a cultura de embriões de zigóticos em diversas palmeiras: *Bactris major* (TZEC-SIMÁ et al., 2006); *Cocos nucifera* (LEDO et al., 2007; PECH et al., 2007; FUENTES et al., 2005; LEDO et al., 2001); *Desmoncus orthacanthos* (TZEC-SIMÁ et al., 2006); *Elaeis guineensis* (KANCHANAPOOM et al., 2001) e *Hyophorbe lagenicaulis* (SARASAN et al., 2002).

A embriogênese somática direta reduz o tempo necessário para a propagação *in vitro* de plantas e o número de divisões celulares para a formação do embrião somático. Tais características minimizam possíveis alterações genéticas, que normalmente, ocorreriam durante o cultivo *in vitro* (NETO et al., 2003). Adicionalmente, o processo de embriogênese somática ofereceu a possibilidade de propagar um grande número de genótipos superiores, em um curto período de

tempo. Esta técnica foi utilizada com várias finalidades, como: produção de sementes sintéticas, propagação em grande escala em biorreatores e estudos de transformação genética de plantas (DESAI et al., 2004). Vários estudos demonstraram a possibilidade da regeneração completa de plântulas de palmeiras, empregando a técnica de embriogênese somática, tais como em: *B. gasipaes* (STEINMACHER et al., 2007), *Phoenix dactylifera* (SANÉ et al., 2006), *Elaeis guineensis* (RAJESH et al., 2003), *H. lagenicaulis* (SARASAN et al., 2002) e *E. edulis* (GUERRA et al., 2000). A embriogênese somática tem sido uma técnica adequada para a propagação clonal de espécies lenhosas para a captura de ganhos genéticos, tem inúmeras vantagens como a propagação em larga escala, potencial para a automatização, produção de sementes sintéticas, armazenamento à longo prazo (criopreservação) e transformação genética (JAIN, 2007).

A indução e o desenvolvimento de embriões somáticos dependem de várias condições, tais como: composição do meio de cultura, genótipo, fonte de explantes, tipo e concentração dos fitoreguladores (GUERRA et al., 1999). A influência de fatores nutricionais do meio de cultura foi estudada na iniciação de cultura embriogênicas em *C. nucifera* (DUSSERT et al., 1995). A iniciação da embriogênese somática de *C. nucifera* foi associada a substâncias específicas como o NH_4^+ , o Ca^{2+} , o Mg^{2-} e a sacarose, pois as células embriogênicas apresentaram um alto acúmulo destes nutrientes.

O cálcio é considerado mensageiro secundário, em muitos eventos regulados por hormônios, exercendo um papel fundamental em vários processos celulares e fisiológicos em plantas superiores (HARPER, 2001), de modo que pode estimular a embriogênese somática de espécies vegetais (TAKEDA et al., 2003; ARRUDA et al., 2000). Foi reportado que esse íon interfere na determinação do crescimento polarizado, na alongação e divisão celular, e na organização do citoesqueleto da célula (ARRUDA et al., 2000). O estabelecimento do crescimento polarizado foi relatado como um importante mecanismo, para a diferenciação inicial do embrião em plantas (CUTTER, 1986).

Os objetivos foram estudar a influência das concentrações salina e de sacarose no meio de cultura durante a germinação e da adição de diferentes concentrações de cálcio ao meio de cultura, na indução de embriogênese somática em embriões zigóticos imaturos de *E. edulis*, visando a conservação *in vitro*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

O estudo foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Florestal da Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul (BIOFLOR/UFSM).

Foram utilizados embriões zigóticos imaturos, extraídos de frutos verdes de *E. edulis*, com endosperma gelatinoso, coletados em uma população de palmitreiro, no município de Santa Cruz do Sul (RS), com 29°41'1" de latitude sul e 52°26'46" de longitude oeste.

Após desinfestação superficial com água corrente e detergente neutro os frutos foram imersos em solução composta por Agrimicina 1,5 g.L⁻¹, Hipoclorito de sódio 20% (v/v), Captan 4 g.L⁻¹, durante 15 min, sob agitação constante. Posteriormente, os frutos foram enxaguados quatro vezes em água bidestilada e autoclavada, secos em placas de Petri, contendo discos estéreis de papel filtro. O procedimento de desinfestação foi realizado em câmara de fluxo laminar.

2.2 Germinação *in vitro* de embriões zigóticos

Embriões zigóticos foram retirados e inoculados em tubos de ensaio (25×150 mm) contendo aproximadamente 10 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), suplementado com as vitaminas de Morel (MOREL e WETMORE, 1951), 7 g.L⁻¹ de ágar e 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativado, em diferentes concentrações de sais e sacarose. Antes da adição de geleificante, o pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 e, posteriormente, submetido à esterilização em autoclave a 127°C e 2 atmosfera, durante 15 minutos.

As culturas foram mantidas em sala de incubação com temperatura de 25±2°C, e ausência total de luz, nos primeiros dez dias. Posteriormente, as culturas foram transferidas para uma sala de incubação com temperatura de 25±2°C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade de 45 μmol.m⁻².s⁻¹.

O delineamento experimental utilizado foi em Blocos ao acaso com 6 repetições. Cada repetição foi constituída por cinco tubos de ensaio, contendo um embrião cada. Os tratamentos consistiram de duas concentrações de sais minerais do meio de cultura MS (50 e 100%), respectivamente designados de MS e MS/2, combinadas com diferentes concentrações de sacarose (20; 30 e 40 g.L⁻¹). Não foram realizados subcultivos.

A porcentagem de germinação dos embriões zigóticos imaturos de palmitreiro foi avaliada aos 40 dias, após a inoculação. O número de raízes, altura das plântulas e massa fresca foram avaliados aos 100 dias após a inoculação.

Os resultados de porcentagem de germinação foram transformados em *arco seno* \sqrt{x} , o número de raízes foi transformado em $\sqrt{x+0,5}$, e submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey, em nível de 5% de significância.

2.3 Indução de embriogênese somática

Os embriões zigóticos foram retirados dos frutos verdes e inoculados em frascos de vidro (250 mL), contendo aproximadamente 30 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), suplementado com as vitaminas de Morel (MOREL e WETMORE, 1951), 30 g.L⁻¹ de sacarose, 7 g.L⁻¹ de ágar, 0,5 g.L⁻¹ de glutamina, 3 mg.L⁻¹ de 2iP, 100 mg.L⁻¹ de 2,4-D, 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativado [Recomendado por GUERRA et al. (2000)] e diferentes concentrações de cálcio [(Na forma de Cloreto de cálcio (CaCl₂)]. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da adição do ágar e posteriormente, foi submetido à esterilização em autoclave a 127°C e 2 atmosfera, durante 15 minutos.

A influência da adição de diferentes concentrações de cálcio (0, 2, 4, 8 e 12 mM de CaCl₂) ao meio MS foram testadas, durante a fase de indução de embriogênese somática. A maturação dos embriões somáticos foi realizada através da repicagem das culturas embriogênicas para o meio de cultura MS suplementado com as vitaminas de Morel, 7 g.L⁻¹ de ágar, 0,5 g.L⁻¹ de glutamina, 3 mg.L⁻¹ de 2iP, 50 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativado. Para a conversão dos embriões somáticos em plântulas foram testados os meios de cultura MS (Com 50 e 100% da concentração salina original).

As culturas foram mantidas em sala de incubação com temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$, e ausência total de luz, nas fases de indução e maturação. Durante a germinação, os embriões somáticos foram mantidos em sala de incubação, com temperatura igual a $25\pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo igual a 16 horas e intensidade de $45\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

No ensaio de indução de embriogênese somática, o delineamento experimental foi em Blocos ao acaso, com 5 tratamentos compostos pela adição de diferentes concentrações de Cloreto de cálcio (0, 2, 4, 8, 12 mM) ao meio MS, em 6 repetições. Cada parcela foi constituída por um frasco, contendo 4 embriões zigóticos. No experimento de conversão dos embriões somáticos, o delineamento foi em blocos ao acaso, com 2 tratamentos (MS e MS/2) e 10 repetições. A parcela foi constituída por 3 tubos de ensaio, contendo um embrião somático em cada.

As avaliações foram realizadas aos 60 dias após a inoculação, através da porcentagem de indução de culturas embriogênicas e da contagem de embriões somáticos induzidos. Aos 150 dias, foi quantificado o número embriões somáticos induzidos em cada frasco (parcela). A porcentagem de embriões somáticos convertidos em plântulas foi avaliada aos 60 dias, após a inoculação dos embriões somáticos em meio de cultura, para a conversão em plântulas (MS e MS/2). Durante a permanência das culturas no meio de cultura, para a indução de embriogênese somática (150 dias), a maturação dos embriões somáticos (180 dias) e a conversão dos embriões somáticos (60 dias), não foram realizados sub-cultivos. Plântulas oriundas de embriões somáticos foram transferidas para substrato esterilizado (solo:casca de pinus:serragem), decorridos 150 dias do início da germinação.

Para a análise de variância, os valores foram transformados. As porcentagens de culturas embriogênicas e de conversão dos embriões somáticos foram transformadas em *arco seno* \sqrt{x} . O número de embriões somáticos foi transformado em $\sqrt{x+0,5}$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Germinação *in vitro* de embriões zigóticos

As diferentes concentrações de sacarose e de sais do meio de cultura MS não apresentaram diferenças significativas para a germinação de embriões zigóticos imaturos de *E. edulis* (Tabela 1). A média geral de germinação dos embriões foi de 74%. O maior índice de germinação (80%) dos embriões zigóticos ocorreu em MS/2 + 30 g.L⁻¹ e de sacarose e com MS + 40 g.L⁻¹ de sacarose, 40 dias após a inoculação. Aos 10 dias após a inoculação dos embriões zigóticos, foi possível observar sinais da emissão dos primórdios radiculares e foliares. Aos 120 dias, foram observadas plântulas completas (Figura 1). GARCIA et al. (2002) relataram que a germinação de embriões zigóticos de *Olea europaea* não dependeu da presença de fonte de carbono no meio de cultura, sugerindo que a energia necessária para a germinação *in vitro* seria fornecida pelas reservas armazenadas nos tecidos do embrião.

A produção de massa fresca de plântulas de palmitero apresentou diferenças significativas entre as concentrações de sacarose. No tratamento com 40 g.L⁻¹ de sacarose ocorreu o maior acúmulo de massa fresca (0,129 g), porém não diferindo significativamente de 30 g.L⁻¹ de sacarose. A altura de plântulas diferiu em função da concentração de sais do meio MS, na presença de 40 g.L⁻¹ de sacarose (Tabela 1), observando-se plântulas com maior altura média (11,7 mm). O número de raízes por plântulas de palmitero não diferiu significativamente entre os tratamentos, aos 120 dias (Tabela 1). Plântulas de palmitero com a maior altura média (12 mm) foram produzidas em MS+40 g.L⁻¹ de sacarose, enquanto que as plântulas com menor altura média ocorreram em MS/2+40 g.L⁻¹ (7,0 cm) de sacarose. Em meio MS+40 g.L⁻¹ de sacarose, foram observados os maiores valores de porcentagem de germinação, de massa fresca, de altura e do número médio de raízes.

A concentração de 40 g.L⁻¹ de sacarose promoveu o maior acúmulo de massa fresca por plântula, em meio de cultura MS (0,138g) e MS/2 (0,120g), aos 120 dias (Tabela 1). Os menores valores observados de massa fresca, foram em 20 g.L⁻¹ de

sacarose, em meio de cultura MS (0,101g) e MS/2 (0,086g). No entanto, as análises estatísticas não apresentaram valores significativos.

Tabela 1 - Efeito de diferentes concentrações de sais (50 e 100% de sais do meio MS) e concentrações de sacarose na germinação *in vitro* de embriões zigóticos imaturos (aos 40 dias após a inoculação) e massa fresca, altura e número de raízes (aos 120 dias após a inoculação) de plântulas de palmitreiro (*Euterpe edulis* Mart.). Valores do teste *F*, obtido para os blocos e diferentes tratamentos.

Concentração de sacarose (g.L ⁻¹)	Germinação (%)		\bar{X} ^{a/}	Massa fresca (g/plântula)		\bar{X}	Altura das plântulas (mm)		\bar{X}	Número de raízes		\bar{X}
	MS	MS/2		MS	MS/2		MS	MS/2		MS	MS/2	
20	70,0	66,7	68,4	0,101	0,086	0,094B*	8,1a	10,9a	9,5	1,0	1,0	1,0
30	76,7	80,0	78,4	0,110	0,113	0,112AB	8,5a	10,2a	9,4	1,0	0,9	1,0
40	80,0	70,0	75,0	0,138	0,120	0,129A	11,7a	7,1b	9,4	1,2	1,2	1,2
Média	75,6	72,2	73,9	0,116	0,106	0,111	9,4	9,4	9,4	1,0	1,0	1,0
Valor de <i>F</i>	Germinação (%)		Massa fresca (g/plântula)	Altura das plântulas (mm)		Número de raízes/plântula						
<i>F</i> (meio de cultura)	0,9546 ns		1,1434 ns	0,0015 ns		0,0736 ns						
<i>F</i> (Concentração de sacarose)	0,6578 ns		4,3830 *	0,0023 ns		1,5378 ns						
<i>F</i> (meio de cultura x Concentração de sacarose)	0,1363 ns		0,4542 ns	4,9155 *		0,2095 ns						
<i>F</i> (Blocos)	0,8599 ns		0,9228 ns	0,1811 ns		0,7103 ns						
CV (%) ¹	25,25		26,32	32,50		12,40						

* Médias não ligadas pela mesma letra minúscula nas linhas e maiúsculas nas colunas diferem pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro.^{a/} Média. ^{ns} indica não significativo a 5%. ¹ coeficiente de variação.

No presente estudo, o coeficiente de variação foi de 25% para a germinação *in vitro* de embriões zigóticos, 26% para a massa fresca das plântulas, 32% para a altura das plântulas e 12% para o número de raízes (Tabela 1). Valor superior (28%) ao coeficiente de variação observado neste estudo para a germinação *in vitro* dos embriões zigóticos foi encontrado em *Syagrus oleracea* (MELO et al., 2001). Quando comparado com o presente estudo, em *Euterpe oleracea* foram observados valores inferiores de coeficiente de variação para a germinação *in vitro* de embriões zigóticos (14%) e altura das plântulas (18%) e superior para o número de raízes (18%) (LEDO et al., 2001).

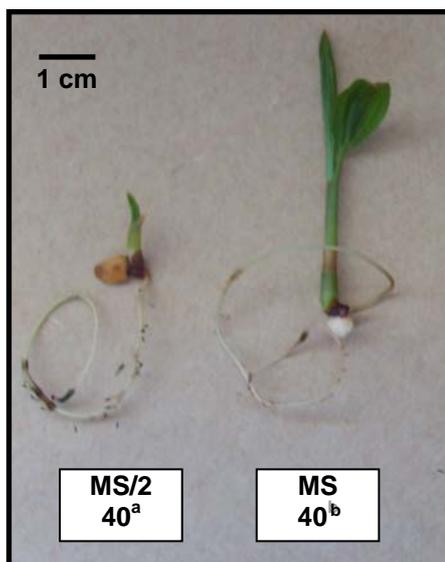


Figura 1 - Aspecto morfológico de plântulas oriundas da germinação *in vitro* de embriões zigóticos imaturos de palmeiro (*Euterpe edulis* Mart.) em meio de cultura MS em 40 g.L⁻¹ de sacarose, aos 120 dias. ^a40 g.L⁻¹ de sacarose; ^b40 g.L⁻¹ de sacarose.

A germinação *in vitro* de embriões zigóticos imaturos de *Brassica napus* foi dependente do tipo e da concentração do açúcar no meio de cultura (SLESÁK e PRZYWARA, 2003). Resultados similares foram observados, sendo que o aumento de massa fresca das plântulas de palmeiro foi relacionado com o aumento da concentração de sacarose no meio de cultura. A interação entre as concentrações de sacarose e a concentração salina do meio de cultura influenciou significativamente a altura das plântulas (Tabela 1). O acúmulo de massa seca de plântulas de *C. nucifera*, com seis meses de idade, foi dependente da concentração de sacarose no meio de cultura, de modo que o maior valor de massa seca foi observado na concentração de 90 g.L⁻¹. A diminuição na concentração de sacarose no meio de cultura levou à diminuição da massa seca das plântulas de *C. nucifera*. Entretanto, com 45 g.L⁻¹ de sacarose no meio de cultura, observou-se a maior altura das plântulas de *C. nucifera*. (FUENTES et al., 2005). Nesse estudo, os autores observaram que as plântulas de *C. nucifera* cresceram *in vitro* sem a adição de exógena de sacarose, porém, não sobreviveram quando transferidas para condições *ex vitro*. Aquelas que cresceram com concentrações intermediárias de sacarose (45 g.L⁻¹) mostraram respostas fotossintéticas, alta sobrevivência e rápido crescimento *ex vitro*. Baixas concentrações de sacarose diminuíram a fotossíntese das plântulas

de *C. nucifera*, mas aumentaram a sobrevivência, sugerindo que ambas contribuíssem para o estabelecimento e o crescimento em condições de campo (FUENTES et al., 2005). Em *Givotia rottleriformis* (espécie arbórea) o maior crescimento (6 cm) *in vitro* de plântulas oriundas de embriões zigóticos foi observado em meio de cultura MS contendo 30 g.L⁻¹ de sacarose, após 4 semanas em meio de cultura (RAMBABU et al., 2006). Os níveis de nutrientes orgânicos e inorgânicos no cultivo *in vitro* influenciaram vários processos metabólicos nas culturas, apresentando efeito sobre o crescimento e a diferenciação dos tecidos vegetais (MALDANER et al., 2006). Estudos indicaram que os açúcares atuam como fonte de carbono, além de atuarem no controle da expressão gênica e do desenvolvimento em plantas (ROLLAND et al., 2002).

Uma elevada pressão osmótica no meio de cultura pode afetar o metabolismo celular, reduzindo o crescimento das plantas (CALDAS et al., 1998). O aumento da concentração de sacarose de 20 g.L⁻¹ para 40 g.L⁻¹ associado a 50% da concentração de sais do MS, provavelmente diminuiu o metabolismo das plântulas de palmito, o que resultou em menor altura das plântulas. O baixo conteúdo da proteína Rubisco (*Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase*) em plântulas de *C. nucifera*, produzidas *in vitro* foi atribuído a altas concentrações de sacarose (90 g.L⁻¹), no meio de cultura (FUENTES et al., 2005). Entretanto, no presente estudo, o aumento na concentração de sacarose, de 20 g.L⁻¹ para 40 g.L⁻¹, no meio de cultura MS, resultou em aumento em altura das plântulas de palmito.

Neste estudo, a média geral da altura das plântulas de palmito foi 0,94 cm, no tratamento MS+40 g.L⁻¹ de sacarose as plântulas atingiram 1,2 cm, aos 120 dias. Esses foram comparativamente superiores aos encontrados em plântulas de 15 progênies de *E. edulis*, desenvolvidas em condições *ex vitro*, as quais apresentaram a altura média de 1,92 cm, aos 210 dias após a semeadura, em que a amplitude de variação da altura foi de 1,7 a 2,12 cm (MARTINS-CORDER e SALDANHA, 2006).

No presente estudo, o número médio de raízes das plântulas de palmito (1,0) não foi significativamente influenciado pelos tratamentos. Na germinação *in vitro* de embriões zigóticos de *E. oleracea*, também não foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos (ANA e BAP) para o número de raízes por plântula (2,22) (LEDO et al., 2001).

A suplementação do meio de cultura (MS ou MS/2) com sacarose foi necessária para o desenvolvimento das plântulas de palmito (Figura 1). No

entanto, a germinação dos embriões zigóticos não apresentou diferenças significativas entre os diversos meios de cultura. Resultados semelhantes foram relatados na germinação *in vitro* de embriões zigóticos e no crescimento de plântulas de *Olea europaea*, pois a adição de sacarose ou de manitol foi necessária para o crescimento das plântulas (GARCIA et al., 2002).

O presente estudo contribuiu com resultados sobre o balanço nutricional do meio de cultura para a obtenção de plântulas assépticas através do emprego de embriões zigóticos imaturos de palmito. A literatura não menciona estudos relacionados à germinação *in vitro* de embriões zigóticos de palmito. Entretanto, para outras espécies de palmeiras têm sido realizados estudos referentes à germinação *in vitro* de embriões zigóticos: *Cocos nucifera* (LEDO et al., 2007; FUENTES et al., 2005), *Bactris major* e *Desmoncus orthacanthos* (TZEC-SIMÁ et al., 2006), *Hyophorbe lagenicaulis* (SARASAN et al., 2002) e *Euterpe oleracea* (LEDO et al., 2001).

3.2 Indução de embriogênese somática

A indução de embriogênese somática em embriões zigóticos imaturos de *E. edulis* não foi influenciada significativamente pela adição de cálcio ao meio de cultura (Tabela 2), aos 60 dias. Entretanto, foram observadas diferenças significativas entre as concentrações de cálcio (0, 2, 4, 8, 12 mM de CaCl_2), para o número de embriões somáticos, aos 150 dias (Tabela 2).

Foi observado que o aumento na concentração de cálcio no meio de cultura resultou em decréscimo no número médio de embriões somáticos de palmito produzidos, aos 150 dias de idade (Figura 2). O meio de cultura básico (MS), suplementado com os fitoreguladores 2iP (3 mg.L^{-1}) e 2,4-D (100 mg.L^{-1}), sem a suplementação com cálcio promoveu a maior proliferação de estruturas embriogênicas.

No presente estudo, foram observados os seguintes valores de coeficiente de variação: 52% para cultura embriogênicas (aos 60 dias), 34% para número de embriões somáticos (aos 60 dias), 21% para número de embriões somáticos (aos 150 dias), e 24% para a germinação dos embriões somáticos. Comparativamente

com o presente estudo, em *Euterpe oleracea* foi observado um coeficiente de variação de 37% para a porcentagem de explantes com embriões somáticos, aos 80 dias de cultura (LEDO et al., 2002). Entretanto, em *Bactris gasipaes* o coeficiente de variação para a porcentagem de culturas embriogênicas (24%) foi inferior ao observado no presente estudo (STEINMACHER et al., 2007).

Tabela 2 - Valores do teste *F*, obtido para os blocos e os tratamentos na indução de embriões somáticos, a partir de embriões zigóticos imaturos de palmitreiro (*Euterpe edulis* Mart.), em meio de cultura MS, suplementado com diferentes concentrações de Cloreto de cálcio (CaCl_2), e na germinação *in vitro* de embriões somáticos de palmitreiro em meio MS e MS/2.

Valor de <i>F</i>	Culturas embriogênicas (%)	Número de embriões somáticos (60 dias)	Número de embriões somáticos (150 dias)	Embriões somáticos germinados (%)
<i>F</i> (Meio de cultura) ^{1/}	0,57 ^{ns}	0,11 ^{ns}	33,28*	0,29 ^{ns}
<i>F</i> (blocos)	1,14 ^{ns}	0,44 ^{ns}	2,07 ^{ns}	1,39 ^{ns}
CV (%) ^{2/}	51,87	33,57	20,92	24,20

^{ns}: indica não significativo a 5%. *indica significativo a 5%. ^{1/}Concentrações de Cloreto de cálcio: 0, 2, 4, 8, 12 mM. ^{2/}coeficiente de variação.

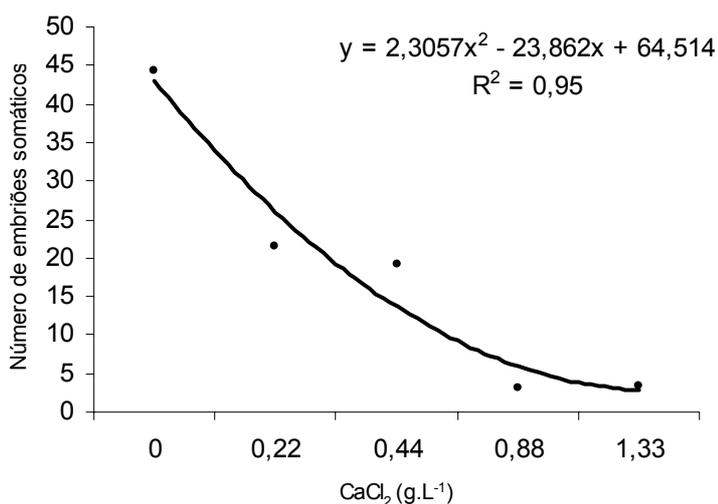


Figura 2 - Número de embriões somáticos induzidos a partir de embriões zigóticos imaturos de palmitreiro (*Euterpe edulis* Mart.) em meio de cultura MS suplementado com diferentes concentrações de Cloreto de cálcio (CaCl_2), aos 150 dias após a inoculação.

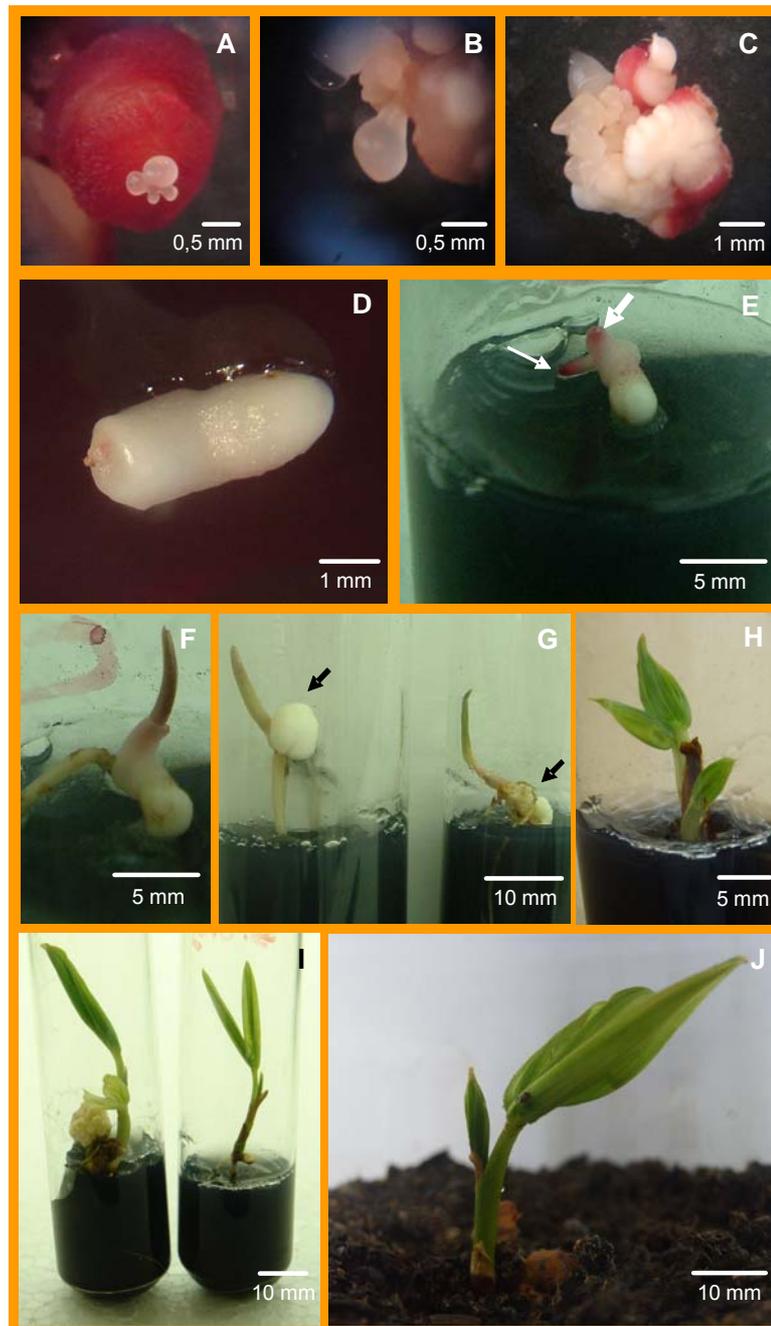


Figura 3 - Processo de embriogênese somática de palmeiro (*Euterpe edulis* Mart.). A) Embriões somáticos após 140 dias da inoculação dos embriões zigóticos imaturos em 100 mg.L^{-1} de 2,4-D e 3 mg.L^{-1} de 2iP. B) Detalhe de um embrião somático, aos 140 dias. C) Embriões somáticos em vários estágios de desenvolvimento. D) embrião somático 10 dias após a inoculação em meio MS/2. E) Primórdio radicular (seta estreita) e plúmula (seta larga), aos 20 dias. F) Aos 40 dias. G) Plântula zigótica na esquerda e somática na direita com presença de haustório (seta), aos 60 dias. H) Plântula somática, aos 120 dias. I) Plântula zigótica na esquerda e somática na direita, após 150 dias de inoculação dos embriões em meio de cultura MS/2. J) Plântula somática aclimatizando em substrato (solo:casca de arroz carbonizada: serragem), aos 60 dias.

A adição de cálcio ($1,33 \text{ g.L}^{-1}$ de CaCl_2) ao meio de cultura líquido, através de suspensão celular, para a indução de embriogênese somática de *Daucus carota*, aumentou a produção de embriões somáticos ($68 \text{ embriões.mL}^{-1}$), quando comparada ao meio de cultura sem a adição de cálcio ($36 \text{ embriões.mL}^{-1}$), aos 21 dias (TAKEDA et al., 2003). Entretanto, a adição de cálcio ao meio de cultura inibiu a embriogênese somática em suspensões celulares, com uma alta concentração de células *Daucus carota*. A suplementação do meio de cultura com $6,12 \text{ mM}$ e $6,62 \text{ mM}$ de cálcio (na forma de CaCl_2) estimulou a indução de embriogênese somática de *Eucalyptus urophylla* (ARRUDA et al., 2000). Em *Hevea brasiliensis*, concentrações de 12 mM de Cloreto de cálcio (CaCl_2) no meio de cultura conduziram a produção de calos friáveis, porém, a indução e o desenvolvimento dos embriões somáticos dependeu de baixas concentrações de cálcio no meio de cultura (MONTORO et al., 1995).

Em *C. nucifera*, a transferência da cultura embriogênica para um meio de cultura, com uma reduzida concentração de auxina, aumentou o número de plântulas regeneradas em 7% (FERNANDO e GAMAGE, 2000). No presente estudo, foi observado que a redução na concentração de auxina no meio de cultura, para a maturação, manteve o potencial embriogênico das culturas (Figura 3), sendo observados vários estágios de desenvolvimento dos embriões somáticos, o que caracterizou um processo de embriogênese assincrônica (Figura 3C). Resultados similares foram observados na embriogênese somática a partir de embriões zigóticos de *E. edulis*, por GUERRA e HANDRO (1998), e de *B. gasipaes* (STEINMACHER et al., 2007).

No presente estudo, a germinação de embriões somáticos e a conversão em plântulas em meio MS ou MS/2 não diferiram estatisticamente (Tabela 2), apesar de que, no meio MS, o índice de conversão foi de 50%, e no MS/2 de 40%. GUERRA e HANDRO (1998) utilizaram o meio de cultura MS com a metade da concentração salina para a conversão de embriões somáticos de *E. edulis* em plântulas. O padrão morfogenético observado durante a germinação dos embriões somáticos, por GUERRA e HANDRO (1998) foi semelhante ao observado em embriões zigóticos. As plântulas produzidas, a partir dos embriões somáticos maduros (Figura 3D), apresentaram morfologia semelhante àquelas germinadas de embriões zigóticos (Figura 3G, 3I), com desenvolvimento da parte aérea e radicular (Figura 3E, 3F).

Resultados similares, na morfologia das plântulas oriundas de embriões somáticos e zigóticos, foram observados no presente estudo (Figura 3G e 3I), de maneira que plântulas com aproximadamente 5 centímetros foram obtidas 60 dias, após o início da germinação dos embriões somáticos de palmitreiro (Figura 3I). Em *P. dactylifera*, a conversão de embriões somáticos em plântulas completas foi de 86%, com o uso do meio de cultura MS com a metade da concentração original, contendo de 0,2 a 0,4 mg.L⁻¹ de AIB (AL-KHAYRI, 2003).

Plântulas oriundas de embriões somáticos de *P. dactylifera* atingiram *in vitro* de 8 a 10 cm, em 90 dias após o início da geminação, tamanho este considerado ideal para a transferência ao solo (AL-KHAYRI, 2003). Em *E. edulis* plântulas oriundas de embriões somáticos foram transferidas para o solo, com 10 cm (GUERRA e HANDRO, 1998). No presente estudo, após 150 dias decorridos do início da germinação dos embriões somáticos, as plântulas de palmitreiro com aproximadamente 6 cm de comprimento de parte aérea foram transferidas para substrato esterilizado composto por casca de arroz carbonizada, solo e serragem decomposta (1:1:1). As plântulas foram mantidas em temperatura de 25±2°C e fotoperíodo de 16 horas e, após 60 dias, foi possível observar plântulas crescendo nesse substrato (Figura 3J).

Os resultados obtidos no presente estudo apontaram para a possibilidade de propagar em larga escala a palmeira *E. edulis* através da técnica de embriogênese somática, assim como se mostrou viável à aplicação desta técnica na conservação de germoplasma. O processo de indução de embriogênese somática nos embriões zigóticos imaturos de *E. edulis* ocorreu diretamente a partir do nó cotiledonar do embrião (Figura 3A). Esse mesmo padrão morfogenético foi observado nesta espécie em estudos anteriores por GUERRA e HANDRO (1988).

Estudos adicionais relacionados à maturação e à conversão dos embriões somáticos deverão ser realizados para a melhoria do protocolo de regeneração, através da técnica de embriogênese somática. Assim como estudos com outras fontes de explantes (bainhas foliares e inflorescência) utilizando a técnica de *Thin cell layer*, para a indução de embriogênese somática (VÂN e LÊ, 2000). Em comparação aos resultados reportados por GUERRA e HANDRO (1998) e GUERRA et al. (2000) na embriogênese somática de *E. edulis*, as respostas morfogenéticas observadas no presente estudo foram semelhantes. Entretanto, o efeito da

suplementação do meio de cultura com cálcio na indução de embriogênese somática de palmeiteiro não havia sido relatada para por esses autores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-KHAYRI, J. M. *In vitro* germination of somatic embryos in date palm: Effect of auxin concentration and strength of MS salts. **Current Science**, Bangalore, v.84, n.5, p.680-683, 2003.

ARRUDA, S. C. C. et al. Anatomical and biochemical characterization of the calcium effect on *Eucalyptus urophylla* callus morphogenesis *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.63, n.2, p.143-154, 2000.

BAH, B. A.; DURAND, T. G.; PANNETIER, C. Coconut germplasm collection through zygotic embryo culture. **Coconut breeding and management**, Vellinakkara, p.169-172, 1991.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPQ, 1998. v.2. p.87-132.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies Arbóreas Brasileiras**. Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2003. 1039p.

CUTTER, E. G. **Anatomia Vegetal. Parte II: Experimentos e interpretações**. Editora Roca, São Paulo, 1986.

DESAI, N. S.; SUPRASANNA, P.; BAPAT, V. A. Simple and reproducible protocol for direct somatic embryogenesis from cultured immature inflorescence segments of sugarcane (*Saccharum* spp.). **Current Science**, Bangalore, v.87, n.6, p.764-768, 2004.

DUSSERT, S.; VERDEIL, J. L.; BUFFARD-MOREL, J. Specific nutrient uptake during initiation of somatic embryogenesis in coconut calluses. **Plant Science**, Limerick, v.111, p.229-236, 1995.

FERNANDO, S. C.; GAMAGE, C. K. A. Abscisic acid induced somatic embryogenesis in immature embryo explants of coconut (*Cocos nucifera* L.). **Plant Science**, Limerick, v.151, n.2, p.193-198, 2000.

FUENTES, G. et al. Exogenous sucrose can decrease *in vitro* photosynthesis but improve field survival and growth of coconut (*Cocos nucifera* L.) *in vitro* plantlets. **In Vitro Cellular and Development Biology**, Heidelberg, v.41. n.1, p.69-76, 2005.

GARCIA, J. L. et al. Influence of carbon source and concentration on the *in vitro* development of olive zygotic embryos and explants raised from them. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.69, n.1, p.95-100, 2002.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI / EMBRAPA-CNPH, v.1, p.183-260, 1999.

GUERRA, M. P. et al. Embriogênese somática e micropropagação do palmitreiro. **Sellowia**, Itajaí, v.49-52, p.150-162, 2000.

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.1, p.65-71, 1998.

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

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Embrapa-SPI / Embrapa-CNPH, Brasília, v.2, 1999. p.533-568.

HARPER, J. Dissecting calcium oscillators in plant cells. **Trends in Plant Science**, London, v.6, n.9, p.395-397, 2001.

KANCHANAPOOM, K.; CHOURKAEW, B.; PATCHARAPISUTSIN, W. Beneficial of activated charcoal on embryo culture of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, Thailand, v.23, n.3, p.317-323, 2001.

JAIN, S. M. Recent advances in date palm tissue culture and mutagenesis. **Acta Horticulturae**, Netherlands, n.736, p.205-211, 2007.

LEDO, A da S. et al. Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos e aclimação de plântulas de coqueiro-anão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.2, p.147-154, 2007.

LEDO, A. da S. et al. Cultura *in vitro* de embriões zigóticos de açazeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.3, p.468-472, 2001.

LEDO, A. da S.; LAMEIRA, O. A.; MENEZES, I. C. de. **Embriogênese somática e regeneração de plantas em açazeiro**. Rio Branco: EMBRAPA Acre. 2002. 22 p. (Boletim de Pesquisa 34).

LIU, G. S. et al. Highly efficient embryo germination *in vitro* shortens the breeding cycle in *Leymus chinensis*. **In Vitro Cellular and Development Biology**, Heidelberg, v.40, n.3, p.321-324, 2004.

MALDANER, J. et al. Sacarose e nitrogênio na multiplicação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.4, p.1201-1206, 2006.

MARTINS-CORDER, M. P.; SALDANHA, C. W. Germinação de sementes e crescimento de plântulas de diferentes progênies de *Euterpe edulis* Mart. **Revista Árvore**, Viçosa, v.30, n.5. p.693-699, 2006.

MELO, B de. et al. Diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e desenvolvimento das plântulas na cultura *in vitro* de embriões da guarirobeira [*Syagrus oleracea* (MART.) BECC.]. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v.25, n.6, p.1301-1306, 2001.

MONTORO, P.; ETIENNE, H.; CARRON, M. P. Effect of calcium on callus friability and somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* Müll. Arg.: relations with callus mineral nutrition, nitrogen metabolism and water parameters. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v.46, n.2, p.255-261, 1995.

MOREL, G. M.; WETMORE, R. H. Fern callus tissue culture. **American Journal of Botany**, Saint Louis, v.38, n.2, p.141-143, 1951.

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

NETO, V. B. P. et al. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of annatto (*Bixa orellana* L.). **In Vitro Cellular and Development Biology**, Heidelberg, v.39, n.6, p.629-634, 2003.

PECH, A. et al. The effect of gibberellic acid on the *in vitro* germination of coconut zygotic embryos and their conversion into plantlets. **In Vitro Cellular and Development Biology**, Heidelberg, v.43, n.3, p.247-253, 2007.

RAGHAVAN, V. One hundred years of zygotic embryo culture investigations. **In Vitro Cellular and Development Biology**, Heidelberg, v.39, n.5, p.437-442, 2003.

RAJESH, M. K. et al. Plant regeneration from embryo-derived callus of oil palm - the effect of exogenous polyamines. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.75, n.1, p.41-47, 2003.

RAMBABU, M. et al. *In vitro* zygotic embryo culture of an endangered forest tree *Givotia rottleriformis* and factors affecting its germination and seedling growth. **In Vitro Cellular and Development Biology**, Heidelberg, v.42, n.5, p.418-421, 2006.

REIS, M. S. dos et al. Distribuição geográfica e situação atual das populações na ocorrência de *Euterpe edulis* Martius. **Sellowia**, Itajaí, v.49-52, p.324-335, 2000.

ROLLAND, F.; MOORE, B.; SHEEN, J. Sugar Sensing and Signaling in Plants. **The Plant Cell**, Rockville, v.14, p.185-205, 2002.

SANÉ, D. et al. Histocytological analysis of callogenesis and somatic embryogenesis from cell suspensions of date palm (*Phoenix dactylifera*). **Annals of Botany**, London, v.98, n.2, p.301-308, 2006.

SARASAN, V.; RAMSAY, M. M.; ROBERTS, A. V. *In vitro* germination and induction of direct somatic embryogenesis in 'Bottle Palm' [*Hyophorbe lagenicaulis* (L. Bailey) H.E. Moore], a critically endangered Mauritian palm. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v.20, p.1107-1111, 2002.

SLESÁK, H.; PRZYWARA, L. The effect of carbohydrate source on the development of *Brassica napus* L. immature embryos *in vitro*. **Acta Biologica Cracoviensia**, Cracow, v.45, n.2, p.183-190, 2003.

STEINMACHER et al. Somatic embryogenesis from peach palm zygotic embryos. **In Vitro Cellular and Development Biology**, Heidelberg, v.43, n.2, p.124-132, 2007.

TAKEDA, T.; INOSE, H.; MATSUOKA, H. Stimulation of somatic embryogenesis in carrot cells by the addition of calcium. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, n.14, p.143-148, 2003.

TZEC-SIMÁ, M. A.; ORELLANA, R.; ROBERT, M. L. *In vitro* rescue of isolated embryos of *Bactris major* Jacq. and *Desmoncus orthacanthos* Mart., potentially useful native palms from the Yucatan Peninsula (Mexico). **In Vitro Cellular and Development Biology**, Heidelberg, v.42. n.1, p.54-58, 2006.

VÂN, K. T. T.; LÊ, B. V. Current status of Thin Cell Layer method for the induction of organogenesis or somatic embryogenesis. In: JAIN, S. M.; GUPTA, P. K.; NEWTON, R. J. (Eds.). **Somatic embryogenesis in woody plants**. Kluwer Academic Publishers, 2000, p. 51-92.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos no presente estudo apontaram para a possibilidade da propagação *in vitro* de palmitero através da técnica de embriogênese somática. Usando embriões zigóticos como fonte de explantes foi possível a regeneração completa de plântulas, demonstrando o potencial desta rota morfogenética para a regeneração *in vitro* de palmitero.

A indução de nódulos em bainhas foliares de palmitero foi dependente da adição de altas concentrações de nitrogênio orgânico [glutamina ($1,17 \text{ g.L}^{-1}$)] ao meio de cultura, contribuindo para o avanço no conhecimento básico da morfogênese *in vitro* e do metabolismo celular de culturas estabelecidas com bainhas foliares.

A utilização de diferentes fontes de carboidrato (glicose e sacarose) não promoveu efeito na indução de calos e, indução de culturas embriogênicas em embriões zigóticos de palmitero.

Para a germinação de embriões zigóticos de palmitero foi evidenciado que a germinação não foi influenciada pela concentração salina e de sacarose do meio de cultura. Porém, o crescimento em altura e a produção de massa fresca foram afetados pelas doses de sacarose.

O processo de indução de embriogênese somática nos embriões zigóticos imaturos de *E. edulis* ocorreu diretamente a partir do nó cotiledonar do embrião. Esse mesmo padrão morfogenético foi observado nesta espécie em estudos anteriores por GUERRA e HANDRO (1988).

A suplementação com cálcio do meio de cultura para a indução de embriogênese somática de palmitero não maximizou a taxa de embriões somáticos obtidos no meio de cultura MS suplementado com as vitaminas de Morel, 7 g.L^{-1} de ágar, $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de glutamina, 3 mg.L^{-1} de 2iP, 100 mg.L^{-1} de 2,4-D e $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ de

carvão ativado. Entretanto, outras condições nutricionais podem ser testadas na tentativa de melhoria das condições de regeneração, visto que tem sido reportada a influência nutricional na embriogênese somática de espécies arbóreas.

A conversão dos embriões somáticos obtidos não foi dependente do meio de cultura utilizado para a conversão. Entretanto, foi obtida uma taxa de 50% de germinação dos embriões somáticos. Estes resultados abrem perspectivas para estudos comparativos entre a embriogênese somática e zigótica. Estudar os tipos e níveis de substâncias de reserva que se encontram em diferentes estágios de desenvolvimento do embrião zigótico de palmitreiro poderia conduzir ao entendimento da taxa obtida na conversão de embriões somáticos. O acúmulo de substâncias de reserva é um processo chave no estabelecimento autotrófico do embrião. Em *Olea europaea*, GARCIA et al. (2002) relataram que o fato de embriões zigóticos não depender da presença de fonte de carbono no meio de cultura, sugeriu que a energia necessária para a germinação *in vitro* foi fornecida pelas reservas armazenadas nos tecidos do embrião.

A utilização de embriões zigóticos como fonte de explantes, pode ser aplicada ao melhoramento genético do palmitreiro. Pois a produção em larga escala de plântulas com alta qualidade genética pode ser viabilizada através da embriogênese somática em embriões zigóticos oriundos de cruzamentos controlados entre genótipos superiores.

Os resultados obtidos no presente estudo apontam perspectivas para a aplicação da técnica de embriogênese somática em palmitreiro para a produção de sementes sintéticas e criopreservação de culturas embriogênicas.

O estabelecimento de suspensões celulares de palmitreiro através de calos embriogênicos friáveis também apresenta uma alternativa para a propagação massal, abrindo perspectivas para novos estudos relacionados a essa temática.

Estudos relacionados à maturação e à conversão dos embriões somáticos deverão ser realizados, para a melhoria do protocolo de regeneração, através da técnica de embriogênese somática. Assim como estudos com outras fontes de

explantes (bainhas foliares e inflorescência) utilizando a técnica de *Thin cell layer*, para a indução de embriogênese somática. A propagação de palmitero através da técnica de embriogênese somática usando inflorescências não emitidas como fonte de explantes pode ser utilizada para a propagação massal de genótipos superiores.

ANEXOS

ANEXO I - Composição das formulações minerais MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962)

Componentes	Concentração (mg.L⁻¹)
Macronutrientes	–
NH ₄ NO ₃	1.650
KNO ₃	1.900
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Micronutrientes	–
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	3,72
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,85
H ₃ BO ₃	6,20
MnSO ₄ .7H ₂ O	22,30
KI	0,83
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
ZnSO ₄ .4H ₂ O	8,60
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025

ANEXO II - Composição das formulações de Morel e Wetmore (1951).

Componente	Concentração (mg.L⁻¹)
Mioinositol	100
Ácido nicotínico	1
Piridoxina	1
Tiamina.HCl	1
Biotina	0,01
Pantotenato de cálcio	1

Anexo III - Detalhe do monovacúômetro da autoclave horizontal registrando 2 atmosfera de pressão durante a autoclavagem.



Anexo IV - Efeito de diferentes fontes de auxinas e concentrações de glutamina no acúmulo de antocianina em explantes de bainhas foliares de palmitero (*Euterpe edulis* Mart.) cultivados *in vitro*, 60 dias após a inoculação.

Glutamina (mM)	Fonte de auxina *	Blocos (%)		
		1	2	3
0	2,4-D	3,1	3,4	2,8
0	Picloram	8,3	10	13,3
2	2,4-D	2,1	3	3,5
2	Picloram	11	10	13
4	2,4-D	3,9	2,2	2,8
4	Picloram	9,5	12	10,3
8	2,4-D	2,8	3,5	3,7
8	Picloram	10,4	12	9

Anexo V - Porcentagem de calos formados, a partir de explantes de bainhas foliares de palmitero (*Euterpe edulis* Mart.), em meio de cultura MS suplementado com diferentes concentrações de glutamina e diferentes fontes de auxina [Picloram ($72,3 \text{ mg.L}^{-1}$) ou 2,4-D ($66,3 \text{ mg.L}^{-1}$)], aos 60 dias.

Bloco	Fonte de auxina	Glutamina (mM)			
		0	2	4	8
1	Picloram	8,3	7,4	26,78	21,42
	2,4-D	28,5	23,8	28,57	28,57
2	Picloram	18,3	28,98	21,42	28,57
	2,4-D	19	42,85	23,8	32,14
3	Picloram	13,3	20,63	24,1	24,995
	2,4-D	28,5	21,43	33,33	30,355

Anexo VI - Porcentagem de culturas embriogênicas, obtido para os blocos e tratamentos, a partir de embriões zigóticos imaturos de palmitero (*Euterpe edulis* Mart.), em meio de cultura MS, suplementado com diferentes concentrações de Cloreto de cálcio (CaCl_2), aos 60 dias.

CaCl ₂ (mM)	Culturas embriogênicas (%)				
	Blocos				
	1	2	3	4	5
0	100	100	100	100	100
2	100	100	100	0	100
4	100	100	100	100	0
8	100	100	100	100	0
12	100	100	0	0	100

Anexo VII - Número de culturas embriogênicas, obtido para os blocos e tratamentos, a partir de embriões zigóticos imaturos de palmito (*Euterpe edulis* Mart.), em meio de cultura MS, suplementado com diferentes concentrações de Cloreto de cálcio (CaCl_2), aos 60 dias.

CaCl_2 (mM)	Número de embriões somáticos				
	Blocos				
	1	2	3	4	5
0	2	3	4	3	2
2	3	5	2	0	10
4	4	3	1	8	0
8	3	5	3	4	0
12	4	6	0	0	5

Anexo VIII - Número de embriões somáticos, obtido para os blocos e tratamentos, induzidos a partir de embriões zigóticos imaturos de palmito (*Euterpe edulis* Mart.) em meio de cultura MS suplementado com diferentes concentrações de Cloreto de cálcio (CaCl_2), aos 150 dias após a inoculação.

CaCl_2 (mM)	Número de embriões somáticos				
	Blocos				
	1	2	3	4	5
0	52	35	49	65	59
2	36	24	15	27	27
4	50	5	21	20	19
8	3	5	3	4	4
12	5	5	1	5	4

Anexo IX - Número de embriões somáticos de palmito (*Euterpe edulis* Mart.) germinados em meio de cultura MS e MS/2, aos 60 dias após a inoculação.

Tratamentos	Número de embriões somáticos germinados									
	Blocos									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
MS/2	2	2	1	2	1	1	1	1	0	1
MS	2	2	1	1	3	3	0	0	1	2

Anexo X - Efeito de diferentes meios de cultura e concentrações de sacarose na média de germinação *in vitro* de embriões zigóticos imaturos de palmitero (*Euterpe edulis* Mart.), aos 40 dias após a inoculação .

Tratamentos		Germinação (%)					
		Blocos					
Meio de cultura	Sacarose (g.L ⁻¹)	1	2	3	4	5	6
MS	20	80	100	60	40	60	80
MS	30	60	40	100	100	60	100
MS	40	80	80	80	80	60	100
MS/2	20	100	60	80	80	40	40
MS/2	30	80	80	80	80	80	80
MS/2	40	60	80	80	60	60	80

Anexo XI - Efeito de diferentes meios de cultura e concentrações de sacarose na média de massa fresca *in vitro* de plântulas de palmitero (*Euterpe edulis* Mart.).

Tratamentos		Massa fresca (g/plântula)					
		Blocos					
Meio de cultura	Sacarose (g.L ⁻¹)	1	2	3	4	5	6
MS	20	0,068	0,184	0,105	0,050	0,095	0,105
MS	30	0,110	0,140	0,095	0,124	0,090	0,100
MS	40	0,148	0,135	0,143	0,160	0,124	0,122
MS/2	20	0,132	0,070	0,085	0,030	0,118	0,083
MS/2	30	0,092	0,142	0,122	0,095	0,118	0,105
MS/2	40	0,153	0,097	0,093	0,100	0,127	0,148

Anexo XII - Efeito de diferentes meios de cultura e concentrações de sacarose na altura média de plântulas de palmitero (*Euterpe edulis* Mart.).

Tratamentos		Altura (mm)					
		Blocos					
Meio de cultura	Sacarose (g.L ⁻¹)	1	2	3	4	5	6
MS	20	9,4	15,4	5,4	7,0	5,0	6,2
MS	30	6,2	10,6	9,0	12,6	3,8	8,8
MS	40	11,6	10,2	16,6	11,4	9,4	10,8
MS/2	20	13,2	5,2	12,6	9,2	14,0	11,0
MS/2	30	10,4	8,4	11,0	8,4	13,8	9,6
MS/2	40	8,8	8,5	5,8	5,0	7,8	7,4

Anexo XIII - Efeito de diferentes meios de cultura e concentrações de sacarose o número médio de raízes em plântulas de palmito (*Euterpe edulis* Mart.).

Tratamentos		Número médio de raízes					
		Blocos					
Meio de cultura	Sacarose (g.L ⁻¹)	1	2	3	4	5	6
MS	20	1,2	1,4	0,6	1,0	0,8	1,0
MS	30	1,0	0,8	1,2	1,4	0,8	1,0
MS	40	1,2	1,2	1,0	1,0	1,0	1,6
MS/2	20	1,2	0,8	1,4	0,8	1,0	1,0
MS/2	30	0,8	1,0	1,0	1,0	1,0	0,8
MS/2	40	1,2	0,8	1,4	0,8	1,0	1,8