

PROPAGAÇÃO DA PALMEIRA MACAÚBA *Acrocomia aculeata*
(JACQ.) LODDIGES. ATRAVÉS DE MÉTODOS "IN VITRO"

SANDRA APARECIDA TABAI

Dissertação apresentada a Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências, Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Fevereiro - 1992

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCAP/USP

T112p Tabai, Sandra Aparecida
Propagação da palmeira macaúba Acrocomia aculeata
(Jacq.) Loddiges através de métodos "in vitro". Pi
racicaba, 1992.
121p. ilus.

Diss. (Mestre) - ESALQ
Bibliografia

1. Macaúba - Propagação "in vitro" 2. Palmeira olea-
ginosa - Propagação "in vitro" I. Escola Superior de
Agricultura Luiz de Queiroz.

CDD 634.6

PROPAGAÇÃO DA PALMEIRA MACAÚBA *Acrocomia aculeata*
(JACQ.) LODDIGES. ATRAVÉS DE MÉTODOS "IN VITRO"

SANDRA APARECIDA TABAI

Bióloga

Orientador: Prof. Dr. Otto Jesu Crocomo

Dissertação apresentada a Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências, Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Fevereiro - 1992

PROPAGAÇÃO DA PALMEIRA MACAÚBA *Acrocomia aculeata*
(JACQ.) LODDIGES ATRAVÉS DE MÉTODOS "IN VITRO"

Sandra Aparecida Tabai

Aprovada em: 31/03/1992

Comissão Julgadora:

| | |
|-----------------------------|--|
| Prof. Dr. Otto Jesu Crocomo | Centro de Biotecnologia Agrícola CEBTEC/ESALQ/USP |
| Prof. Dr. Murilo de Melo | Departamento de Química/ CEBTEC-ESALQ/USP |
| Prof. Dr. Rolf Illg Dieter | Departamento de Genética e Evolução - UNICAMP |



Prof. Dr. Otto Jesu Crocomo
Orientador

Aos meus pais,

Armando e Seide,

pelo caminho e ensinamentos,

DEDICO

Às minhas irmãs,

Silvia e Solange,

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Otto Jesu Crocomo, pela orientação, estímulo e confiança em mim depositada.
- Ao Prof. Dr. Murilo de Melo, pelo auxílio e constante contribuição para a minha formação profissional.
- À Profa. Beatriz Apezato da Gloria, do Departamento de Botânica da ESALQ/USP, pela orientação na análise histológica.
- Ao Centro de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC/FEALQ), pela oportunidade concedida.
- Aos Profs. da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ/USP), pelos ensinamentos transmitidos.
- Aos Profs. Luis Antonio Gallo e Helaine Carrer, pela amizade e consideração.
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN), pela concessão de bolsa de estudo.
- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro para a realização de parte

deste trabalho.

- À Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), pelo auxílio financeiro para realização de parte deste trabalho.
- À Gabriel Sarries pelo auxílio na análise estatística.
- À Antonio F. Amaral e Enio Thiago de Oliveira, pelo auxílio técnico prestado.
- À Romeu A. Rocha pelas ilustrações, gráficos e figuras.
- À secretária Maria Solizete Granziol, pela colaboração e amizade.
- Aos pesquisadores e amigos de pós-graduação, Jeanette I. Miachir, Fernando Broetto, Leonardo A. Alves Carneiro, Irionaldo Chagas, Vera Romani, Carlos Corsato, João Chaddad, pelo incentivo e atenção.
- À Maria Cristina Rocha Dias, Silvana R. Vicino Sarriés, Maria Beatriz Rocha Dias e Marise Storel Dutra de Moraes, pelo estímulo e amizade.
- À todos que direta e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

| | Página |
|--|--------|
| LISTA DE FIGURAS..... | viii |
| LISTA DE TABELAS..... | xiii |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | xvi |
| RESUMO..... | xvii |
| SUMMARY..... | xx |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA..... | 4 |
| 2.1. Considerações gerais..... | 4 |
| 2.2. Fatores limitantes da produção..... | 9 |
| 2.3. Propagação de palmeiras "in vitro"..... | 11 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS..... | 25 |
| 3.1. Assepsia do explante..... | 25 |
| 3.2. Cultura de embriões..... | 26 |
| 3.3. Estudos fisiológicos do crescimento e desenvolvimento..... | 28 |
| 3.4. Obtenção de calos..... | 30 |
| 3.4.1. Efeito da autoclavagem nos fitorreguladores..... | 31 |
| 3.4.1.1. Fitorreguladores filtrados..... | 31 |
| 3.4.1.2. Fitorreguladores autoclavados... | 32 |
| 3.4.1.3. Confronto entre autoclavagem e filtragem dos fitorreguladores.. | 35 |
| 3.4.2. Indução de calos por 2,4-D em embriões zigóticos inteiros e cortados... | 35 |
| 3.4.3. Efeito do tempo de exposição ao | |

| | |
|--|----|
| 2,4-D na indução de calos..... | 37 |
| 3.4.4. Efeito de altas concentrações de 2,4-D na indução de calos..... | 37 |
| 3.4.5. Efeito do ácido 4-amino-3,5,6-tri- cloropicolínico (picloram) na indu- ção de calos..... | 39 |
| 3.4.6. Efeito da concentração de cálcio no meio de cultura contendo picloram na indução de calos e embriogênese..... | 41 |
| 3.5. Histologia..... | 42 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 44 |
| 4.1. Cultura de embriões..... | 44 |
| 4.2. Estudo fisiológico do crescimento e desen- volvimento..... | 48 |
| 4.3. Obtenção de calos..... | 52 |
| 4.3.1. Efeito da autoclavagem nos fitorre- guladores..... | 52 |
| 4.3.2. Indução de calos por 2,4,-D em embriões zigóticos inteiros e cor- tados..... | 65 |
| 4.3.3. Efeito do tempo de exposição dos em- briões ao 2,4-D na indução de calos. | 69 |
| 4.3.4. Efeito de altas concentrações de 2,4-D na indução de calos..... | 71 |
| 4.3.5. Efeito do ácido 4-amino-3,5,6-tri- cloropicolínico (picloram) na indu- ção de calos..... | 75 |

| | |
|--|-----|
| 4.3.6. Efeito da concentração de cálcio no meio de cultura contendo picloram na indução de calos e embriogênese..... | 84 |
| 4.3.7. Histologia..... | 92 |
| 5. CONCLUSÕES..... | 103 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 105 |

LISTA DE FIGURAS

| | Página |
|---|--------|
| Figura 1. Esquema do corte do embrião zigótico para inoculação da região do nó cotiledonar..... | 36 |
| Figura 2. Esquema do meio de cultura com dupla camada, utilizado para minimizar o escurecimento do explante..... | 40 |
| Figura 3. Aspecto da plântula completa após 14 semanas da inoculação em meio MS + Vit. + aa..... | 45 |
| Figura 4. Aspecto da plântula completa após 4 semanas em condições ex-vitro..... | 49 |
| Figura 5. Efeito de fontes e concentrações de nitrogênio sobre o crescimento e desenvolvimento de embriões zigóticos. Média de massa de matéria fresca de 10 plantas com acompanhamento a cada 15 dias..... | 50 |
| Figura 6. Efeito de fontes e concentrações de nitrogênio sobre o crescimento e desenvolvimento de embriões zigóticos. Média de massa de matéria seca de 10 plantas com acompanhamento a cada 15 dias..... | 51 |
| Figura 7. Efeito do 2,4-D filtrado na indução de | |

- calos em embriões de frutos imaturos.... 54
- Figura 8. Efeito do 2,4-D filtrado na indução de calos em embriões de frutos maduros..... 54
- Figura 9. Avaliação do efeito dos fitorreguladores 2,4-D e 2i-P na indução e desenvolvimento de calos em embriões de frutos maduros de macaúba (avaliação feita 35 dias após a inoculação)..... 57
- Figura 10. Avaliação do efeito dos fitorreguladores 2,4-D e 2i-P na indução e desenvolvimento de calos em embriões maduros mantidos à luz (avaliação feita 35 dias após inoculação)..... 60
- Figura 11. Avaliação do efeito dos fitorreguladores 2,4-D e 2i-P na indução desenvolvimento de calos em embriões maduros, mantidos no escuro (avaliação feita 35 dias após inoculação)..... 61
- Figura 12. Efeito do tempo de exposição dos embriões ao 2,4-D para indução de calos. Observações após 20 dias da inoculação.. 70
- Figura 13. Avaliação do efeito do picloram na indução e desenvolvimento de calos. Observações feitas 30 dias após inoculação..... 76
- Figura 14. Estruturas globulares formadas na região oposta aos ápices com alongamento do embrião. Tratamento com 25 mg/l de

| | | |
|------------|--|----|
| | picloram. Observações após 80 dias da inoculação..... | 78 |
| Figura 15. | Formação de agregados globulares sem expansão do embrião. Tratamento com 100 mg/l de picloram. Após 80 dias da inoculação..... | 79 |
| Figura 16. | Avaliação do efeito do picloram na indução e desenvolvimento de calos com características embriogênicas. Observações feitas após 60 dias da inoculação.. | 80 |
| Figura 17. | Agregado de estruturas globulares formados sem expansão do embrião..... | 82 |
| Figura 18. | Agregado de estruturas mais alongadas formadas sem expansão do embrião..... | 83 |
| Figura 19. | Efeitos do cálcio e picloram na indução e desenvolvimento de calos com características embriogênicas. Observações após 70 dias da inoculação..... | 90 |
| Figura 20. | Agregado de estruturas globulares com região central com estruturas globulares translúcidas. Observações após 70 dias.. | 91 |
| Figura 21. | Cortes transversais mostrando um agregado de nódulos meristemáticos observados em estruturas globulares após 106 dias da inoculação formadas em meio de cultura contendo 25 mg/l de picloram: a) Aspecto geral do agregado de nódulos | |

meristemáticos. Seta mostrando um nódulo.

b) Detalhe da região de união entre os nódulos mostrando as células de aspecto parenquimático.

c) Detalhe da região superior e externa do nódulo mostrando algumas células se soltando.

d) Detalhe da foto anterior . A seta indica a presença de idioblastos.

e) Detalhe da região entre dois nódulos constituída de células de aspecto parenquimático com baixa relação núcleo-citoplasma em constraste com células dos nódulos tipicamente meristemáticas com alta relação núcleo-citoplasma.

f) Detalhe da região interna do nódulo mostrando células procambiais (seta)....

96

Figura 22. Cortes longitudinais de uma estrutura alongada . Aspecto geral mostrando a organização das células:

a) Aspecto geral.

b) Detalhe da região de vascularização.

Nota-se a presença de elementos traqueais (seta).....

97

Figura 23. Cortes transversais de um apêndice mor-

fologicamente similar à raiz, produzido por uma estrutura alongada:

a) Região de contato entre o apêndice e a estrutura alongada. A seta indica um idioblasto.

b) Visão geral do apêndice radicular mostrando a organização semelhante à estrutura anatômica de uma raiz.....

c) Detalhe do cilindro central.....

99

Figura 24. Cortes transversais do agregado de nódulos meristemáticos observados em estruturas globulares após 70 dias da inoculação em meio contendo 50 mg/l de picloram:

a) Visão geral do nódulo meristemático mostrando o gradiente de tamanhos de células.

b) Detalhe do nódulo meristemático mostrando a presença de elementos traqueais do xilema.....

100

LISTA DE TABELAS

| | Página |
|---|--------|
| Tabela 1. Espécies de palmeiras não explorados e com alto potencial para agricultura | 6 |
| Tabela 2. Eficiência da produção de óleo entre espécies oleaginosas | 8 |
| Tabela 3. Composição do meio de MURASHIGE & SKOOG (1962) utilizado como meio básico na cultura de embriões e indução de calos.... | 27 |
| Tabela 4. Composição do meio GONÇALVES (1980) utilizado como meio básico na cultura do embrião | 28 |
| Tabela 5. Meios de cultura empregado para o cultivo de embrião de macaúba (mg/l) | 29 |
| Tabela 6. Quantidade dos componentes utilizados nos meios de cultura (mg/l) | 30 |
| Tabela 7. Composição do meio de MURASHIGE e SKOOG (1962) modificado conforme NWANKWO & KRIKORIAN (1986) e a suplementação utilizada para indução de calos | 34 |
| Tabela 8. Composição do meio de MURASHIGE & SKOOG (1962) modificada e com a suplementação utilizada para indução de calos | 38 |

| | |
|---|----|
| Tabela 9. Diferentes combinações de cálcio e picloram para indução de calos embriogênicos (os números no quadro representam a numeração atribuída aos tratamentos)..... | 41 |
| Tabela 10. Avaliação do efeito da autoclavagem na indução e desenvolvimento de calos e oxidação após 35 dias da inoculação..... | 62 |
| Tabela 11. Avaliação do efeito da autoclavagem do 2,4-D na indução e desenvolvimento de calos. Observações após 30 dias da inoculação, em meio com 2,4-D filtrado..... | 64 |
| Tabela 12. Avaliação do efeito da autoclavagem do 2,4-D na indução e desenvolvimento de calos. Observações após 30 dias da inoculação, em meio com 2,4-D autoclavado..... | 64 |
| Tabela 13. Avaliação da indução de calos por 2,4-D em região do nó cotiledonar de embriões zigóticos. Observações após 30 dias da inoculação..... | 66 |
| Tabela 14. Avaliação da indução de calos por 2,4-D em embriões zigóticos inoculados inteiros. Observações após 30 dias da inoculação.... | 67 |
| Tabela 15. Efeito de altas concentrações de 2,4-D na indução e desenvolvimento de calos, mantidos à luz. Observações feitas após 40 | |

| | | |
|------------|--|----|
| | dias da inoculação..... | 72 |
| Tabela 16. | Efeito de altas concentrações de 2,4-D na indução e desenvolvimento de calos, mantidos no escuro. Observações feitas após 40 dias de inoculação..... | 72 |
| Tabela 17. | Avaliação do efeito do picloram e cálcio na indução e desenvolvimento de calos. Observações feitas 40 dias após inoculação..... | 85 |
| TABELA 18. | Regressão polinomial para níveis de cálcio dentro dos níveis de picloram (Regressão linear) | 86 |
| TABELA 19. | Regressão polinomial para os níveis de picloram dentro dos níveis de cálcio (Regressão quadrática) | 88 |

LISTA DE ABREVIATURAS

- 2,4-D = Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
- 2i-P = 6(γ,γ -dimetil alil amino) - purina
- Picloram = Ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico
- NAA = Ácido naftalenoacético
- BA = benziladenina
- GA = Ácido giberélico
- BAP = 6-benzilaminopurina
- B₅ = Gamborg (1968)
- MS = MURASHIGE & SKOOG (1962)
- MG = GONÇALVES (1980)
- Y₃ = EEUWENS (1976)
- Ca = Cerca de
- 2,4,5-T = Ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético
- 2,4,5-TP = Ácido 2,4,5-triclorofenoxi-propiónico
- PVP = polivinilpirrolidona

PROPAGACÃO DA PALMEIRA MACAÚBA *Acrocomia aculeata*
(JACQ.) LODDIGES, ATRAVÉS DE MÉTODOS "IN VITRO"

Autora: Sandra Aparecida Tabai

Orientador: Prof. Dr. Otto Jesu Crocomo

RESUMO

A propagação da macaúba é feita exclusivamente através de sementes, as quais têm período de dormência de até 4 anos. Apesar dos maciços povoamentos naturais de macaúba em regiões do território brasileiro e da alta produtividade estimada, a sua dormência e outros fatores como alta heterogeneidade, ausência de informações fisiológicas e bioquímica envolvendo esta espécie, determinam um avanço muito lento na sua propagação e conseqüentemente na sua produção.

Neste contexto o trabalho teve como objetivo estudar os problemas relacionados com a propagação desta palmeira e o seu potencial morfogenético na expressão da embriogênese somática.

Através da cultura de embriões "in vitro" o tempo de germinação foi reduzido, possibilitando a obtenção de plântulas após 16 semanas da inoculação. Em estudo fisiológico do crescimento e desenvolvimento verificou-se que alta concentração de nitrogênio causa redução nas massas de matéria fresca e seca quando comparada com meio de cultura

contendo concentrações de nitrogênio correspondentes à 50 e 25% da formulação completa de MS. Observou-se que ausência de nitrato afeta germinação e que a presença conjunta de No_3^- e NH_4^+ em concentrações correspondente à 50 e 25% presentes no MS são favoráveis para germinação e desenvolvimento de plântulas. A utilização de embriões oriundos de frutos maduros e imaturos como explantes evidenciaram que os fatores que causam dormência em macaúba surgem possivelmente durante a maturação do fruto.

Para obtenção de calos, objetivando a produção de mudas através da embriogênese somática, embriões zigóticos oriundos de frutos maduros e imaturos foram utilizados como explante. Foram também utilizados embriões pré-germinados inoculados inteiros ou somente parte deste contendo região do pecíolo cotiledonar. Embriões de frutos maduros comportaram-se melhores como fonte de explante.

A manifestação do potencial morfogênético dos calos desenvolvidos em meio contendo 2,4-D mostraram que essa auxina filtrada, em baixas concentrações (até 43,5 mg/l) induziu calos e quando autoclavado em concentrações de até 90 mg/l, foi insuficiente na indução de calos. Esta observação evidencia que ocorreu degradação de parte desta auxina pela autoclavagem e/ou maior adsorção pelo carvão ativado. Mesmo a utilização de concentrações elevadas de 2,4-D (até 600 mg/l) não favoreceram a formação de calos com características embriogênicas.

Na indução e desenvolvimento de calos utilizando

picloram observou-se a formação de calos com características embriogênicas. Na tentativa de aumentar a manifestação do potencial embriogênico estudou-se o efeito da concentração de cálcio no meio de cultura contendo picloram. Observou-se que níveis menores de cálcio, correspondente a 25 e 50% do MS são mais efetivos para indução de calos com características embriogênicas. Estudos histológicos confirmaram o potencial morfogenético, evidenciando algumas estruturas com características embriogênicas, apontando o uso do picloram com grande potencial para indução da embriogênese somática em macaúba.

"IN VITRO" PROPAGATION OF MACAUBA PALM

Acrocomia aculeata (JACQ.) LODDIGES.

Author: Sandra Aparecida Tabai

Adviser: Prof. Dr. Otto Jesu Crocomo

SUMMARY

The propagation of macauba has exclusively been done by using seeds, which show a dormancy time of up to 4 years. In despite of large natural population of macauba on the Brazilian lands and the high yield; the dormancy, the high heterogeneity of the plants population and the lack of physiological and biochemical information related to this palm species have determined a very slow improvement in its propagation procedures and in its productivity.

In this context, the objective of this work was to study the problems concerned with the propagation and the morphogenetical potential toward plant regeneration "in vitro".

By using embryo culture "in vitro" the germination time was reduced drastically being possible to obtain macauba seedling 16 weeks after inoculation. In the seedling growth physiology and development studies it was observed that growth medium with high nitrogen content caused

decrease on the fresh and dry weight compared with medium containing nitrogen concentration of 50% and 25% of the nitrogen in the original MS formulation. Nitrate absence in the medium was observed to affect the germination of the embryo and its presence together with NH_4^+ at concentration of 50% and 25% of those in the original MS formulation respectively, favored the germination and the growth of the seedlings. Germination experiments utilizing embryos from mature and from imature fruit showed evidences that the factors causing dormancy in macauba seeds develop during or after fruit maturation.

Embryos from mature, imature fruits, pre-germinated embryos and region of the embryo containing only the cotyledonal petiole were used as explant material for callus and embryogenese induction. Embryos from mature fruits provided the best results.

The expression of the morphogenetical potential of the callus induced in autoclaved medium containing 2,4-D compared with medium containing filtrated 2,4-D indicated a degrading effect of the autoclavation on the 2,4-D, causing a low efficiency of it when concentrations lower than 90 mg/lit were used. When 2,4-D was filtrated, concentration as low as 43 mg/lit was sufficient to induce callus. However the callus obtained, even when concentration of 600 mg/lit was used, never showed embriogenic characteristics.

On the other hand, the use of Picloram

(2,4,5-trichloropropionic acid) as auxin source it induced a callus formation showing embryogenic performance. Levels of Ca^{2+} of 25% and 50% of that in the original MS medium improved the expression of the embryogenic potential.

Hystological studies of the obtained embryogenic aggregations confirmed the embryogenic nature of the callus and suggested the use of Picloram as best auxina to carry out morphogenetical studies with macauba.

1. INTRODUÇÃO

A macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq) Loddiges) é uma palmeira neotropical com distribuição em quase todas as regiões do território brasileiro. Dentro do gênero *Acrocomia* ela é a de maior dispersão no nosso país, constituindo-se na espécie mais típica de Minas Gerais.

O valor econômico representado pela macaúba pode ser avaliado em função das amplas possibilidades de seu aproveitamento como produtora de alimento para o homem e animais, bem como de matéria prima para indústria.

O fruto da macaúba é o produto economicamente de maior importância. Tanto o óleo da polpa como o das amêndoas apresentam interesse para a indústria farmacêutica e de cosmético, bem como para o setor energético.

As perspectivas de aumento de rendimento do óleo foram estimadas por WANDECK e JUSTO (1982), podendo ser superior a 6 toneladas/ha de óleo. Mais recentemente CORADIN e LLERAS (1986), relataram que em algumas populações nativas amostradas foi permitido estimar uma produtividade de 10 toneladas/ha. Entre as oleaginosas a macaúba se destaca pela alta produtividade estimada, principalmente quando comparada com culturas de ciclo curto, como a soja que apresenta uma

estimativa de produção de 0,50 a 0,66 toneladas/ ha de óleo (BATISTA, 1980), o que representa 10 vezes menos do que a produção de óleo da macaúba.

Programas visando a domesticação desse gênero podem efetivamente consagrar a macaúba entre as oleaginosas mais promissoras economicamente.

A sua propagação é realizada por sementes, as quais tem um período de dormência de até 4 anos, sendo que a árvore começa a produzir frutos entre 5 a 6 anos de idade. Esse fator determina drástico atraso na propagação e na produção agrícola.

Neste sentido, o desenvolvimento de tecnologia para racionalizar e regularizar a produção de mudas permitiria o avanço da cultura com melhor aproveitamento do seu potencial agrônomo.

Para viabilizar esse aspecto, a técnica de cultivo *in vitro* apresenta-se como uma alternativa para a redução do período de germinação da semente através da cultura de embriões zigóticos. O desenvolvimento de protocolo para propagação rápida, obtida seja através da embriogênese somática e/ou da organogênese, possibilitando a obtenção de populações de plantas geneticamente uniformes, se constitui em outra alternativa racional para esta cultura.

Assim, além da regularização da produção de mudas por cultura de embriões, propõe-se ainda a realização de estudos dos fenômenos que ocorrem durante a morfogênese *in vitro*.

Esses estudos permitem a compreensão dos até agora pouco conhecidos aspectos dos processos de crescimento, diferenciação e morfogênese de palmeiras, necessários para se controlar *in vitro* e posteriormente *in vivo* os mecanismos bioquímicos e fisiológicos responsáveis pelo seu crescimento e produtividade.

Neste contexto, o presente trabalho tem por objetivo procurar entender e contornar os problemas relacionados com a propagação da macaúba através da abordagem biotecnológica, principalmente o controle da germinação e a indução da embriogênese somática e sua expressão.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Considerações gerais.

Atualmente são conhecidos cerca de 230 gêneros e 2650 espécies de palmeiras. A maioria destas palmeiras são utilizadas ornamentalmente, entretanto três espécies tem causado impacto internacional quanto ao que delas se pode extrair: *Elaeis guineensis* Jacq (dendê), *Cocos nucifera* L. (coco) e *Phoenix dactylifera*. (tâmara). As duas primeiras são importantes fontes de óleo comestível e a última é fonte de carboidratos (REYNOLDS, 1982).

Durante a última década tem surgido um crescente interesse em plantas oleaginosas devido, em parte, a demanda por óleos vegetais para consumo humano e mais recentemente como fonte alternativa renovável de energia (LLERAS, 1985).

Embora as palmeiras possam se constituir em fontes mais promissoras de óleos vegetais, até o presente só duas espécies foram domesticadas para este fim: o dendê (*E. guineensis*) e o coco (*C. nucifera*).

Na América do Sul ocorre a maior concentração

de espécies de palmeiras, cerca de 1200 espécies das quais 500 são nativas do Brasil (MARKEY,1956), sendo algumas apontadas por TISSERAT (1984); SÖNDAHL & TEIXEIRA (1991) com grande potencial para agricultura. Dentre elas se destaca a macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Loddiges) (Tabela 1).

O gênero *Acrocomia* que engloba cerca de duas dezenas de espécies com distribuição na América Latina estendendo-se do México a Argentina, ocorrendo principalmente nas Antilhas, Costa Rica e Paraguai, sendo constatada em quase todas as regiões do território brasileiro. Dentro deste gênero está a *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Loddiges que é a palmeira de maior dispersão no nosso país, constituindo-se na espécie típica de Minas Gerais. Este gênero foi estabelecido em 1824 por MARTIUS como *Acrocomia sclerocarpa*, atualmente *A. aculeata* (Jacq.) Loddiges ex Mart.(ALVES, 1987).

O valor econômico representado pela macaúba pode ser avaliado em função das amplas possibilidades de seu aproveitamento integral (NOVAES, 1952).

O fruto da macaúba é o produto economicamente de maior importância dessa palmeira. Tanto o óleo da polpa como o das amêndoas apresentam interesse para indústria farmacêutica e de cosméticos, bem como para o setor energético. Esse óleo tem bom mercado na indústria de sabões, podendo ambos, no entanto, serem usados para consumo humano, desde que haja seleção de frutos, recém colhidos e não deteriorados. O farelo da amêndoa, subproduto da extração do óleo, tem considerável valor nutritivo pelo seu

Tabela 1. Espécies de palmeiras não exploradas e com alto potencial para agricultura.

| PALMEIRAS | Habitat | Produtos | Referências |
|--|------------------------|----------------------------------|------------------------------|
| <i>Acrocomia aculeata</i> L. | Brasil reg. central | óleo industrial fibra, carvão | Lleras, 1985 |
| <i>Astrocaryum tucuma</i> Mart. | Amazônia | fibra, óleo vegetal | Schultes, 1977 |
| <i>Bactris gasipaees</i> H.B.K. | América Central | palmito, fruto, óleo | Kitzke & Johnson, 1975 |
| <i>Hyphaene natalensis</i> | África do Sul | fonte de fibra | Moll, 1972 |
| <i>Manicaria saccifera</i> Gaert. | Amazônia | fibra, óleo | Balick, 1979 |
| <i>Mauritia vinifera</i> Mart. | Amazônia | óleo | Balick, 1979 |
| <i>Sygrus coronata</i> (Mart.) Becc | Amazônia | fonte de cera via folha | Kitzke & Johnson, 1975 |
| <i>Elaeis oleifera</i> (H.B.K.) Cortes | Amazônia | óleo | Balick, 1979 |

Fontes: TISSERAT (1984); SONDAHL & TEIXEIRA (1991)

alto teor de proteína, o que leva ao seu emprego como componente de rações animais balanceadas. O endocarpo duro tem sido empregado, *in natura*, como insumo energético nas regiões de maior ocorrência da macaúba, para uso doméstico ou em escala industrial para a produção de carvão (BRASIL, 1985).

A medicina popular utiliza o óleo extraído da amêndoa como calmante e para nevralgias (dores de cabeça) (ROCHA, 1946).

ARKCOOL (1988), incluiu a macaúba como uma fonte potencial de ácido láurico. O ácido láurico e seus derivados tem muitas aplicações nas indústrias alimentícia e química. Além do seu mercado nas indústrias de cosméticos e farmacêutica.

O óleo da macaúba destaca-se como fonte alternativa de energia, como a produção da mistura combustível, como substituto do óleo diesel (BRASIL, 1985; TEIXEIRA, 1985).

LLERAS (1985), enfatizou a necessidade de se desenvolver estratégias para a domesticação desta espécie, devido a alta variabilidade genética dentro e entre populações principalmente no que se refere a precocidade de floração e frutificação assim como ocorrência de material de alto rendimento nas populações nativas. Até o presente não há culturas racionais e orientadas da macaúba. Portanto, todas as considerações em torno desta palmeira foram baseadas sobre as culturas nativas.

DUKE (1986), relaciona a produção de óleo de dendê e soja, estimando que a produção de óleo de dendê pode chegar a ser 10 vezes maior do que a de soja. Além disso, muitas espécies de palmeiras podem produzir óleos com características mais desejáveis do que o dendê. Assim como CORADIN & LLERAS (1986), evidenciaram que não só o dendê pode chegar a ser opção viável na produção de óleo, mas destaca a macaúba com uma produtividade excepcionalmente alta, podendo atingir 10 toneladas/ ha de óleo (Tabela 2.).

Tabela 2. Eficiência da produção de óleo entre espécies oleaginosas.

| Espécies | Área Necessária para Produção de 1 ton de Óleo (ha) | Eficiência Relativa | Conteúdo de Óleo Semente (%) | Produção Semente (Kg/ha) |
|----------|---|---------------------|------------------------------|--------------------------|
| macaúba* | 0,1 | 10,0 | 25 | 40.000 |
| dendê | 0,14 | 10,0 | 50 | 35.000 |
| coco | 0,4 | 3,5 | 60 | 4.000 |
| soja | 1,4 | 1,0(a) | 18 | 4.000 |

Fonte: SÖNDAL & TEIXEIRA, 1991;

* CORADIN & LLERAS, 1986

(a) baseando-se que a produtividade de soja seja 4000 kg/ha considerou-se uma eficiência relativa igual a 1,0.

A macaúba é uma das palmeiras de crescimento mais rápido, chegando a crescer 1 metro por ano até atingir o tamanho normal. A frutificação pode ocorrer mesmo antes da palmeira atingir seu desenvolvimento completo, em geral aos 6 anos. Dependendo das condições do solo e clima é possível a frutificação plena aos 4 anos de idade (BRASIL, 1985). A palmeira adulta frutifica por quase todo ano, encontrando, nos 3 primeiros anos de frutificação, ocasião mais propícia para o amadurecimento dos frutos (NOVAES, 1952).

2.2. Fatores limitantes da produção.

Entre as palmeiras, as do gênero *Acrocomia* são as que apresentam mais difícil germinação; embora sejam palmeiras de rápido crescimento existem poucos estudos efetuados com este gênero (PINHEIRO, 1986).

A macaúba é uma palmeira de fecundação cruzada cuja propagação é feita exclusivamente por sementes as quais apresentam um período de dormência de até 4 anos. Por outro lado, os métodos convencionais de propagação vegetativa não são possíveis para esta espécie, pois a planta não emite brotações laterais que pudessem ser utilizadas para produção de mudas (TEIXEIRA, 1985).

KOEBERNIC (1971), indicou como sendo de 878 dias o período de dormência da espécie *Acrocomia aculeata* Jacq., em seu trabalho de observação do tempo de germinação de sementes de palmeiras.

Estes fatores determinam drástico atraso na propagação e produção agrícola, pois somam-se a outro fator fisiológico que é a frutificação heterogênea e amadurecimento desuniforme dos frutos (ARKCOLL, 1988). Entretanto, outros fatores como ocorrência de algumas plantas com crescimento e frutificação precoce e alto rendimento desta espécie, ampliam as perspectivas que visam programas de domesticação que podem efetivamente consagrar a macaúba entre as oleaginosas mais promissoras economicamente. Assim, a racionalização e regularização da produção de mudas permitiria o avanço da cultura com melhor aproveitamento do seu potencial agronômico.

A propagação vegetativa por métodos convencionais é inviável para esta espécie. A possibilidade de preservar e propagar progênies superiores está na dependência de viabilizar tecnologias de multiplicação não convencionais através da técnica de cultura de tecidos vegetais.

A técnica de cultivo *in vitro* apresenta-se como uma alternativa, não só no desenvolvimento de protocolos para a produção de plantas à partir da cultura de calos levando à embriogênese somática, mas principalmente na cultura de embriões zigóticos. Neste último caso se poderia viabilizar a produção racional de mudas através da uniformização e da redução do período de germinação da semente.

2.3. Propagação de palmeiras "in vitro".

A tecnologia da micropropagação é útil por si mesma, e pode ser extremamente valiosa na propagação de genótipos superiores, desde que os protocolos permitam alta frequência de regeneração de plantas. Por outro lado, no melhoramento de plantas, a tecnologia *in vitro* é uma poderosa ferramenta com vantagens qualitativas (obtenção de variantes somaclonais) e quantitativa (espaço e tempo), precedendo a incorporação das plantas regeneradas em um programa convencional de melhoramento (CROCOMO & CABRAL 1985).

Por não apresentarem o fenômeno de propagação vegetativa de modo natural, o interesse em cultura de tecido de palmeiras como meio para produção em massa de clones com alta produção ou resistência a doença teve início na década de 60. Na década de 70 uma série de metodologias *in vitro* foram desenvolvidas, sendo que na década de 80 intensificaram-se os estudos de técnicas em micropropagação e estudos morfogênicos. Esses estudos tem sido feito quase que exclusivamente em *P. dactylifera*, *E. guineensis*, *C. nucifera* e outras ornamentais (BRACKPOOL et alli, 1986).

Para TISSERAT (1987), a cultura de tecido em palmeiras pode ser dividida em três categorias com objetivos distintos: a) propagação clonal; b) cultura de embriões; c) estudos fisiológicos do crescimento e desenvolvimento. A propagação clonal de palmeiras, tem como objetivo principal

produzir numerosas árvores geneticamente uniformes. A propagação clonal através da embriogênese somática (formação de plântulas pela obtenção e germinação de embriões somáticos), ou através da organogênese (formação sequencial de raízes e brotos ou vice-versa).

O melhoramento de palmeiras e o estudo genético podem ser beneficiados a partir da aplicação da cultura de embriões para acelerar a germinação de embriões os quais apresentam germinação lenta. A cultura de embriões pode ser utilizada para o desenvolvimento de híbridos interspecíficos ou intergenéricos que não sobrevivem naturalmente. Além disso, esta técnica oferece um sistema controlado para estudar os problemas nutricionais, fisiológicos e bioquímicos dos embriões em vários estágios de desenvolvimento. Essa técnica pode também ser utilizada para estudos da morfogênese em palmeiras (TISSERAT,1984)

Em monocotiledôneas, organogênese e embriogênese são as duas vias morfogenéticas possíveis para obtenção de plantas *in vitro*. A embriogênese somática parece ser a via mais importante em palmeiras (BLAKE, 1983).

Um dos primeiros trabalhos em cultura de tecido de palmeiras envolveu o estudo do crescimento de embriões de coco, em meio modificado de White, contendo água de coco (CUTTER & WILSON, 1954). Desde então, a cultura de embriões tem sido explorada em coco, dendê e tâmara.

Em coco da Bahia, a cultura *in vitro* de embriões tem sido utilizada para propagação do mutante

"Makapuno", cujas sementes não germinam. DE GUZMAN (1969), sugeriu que embriões zigóticos de coco da Bahia poderiam ser a forma de intercâmbio de germoplasma dessa palmeira, em substituição às sementes.

BALAGA & DE GUZMAN (1972), obtiveram sucesso na germinação de embriões de coco "Makapuno". Após emergência da raiz e parte aérea, o "seedlings" era transferido para meio líquido para facilitar o crescimento da raiz. Para esses pesquisadores o escurecimento produzido pelo embrião excisado inibia o crescimento da raiz, esse inibidor era removido mais rapidamente em meio líquido.

DE GUZMAN & MANUEL (1975), adicionaram carvão ativado no meio de cultura para o desenvolvimento de embriões zigóticos de coco da Bahia, mutante "Makapuno", os quais apresentaram um melhor desenvolvimento de raízes com a adição do carvão.

RABECHault et alii (1972), obtiveram melhor crescimento em cultura de embriões de dende em meio líquido do que em sólido. Um estímulo progressivo do crescimento foi observado quando meio líquido foi suplementado com água de coco. O desenvolvimento da raiz foi precoce e mais frequente em meio líquido contendo 5% (v/v) de água de coco. No entanto, RABECHault et alii (1973) verificaram que o crescimento de embriões obtidos de sementes frescas apresentavam crescimento vigoroso e não foram estimulados pela água de coco.

Para tâmara, TISSERAT (1969) verificou que

não era necessário a adição de água de coco para germinação dos embriões. TISSERAT (1987) cita em seu protocolo a utilização do sais de Murashige & Skoog (MS) com a concentração dos macronutrientes reduzida à metade. Os embriões apresentaram alongamento e germinação após uma a duas semanas da inoculação, sendo que após oito semanas foram obtidos "seedlings" com 2 a 6 cm de comprimento.

NWANKWO & KRIKORIAN (1986), utilizando os sais de MS com a concentração dos macronutrientes reduzida a metade obtiveram a formação de "seedlings" após seis semanas da inoculação, a partir de embriões zigóticos de dênde.

Embriões zigóticos de *E. guineensis* var. "pisifera" de dênde desenvolveram rapidamente em "seedlings" em meio contendo carvão ativado. O desenvolvimento de raízes, geralmente, foi ausente em meio sem carvão ativado (PARANJOTHY & OTHMAN, 1982)

ASSY BAH (1986), obteve o desenvolvimento de "seedlings" a partir de embriões excisados do coco híbrido (WAT x MYD IPB-121) em meio sólido simples, contendo carvão ativado. Após 5 a 6 meses de cultivo, foi possível a transferência de plântulas para o solo. Essa metodologia foi aplicada para 20 variedades de coco.

TISSERAT (1987), cita que das 62 espécies de tâmaras estudadas, 19 espécies produziram plântulas a partir da cultura *in vitro* de embriões.

SITTOLIN & GUNHA (1987), utilizaram a técnica de cultura de embriões *in vitro* para produzir mudas para

implantação de um banco de germoplasma, para possibilitar o acompanhamento e avaliação do potencial da cultura de macaúba para produção de óleo. TABAI et alii (1990), utilizaram a técnica de cultura de embriões *in vitro*, para reduzir o tempo de germinação de sementes de macaúba. Esses pesquisadores obtiveram plântulas completas prontas para serem transferidas para casa de vegetação, após 16 semanas da inoculação.

Um dos principais fatores da baixa produtividade do dendê é a alta variação observada em plantas propagadas por sementes. Para RODRIGUEZ (1989), o uso de embriões como fonte de explante pode contornar o problema, proporcionando uma maior uniformidade fisiológica. Para TEIXEIRA (1990), o melhoramento e o estudo genético em dendê pode ser beneficiado com a aplicação da cultura de embriões *in vitro*, para acelerar a germinação de sementes com lenta germinação e a rápida avaliação da progênie de "seedlings", além da utilização dessa técnica para resgatar embriões híbridos interespecíficos que não sobrevivem naturalmente.

KANCHANAPOOM et alii (1990), verificaram que embriões zigóticos de dendê germinaram melhor no meio Y_3 do que MS e $1/2$ MS. A utilização de 0,1% de carvão ativado resultou no melhoramento da germinação e crescimento uniforme de "seedlings".

A cultura *in vitro* de embriões zigóticos, além de permitir estudos fundamentais de bioquímica, fisiologia e diferenciação celular, apresenta-se, no caso de pal-

meiras, como excelente fonte de explante para indução de calos (TISSERAT, 1984).

As primeiras evidências de que a morfogênese de tecidos e órgãos de palmeiras cultivados *in vitro* podem se expressar através da embriogênese somática foi feita por RABECHAUULT et alii (1970, 1972), os quais descreveram a formação de colônias celulares com formas similares a embriões somáticos a partir de embriões zigóticos de *E. guineensis*. Estas estruturas contudo não progrediam em cultura e não originavam novas plantas.

JONES (1974) obteve a formação de calos a partir de embriões excisados de sementes maduras de dendê, e posteriormente setores destes calos se diferenciavam em estruturas globulares, das quais muitas originavam plântulas.

REYNOLDS & MURASHIGE (1979), induziram calos embriogênicos em meio de cultura contendo 100 mg/l de 2,4-D, 3 mg/l de 2i-P e 0,3% de carvão ativado. Como explante utilizaram embriões zigóticos e segmentos de inflorescência das palmeiras ornamentais *Howeia forsteriana* e *Chaemaedorea costricana*. Para esses pesquisadores a concentração de fitorreguladores no meio de cultura parece ser importante para a indução de calos embriogênicos, enquanto que a expressão da embriogênese somática foi verificada após a repicagem desses calos para meio contendo concentrações reduzidas ou na ausência de auxinas.

Calos embriogênicos tem sido obtidos pela cultura de embriões zigóticos de coco da Bahia (DE GUZMAN et

alii, 1979), tâmara (AMMAR e BENBADIS, 1977; REYNOLDS e MURASHIGE, 1979) e dendê (RABECHAUULT et alii, 1970). Embriões maduros e imaturos tem sido fontes de calos embriogenéticos (TISSERAT, 1984). Em geral qualquer tecido jovem ou meristemático de palmeira pode ser utilizado como fonte de explante para iniciação de calos (BRACKPOOL et alii, 1986).

Para BLAKE (1983), parece evidente que a morfogênese de tecidos e órgãos de palmeiras *in vitro* normalmente ocorre através da embriogênese somática indireta, ou seja, mediada por uma fase de calos. A indução da embriogênese parece seguir o comportamento básico em que altos níveis de auxinas são necessários para a iniciação de calos e as citocininas atuam na expressão da embriogênese.

Um dos componentes críticos para obtenção da resposta morfogênética em palmeiras são as auxinas (REYNOLDS, 1982). O tipo e a concentração destes fitorreguladores são fundamentais para indução de calos embriogenéticos (TISSERAT, 1979). As concentrações utilizadas normalmente são altas. Mesmo assim a iniciação de calos é demorada e a quantidade de explante que evoluem para calos é da ordem de 10 a 50 % (BLAKE, 1983).

A indução da embriogênese somática em palmeiras não é bem compreendida (TEIXERA, 1990). Em geral a indução de calos é considerada como um pré-requisito para que ocorra embriogênese somática (RABECHAUULT & MARTIN, 1976). O uso de uma auxina é requerida para indução e

proliferação de calos (NWANKNO & KRIKORIAM, 1986). Após sucessivos subcultivos alguns calos parecem adquirir capacidade para embriogênese. Isso é observado em baixas e altas concentrações de auxinas (TURNHAM & NORTHCOTE, 1982). Em alguns casos a redução ou omissão da auxina é necessária para o desenvolvimento de embriões (REYNOLDS & MURASHIGE, 1979; TISSERAT, 1979). Mudanças na fonte de auxina bem como a adição de uma citocinina parece ajudar (RABECHALT & MARTIM, 1976). Para KOMANINE et alii (1990), a adição da auxina é essencial para a indução da embriogênese, mas é inibitória para o desenvolvimento da embriogênese.

Na maioria das palmeiras estudadas, bem como na maior parte das monocotiledôneas, o 2,4-D é a auxina mais utilizada. Embora o 2,4-D tenha sido usado como fonte preferencial de auxina, o uso de outras auxinas vem sendo explorado. O picloram apresenta um forte efeito como auxina e tem sido usado na indução de calos e regeneração de plantas de varias espécies de plantas (COLLINS et alii, 1978; VALVERDE et alii, 1987; OMAR & NOVAK, 1990; TEIXEIRA et alii, 1990).

O uso do picloram promoveu a embriogênese somática na palmeira peyibaye (VALVERDE et alii, 1987). OMAR et alii (1990), verificaram o efeito do picloram e dicamba no crescimento de calos e na embriogênese de tâmara, onde o máximo em peso fresco foi obtido em meio contendo 200 μ M de picloram. A embriogênese somática, bem como a regeneração de plantas foi obtida quando os calos foram transferidos

para meio sem fitorreguladores.

Um dos principais problemas relacionados com cultura de tecido de palmeiras é o escurecimento do explante (TISSERAT, 1979; REYNOLDS & MURASHIGE, 1979). Alguns pesquisadores atribuem o escurecimento do explante em palmeiras a liberação e oxidação de compostos fenólicos produzidos por ferimento do tecido (REYNOLDS, 1982; CHOO, 1984). Para minimizar esse escurecimento é comum a adição de carvão ativado, PVP, ácido ascórbico e cisteína (TISSERAT, 1979; HANOVER & PANNETIER, 1982; TEIXEIRA, 1990). Entre os compostos utilizados, o carvão ativado pareceu promover melhores resultados e passou a ser incluído como procedimento padrão nos protocolos de cultura de tecido de palmeiras (TISSERAT, 1987).

O carvão ativado tem sido adicionado no meio de cultura devido a sua propriedade adsorptiva, por remover inibidores de crescimento em tecidos que apresentam metabólitos tóxicos (EBERT & TAYLOR, 1990). Para alguns pesquisadores como REYNOLDS (1982), PANNETIER & BUFFARD-MOREL (1986), EBERT & TAYLOR (1990), além do efeito do carvão ativado sobre a prevenção da oxidação, este também possui propriedade de adsorver e reduzir a disponibilidade da auxina exógena no meio de cultura.

TEIXEIRA (1990), cita que o nível de oxidação pode ser diminuído com adição de nitrogênio reduzido como arginina, asparagina, glutamina e também caseína. O efeito do nitrogênio orgânico é o de melhorar o crescimento, como

resultado de menor acúmulo de compostos fenólicos e escurecimento.

SMITH & THOMAS (1973), verificaram que a composição mineral do meio de cultura não era tão importante como as auxinas para iniciação de calos em embriões zigóticos de dendê. A iniciação de calos foi mais dependente de uma auxina forte do que a sua subsequente manutenção. O 2,4-D , 2,4,5-T e o 2,4,5,-TP foram mais efetivos para indução de calos do que o NAA.

EEUWENS (1976), fez tentativas para determinar os componentes inorgânicos ótimos para indução e crescimento de calos de coco, comparando diferentes formulações. Efeitos benéficos para o crescimento de calos foram obtidos nas formulações inorgânicas de MS e Y₃, ambos com altos níveis de nitrogênio.

No entanto, não existem informações suficientes para a formulação de um meio específico para palmeiras e as comparações entre várias composições de meios e seus efeitos nestas espécies não foram realizadas com a intensidade desejada (TISSERAT, 1984). De modo geral o meio de cultura frequentemente utilizado para a maior parte dos sistemas *in vitro* de palmeiras, baseia-se na formulação inorgânica de Murashige & Skoog, na sua forma original (OMAR, 1986) ou modificada (NWANKWO & KRIKORIAN, 1986; CID, 1987; VALVERDE, 1987).

SRINIVASAN et alii (1985), obtiveram embriogênese somática a partir de embriões zigóticos da pal-

meira *Veitchia merrilli* (Bacc) H.E. Moore, em meio MS contendo 5 a 50 uM de 2,4-D e 5 uM de BA. Embriões somáticos desenvolveram em meio sem hormônio e contendo glutamina.

BHALLA- SARIN et alii (1986), obtiveram calos a partir de embriões zigóticos de coco (*C. nucifera* L.), cultivados em meio B5 (Gamborg) com IAA/asparagina ou IAA/alanina (2,0 mg/l). O desenvolvimento de calos aumentou em 10% com adição de IAA conjugado. A diferenciação de raiz e broto ocorreu quando calos foram transferidos para meio com IAA/Asp e cinetina ou com NAA. Plântulas completas foram obtidas em meio com NAA, BAP e PVP.

NWANKWO & KRIKORIAN (1986), induziram calos a partir de embriões zigóticos de dendê em meio MS com os macronutrientes reduzidos à metade, suplementado com inositol, caseína hidrolisada, carvão ativado e 2,4-D. Os calos formados após subcultivo em meio similar apresentaram estruturas organizadas. Essas estruturas mantidas no mesmo meio formavam estruturas "neomorficas", mas quando os calos formados eram transferidos para meio com baixa concentração de auxina ou na ausência desta, ocorreu a formação de brotos bem organizados. A adição de ácido giberelico produziu brotos bem organizados acompanhados de raiz.

TEIXEIRA et alii (1986), utilizando embriões zigóticos de *E. oleifera* e *Acrocomia aculeata*, obtiveram calos após duas semanas em meio MS modificado contendo 450 uM de 2,4-D e 3 g/l de carvão ativado. Após duas semanas em meio primário, calos consistiam de várias estruturas globu-

lares. A mesma aparência de calos foi observada para ambas espécies, exceto que para *A. aculeata* os calos eram mais compactos e com tendência a oxidação. O subcultivo de calos em meio contendo 10 uM de NAA, 20 uM de 6-BA e 3 g/l de carvão ativado, resultou em vários embriões após 4 a 6 semanas. A germinação normal foi encontrada somente para *E. oleifera* em meio sem fitorregulador.

CID (1987), visando alcançar a regeneração das palmeiras caiaué (*E. oleifera*) e de seu híbrido com dendezeiro (*E. guineensis*) via embriogênese somática, inoculou embriões zigóticos em meio MS modificado contendo 2,4-D e 2,i-P. A formação de embriões somáticos foram obtidos a partir de calos, os quais passaram por uma seqüência de transferência em meio sem auxina.

GUERRA & HANDRO (1988), induziram a embriogênese somática em cultura de embriões de *Euterpe edulis* em meio de cultura LS contendo 100 mg/l de 2,4-D. Embriões somáticos originaram diretamente da superfície do tecido, aparecendo após 45 a 180 dias da inoculação. A transferência da massa de embriões para meio com NAA e 2i-P ou sem fitorreguladores induziu o desenvolvimento de plântulas.

RODRIGUEZ (1989), obteve maior taxa de produção de embriões em meio MS contendo 2 g/l de caseína hidrolizada. A formação de raízes foi obtida em meio com 1,25 g/l de zeatina.

KANCHANAPOOM et alii (1990), induziram calos

embriogénéticos a partir de embriões zigóticos de dendê (*E. guineensis*), em meio MS contendo 2 mg/l de 2,4-D e sem carvão ativado. Quando calos foram cultivados em meio MS modificado, embrioides emergiram em algumas culturas e plântulas foram regeneradas desses embriões somáticos.

TEIXEIRA (1990), utilizou altas concentrações de 2,4-D (400 a 700 μM) para indução de calos em embriões zigóticos de dendê. O crescimento de calos começou após 2 a 3 semanas da inoculação e foi considerado alto em todos tratamentos, mas foi superior quando embriões foram pré-tratados em meio com 700 μM de 2,4-D e então subcultivados em 400 ou 500 μM de 2,4-D. A embriogênese somática apresentou uma baixa porcentagem em meios contendo altas concentrações de 2,4-D após 4 a 6 subcultivos.

Em todos os sistemas conhecidos as células embriogénéticas a partir das quais os embriões somáticos originam, apresentam um conjunto de características comuns ao comportamento de células meristemáticas em divisão celular. Estas características incluem o tamanho pequeno, conteúdo citoplasmático denso, núcleos grandes com nucléolos proeminentes, vacúolos pequenos e uma profusão de grãos de amido (BRANTON & BLAKE, 1986; WILLIAMS & MAHESWARAW, 1986; SCHWENDIMAN et alii, 1988).

Estudos anatômicos tem mostrado que os calos são produzidos a partir de tecidos procambiais em embriões de dendê (RABECHAUULT & GUENIN, 1970; NWANKWO & KRİKORIAM, 1986) e embriões de coco da Bahia (DE GUZMAN et alii,

1978).

REYNOLDS & MURASHIGE (1979), observaram que secções de calos granulados mostravam numerosos centros de atividade meristemática. As células nestas regiões eram menores e altamente vacuoladas. Estes centros meristemáticos, na ausência de fitorreguladores, diferenciavam-se em estruturas organizadas contendo tecidos vasculares e com um ápice caulinar encoberto pelos tecidos cotiledonares. Resultados similares foram observados por TISSERAT & DE MASON (1980) em tâmara, verificando que embriões adventícios originavam de células meristemáticas localizadas na epiderme e porção sub-epidérmica da periferia dos calos.

Estudos histológicos realizado por MALAURIE (1987) em calos primários e secundários de *E. guineensis*, mostraram que estruturas globulares que evoluíram para estruturas polarizadas, apresentaram organização de meristemas radiculares e caulinares de forma similar a encontrada na embriogênese zigótica.

Avaliações histológicas foram realizadas por SCHWENDIMAN et alii (1988), durante uma sequência de eventos que levou a obtenção de embriões somáticos de *E. guineensis*. Os calos formaram a partir da nervura central de folhas jovens. A proliferação celular nesta região originou nódulos meristemáticos. Quando esses nódulos foram isolados ocorreu rápida diferenciação originando agregados pró-embriogénéticos que evoluíram, apresentando meristema caulinar e radicular.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Centro de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC) do Departamento de Química, ESALQ, no Campus da Universidade de São Paulo (SP), em Piracicaba-SP.

O material vegetal constituído por frutos da palmeira macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Loddiges), foram coletados na região de povoamento natural dessa palmeira, em São Gotardo no Estado de Minas Gerais. Esses frutos, que tiveram o mesocarpo removido para indústria, foram quebrados para remoção da amêndoa.

3.1. Assepsia do Explante.

Embriões zigóticos de macaúba extraídos da amêndoa foram mantidos em solução de ácido ascórbico (250 mg/l) para minimizar problemas relacionados com a oxidação. Completada a extração, os embriões foram deixados em água corrente durante 12 horas, aproximadamente, para remoção de prováveis toxinas liberadas pelos embriões e para embebição dos mesmos. Para obtenção de calos os embriões foram inoculados sem prévia embebição para evitar qualquer início

do processo de germinação.

Para o processo de desinfecção, os embriões foram colocados em solução de hipoclorito de sódio 20% (v/v) por 20 minutos em agitação constante e logo após lavados por 3 vezes em água deionizada esterilizada, para remoção do hipoclorito residual.

3.2. Cultura de Embriões.

Visando reduzir o tempo de germinação para macaúba, embriões zigóticos foram inoculados em dois diferentes meios de cultura básicos: MURASHIGE & SKOOG, (1962) (MS) e GONÇALVES (1980) (MG), descritos nas Tabelas 3 e 4 respectivamente. Estes meios foram suplementados com sacarose (30 g/l), ágar (6 g/l) e carvão ativado (3 g/l) como neutralizador dos efeitos oxidativos da liberação de compostos fenólicos pelo explante. O pH dos diferentes meios de cultura foi ajustado para o valor 5,7.

Os meios diferiram na adição ou não de vitaminas e aminoácidos. Os seguintes meios foram testados: a) meio MS e MG sem arginina e vitaminas; b) meio MS suplementado com vitaminas de MOREL & WETMORE (1951) e arginina (70 mg/l); c) MS e MG suplementados com tiamina (1 mg/l), água de coco (100 ml/l), meso-inositol (100 mg/l) e arginina (70 mg/l)

Tabela 3. Composição do meio de MURASHIGE & SKOOG (1962) utilizado como meio básico na cultura de embrião e indução de calos.

| Componentes | Concentração (mg/l) |
|---|---------------------|
| NH_4NO_3 | 1650,000 |
| KNO_3 | 1900,000 |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 440,000 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 370,000 |
| KH_2PO_4 | 170,000 |
| Na_2EDTA | 37,300 |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 27,800 |
| H_3BO_3 | 6,200 |
| $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 22,300 |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 8,600 |
| KI | 0,830 |
| $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0,250 |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 0,025 |
| $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0,025 |

Tabela 4. Composição do meio GONÇALVES (1980), utilizado como meio básico na cultura de embrião.

| Componentes | Concentração (mg/l) |
|--|---------------------|
| NH_4NO_3 | 800,000 |
| KNO_3 | 1000,000 |
| KH_2PO_4 | 170,000 |
| $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 236,000 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 250,000 |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 27,800 |
| Na_2EDTA | 37,300 |
| H_3BO_3 | 6,200 |
| $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0,250 |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 0,025 |
| $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 1,700 |
| MoO_3 | 0,144 |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 3,000 |
| KI | 0,750 |

3.3 Estudos Fisiológicos do Crescimento e Desenvolvimento.

Para testar o efeito das fontes e concentrações de nitrogênio durante o crescimento e desenvolvimento, embriões zigóticos de frutos maduros foram inoculados em meio de cultura contendo os sais de MURASHIGE & SKOOG (1962), onde as concentrações e fontes de nitrogênio

foram alteradas (Tabelas 5 e 6). A suplementação usada foi igual para todos os tratamentos, sendo utilizado caseína hidrolizada (0,5 g/l), tiamina (0,4 mg/l), piridoxina (1 mg/l), sacarose (30 g/l), carvão ativado (3 g/l) e ágar (6 g/l). O pH foi ajustado a 5,7.

A determinação da massa de matéria fresca e seca foi feita no início da inoculação, com 10 repetições para cada tratamento e repetida a cada 15 dias até atingir o estágio de plântulas prontas para serem transferidas para condições "ex vitro".

Com emprego de balança de precisão, determinou-se a massa de matéria fresca. Após, o material foi então colocado em estufa para secagem por 2 dias à 60 °C e pesados novamente para se calcular a massa de matéria seca.

Tabela 5. Meios de cultura empregados para o cultivo de embrião de macaúba (mg/l).

| Nutrientes | MS | MS 1/2 | MS 1/2 | | MS 1/4 | MS 1/4 | |
|--|------|-----------|----------------------------------|----------------------------------|-----------|----------------------------------|----------------------------------|
| | | | sem NH ₄ ⁺ | sem NO ₃ ⁻ | | sem NH ₄ ⁺ | sem NO ₃ ⁻ |
| NH ₄ NO ₃ | 1650 | 825 | - | - | 412,5 | - | - |
| KNO ₃ | 1900 | 950 | 950 | - | 475 | 950 | - |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | 440 | 220 | - | 220 | 220 | - | 220 |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 370 | 185 | 185 | 185 | 185 | - | 185 |
| KH ₂ PO ₄ | 170 | 85 | 85 | - | 85 | 85 | - |
| K ₂ HPO ₄ | - | - | - | 108,9 | - | - | 108,9 |
| K ₂ CO ₃ | - | - | - | 342,4 | 324,4 | - | 342,4 |
| CH ₃ COONH ₄ | - | - | - | 2312,2 | - | - | 1156 |
| Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O | - | - | 1011,4 | - | - | 413 | - |
| Mg(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O | - | - | 1544,8 | - | - | 270,1 | - |
| NaCl | - | - | 174,8 | - | - | 174,8 | - |
| Na ₂ SO ₄ | - | - | - | - | - | 106,7 | - |

Tabela 6. Quantidade dos componentes utilizados nos meios de cultura (mg/l).

| Nutrientes | MS | MS 1/2 | MS 1/2 | | MS 1/4 | MS 1/4 | |
|-----------------|--------|-----------|----------------------------------|----------------------------------|-----------|----------------------------------|----------------------------------|
| | | | sem NH ₄ ⁺ | sem NO ₃ ⁻ | | sem NH ₄ ⁺ | sem NO ₃ ⁻ |
| NH ₄ | 288,75 | 144,37 | - | 420,4 | 72,19 | - | 210,2 |
| NO ₃ | 552,12 | 276,07 | 420,4 | - | 138,03 | 210,2 | - |
| P | 38,75 | 19,4 | 19,4 | 19,4 | 19,4 | 19,4 | 19,4 |
| K | 782,41 | 391,23 | 391,2 | 391,23 | 391,23 | 391,2 | 391,23 |
| Ca | 120,55 | 60,2 | 171,4 | 60,2 | 60,2 | 70,0 | 60,2 |
| Mg | 36,09 | 18,04 | 168,6 | 18,04 | 18,04 | 25,28 | 18,04 |
| S | 48,13 | 24,06 | 24,06 | 24,06 | 24,06 | 24,06 | 24,06 |
| Cl | 210,96 | 105,5 | 105,5 | 105,5 | 105,5 | 105,5 | 105,5 |

3.4 Obtenção de Calos.

Para obtenção de calos, embriões zigóticos oriundos de frutos maduros e imaturos foram utilizados como explante. Foram também utilizados embriões pré-germinados inoculados inteiros ou somente parte destes, contendo regiões referentes aos ápices (nó cotiledonar).

Com base nas observações bibliográficas feitas sobre o efeito dos tipos e concentrações dos fitorreguladores na morfogênese *in vitro* das palmeiras, diferentes fontes e concentrações de auxina e citocininas foram avaliadas.

O meio de cultura utilizado foi a formulação

básica de MURASHIGE & SKOOG (1962), modificado de acordo com cada experimento.

3.4.1. Efeito da autoclavagem nos fitorreguladores

3.4.1.1. Fitorreguladores filtrados.

Embriões de frutos maduros e imaturos (amêndoa em estado gelatinoso), foram inoculados em meio de cultura sólido constituído dos macro e micronutrientes de MURASHIGE & SKOOG (1962) (Tabela 3), porém, contendo a metade da concentração de nitrogênio e suplementado com monofosfato de sódio (170mg/l), tiamina (0,4 mg/l), meso-inositol (100 mg/L), caseína hidrolizada (0,5 g/l), sacarose (30 g/l) e ágar (6 g/l). Carvão ativado a 0,3% e ácido ascórbico (100mg/l), foram adicionados ao meio para minimizar o escurecimento dos explantes. O pH do meio foi ajustado para 5,7.

As vitaminas e os fitorreguladores foram filtrados com auxílio de filtro Millipore, membrana de $0,45\mu$ e adicionados ao meio básico após autoclavagem à 120°C e 1 atmosfera de pressão, durante 20 minutos.

Os embriões foram inoculados individualmente em frascos contendo 10 ml de meio de cultura. O experimento constituiu-se de diferentes combinações de 2,4-D e 2i-P, sendo as interações desses fitorreguladores testadas

segundo-se o delineamento experimental de quadrado latino, com 10 repetições, envolvendo as seguintes concentrações (mg/l) dos fitorreguladores:

2,4-D: 0,0 - 10,8 - 21,6 - 36,0 - 43,2

Zi-P : 0,0 - 0,05 - 0,50 - 1,00 - 2,50

Todos os frascos foram mantidos no escuro à temperatura de 27 ± 2 °C e os subcultivos feitos a intervalos de duas semanas.

A avaliação foi feita atribuindo-se notas de 0 a 4, sendo a nota zero atribuída para o embrião sem desenvolvimento aparente de calos e quatro para calos com maior crescimento (ca. 0,5 cm). A avaliação foi feita após 35 dias da inoculação.

3.4.1.2. Fitorreguladores autoclavados.

Visando a otimização do meio de cultura para indução de calos de macaúba, esse experimento explorou o efeito da autoclavagem nas diferentes combinações dos fitorreguladores 2,4-D e Zi-P. O meio básico utilizado foi o de MURASHIGE & SKOOG (1962) modificado, conforme mostra Tabela 7, onde a concentração dos sais (macronutrientes) e do $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e do Na_2EDTA , foi reduzida à metade conforme NWANKWO & KRIKORIAN (1982). A suplementação utilizada é mostrada na Tabela 7.

O experimento consistiu no uso de diferentes combinações de 2,4-D e Zi-P, sendo a interação desses fitor-

reguladores estudada através do delineamento experimental de quadrado latino, envolvendo as seguintes concentrações (mg/l) dos fitorreguladores:

2,4-D : 0,0 - 30,0 - 60,0 - 90,0 - 120,0.

2i-P : 0,0 - 2,0 - 5,0 - 10,0 - 15,0.

Os embriões foram inoculados individualmente em frascos contendo 10 ml de meio de cultura com 40 repetições para cada tratamento, sendo 20 mantidas à luz com fotoperíodo de 16/8 horas (luz/escuro) e 20 no escuro a temperatura de 27 ± 2 °C.

A avaliação foi feita, atribuindo-se notas de 0 a 4, sendo a nota zero atribuída para o embrião sem desenvolvimento aparente de calos e quatro para calos maiores (ca.0,5 cm). A avaliação foi feita após 35 dias da inoculação.

Tabela 7. Composição do meio de MURASHIGE e SKOOG (1962) modificado conforme NWANKWO e KRIKORIAN (1986) e a suplementação usada, utilizado para indução de calos.

| Componentes | Concentração (mg/l) |
|---|---------------------|
| NH_4NO_3 | 825,000 |
| KNO_3 | 950,000 |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 220,000 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 185,000 |
| KH_2PO_4 | 85,000 |
| Na_2EDTA | 18,650 |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 13,900 |
| $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 170,000 |
| KI | 0,830 |
| H_3BO_3 | 6,300 |
| $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 22,300 |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 8,600 |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 0,025 |
| $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0,025 |
| $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0,250 |
| Tiamina..... | 0,400 |
| Inositol..... | 100,000 |
| Caseína Hidrolisada..... | 500,000 |
| Piridoxina..... | 1,000 |
| Carvão Ativado..... | 3.000,000 |
| Sacarose..... | 30.000,000 |
| Ágar..... | 6.000,000 |

3.4.1.3. Confronto entre autoclavagem e filtragem dos fitorreguladores.

Para melhor testar o efeito da autoclavagem do 2,4-D na indução de calos, embriões zigóticos oriundos de frutos maduros foram inoculados individualmente em frascos contendo 10 ml de meio básico (Tabela 7), adicionado de 2,4-D (autoclavado e filtrado) nas seguintes concentrações (mg/l): 0,0 - 100,0 - 150,0 - 200,0 - 300,0 - 400,0. Foram feitas 40 repetições para cada tratamento, sendo 20 mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16/8 horas (luz/escuro) e 20 no escuro a temperatura de 27 ± 2 °C.

O experimento consistiu dos seguintes ensaios:

a) 2,4-D, adicionado ao meio básico seguindo-se autoclavagem; b) 2,4-D filtrado em filtro Agrodisc - Gelman Sciences, membrana de 0,2 μ m e adicionado ao meio básico após este ter sido autoclavado.

A avaliação da porcentagem de indução de calos e outros possíveis efeitos da autoclavagem do 2,4-D foi feita após 30 dias da inoculação.

3.4.2. Indução de calos por 2,4-D em embriões zigóticos inteiros e cortados.

Embriões zigóticos de frutos maduros, foram inoculados em meio de cultura sem fitorreguladores (Tabela 7). Após duas semanas da inoculação a metade dos embriões

foi transferida para meio de cultura acrescido de 2,4-D nas seguintes concentrações (mg/l): 0,0 - 100,0 - 150,0 - 200,0 - 300,0 - 400,0 e os embriões da outra metade foram seccionados em solução de ácido ascórbico (250 mg/l), conforme mostra a Fig. 1. As secções dos embriões contendo ápice (pecíolo cotiledonar ou nó cotiledonar) foram inoculadas no meio acima. As secções referentes ao haustório (lâmina cotiledonar) foram descartadas.

Foram feitas 40 repetições para cada tratamento (embriões inteiros e cortados), sendo 20 mantidos à luz e 20 mantidos no escuro, a temperatura de 27 ± 2 °C.

Após 30 dias da inoculação foram feitas observações visuais das respostas morfogénicas obtidas.

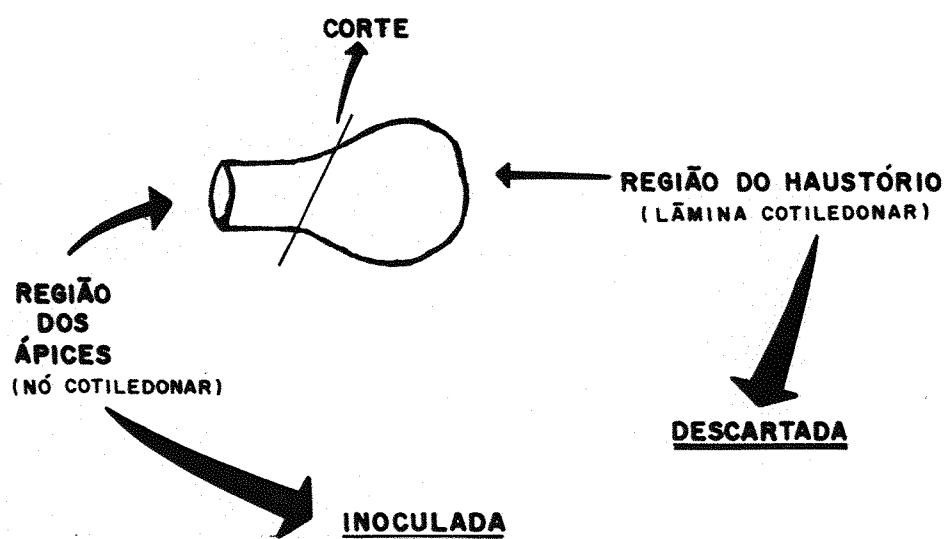


Fig. 1. Esquema do corte do embrião zigótico para inoculação da região do nó cotiledonar

3.4.3. Efeito do tempo de exposição ao 2,4-D na indução de calos.

Embriões zigóticos de frutos maduros foram inoculados em meio de cultura contendo os fitorreguladores 2,4-D (100 mg/l) e 2i-P (5 mg/l), (Tabela 7). Após períodos de 5, 10, 15 e 20 dias de exposição ao 2,4-D, os embriões foram transferidos para meio básico contendo 2,4-D (10 mg/l) e 2i-P (5 mg/l). Como controle, embriões foram inoculados em meio sem fitorreguladores e em meio contendo 2,4-D (100 mg/l) e 2i-P (5 mg/l) e mantidos sem transferência para concentrações menores de 2,4-D.

O experimento consistiu de 10 repetições de cada tratamento, mantidos no escuro a temperatura de 27 ± 2 °C. As transferências foram feitas a cada 5 dias para meio de mesma composição química e obedecendo o cronograma de exposição ao 2,4-D, que foi de 5, 10, 15, 20 dias em meio com fitorregulador.

3.4.4. Efeito de altas concentrações de 2,4-D na indução de calos.

Esse experimento explorou o efeito de altas concentrações de 2,4-D na indução de calos. Meio de cultura contendo as seguintes concentrações (mg/l) de 2,4-D: 0,0 - 100,0 - 200,0 - 300,0 - 400,0 - 600,0 foi utilizado (Tabela 8).

Tabela 8. Composição do meio de Murashige e Skoog (1962) modificado e com a suplementação usada, utilizado para indução de calos.

| Componentes | Concentração (mg/l) |
|---|---------------------|
| NH_4NO_3 | 412,200 |
| KNO_3 | 475,000 |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 220,000 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 185,000 |
| KH_2PO_4 | 85,000 |
| Na_2EDTA | 18,650 |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 13,900 |
| $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 170,000 |
| KI | 0,830 |
| H_3BO_3 | 6,300 |
| $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 22,300 |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 8,600 |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 0,025 |
| $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0,025 |
| $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0,250 |
| Tiamina | 0,400 |
| Inositol | 100,000 |
| Caseína Hidrolisada | 500,000 |
| Piridoxina | 1,000 |
| Carvão Ativado | 3.000,000 |
| Sacarose | 30.000,000 |
| Ágar | 6.000,000 |

As concentrações de nitrogênio foram reduzidas a um quarto da concentração presente no meio MS. Os embriões foram inoculados individualmente em frascos contendo 10 ml de meio com 80 repetições, sendo 40 mantidas em fotoperíodo de 16/8 horas (luz/escuro) e 40 mantidas no escuro. A temperatura foi de 27 ± 2 °C.

A avaliação da porcentagem de embriões que formaram calos foi feita após 40 dias da inoculação.

3.4.5. Efeito do ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-picolínico (picloram) na indução de calos.

Embriões zigóticos de frutos maduros foram inoculados em meio de cultura (Tabela 8) contendo picloram nas seguintes concentrações (mg/l) : 0,0 - 10,0 - 25,0 - 50,0 - 100,0 - 200,0.

Os embriões foram inoculados individualmente em frascos contendo 5 ml de meio com 40 repetições, sendo 20 mantidas sob fotoperíodo de 16/8 horas (luz/escuro) e 20 no escuro. A temperatura foi de 27 ± 2 °C. As transferências foram feitas a cada 10 dias.

Após 50 dias da inoculação, quando já se observava a formação de calos com aspecto aparentemente globular, estes foram transferidos para meio sem picloram consistindo de duas camadas, sendo a inferior sólida e contendo carvão ativado e a superior líquida e sem carvão

ativado (Figura 2). O material foi mantido em agitação a 70 rpm em agitador horizontal.

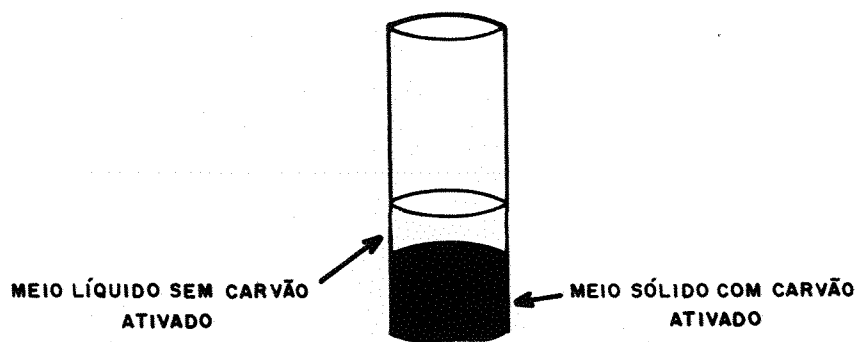


Fig. 2. Esquema do meio de cultura com dupla camada utilizado para minimizar o escurecimento do explante.

A avaliação foi feita atribuindo-se notas de 0 a 3, sendo a nota zero atribuída para explante sem desenvolvimento de calos e a nota três para calos com características embriogênicas. As notas intermediárias foram dadas para calos formados somente em alguns setores nota 1 e a outra para calos envolvendo todo tecido nota 2. As épocas de avaliações foram aos 30 e 60 dias após inoculação.

3.4.6. Efeito da concentração de cálcio no meio de cultura contendo picloram na indução de calos e embriogênese.

Embriões zigóticos de frutos maduros foram inoculados em meio de cultura contendo diferentes combinações de picloram e cálcio. A interação e concentração usadas estão na Tabela 9.

Tabela 9. Diferentes combinações de cálcio e picloram para indução de calos embriogênicos (os números no quadro representam a numeração atribuída aos tratamentos).

| PICLORAM (mg/l) | Concentrações de Ca ⁺⁺ | | | |
|--------------------|--|---------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| | 1/4 Ca-MS (0,75x10 ⁻³ M) | 1/2 Ca-MS (1,5x10 ⁻³ M) | 1 Ca-MS (3x10 ⁻³ M) | 2 C2-M (6x10 ⁻³ M) |
| 0 | 1 | 7 | 13 | 19 |
| 10 | 2 | 8 | 14 | 20 |
| 25 | 3 | 9 | 15 | 21 |
| 50 | 4 | 10 | 16 | 22 |
| 100 | 5 | 11 | 17 | 23 |
| 200 | 6 | 12 | 18 | 24 |

As concentrações de cálcio foram estabelecidas com base no meio de Murashige e Skoog (Tabela

3), onde a concentração de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ é de $3 \cdot 10^{-3}\text{M}$.

Os embriões foram inoculados individualmente em frascos contendo 5 ml de meio de cultura (Tabela 8) com 40 repetições para cada tratamento e mantida no escuro a temperatura de 27 ± 2 °C. A avaliação foi feita após 40 dias da inoculação, verificando-se a porcentagem de embriões que formaram calos.

Após 50 dias da inoculação, quando foi observada a formação de calos, estes foram transferidos para meios sem picloram constituído de duas camadas, uma inferior sólida com carvão ativado e outra superior líquida e sem carvão e mantidos em agitação a 70 rpm em agitador horizontal.

Aos 100 dias da inoculação, quando apresentavam estruturas aparentemente globulares, alongadas separadas do explante, estas foram transferidas para meio semi-sólido (4 mg/l de ágar) contendo as seguintes combinações dos fitorreguladores: NAA (0,5 mg/l) + 2i-P (1 mg/l); NAA (2 mg/l) + 2i-P (1 mg/l); NAA (0,5 mg/l) + 2i-P (5 mg/l) e NAA (0,5 mg/l) + GA (1 mg/l).

3.5. Histologia.

O material para estudo histológico foi selecionado a partir de calos com características embriogênicas obtidos através do cultivo de embriões, após 70, 106 e 151 dias da inoculação em meio contendo

concentrações de 25 e 50 mg/l de Picloram.

Essas estruturas foram fixadas em FAA 50 (SASS,1951). A técnica empregada para desidratação e inclusão do material em parafina, corte e distensão das fitas em lâminas, foi a indicada por SASS (1951). A espessura dos cortes variou entre 8 a 10 μ m. Seguiram-se a desparafinação das lâminas pelo xilol e a coloração do material pela safra-nina e azul de astra (GERLACH, 1969).

Foram tiradas fotomicrografias de material preparado em lâminas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Cultura de embriões.

Visando reduzir o tempo de germinação de sementes de macaúba o qual pode ser de até 4 anos, neste trabalho foi feita a cultura de embriões *in vitro*, utilizando diferentes meios de cultura. Os resultados mostraram que o meio de cultura MS suplementado com vitaminas e arginina apresentou melhor resultado para germinação dos embriões.

Após a segunda semana da inoculação observou-se o alongamento dos embriões. Na quarta semana ocorreu emergência da radícula e do caulículo e ao final da oitava semana as plântulas apresentavam-se com aproximadamente 5 cm de comprimento. Plântulas bem desenvolvidas foram obtidas após a 14^a semana da inoculação (Fig. 3), possibilitando a transferência de plantas para condições *ex vitro* após 16 semanas da inoculação.



Fig. 3. Aspecto da plântula após 14 semanas da inoculação em meio MS + Vit. + aa.

A utilização de meio contendo os sais do meio MG (GONÇALVES, 1980) com e sem as suplementações, exigiu um maior tempo de crescimento de plântulas e apresentou menor uniformidade na germinação.

A formulação de meios específicos para determinadas plantas é prática comum em micropropagação. Para palmeiras poucos estudos foram feitos nesta área, em consequência, um meio básico ideal de utilização geral parece não existir (TISSERAT, 1984). Geralmente o meio básico utilizado é o de Murashige & Skoog (1962) completo (TISSERAT, 1987) ou modificado (NWANKWO & KRIKORIAN, 1986).

Embriões maduros germinam e crescem em meio simples, constituído de sais inorgânicos e uma fonte de energia. A adição de vitaminas e aminoácidos tem-se mostrado dispensável para o cultivo de embriões de algumas espécies de plantas, mas para embriões de algumas palmeiras tem-se verificado que sua inclusão favorece o desenvolvimento de plântulas (TISSERAT, 1987). Para macaúba a inclusão de vitaminas e arginina favoreceu a germinação e o desenvolvimento de plântulas.

A adição do carvão ativado para cultura de embriões de macaúba foi indispensável para todos os meios testados, mostrando-se eficiente na eliminação do escurecimento causado pela oxidação. Esta oxidação prejudica a germinação e também o desenvolvimento de plântulas.

Alguns explantes são propensos ao escurecimento, sendo considerado por vários pesquisadores

como um dos principais problemas relacionados a cultura de tecidos de palmeiras. Este escurecimento é atribuído aos produtos da oxidação de compostos fenólicos os quais inibem o crescimento (CHOO, 1984). Para evitar esse escurecimento a adição de carvão ativado tem contornado os efeitos deletérios causados por substâncias tóxicas sobre os explantes. PARANJOTHY & OTHMAM (1982), verificaram em dendê que os embriões desenvolveram e formaram plântulas somente em meio de cultura que continham carvão ativado. O carvão ativado pode ser adicionado no meio de cultura a 0,3% aumentando-se a germinação e reduzindo o escurecimento do explante (TISSERAT,1987).

A transferência de plântulas para condições *ex-vitro* necessita de uma metodologia que devolva aos poucos as características autotróficas da planta. Para isso, as plântulas de macaúba foram transferidas para substratos e mantidas em condições de alta umidade por 3 a 4 semanas, conforme recomenda CHOO (1984) para palmeiras.

A sobrevivência das plântulas de palmeiras parece estar associada com a altura no momento da transferência para as condições "ex vitro". Plântulas menores que 8 cm apresentaram taxa de sobrevivência reduzida. O substrato frequentemente utilizado para palmeiras consiste de uma mistura de vermiculita e turfa na proporção de 1:1 (v/v), não autoclavados (TISSERAT,1987).

Plantas de macaúba ,com altura superior a 8 cm, foram transferidas para vasos contendo esse substrato e

permaneceram em ambiente com alta umidade por 4 semanas, em seguida as plantas foram transferidas para casa de vegetação com umidade ambiente, apresentando desenvolvimento normal conforme Figura 4.

4.2 Estudo fisiológico do crescimento e desenvolvimento.

A formulação do meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) que apresenta alta concentração de nitrogênio causou redução na massa de matéria fresca/seca quando comparado com o meio de cultura com concentrações de nitrogênio correspondente à 50 e 25% da formulação de MS 1/2 e com 50% de nitrato e sem amônio e 25% de nitrato e sem amônio.

Ausência de nitrato no meio de cultura afeta sensivelmente a germinação e o desenvolvimento, enquanto que ausência de amônio parece ter um efeito menos acentuado. Entretanto, a presença conjunta de nitrato e amônio com níveis reduzidos à 50 e 25% exerceu influência favorável na germinação e desenvolvimento, apresentando-se consistente no seu desenvolvimento como mostram as Figuras 5 e 6.



Fig. 4. Aspecto da planta após 4 semanas em condições *ex vitro*.

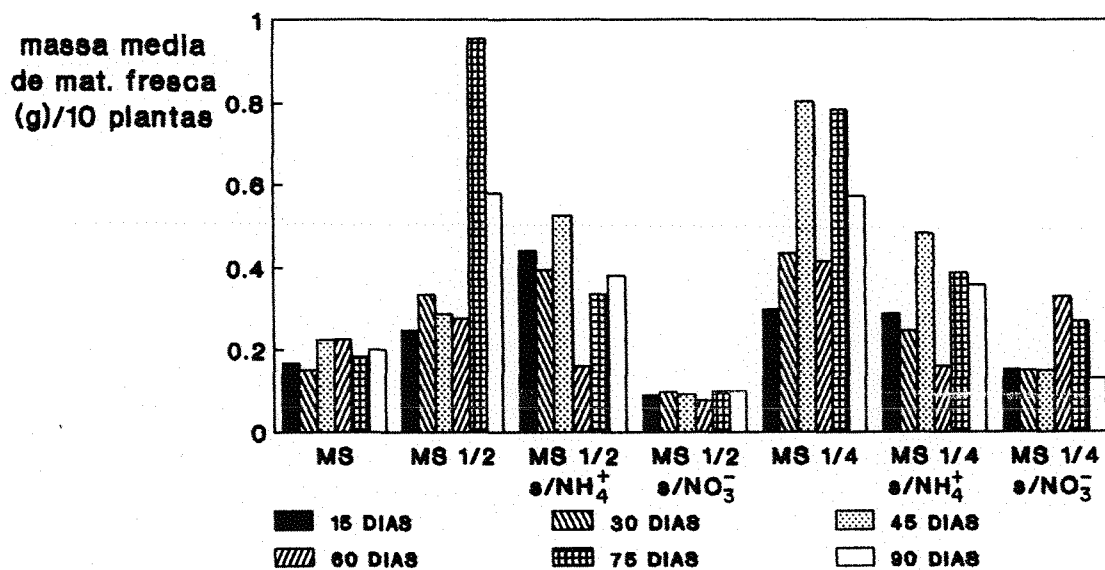


Fig. 5. Efeito de fontes e concentrações de nitrogênio sobre o crescimento e desenvolvimento de embriões zigóticos. Média da massa de matéria fresca de 10 plantas com acompanhamento a cada 15 dias.

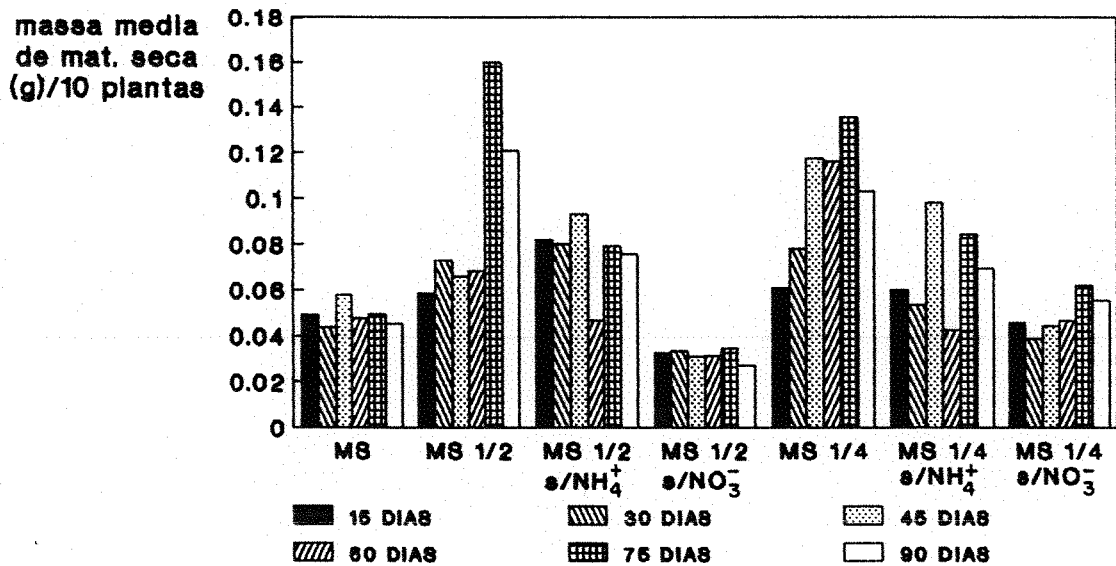


Fig. 6. Efeito de fontes e concentrações de nitrogênio sobre o crescimento e desenvolvimento de embriões zigóticos. Média da massa de matéria seca de 10 plantas com acompanhamento a cada 15 dias.

Um aspecto importante que deve ser salientado, é que todos os meios foram suplementados com caseína hidrolizada como fonte de nitrogênio reduzido.

A presença de nitrogênio reduzido no meio de crescimento é requerido para continuar o crescimento de embriões zigóticos em cultura. EEUWENS (1978), verificou um incremento significativo na massa de matéria fresca dos explantes de *C. nucifera* e *P. dactylifera* na presença deste composto.

Tecidos de plantas perenes têm frequentemente

encontrado melhor crescimento "in vitro" em meio contendo concentrações menores de um ou mais íons (GEORGE & SHERRINGTON, 1984).

Para algumas palmeiras a redução dos macronutrientes para a metade da concentração promoveu resultados favoráveis para germinação e desenvolvimento de plântulas, obtidos a partir de embriões zigóticos (NWANKWO & KRIKORIAN, 1986). Resultado semelhante foi observado para macaúba neste trabalho, onde a redução das fontes de nitrogênio promoveu maior desenvolvimento de plântulas.

4.3. Obtenção de calos.

4.3.1. Efeito da autoclavagem nos fitorreguladores.

Em experimento utilizando concentrações de 2,4-D inferiores a 45 mg/l, na maioria dos tratamentos ocorreu a germinação dos embriões tanto para embriões extraídos de frutos maduros como imaturos. As Figuras 7 e 8 mostram que aumentando-se a concentração de auxina diminui o desenvolvimento da radícula e do caulículo, apresentando regiões com formação de calos.

Nos tratamentos com concentrações maiores de auxina (43,2 mg/l) há uma tendência a formação de calos, os quais tornaram-se visíveis na região referente aos ápices (nó cotiledonar).

Nas diferentes interações dos fitorreguladores foi observado que as concentrações maiores de auxina promoveram a formação de calos, tanto para embriões de fruto maduro como imaturo (Figs. 7 e 8).

A concentração dos fitorreguladores no meio de cultura parece ser importante para indução de calos e possivelmente para a formação de embriões somáticos. Entretanto, resultados preliminares evidenciaram que não só o balanço dos fitorreguladores, mas também a composição do meio desempenharam papéis preponderantes. Neste sentido, as modificações feitas no meio que passou a conter a metade da concentração de nitrogênio da formulação de Murashige & Skoog e suplementada com uma fonte de nitrogênio reduzido, a caseína hidrolizada, apresentou resultados favoráveis no processo de obtenção de calos.

Os aminoácidos são uma das fontes mais efetivas de nitrogênio para plantas cultivadas *in vitro*. Não somente estimulam o crescimento mas também induzem a morfogênese e particularmente a embriogênese somática (GEORGE et alii, 1987).

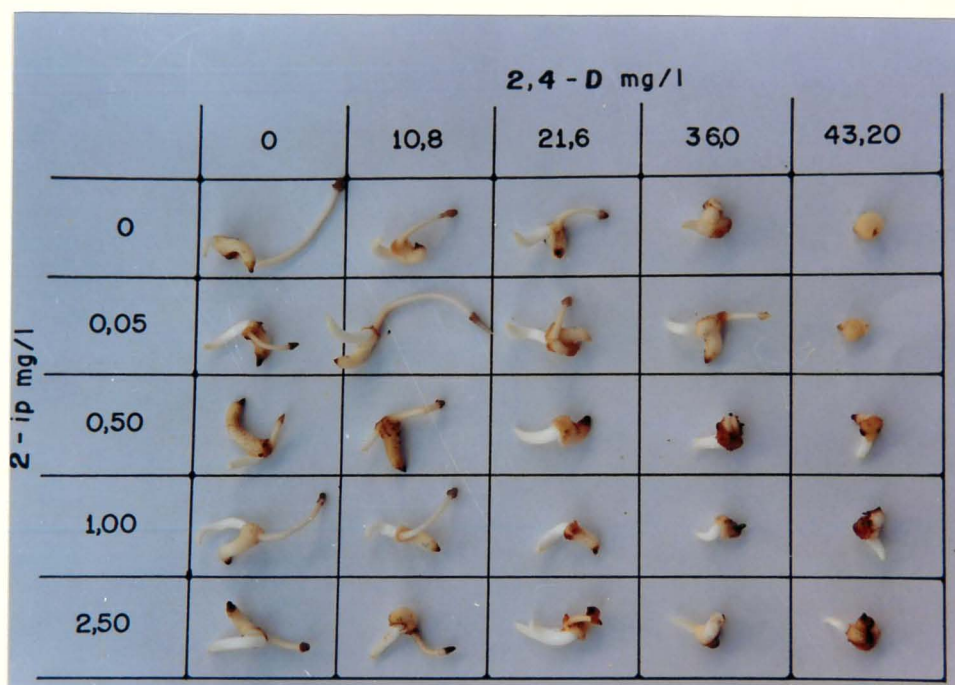


Fig. 7. Efeito do 2,4-D filtrado na indução de calos em embriões de frutos imaturos

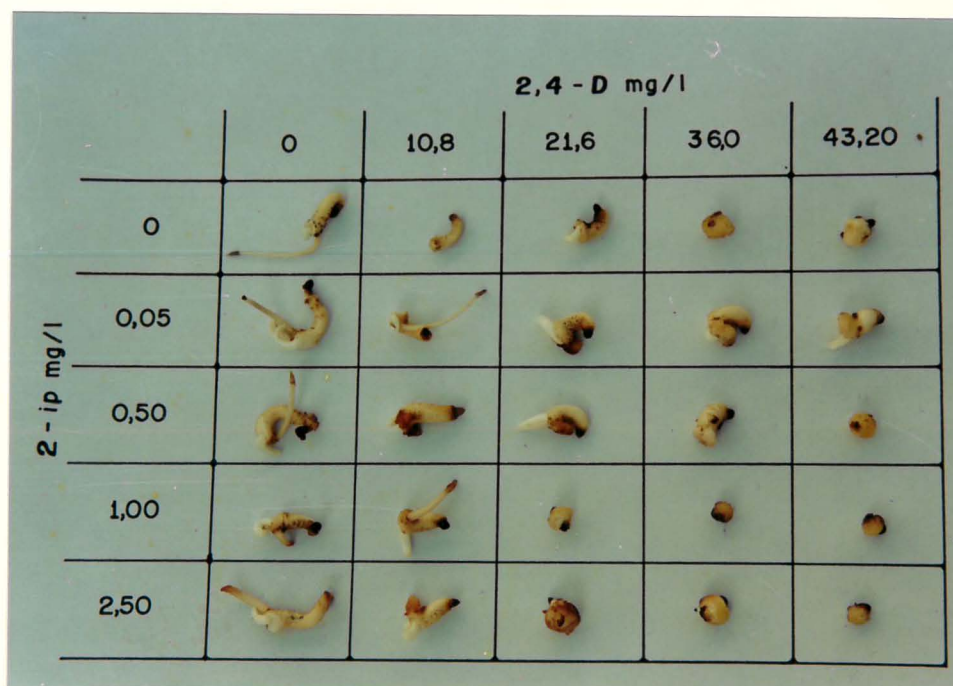


Fig. 8. Efeito do 2,4-D filtrado na indução de calos em embriões de frutos maduros

A pronta disponibilidade de uma fonte de nitrogênio parece ser importante para manter a célula em um estado indiferenciado (GEORGE & SHERRINGTON, 1984).

Praticamente todos os componentes em um meio de cultura podem afetar a morfogênese *in vitro*. Sua composição portanto, é crítica para a indução e expressão de um programa de embriogênese somática (GUERRA, 1989).

VELLEGAR et alii (1986), verificaram em alfafa que a composição qualitativa e quantitativa do nitrogênio, auxina e componentes osmóticos pode afetar a expressão *in vitro* do processo da embriogênese somática.

Embriões oriundos de frutos imaturos mostraram menor tendência a formação de calos quando comparados com frutos maduros (Figs. 7. e 8.), no entanto, a germinação e o crescimento mostraram-se favorecidos. Isto indica que os fatores que causam a dormência nas sementes de macaúba surgem com a maturação do fruto. Similarmente CUTTER & WILSON (1954), observaram que fatores inibitórios do crescimento de embriões de coco estavam presentes no fruto maduro, ocasionando a dormência do embrião.

GUERRA & HANDRO (1988), obtiveram germinação normal em embriões de palmito (*Euterpe edulis* Mart.) em concentrações de até 50 mg/l de 2,4-D, sendo necessárias concentrações superiores a essa para indução da embriogênese somática.

Tanto os calos oriundos de embriões de frutos maduros como imaturos não demonstraram características de

calos embriogénéticos. Sabe-se que monocotiledôneas apresentam difíceis respostas morfogenéticas, além disso, em palmeiras a formação de calos é um processo gradual e lento, sendo observado calos embriogénéticos após 4 a 6 meses (CID, 1987; TISSERAT, 1987).

Os tratamentos que apresentaram formação de calos, quando foram transferidos para a luz (fotoperíodo de 16/8 horas, claro / escuro) apresentaram aceleração no processo de escurecimento.

O escurecimento do explante é considerado um dos aspectos mais sérios relacionados com cultura de tecidos de palmeiras. O escurecimento tem sido atribuído a produção e oxidação de composto fenólicos que inibem o crescimento. A adição de carvão ativado tem sido empregada com sucesso para prevenir o escurecimento em palmeiras. Para alguns pesquisadores a utilização de citocinina e ágar parece promover o escurecimento (RABECHAULT & MARTIN, 1976; MARTIN & RABECHAULT, 1978).

Embriões de fruto maduro e imaturo apresentaram resultados conflitantes, principalmente com relação a citocinina, onde, para embriões de frutos imaturos não promoveu resultados favoráveis para indução de calos (Figs. 7 e 8).

Para embriões de frutos imaturos inoculados em meio contendo a maior concentração de 2,4-D (43,2 mg/l), ocorreu a formação de calos, que foi observado ser inversamente relacionado com a concentração de citocinina.

Enquanto que, para embriões de frutos maduros, aumentando-se a concentração de citocinina houve a formação de calos mesmo em concentrações menores de auxina (21,6 mg/l). Apesar dos embriões de frutos maduros apresentarem maior formação de calos (Figura 9.), nenhum desses calos progrediu e não houve qualquer evidência de serem calos embriogênicos.

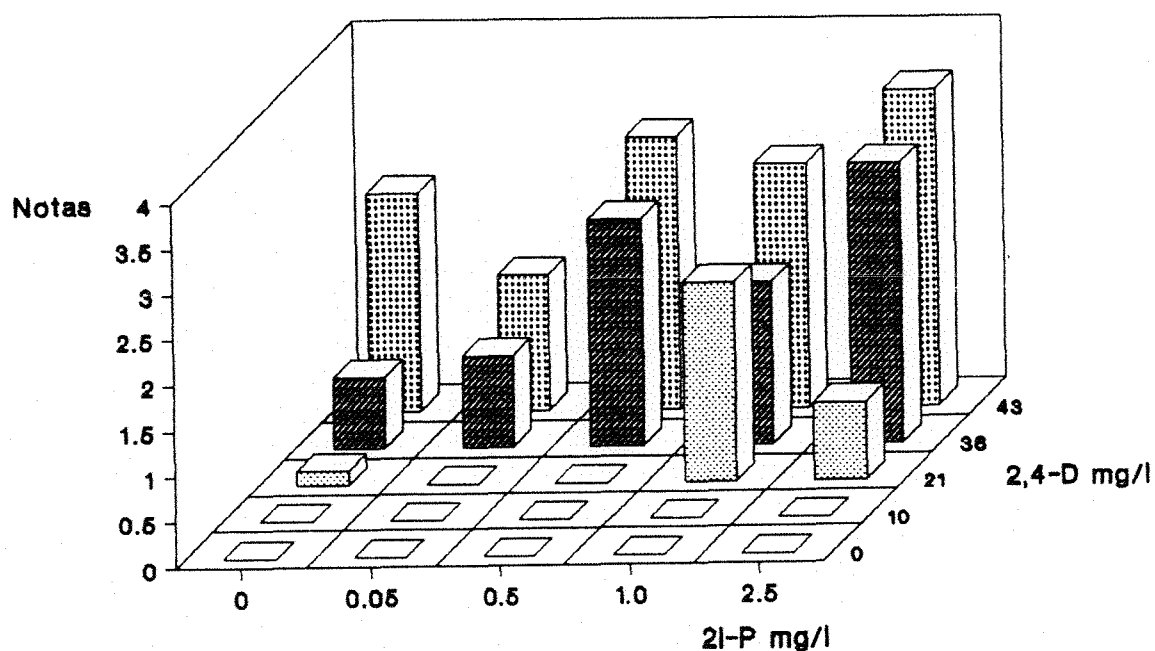


Fig. 9. Avaliação do efeito dos fitorreguladores 2,4-D e 2i-P na indução e desenvolvimento de calos em embriões de frutos maduros de macaúba (avaliação feita 35 dias após a inoculação)

Reforçando o fato de que altas concentrações de auxina são essenciais para indução de calos, as concentrações utilizadas para macaúba neste experimento não foram suficientes para suprimir a germinação de embriões

zigóticos e conseqüentemente induzir a embriogênese somática. Entretanto, as modificações feitas no meio básico foram favoráveis, sendo que mesmo com as concentrações inadequadas de auxina ainda ocorreu formação de calos.

Tanto embriões de frutos imaturos (REYNOLDS & MURASHIGE, 1979) como de maduros (TISSERAT, 1979) são utilizados como fontes de explantes para obtenção de calos. GUERRA & HANDRO (1988), utilizaram embriões maduros e imaturos como fonte de explante para indução da embriogênese somática. Para macaúba embriões de frutos maduros mostraram-se melhores como fonte de explantes para indução de calos do que embriões de frutos imaturos. Nas concentrações de 90 e 120 mg/l de 2,4-D em presença ou ausência de 2i-P a formação de calos iniciou-se após duas semanas da inoculação. A concentrações de 60 mg/l de 2,4-D combinado com todos os níveis de 2i-P causaram redução na germinação.

A citocinina 2i-P, pareceu ter pouco ou nenhum efeito na indução de calos, tanto para os tratamentos mantidos à luz como no escuro. A adição simultânea de citocininas parece promover bons resultados para algumas palmeiras, como no caso da tâmara, onde TISSERAT (1987), incluiu em seu protocolo a utilização de 2i-P. Por outro lado, a inclusão de citocinina é ainda considerada incerta (BRACKPOOL et alii, 1986). Para BLAKE (1983), a inclusão de citocinina é importante no desenvolvimento das subseqüentes fases de embriões somáticos e não na fase de indução de

calos.

As Figuras 10 e 11 mostram as médias das avaliações (notas), feitas no 35^o dia após a inoculação, comparando-se as diferenças no efeito da luz e do escuro na indução de calos, bem como da interação dos fitorreguladores. Os tratamentos que formaram calos são mostrados na Tabela 10. Nessa fase (após 35 dias da inoculação) os calos apresentaram baixa percentagem de oxidação. A comparação dos tratamentos mantidos à luz e no escuro não mostrou diferenças significativas. A concentração de 60 mg/l de 2,4-D sem e com 2i-P mantidos no escuro apresentaram uma baixa percentagem de embriões que formaram calos e para os mantidos à luz não houve formação de calos.

Os calos eram de coloração amarela e compactos e apresentaram lento crescimento. Esses explantes com calos, mantidos nas concentrações de 90 e 120 mg/l de 2,4-D, apresentaram formação da parte aérea na menor concentração (90 mg/l) e tendências a oxidação para a concentração maior (120 mg/l). Essas concentrações que em outras palmeiras são ideais para induzir o processo de embriogênese somática (REYNOLDS & MURASHIGE, 1979), para macaúba foi insuficiente para suprimir o processo de germinação e, quando isso não ocorreu, os calos oxidaram.

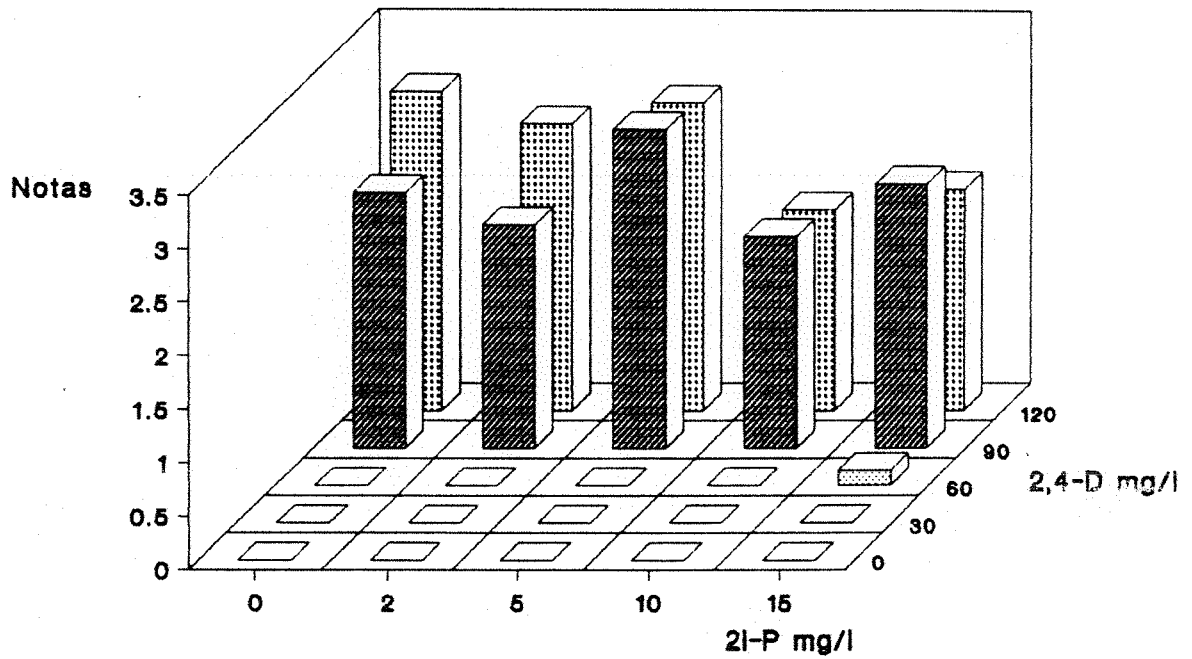


Fig. 10. Avaliação do efeito dos fitorreguladores 2,4-D e 2i-P na indução e desenvolvimento de calos em embriões maduros, mantidos à luz (avaliação feita 35 dias após inoculação)

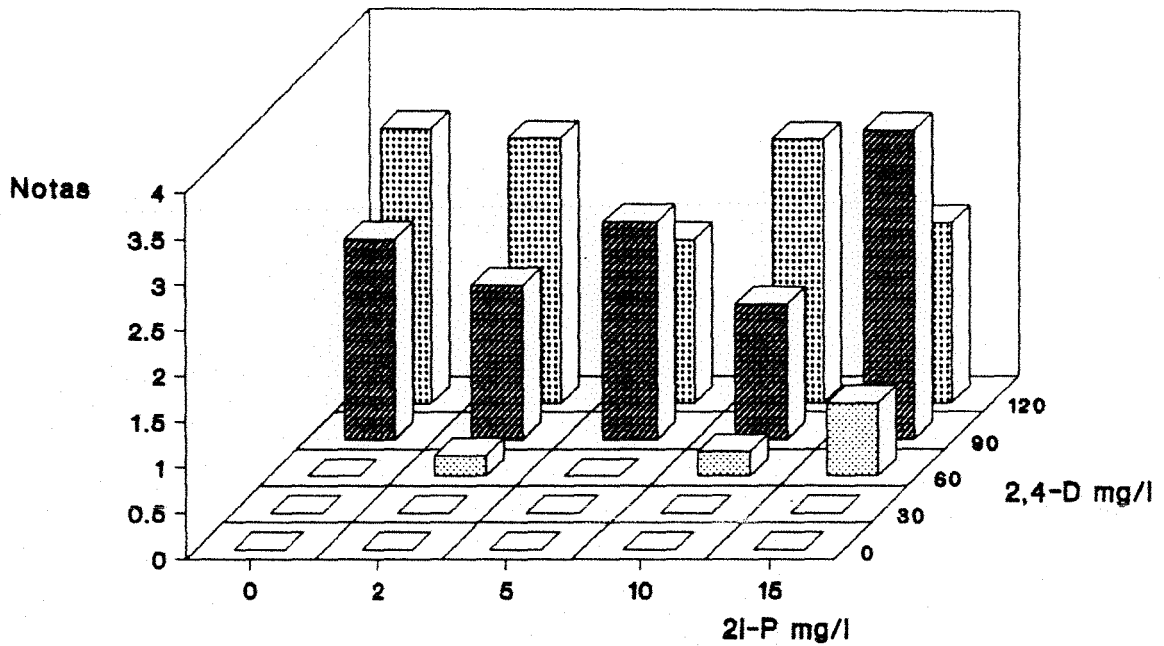


Fig. 11. Avaliação do efeito dos fitorreguladores 2,4-D e 2i-P na indução e desenvolvimento de calos em embriões maduros, mantidos no escuro (avaliação feita 35 dias após inoculação)

Tabela 10. Avaliação do efeito da auto clavagem na indução e desenvolvimento de calos e oxidação após 35 dias da inoculação.

| Trat. 2,4-D/ 2ip mg/l | N° total de frascos | | % Oxidação | | % embriões sem desenvolvimento | | N° de embriões que formaram calos | | % de embriões que formaram calos | |
|--------------------------------|------------------------|--------|------------|--------|-----------------------------------|--------|--------------------------------------|--------|-------------------------------------|--------|
| | Claro | Escuro | Claro | Escuro | Claro | Escuro | Claro | Escuro | Claro | Escuro |
| 60/0 | 6 | 10 | - | - | - | - | 0 | 4 | 0 | 40 |
| 90/0 | 9 | 12 | 22 | - | 11 | 8,7 | 6 | 8 | 67 | 67 |
| 120/0 | 12 | 15 | 16 | - | 8,3 | 13,3 | 9 | 13 | 75 | 87 |
| 90/2 | 8 | 12 | 12,5 | - | 25 | 25 | 5 | 9 | 63 | 75 |
| 120/2 | 13 | 20 | - | 5 | 15,4 | 10 | 11 | 17 | 85 | 85 |
| 90/5 | 15 | 19 | - | - | 13,3 | 21 | 13 | 15 | 86 | 79 |
| 120/5 | 16 | 19 | - | - | 6,3 | 42 | 15 | 11 | 94 | 58 |
| 60/10 | 9 | 12 | - | - | - | - | 0 | 3 | 0 | 25 |
| 90/10 | 12 | 19 | - | - | 8,3 | 21 | 11 | 15 | 92 | 79 |
| 120/10 | 12 | 18 | 8,3 | - | 25 | 16,7 | 8 | 15 | 67 | 83 |
| 60/15 | 12 | 15 | - | - | - | - | 0 | 6 | 0 | 40 |
| 90/15 | 9 | 19 | - | - | 22 | - | 7 | 19 | 78 | 100 |
| 120/15 | 9 | 19 | 11 | - | 22 | 31 | 6 | 13 | 67 | 68 |

Esses resultados são conflitantes ao encontrado por TEIXEIRA et alii (1986) que induziram calos em embriões de *Acrocomia* em meio contendo 450 μ m de 2,4-D e obtiveram embriões somáticos os quais não progrediram.

A autoclavagem dos fitorreguladores apresentou um efeito diferencial, quando comparados com baixas concentrações de fitorreguladores filtrados, verificando-se que a concentração de 43,5 mg/l de 2,4-D filtrado induziu a formação de calos, enquanto que em concentrações de até 60 mg/l de 2,4-D autoclavado ocorreu germinação.

Para os tratamentos com 100, 150, 200 e 300 mg/l de 2,4-D após duas semanas da inoculação apresentaram início de formação de calos, tanto para os fitorreguladores filtrados como autoclavados. Para os tratamentos com 400 mg/l de 2,4-D o início de formação de calos ocorreu alguns dias depois.

Nos tratamentos com 2,4-D filtrado ocorreu maior indução e desenvolvimento de calos na fase inicial comparado ao 2,4-D autoclavado, principalmente para os tratamentos filtrados mantidos no escuro (Tabelas 11 e 12). Após essa fase não houve diferenças significativas, ocorrendo lento desenvolvimento dos calos os quais eram de aspecto compacto com coloração amarela e tendência a oxidação com o passar do tempo.

O efeito da autoclavagem do 2,4-D nas concentrações utilizadas não foi significativo. A autoclavagem do 2,4-D apresentou um efeito visível, quando utilizado em concentrações menores (90 mg/l) (Figs. 10 e 11). Parece evidente que há degradação e/ou a adsorção mais rápida quando foram utilizadas concentrações menores desta auxina autoclavada. Quando a concentração é aumentada para níveis superiores a 100 mg/l, mesmo que ocorra degradação de parte dessa auxina pela autoclavagem e/ou adsorção pelo carvão ativado, a quantidade restante disponível é ainda suficiente para induzir calos. Outra evidência relevante é o efeito favorável da ausência de luz no crescimento de calos e na redução do escurecimento.

Tabela 11. Avaliação do efeito da auto clavagem do 2,4-D na indução e desenvolvimento de calos. Observações após 30 dias da inoculação, em meio com 2,4-D filtrado.

| Trat. 2,4-D mg/l | N° total de frascos | | % Oxidação | | % embriões sem desenvolvimento | | % germinação | | % de embriões que formaram calos | |
|------------------------|------------------------|--------|------------|--------|-----------------------------------|--------|--------------|--------|-------------------------------------|--------|
| | Claro | Escuro | Claro | Escuro | Claro | Escuro | Claro | Escuro | Claro | Escuro |
| 0 | 18 | 19 | 16,67 | - | 16,67 | 10,53 | 66,67 | 89,47 | - | - |
| 100 | 20 | 17 | 5 | 5,9 | 25 | 23,53 | - | - | 70 | 70,59 |
| 150 | 17 | 15 | - | 6,67 | 52,94 | 26,67 | - | - | 47,06 | 66,67 |
| 200 | 16 | 16 | - | 12,5 | 31,25 | 18,75 | - | - | 68,75 | 68,75 |
| 300 | 15 | 16 | - | 12,5 | 46,67 | 56,25 | - | - | 53,33 | 31,25 |
| 400 | 17 | 14 | - | 7,14 | 82,35 | 78,57 | - | - | 17,64 | 14,28 |

Tabela 12. Avaliação do efeito da auto clavagem do 2,4-D na indução e desenvolvimento de calos. Observações após 30 dias da inoculação, em meio com 2,4-D auto clavado.

| Trat. 2,4-D mg/l | N° total de frascos | | % Oxidação | | % embriões sem desenvolvimento | | % germinação | | % de embriões que formaram calos | |
|------------------------|------------------------|--------|------------|--------|-----------------------------------|--------|--------------|--------|-------------------------------------|--------|
| | Claro | Escuro | Claro | Escuro | Claro | Escuro | Claro | Escuro | Claro | Escuro |
| 0 | 18 | 19 | 16,67 | - | 16,67 | 10,53 | 66,67 | 89,47 | - | - |
| 100 | 15 | 14 | 13,33 | - | 26,67 | 14,28 | - | - | 60 | 85,71 |
| 150 | 16 | 18 | - | - | 31,25 | 11,11 | - | - | 68,75 | 88,89 |
| 200 | 16 | 15 | 12,5 | - | 43,75 | 13,33 | - | - | 43,75 | 86,67 |
| 300 | 16 | 14 | 18,75 | 21,43 | 43,75 | 35,71 | - | - | 37,5 | 42,86 |
| 400 | 20 | 19 | 45 | 26,31 | 30 | 31,58 | - | - | 25 | 42,11 |

As concentrações de 150, 200, e 300 mg/l de 2,4-D apresentaram calos com agregados protuberantes, tanto para o 2,4-D filtrado como autoclavado. Esses tipos de calos foram pouco frequentes e não progrediram.

SWANSON & TOMES (1980), apontaram a inativação do 2,4-D por esterificação e YAMAKAWA et alii (1979), verificaram que IAA e 2,4-D em meio MS com sacarose não eram decompostos pela autoclavagem. Mas, exposição à luz decompõem IAA. No entanto, poucos estudos têm sido feitos para analisar as mudanças no meio durante o preparo, armazenamento e incubação com explantes (HAGEN et alii, 1991).

4.3.2. Indução de calos por 2,4-D em embriões zigóticos inteiros e cortados.

Visando a obtenção de calos embriogênicos, examinou-se as diferentes regiões do embrião quanto ao potencial embriogênico, devido principalmente a região referente ao haustório (lâmina cotiledonar), a qual é um órgão de reserva podendo, portanto, formar calos não desejáveis.

O início de formação de calos ocorreu após 10 dias da inoculação, para ambos experimentos com 150, 200 e 300 mg/l de 2,4-D. Na concentração de 100 mg/l de 2,4-D iniciou-se o processo de germinação enquanto que para a concentração de 400 mg/l ocorreu escurecimento do explante,

tanto para os tratamentos mantidos à luz como no escuro. Tanto embriões pré-germinados inoculados inteiros como os cortados apresentaram o mesmo desenvolvimento (Tabelas 13 e 14)

Tabela 13. Avaliação da indução de calos por 2,4-D em região do pecíolo cotiledonar de embriões zigóticos. Observações após 30 dias de inoculação.

| Tratamento 2,4-D mg/l | No. de Repetições culturas viáveis | | Respostas Morfogenéticas | |
|--------------------------|---------------------------------------|--------|----------------------------|----------------------|
| | Claro | Escuro | Claro | Escuro |
| 0 | 14 | 8 | germinação | germinação |
| 100 | 10 | 12 | germinação | germinação |
| 150 | 12 | 6 | regiões com calos | calos |
| 200 | 8 | 14 | calos com escurecimento | calos |
| 300 | 6 | 7 | calos escurecidos | calos escurecidos |
| 400 | 5 | 6 | calos oxidados | calos oxidados |

Tabela 14. Avaliação da indução de calos por 2,4-D em embriões zigóticos inoculados inteiros. Observações após 30 dias da inoculação.

| Tratamento 2,4-D mg/l | No. de Repetições culturas viáveis | | Respostas morfo genéticas | |
|--------------------------|---------------------------------------|--------|---|----------------------|
| | Claro | Escuro | Claro | Escuro |
| 0 | 18 | 17 | germinação | germinação |
| 100 | 15 | 14 | germinação | germinação |
| 150 | 15 | 16 | alongamento com regiões com calos | calos |
| 200 | 18 | 19 | calos | calos |
| 300 | 15 | 14 | calos escurecidos | calos escurecidos |
| 400 | 15 | 13 | calos oxidados | calos oxidados |

Nas concentrações de 100, 150 e 300 mg/l de 2,4-D após 45 dias da inoculação foi observada a formação de calos com agregados protuberantes. Na concentração de 400 mg/l após oxidação dos calos na fase inicial do desenvolvimento, ocorreu formação de calos a partir do tecido oxidado. Os calos com protuberâncias cresceram lentamente e, em meios ausentes de fitorregulador, tenderam à oxidação.

A seleção dos tecidos utilizados como

explantes é importante para que sejam ampliados os conhecimentos sobre os dois aspectos mais críticos da morfogênese *in vitro* de palmeiras: a iniciação de calos e a indução da embriogênese somática (BLAKE, 1983).

Um dos fatores críticos para macaúba tem sido o desenvolvimento de calos e consequentemente a indução da embriogênese somática. A formação de calos nessa palmeira inicia-se na região referente aos ápices (nó cotiledonar), com ruptura dos tecidos.

NAWANKWO & KRIKORIAM (1986), verificaram no processo embriogenético que quando embriões zigóticos foram utilizados como explantes ocorreu o desenvolvimento da lâmina cotiledonar e do nó cotiledonar, mas a formação de calos embriogenéticos ocorreu somente a partir de tecidos do nó cotiledonar. Resultados similares foram verificados por GERRA (1989), onde a lâmina regredia nas condições de cultivo *in vitro*, enquanto que os tecidos do nó cotiledonar originavam embriões somáticos diretamente sobre os tecidos epidérmicos, constituindo-se em evidências de que determinados tecidos do embrião zigótico apresentavam potencial para seguirem um programa embriogenético.

Nem os calos formados de embriões inteiros e nem os de embriões cortados evidenciaram características embriogênicas significativas.

A pré-germinação diminuiu o potencial morfogênético, visto que em concentrações menores e igual de 2,4-D em embriões inoculados inteiros e sem prévia

germinação verificou-se o início do processo de formação de calos enquanto que com a pré-germinação em concentrações de até 200 mg/l de 2,4-D ocorreu o desenvolvimento da lâmina cotiledonar.

Para Ammar & Benbadis,¹ citado por GERRA (1989), após a germinação do embrião zigótico parece existir uma diminuição no potencial morfogênético. Isto reflete na menor capacidade dos explantes em produzir calos embriogênicos.

4.3.3. Efeito do tempo de exposição dos embriões ao 2,4-D na indução de calos.

Esse experimento avaliou o tempo de exposição do embrião ao 2,4-D necessário para indução de calos.

Após 10 dias da inoculação os embriões que permaneceram durante 5 dias em exposição ao 2,4-D (100 mg/l) e 2i-P (5 mg/l) apresentaram alongamento do embrião similar ao ocorrido no controle (sem fitorregulador). Nos embriões com 10 dias de exposição ocorreu entumescimento do embrião na região do pecíolo cotiledonar com aparente formação de

¹ AMMAR, S. & BENBADIS, A. Multiplication vegetative du palmier-dattier (*Phoenix dactylifera* L.) par la culture de tissus de jeunes issus de semis. C. r. hebb. Séan. Ac. Sci, Paris, 2484: 1789-1792, 1977.

calos. Para os tratamentos com o tempo de exposição de 15 e 20 dias e exposição direta, apresentaram início de formação de calos (Fig. 12.), mas não foi suficiente para suprimir o processo de germinação do embrião.

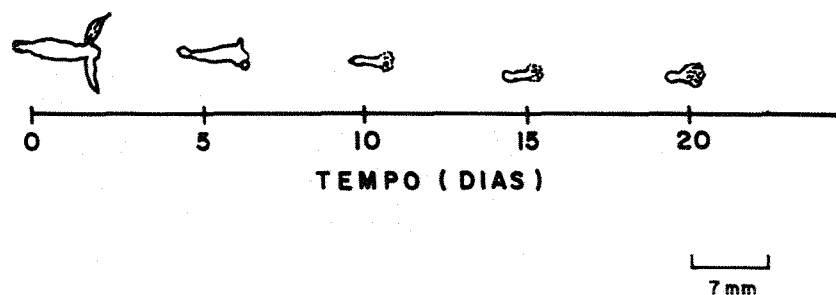


Fig. 12. Efeito do tempo de exposição dos embriões ao 2,4-D para indução de calos. Observações após 20 dias da inoculação

Para SHARP et alii (1980), a presença de fitorreguladores no meio de cultura tende a diminuir o potencial embriogênético, sendo que estas substâncias devem ser consideradas somente como agentes indutivos para a diferenciação.

Em macaúba após 72 dias (11 semanas) da inoculação os embriões que permaneceram por 10 e 15 dias em meio com 2,4-D, apresentaram desenvolvimento da parte aérea. Nos embriões que permaneceram por 20 dias, houve crescimento de calos, porém não persistiram, ocorrendo nessa fase o desenvolvimento da parte aérea. Portanto, para

macaúba, período de exposição de até 20 dias é insuficiente para suprimir o processo de germinação e induzir calos.

Os embriões mantidos em meio com fitorreguladores e sem transferências, apresentaram lento crescimento de calos os quais eram mais compactos. Houve alguns calos com formação de parte aérea, porém, menos frequentes quando comparado com as exposições menores.

4.3.4. Efeito de altas concentrações de 2,4-D na indução de calos.

O efeito de altas concentração do 2,4-D na indução de calos é mostrado nas Tabelas 15 e 16. A maior porcentagem de calos ocorreu nos tratamentos mantidos no escuro.

A formação de calos começou após duas semanas da inoculação. Os calos desenvolveram na região referente aos ápices com ruptura dos tecidos dessa região. A concentração de 100 mg/l de 2,4-D apresentou baixa porcentagem de indução de calos, onde então ocorreu germinação anormal com formação de parte aérea. Embora a concentração de 100 mg/l de 2,4-D seja comumente usada em

Tabela 15. Efeito de altas concentrações de 2,4-D na indução e desenvolvimento de calos, mantidos à luz. Observações feitas após 40 dias de inoculação.

| Tratamento 2,4-D mg/l | n° de repetição | % sem desenvol/ | % com oxidação | % de germ. | % de calos | Respostas morfogenéticas |
|--------------------------|--------------------|--------------------|-------------------|---------------|---------------|---|
| 0 | 35 | 5,7 | 4,3 | 90 | - | germinação |
| 100 | 29 | 3,4 | 27,6 | 65,5 | 3,4 | processo de germinação alongamento |
| 200 | 30 | 3,3 | 60 | - | 36,7 | calos com -0,5 cm e coloração amarela- escura |
| 300 | 28 | - | 53,6 | - | 46,4 | calos -0,5cm e coloração amarela-escura, ten- dência a oxidação |
| 400 | 30 | 40 | 40 | - | 20 | calos amarelos-escuros, tendência a oxidação |
| 600 | 30 | - | 100 | - | - | oxidação total dos calos em início de formação |

Tabela 16. Efeito de altas concentrações de 2,4-D na indução e desenvolvimento de calos, mantidos no escuro. Observações feitas após 40 dias de inoculação.

| Tratamento 2,4-D mg/l | n° de repetição | % sem desenvol/ | % com oxidação | % de germ. | % de calos | Respostas morfogenéticas |
|--------------------------|--------------------|--------------------|-------------------|---------------|---------------|--|
| 0 | 35 | 3,5 | 1,6 | 89,9 | - | germinação |
| 100 | 29 | - | 13,8 | 75,9 | 10,3 | processo de germinação fase de alongamento |
| 200 | 30 | 6,6 | 20 | - | 73,3 | calos amarelo-escuro |
| 300 | 29 | - | 17,2 | - | 82,7 | calos amarelo-escuro com tendência a oxidação |
| 400 | 29 | 82,7 | 17,2 | - | - | oxidação dos calos em fase inicial de formação |
| 600 | 33 | 42,4 | 57,6 | - | - | oxidação total dos calos em fase inicial de formação |

cultura de tecidos de palmeiras, para macaúba essa concentração foi insuficiente para suprimir o processo de germinação e indução de calos. Para diversos autores, entretanto, essa concentração é suficientemente adequada para induzir calos e promover embriogênese somática (REYNOLDS & MURASHIGE, 1979; NWANKWO & KRIKORIAN, 1986; GERRA & HANDRO, 1988).

As concentrações de 200 e 300 mg/l de 2,4-D estimulou a indução de calos. Esses calos apresentaram lento crescimento e eram em geral compactos e de coloração amarela com tendências a oxidação apresentando escassos casos de formação de calos com agregados protuberantes, os quais não progrediram. Quando foram utilizadas concentrações maiores de 2,4-D (400 e 600 mg/l) após o início de formação de calos ocorreu alta percentagem de oxidação.

AHÉE et alii (1981), PANNETIER et alii (1981), obtiveram calos de lento crescimento em dendê os quais, aos 100 dias da inoculação, foram transferidos para meio de cultura que diferiram quanto ao tipo e concentração de fitorregulador utilizado no meio primário, nos quais com sucessivas transferências ocorreu a formação de estruturas globulares. TISSERAT (1987), obteve produção de calos em tâmarameio com 2,4-D (100 mg/l) e 2i-P (3 mg/l). Esses calos apresentaram lento crescimento, formando calos nodulares que foram subcultivados em meio BM sem reguladores, originando embriões somáticos.

Para macaúba verificou-se que após 80 dias da

inoculação, quando foi feita a retirada do fitorregulador, no tratamento que continha 200 mg/l de 2,4-D ocorreram alguns casos de calos que apresentaram formação de caulículo. Esse resultado é similar ao verificado por NWANKWO & KRIKORIAN (1986), onde ocorreu a formação da parte aérea em calos, ocasionando regiões que persistiram como calos ou que formavam projeções semelhantes a raízes. Esses autores atribuíram esse fato a longa permanência do fitorregulador no meio de cultura. Por outro lado, verificou-se que períodos de exposição ao 2,4-D menores que essa (80 dias) foram insuficientes para suprimir os processos de germinação. Além do mais, estudos preliminares em macaúba mostraram que a redução do fitorregulador no meio levou a um acentuado processo de germinação irregular.

De acordo com resultados obtidos para macaúba, o uso do 2,4-D e/ou as condições de cultivo não favoreceram a proliferação de calos e conseqüentemente não induziram os processos embriogênicos. Acredita-se que outros fatores podem estar envolvidos no processo como época adequada de transferência, tipo e concentração de fitorreguladores ou a utilização de outras substâncias como agentes indutivos para a diferenciação.

Além do 2,4-D ser conhecido como uma potente auxina, ele também apresenta algumas características indesejáveis em cultura de calos, como a perda da capacidade de diferenciação em culturas prolongadas, aberrações cromossômicas, mutações e poliploidia (SUNDERLAND, 1977;

NOVAK, 1981).

Embora o uso do 2,4-D em outras palmeiras apresente bons resultados, para macaúba o seu uso não pareceu favorecer a indução de calos.

4.3.5. Efeito do ácido 4-amino-3,5,6,- tri-cloropicolínico (picloram) na indução de calos.

O picloram tem sido usado com sucesso em cultura de tecidos de várias plantas por não causar efeito adverso em calos ou na regeneração de plantas (COLLINS et alii, 1978; OMAR & NOVAK, 1990), além de induzir a embriogênese somática em palmeiras (VALVERDE et alii, 1987; OMAR & NOVAK, 1990). Portanto, o objetivo desse experimento foi de estudar e verificar o efeito do picloram na indução de calos e expressão morfogênética.

Os embriões zigóticos de frutos maduros foram cultivados *in vitro* em meio de cultura contendo diferentes concentrações de picloram. Após 10 dias da inoculação foi possível verificar o início de desenvolvimento de calos.

O desenvolvimento dos calos foram acompanhados no intervalo de 30 e 60 dias após inoculação, atribuindo-se notas de zero a três. Zero sendo atribuído às culturas sem desenvolvimento aparente de calos e três para calos com características embriogênicas.

A Figura 13 mostra as médias das avaliações

(notas) comparando-se as respostas morfogênicas. É possível verificar que o picloram estimulou a formação e o desenvolvimento de calos nas concentrações de 25 a 200 mg/l, sendo que no controle e na menor concentração (10 mg/l) ocorreu a germinação dos embriões.

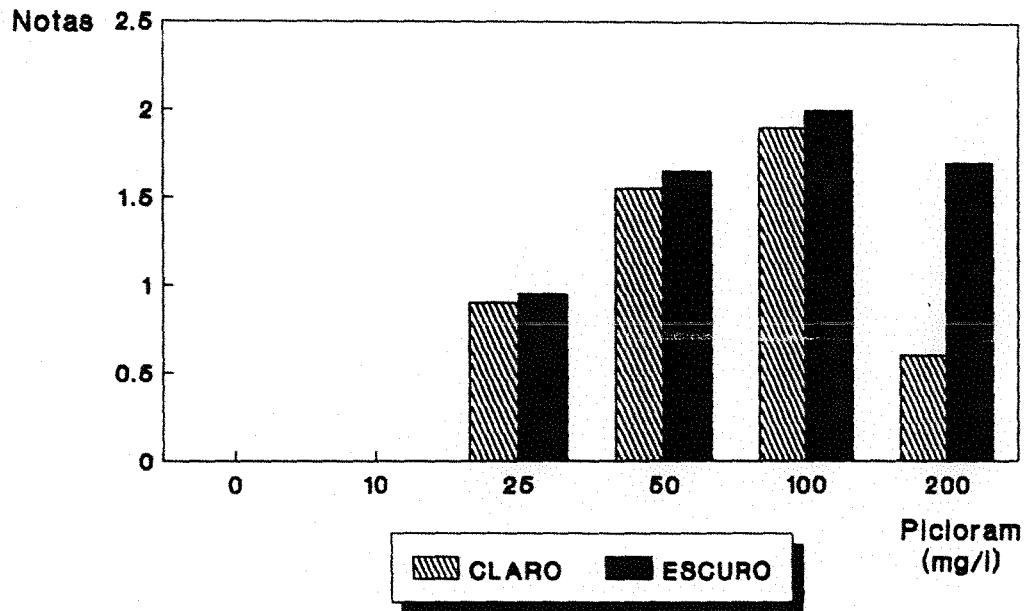


Fig. 13. Avaliação do efeito do picloram na indução e desenvolvimento de calos. Observações feitas 30 dias após inoculação

Para os tratamentos com 25 e 50 mg/l de picloram ocorreu o alongamento do embrião com formação de calos com aspecto globular. Nos tratamentos com 100 e 200 mg/l de picloram ocorreu a ruptura dos tecidos na região referente aos ápices (nó cotiledonar), e formação de calos globulares nessa região. Essas observações foram verificadas tanto para os tratamentos mantidos à luz como no escuro,

porém com maior desenvolvimento para os tratamentos mantidos no escuro.

Os calos apresentaram lento crescimento e desenvolvimento o que parece ser característica comum em palmeiras, como já verificado em diversos sistemas (AHÉE et alii, 1981; PANNETIER et alii, 1981; BHALLA-SARIN et alii, 1986).

A formação de calos com características embriogênicas apareceu em macaúba aos 50 dias da inoculação. Nos tratamentos com 25 e 50 mg/l de picloram foi observada a formação de calos globulares na região oposta aos ápices ocorrendo a formação de estrutura branca compacta referente a tecidos remanescentes do embrião (Fig. 14). Nas concentrações de 100 e 200 mg/l, ocorreu a formação de calos globulares sem que houvesse o alongamento do explante (Fig. 15).

A Figura 16 mostra a avaliação (notas) de calos com características embriogênicas, com formação de agregado de estruturas globulares. É possível verificar que o picloram estimulou a formação de agregados globulares, sendo as concentrações de 50 e 100 mg/l as que apresentaram melhor desenvolvimento. A concentração de 200 mg/l exerceu um efeito estimulador menos acentuado do que as concentrações de 25, 50 e 100 mg/l.



Fig. 14. Estruturas globulares formadas na região oposta aos ápices com alongamento do embrião. Tratamento com 25 mg/l de picloram. Observações após 80 dias da inoculação



Fig. 15. Formação de agregados globulares sem expansão do embrião. Tratamento com 100 mg/l de picloram. Após 80 dias da inoculação

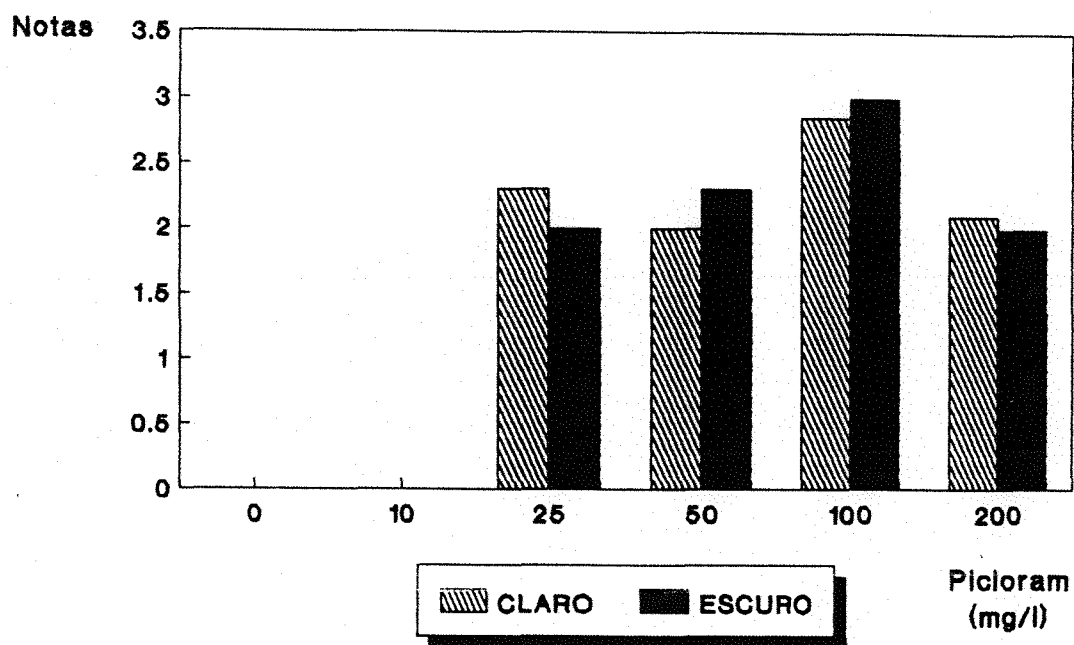


Fig. 16. Avaliação do efeito do picloram na indução e desenvolvimento de calos com características embriogênicas. Observações feitas após 60 dias da inoculação

Após 50 dias da inoculação quando as estruturas globulares estavam bem evidentes, o picloram foi removido do meio e para melhor desenvolvimento foi utilizado meio com dupla camada, sendo a inferior sólida e com carvão ativado e a superior líquida e sem carvão. A transferência do explante contendo essas estruturas facilitou a visualização de agregados globulares (Fig. 17) e e mais alongadas (Fig.

18) e também a separação dessas estruturas. Resultado semelhante foi obtido por VALVERDE et alii (1987), onde calos secundários são distinguidos de calos primários por apresentarem uma coloração amarela clara e estruturas globulares embriogênicas, as quais são facilmente separadas dos calos.

Para ZIV & GADASI (1986) a utilização da dupla camada de meio permitiu o crescimento normal de embriões de *Cucumis sativus* L.. No entanto, para macaúba a utilização desse meio reduziu o nível de oxidação, mas, ainda assim, ocorreu oxidação do explante.

A formação de agregado de estruturas globulares foi verificada após 50 a 100 dias da inoculação. Vários estágios morfogênicos foram observados, podendo ser justificados provavelmente pela heterogeneidade do explante utilizado. Por outro lado, o desenvolvimento de embriões somáticos ocorre frequentemente em palmeiras de forma assincronizada, isto é, verificam-se todos os estágios da embriogênese sobre o mesmo explante (GUERRA, 1989).

Morfologicamente as estruturas globulares e alongadas apresentaram características típicas de estruturas embriogênicas, pois segundo WILLIAM & MAHESWARAM (1986) as células embriogênicas apresentam uma série de aspectos comuns que são características de células meristemáticas as quais foram claramente presentes nas estruturas acima. A maior parte dessas características foram observadas nos cortes histológicos dos tecidos com características

embriogênicas em macaúba (item 4.3.7.).



Fig. 17. Agregados de estruturas globulares formadas sem expansão do embrião



Fig. 18. Agregados de estruturas mais alongadas formadas sem expansão do embrião

Embora as estruturas globulares e alongadas quando isoladas não desenvolveram ou apresentaram escassos casos de emissão de apêndice similar a raízes nas estruturas alongadas, o uso do picloram mostrou-se efetivo para induzir calos embriogênicos apresentando grande potencial para obtenção de embriões somáticos em macaúba, desde que ocorra a otimização adequada da condição e manutenção de cultivo.

4.3.6. Efeito da concentração de cálcio no meio de cultura contendo picloram na indução de calos e embriogênese.

O aumento da concentração de cálcio no meio de cultura tem resultado no aumento da expressão do potencial embriogênico (ZIV & GADASI, 1986; JANSEN et alii, 1990). O cálcio pode mediar algumas respostas fisiológicas direcionadas por citocinina (ALLAN & HEPLER, 1989) e auxinas (ALLAN & HEPLER, 1989; GUERRA, 1989). O objetivo desse experimento foi o de verificar o papel do cálcio na regulação do processo da embriogênese somática. Para tanto, foi estabelecido um experimento utilizando meio de cultura contendo diferentes combinações de cálcio e picloram.

O início de formação de calos ocorreu após 10 dias da inoculação. Notáveis modificações foram verificadas a partir dessa fase.

O efeito do cálcio foi verificado após 40 dias da inoculação e estão representados na Tabela 17. É possível verificar que concentrações menores de cálcio junto com as diferentes concentrações de picloram, estimularam a formação de calos, sendo que as concentrações de $0,75 \cdot 10^{-3}$ e $1,5 \cdot 10^{-3}$ M de cálcio apresentaram as maiores incidências de calos. A concentração de $0,75 \cdot 10^{-3}$ M de cálcio foi utilizada no experimento com picloram (item 4.3.5.) apresentando resultados similares. As evidências de que as concentrações

Tabela 17. Avaliação do efeito do picloram e cálcio na indução e desenvolvimento de calos. Observações feitas 40 dias após inoculação.

| Tratamento | | Repetições | % sem desenvolvimento | % com tendência do escurecimento | % com oxidação | % de germinação | % de calos |
|---------------|-----------------------|------------|-----------------------|----------------------------------|----------------|-----------------|------------|
| Picloram mg/l | Cálcio M | | | | | | |
| 0 | $0,75 \times 10^{-3}$ | 35 | 2,8 | 28,6 | - | 68,6 | - |
| 10 | $0,75 \times 10^{-3}$ | 31 | 3,2 | 32,2 | 16,1 | - | 48,4 |
| 25 | $0,75 \times 10^{-3}$ | 38 | 5,3 | 31,6 | - | - | 63,1 |
| 50 | $0,75 \times 10^{-3}$ | 39 | - | 17,9 | - | - | 82,0 |
| 100 | $0,75 \times 10^{-3}$ | 40 | - | 2,5 | - | - | 97,5 |
| 200 | $0,75 \times 10^{-3}$ | 35 | 11,4 | - | - | - | 88,6 |
| 0 | $1,5 \times 10^{-3}$ | 39 | 12,8 | 87,2 | - | - | - |
| 10 | $1,5 \times 10^{-3}$ | 37 | 29,7 | 10,8 | - | 8,1 | 51,3 |
| 25 | $1,5 \times 10^{-3}$ | 34 | 11,8 | 17,6 | - | - | 70,6 |
| 50 | $1,5 \times 10^{-3}$ | 37 | 5,4 | 8,1 | - | - | 86,5 |
| 100 | $1,5 \times 10^{-3}$ | 37 | 32,4 | 8,1 | - | - | 62,1 |
| 200 | $1,5 \times 10^{-3}$ | 40 | 57,5 | - | - | - | 42,5 |
| 0 | 3×10^{-3} | 39 | 38,5 | 61,5 | - | - | - |
| 10 | 3×10^{-3} | 28 | 64,3 | 35,7 | - | - | - |
| 25 | 3×10^{-3} | 36 | 27,8 | 33,3 | - | - | 38,9 |
| 50 | 3×10^{-3} | 38 | 39,5 | 10,5 | - | - | 50,0 |
| 100 | 3×10^{-3} | 40 | 12,5 | 7,5 | - | - | 80,0 |
| 200 | 3×10^{-3} | 38 | 36,8 | 2,6 | - | - | 60,5 |
| 0 | 6×10^{-3} | 38 | 26,3 | 52,6 | 21 | - | - |
| 10 | 6×10^{-3} | 35 | 28,6 | 25,7 | 8,6 | 11,4 | 25,7 |
| 25 | 6×10^{-3} | 35 | 17,1 | 28,6 | 11,4 | - | 42,8 |
| 50 | 6×10^{-3} | 37 | 35,1 | 29,7 | - | - | 35,1 |
| 100 | 6×10^{-3} | 37 | 59,4 | - | 2,7 | - | 37,8 |
| 200 | 6×10^{-3} | 36 | 57,5 | 8,3 | - | - | 27,8 |

menores de cálcio foram mais efetivas para estimular a formação de calos, está relacionada com o decréscimo linear da porcentagem de calos na medida em que aumentou a concentração de cálcio, Esse decréscimo teve significância estatística para concentrações de 50, 100 e 200 mg/l de picloram (Tabela 18.). Já para as concentrações de 10 e 25 mg/l de picloram estimou-se um coeficiente linear negativo, porém não significativo estatisticamente.

Tabela 18. Regressão polinomial para níveis de cálcio dentro dos níveis de picloram (Regressão linear).

| Concentração de Picloram (mg/l) | Equações | | Significância |
|---------------------------------|------------------|------------------|---------------|
| 10 | — | | NS |
| 25 | — | | NS |
| 50 | 91,4696 - 9,9803 | Ca ⁺⁺ | * |
| 100 | 94,9348 - 9,0968 | Ca ⁺⁺ | * |
| 200 | 78,9478 - 8,5681 | Ca ⁺⁺ | * |

NS - não significativo ao nível de 95% de confiança pelo teste F de Snedecor.

* - significativo ao nível de 95% de confiança pelo teste F de Snedecor.

Em algumas espécies de plantas o aumento de CaCl₂ no meio resultou no aumento do potencial embriogênético (ZIV & GADASI, 1986; JANSEN et alii, 1990). Esses resultados são contrários ao constatado no presente experimento. Quando o aumento de cálcio foi igual a

concentração do meio de MS e superior a esta o seu efeito foi menos estimulador, apresentando melhor desenvolvimento nas concentrações menores ($0,7 \cdot 10^{-3}$ e $1,5 \cdot 10^{-3} M$). Por outro lado, em palmeiras como o coco (*C. nucifera*), o aumento de cálcio, potássio e fósforo, estimulou o crescimento de calos. No entanto, o cálcio teve um efeito menos acentuado (EEUWENS, 1976).

São escassos os relatos sobre o efeito de cálcio na embriogênese somática, mas íons como cálcio podem mediar muitas das respostas direcionadas pelos reguladores de crescimento em plantas (GUERRA, 1989).

JANSEN et alii (1990), relataram que o aumento de cálcio no meio pode neutralizar o efeito inibitório do 2,4-D na embriogênese somática. No entanto, certos problemas associados com uso do 2,4-D em cultura de tecido não foram observados quando picloram foi utilizado (COLLINS et alii, 1978).

As concentrações menores de cálcio, quando combinadas com as diferentes concentrações de picloram foram mais efetivas no desenvolvimento de calos. Esses calos globulares cresceram e desenvolveram lentamente, acompanhados por vários tipos morfogênicos de acordo com os tratamentos. Estatisticamente observou-se um comportamento quadrático da porcentagem de calos na medida em que aumentou a concentração de picloram. A única regressão quadrática não significativa foi encontrada para o nível de $6 \cdot 10^{-3} M$ de cálcio (Tabela 19.).

Estatisticamente foi possível verificar que para as concentrações de cálcio em que houve diferenças significativas, a máxima produção de calos entre as concentrações de picloram ocorreu entre 90 à 140 mg/l de picloram. Segundo as equações de regressão a combinação ideal para produção de calos seria $0,75 \cdot 10^{-3}M$ de cálcio e 130 mg/l de picloram. No entanto, nas dosagens experimentadas a melhor combinação foi $0,75 \cdot 10^{-3}M$ de cálcio e 100 mg/l de picloram.

Tabela 19. Regressão polinomial para os níveis de picloram dentro dos níveis de cálcio (Regressão quadrática).

| Concentração de cálcio (M) | Equação | Significância |
|----------------------------|--|---------------|
| $0,75 \cdot 10^{-3}$ | $20,5796 + 1,4171 \text{ Picl.} - 0,005438(\text{Picl})^2$ | ** |
| $1,5 \cdot 10^{-3}$ | $28,7287 + 1,0776 \text{ Picl.} - 0,005152(\text{Picl})^2$ | ** |
| $3 \cdot 10^{-3}$ | $-2,6545 + 1,3599 \text{ Picl.} - 0,005226(\text{Picl})^2$ | ** |
| $6 \cdot 10^{-3}$ | — | NS |

NS - não significativo ao nível de 95% de confiança pelo teste F de Snedecor.

** - significativo ao nível de 99% de confiança pelo teste F de Snedecor.

Com base nos resultados obtidos e na análise estatística do experimento envolvendo cálcio e picloram foi elaborada análises de regressão polinomial, que possibilita

predizer os parâmetros referentes as concentrações de cálcio e picloram que permitem a maximização dos resultados.

Na Figura 19 pode-se verificar que, após 70 dias da inoculação, os calos se apresentavam em geral com agregado de estruturas globulares. As concentrações maiores de cálcio (10^{-9} e 2.10^{-9} M) mostraram uma maior tendência a oxidação do que as concentrações menores.

Nessa fase, os agregados de estruturas globulares (Fig. 20) apresentaram características típicas de estruturas embriogênicas, as quais foram confirmadas através de cortes histológicos (item 4.3.7.).

























| PICLORAM (mg/l) | CONCENTRAÇÕES DE Ca^{++} | | | |
|--------------------|---|---|---|---|
| | $(0,75 \times 10^{-3} \text{ M})$ | $(1,5 \times 10^{-3} \text{ M})$ | $(3 \times 10^{-3} \text{ M})$ | $(6 \times 10^{-3} \text{ M})$ |
| 0 |  |  |  |  |
| 10 |  |  |  |  |
| 25 |  |  |  |  |
| 50 |  |  |  |  |
| 100 |  |  |  |  |
| 200 |  |  |  |  |

Fig. 19. Efeitos do cálcio e picloram na indução e desenvolvimento de calos com características embriogênicas. Observações após 70 dias da inoculação



Fig. 20. Agregado de estruturas globulares com região central com estruturas globulares translúcidas. Observações após 70 dias.

As estruturas globulares e alongadas isoladas ou em agregados foram transferidas para meio contendo baixas concentrações de auxinas e citocininas ou auxina e ácido giberélico; essas estruturas não progrediram, ocorrendo oxidação. O mesmo foi observado para os agregados de estruturas globulares e alongadas que permaneceram em meio sem fitorreguladores, ocorrendo escassos casos de estruturas alongadas que desenvolveram somente raiz. Similarmente, RABECHULT et alii (1970) relataram a formação de "embrióides" sem observar a diferenciação de folhas e TEIXEIRA et alii (1986), obtiveram a formação de embriões somáticos em *Acrocomia* sem que ocorresse o seu desenvolvimento.

4.3.7. Histologia

Observações histológicas foram realizadas visando a análise das estruturas globulares (Fig. 14) e alongadas (Fig. 18), (isoladas, e numa fase posterior de desenvolvimento) a fim de compará-las com estruturas embriogênicas verificadas em outras palmeiras.

As observações visuais discutidas no item 4.3.5., demonstraram que o primeiro evento morfogênético foi a formação de calos na região entre o nó e a lâmina cotiledonar resultando na formação de estruturas globulares (Fig. 14) com respectivo corte transversal na Fig. 21. Observações a nível histológico revelaram que as estruturas

são constituídas por agregados de nódulos meristemáticos (Fig. 21a) delimitados por células maiores de aspecto parenquimático (Fig. 21b e 21e), algumas das quais apresentam conteúdo diferente que reage com safranina (Fig. 21d). Na região superior do nódulo voltada para superfície exterior, algumas células degeneram e exfoliam (Fig. 21c e 21d). Os nódulos (Fig. 21b) não são delimitados por uma protoderme, mas são constituídos por células curtas, largas e com alta relação núcleo/citoplasma (Fig. 21e) que contrastam com as células mais alongadas e estreitas similares às células procambiais, que estão presentes no interior dos nódulos (Fig. 21b e 21f).

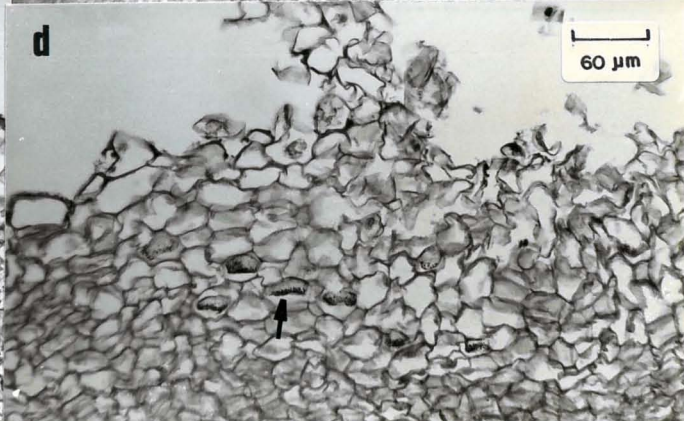
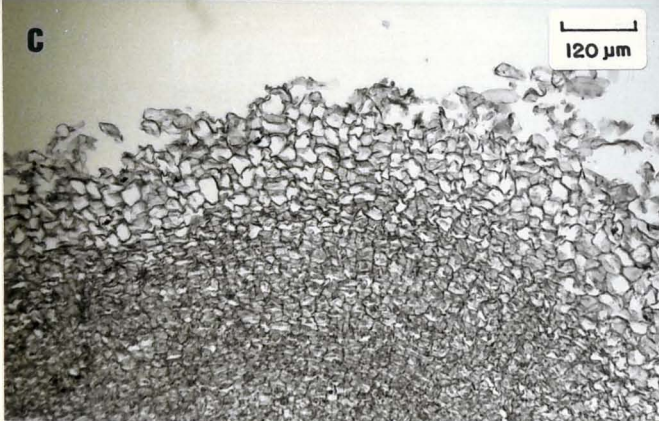
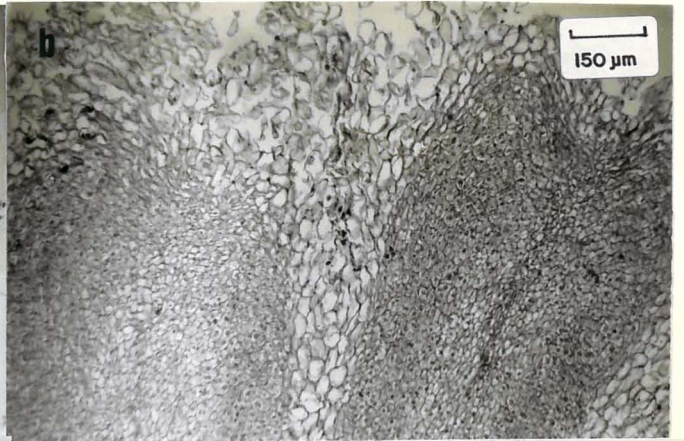
Segundo WILLIAN & MAHESWARAM (1986) as células tipicamente embriogênicas apresentam uma série de características comuns às células meristemáticas descritas para os nódulos de macaúba. Além disso, esses nódulos apresentam similaridades com a descrição de nódulos pró-embriogênicos feita por GUERRA (1989) em *E. edulis*, exceto pela presença das células procambiais no interior dos nódulos de macaúba. Os nódulos meristemáticos se morfogeneticamente competentes ou não apresentam-se como estruturas típicas observadas em palmeiras (TISSERAT & DEMASON, 1980; NWANKWO & KRIKORIAN, 1986; GUERRA, 1989).

Na sequência do processo morfogenético as estruturas globulares referidas na Fig. 14, quando cultivadas com dupla camada de meio em ausência de picloram, evoluíram para formas mais alongadas (Fig. 18). A Fig. 22a.

mostra um corte longitudinal de uma destas estruturas (isoladas e numa fase posterior de desenvolvimento). Observa-se que o nódulo descrito anteriormente, deixa de ser meristemático e passa a ser constituído predominantemente por células de aspecto parenquimático, entre as quais ocorrem idioblastos cujo conteúdo reage com safranina. Nesta fase, as células procambiais já diferenciaram em tecidos vasculares. A presença de elementos traqueais podem ser observados na Fig. 22b.

Fig. 21. Cortes transversais mostrando um agregado de nódulos meristemáticos observados em estruturas globulares após 106 dias da inoculação formadas em meio de cultura contendo 25 mg/l de picloram:

- a) Aspecto geral do agregado de nódulos meristemáticos. Seta mostrando um nódulo.
- b) Detalhe da região de união entre os nódulos mostrando as células de aspecto parenquimático.
- c) Detalhe da região superior e externa do nódulo mostrando algumas células se soltando.
- d) Detalhe da foto anterior. A seta indica a presença de idioblastos.
- e) Detalhe da região entre dois nódulos constituída de células de aspecto parenquimático com baixa relação núcleo-citoplasma em contraste com células dos nódulos tipicamente meristemáticas com alta relação núcleo-citoplasma.
- f) Detalhe da região interna do nódulo mostrando células procambiais (seta).



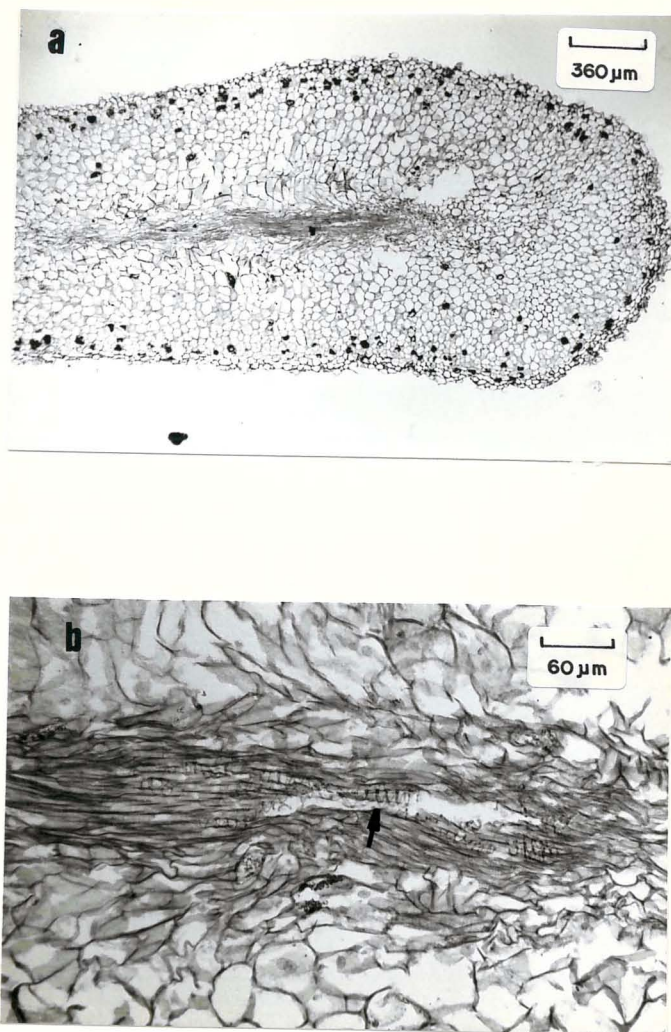


Fig. 22. Cortes longitudinais de uma estrutura alongada.

Aspecto geral mostrando a organização das células:

a) Aspecto geral.

b) Detalhe da região de vascularização. Nota-se a presença de elementos traqueais (seta).

Com o desenvolvimento, observou-se que algumas estruturas alongadas apresentavam emissão de apêndices morfológicamente similares a raízes. Um destes apêndices é mostrado em cortes transversais na Fig. 23. Na região (fig. 23a) que corresponde ao ponto de união do tecido do nódulo alongado com o apêndice observa-se um conjunto de células contendo substâncias que reagem com safranina indicando tratar-se de compostos fenólicos. Nas regiões (Fig. 23b e 23c) que passam pelo apêndice, observa-se uma organização histológica semelhante a estrutura anatômica de raiz com parênquima cortical amplo e cilindro vascular delimitado por células com espessamentos parietais e composto por elementos traqueais do xilema alternados com células floemáticas. Apêndices similares, foram observados por NWANKWO & KRIKORIAN (1986) em *E. guineensis* e foram referidos como estruturas neomórficas.

Um outro padrão morfogenético discutido no item 4.3.6., foi verificado durante a formação de calos na região do pecíolo cotiledonar em meio de cultura contendo 50 mg/l de picloram. Esses calos evoluíram para agregados de estruturas globulares (Fig. 20), e estão representados em corte transversal na Fig. 24. Estes nódulos também meristemáticos diferem daqueles já discutidos por serem mais individualizados (Fig. 24a), por apresentarem um gradiente distinto de tamanhos de células que são maiores e de aspecto

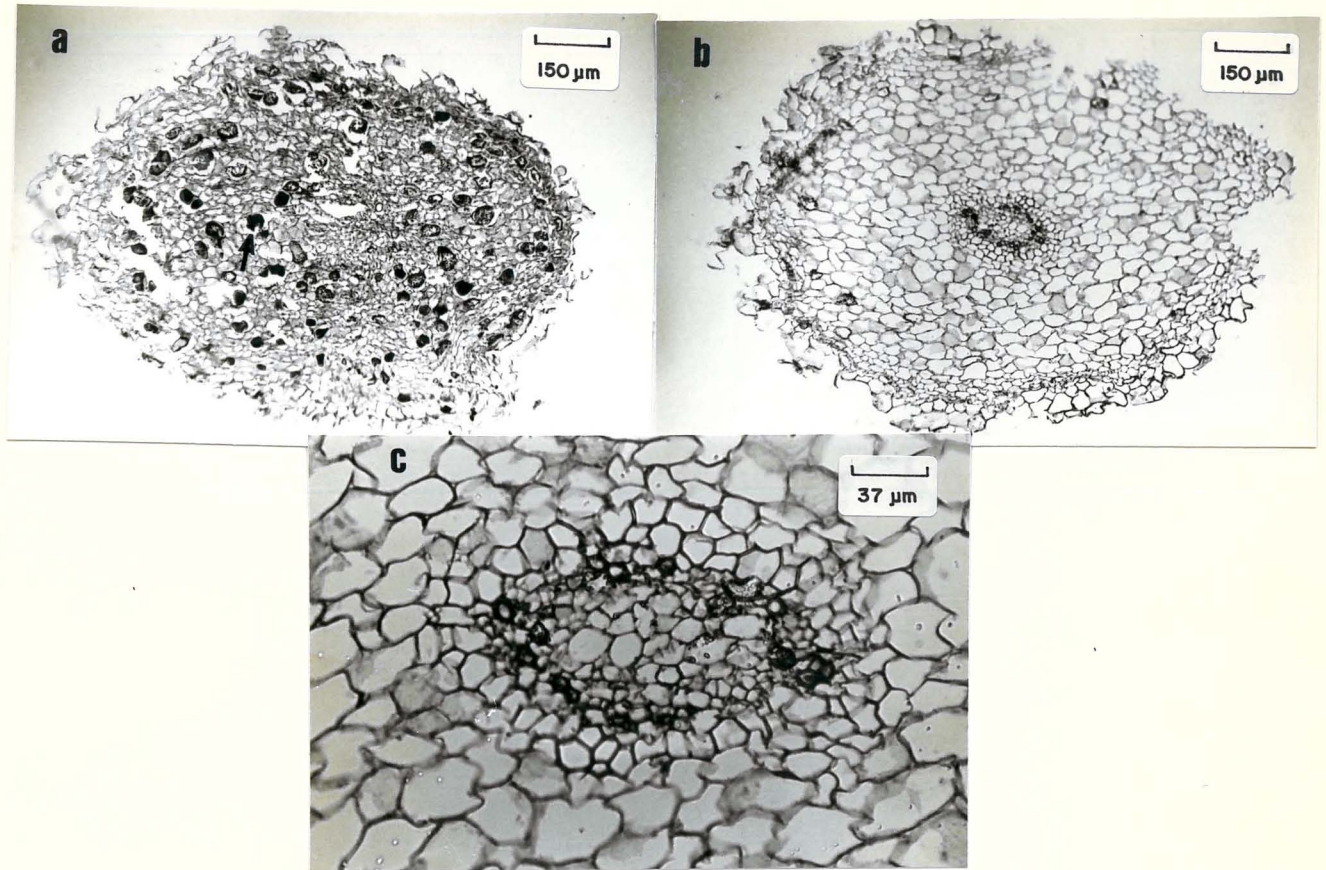


Fig. 23. Cortes transversais de um apêndice morfológicamente similar à raiz, produzido por uma estrutura alongada:

- a) Região de contato entre o apêndice e a estrutura alongada. A seta indica um ediblasto.**
- b) Visão geral do apêndice radicular mostrando a organização semelhante a estrutura anatômica de uma raiz.**
- c) Detalhe do cilindro central.**

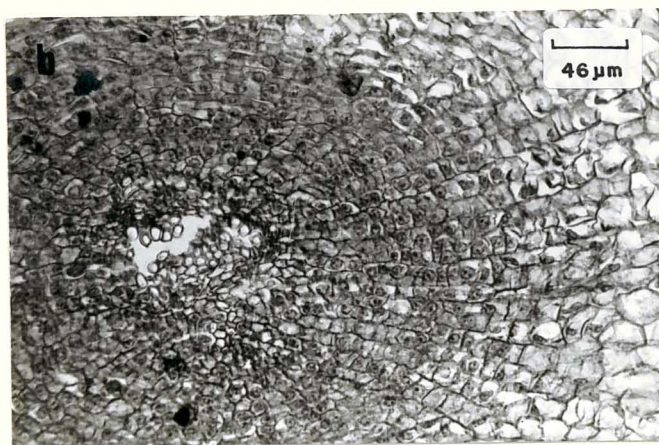
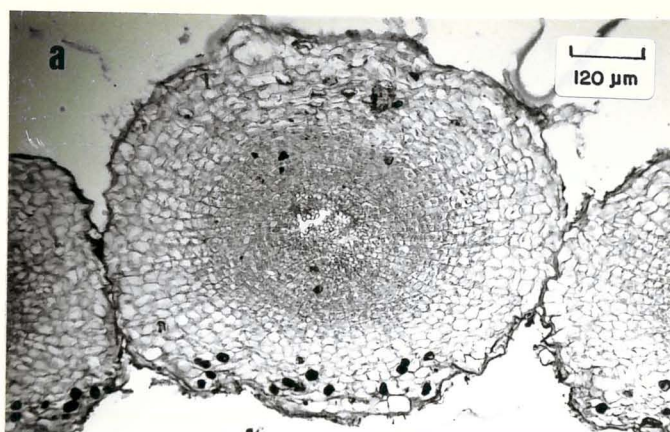


Fig. 24. Cortes transversais do agregado de nódulos meristemáticos observados em estruturas globulares após 70 dias da inoculação em meio contendo 50 mg/l de picloram:

- a) Visão geral do nódulo meristemático mostrando o gradiente de tamanho das células.
- b) Detalhe do nódulo meristemático mostrando a presença de elementos traqueais do xilema,

parenquimático na região externa e menores com alta relação núcleo/citoplasma na região interna dos nódulos, além da presença de elementos traqueais já diferenciados na região central dos nódulos (Fig. 24b).

Essas características se assemelham àquelas encontradas por GUERRA (1989) na sequência de eventos que levou à embriogênese somática em explantes foliares de *E. edulis*. A descrição de nódulos justapostos feita por esse pesquisador são estruturalmente similares a esses nódulos meristemáticos.

Na sequência de desenvolvimento dos tipos morfogênéticos estudados no presente trabalho verificou-se que essas estruturas não progrediram, devido principalmente a fatores relacionados com oxidação que ocorre já na fase de estruturas globulares. E, de fato, histologicamente observou-se que essas estruturas são constituídas de células cujo conteúdo reage com safranina indicando a presença de compostos fenólicos. Um outro fator importante estaria relacionado com o aspecto nutricional e hormonal, que pode levar ao desenvolvimento de estruturas embriônicas que não estão prontas para o desenvolvimento, resultando na formação de estruturas neomórficas (NWANKWO & KRİKORIAN, 1986).

As características morfológicas e histológicas das estruturas globulares obtidas em meio de cultura contendo picloram evidenciam a diferenciação dos explantes formando regiões de crescimento meristemático com características morfológicas e embriogênicas. Se ou não, estas

estruturas desenvolverão formando embriões somáticos permanece para ser testado nas futuras pesquisas que darão continuidade a este trabalho.

Os estudos histológicos revelaram a presença de potencial morfogênético, evidenciando uma série de características similares às observadas na embriogênese somática de outras palmeiras (TISSERAT & DE MASON, 1980; NWANKWO & KRIKORIAN, 1986; SCHWENDIMAN et alii, 1988; GUERRA, 1989).

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos na manipulação "in vitro" de células e tecidos de macaúba - *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Loddiges nas condições do presente trabalho, permitem as seguintes conclusões:

- A germinação e desenvolvimento de plântulas foram significativamente favorecidas quando o meio MS continha NO_3^- e NH_4^+ correspondente à 50 e 25% do meio MS. A utilização de embriões zigóticos oriundos de frutos imaturos como explante evidenciou que os fatores que causam dormência da macaúba surgem com a maturação do fruto.

- Embriões oriundos de frutos maduros mostraram-se melhores como fonte de explante para indução de calos do que embriões de frutos imaturos.

- A adição de 2,4-D em quaisquer das concentrações estudadas não favoreceu a indução e desenvolvimento de calos com características embriogênicas.

- Picloram, mostrou-se mais efetivo nas respostas morfogênicas apresentando-se calos com características embriogênicas.

- O cálcio no meio de cultura combinado com picloram facilitou a manifestação de potencial embriogênico em concentrações correspondente à 25 e 50% do meio MS.

- As observações histológicas confirmaram as características embriogênicas induzidas pelo picloram.

Referências Bibliográficas.

AHÉE, J.; ARTUIS, P.; CAS, G.; DUVAL, Y.; GUÉNIN, G.;
HANOVER, J.; HANOVER, P.; LIEVOUX, D.; LIORET, C.;
MALAURIE, B.; PANNETIER, C.; RAILLOT, D.; VARECHON, C.;
ZUCKERMAN, L. La multiplication végétative "in vitro" du
palmier à huile par embriogénese somatique. **Oleagineux**,
Paris, 36(3): 113-7, 1981.

ALLAN, E. & HEPLER, P.K. Calmodulin and calcium-binding
proteins. In: STUMP, P.K. & CONN, E.E., ed **The
biochemistry of plants**. New York, Academic Press, 1989.
v.15: Molecular biology, p. 455-84.

ALVES, M.R.P. **Palmeiras; características botânicas e
evolução**. Campinas, Fundação Cargill, 1987. 129p.

AMMAR, S & BENBADIS, A. Multiplication vegetative du
palmier-dattier (*Phoenix dactylifera* L.) par la culture
de tissus de jeunes issus de semis. **Comptes Rendus
Hebdomadaires des Séances d'Academie. Sciences, Paris**,
284: 1789-92, 1977.

- ARCOOL, D. Lauric oil resources. *Economic of Botany*, Lancaster, 42(2): 195-205, 1988.
- ASSY BAH, B. Culture "in vitro" d'embryons zygotiques de cocotiers. *Oleagineux*, Paris, 41(7):321-8, 1986.
- BALAGA, H. Y. & DE GUZMAN, E. V. The growth and development of coconut "Makapuno" embryos "in vitro". II Increased root incidence and growth in response to media composition and to sequential culture from liquid to solid medium. *Philippine Agriculturist*, Manila, 53: 551-65, 1972.
- BATISTA, L.F. Extração e beneficiamento. *Energia*, São Paulo, 2(11): 47-9, 1980.
- BHALLA-SARIN, N.; BAGGA, S.; SOPORY, K.S.; GUHA-MUKHERJEE, S. Induction and differentiation of callus from embryos of *Cocos nucifera* L. by IAA-conjugates. *Plant Cell Reports*, Berlin, 5: 322-4, 1986.
- BLAKE, J. Tissue culture propagation of coconut, date and oil palm. In: DODDS, J.H. ed. *Tissue culture of trees*. Westport, AVI. 1983. p.29-50.

- BRACKPOOL, A. L.; BRANTON, R. L.; BLAKE, J. Regeneration in Palms. In: VASIL, I.A., ed. **Cell culture and somatic cell genetics of plant.** Orlando, Academic Press, 1986. v.3, p.207-22.
- BRANTON, R.L. & BLAKE, J. "In vitro" plantlet development from calloid derived from immature inflorescence of *Cocos nucifera* L. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT TISSUE CULTURE, 6., Minneapolis, 1986. **Abstract.** Mineapolis, International Association For Plant Tissue Culture, 1986. p.399.
- BRASIL. Ministério da Indústria e Comércio. Secretaria de Tecnologia Industrial. **Produção de combustíveis líquidos a partir de óleos vegetais.** Brasília, STI/CIT, 1985. 364p (STI Documentos, 16).
- CHOO, W. K. Palm tissue culture. In: SYMPOSIUM ON PLANT TISSUE, TECHNOLOGY AND UTILIZATION, Norway, 1984. **Leiciopropagation of selected rootcrops palms, citrus and ornamental species: proceedings.** Norway, FAO, 1984. p. 88-112.
- CID, L.P.B. Regeneração de plantas de *Elaeis oleifera* e de seu híbrido com *Elaeis guineensis* via embriogênese somática. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** Brasília, 22(1): 109-13, 1987.

- COLLINS, G.B.; VIAN, E.W.; PHILLIPS, G.C. Use of 4-amino 3,5,6-trichloropicolinic acid an auxin source in plant tissue cultures. *Crop Science*, Madison, 18(2): 286-8, 1978.
- CORADIN, L. & LLERAS, E. Coleta de germoplasma de macaúba situação atual. *Newsletter. EMBRAPA-CENARGEN Brasília*, 2: 5-6, abr. 1986.
- CROCOMO, O. J. & CABRAL, J. B. Interspecific hibridization in *Phaseolus*: embryo axis culture. In: Crocomo, O.J.; Tavares, F.C.A.; Evans, W.R.; Brano, J.E.; Paddock, E.F. *Biotechnology of plants and microorganisms*. Columbus, Ohio State Univ. Press, 1985. p.85-96.
- CUTTER, V. M. & WILSON, K. Effect of coconut endosperm and other growth stimulants upon the development "in vitro" of embryos of *Cocos nucifera*. *Botanical Gazette*, Chicago, 115: 234-40, 1954.
- DE GUZMAN, E. V. The Growth Development of Coconut Makapuno embryo "in vitro". The induction of rooting. *Philippine Agriculturist*, Manila, 53: 65-78, 1969.

DE GUZMAN, E. V. & MANUEL, G. C. Improved root growth in embryo and seedlings cultures of coconut "Makapuno" by the incorporation of charcol in the growth medium. Rome, FAO, 1975. 6p.

DE GUZMAN, E.V.; DEL ROSARIO, A.G.; UBALDE, E.M. Proliferative growths and organogenesis in coconut embryo and tissue cultures. *Philippine Journal Coconut Studies*, Manila, 3: 1-10, 1978.

DE GUZMAN, E.V.; DEL ROSARIO, A.G.; UBALDE, E.M. Proliferative growths and organogenesis in coconut embryo and tissue cultures. *Philippine Journal Coconut Studies*, Manila, 7: 1-10, 1979.

DUKE, J.A. Oil palm in your future? *Newsletter. EMBRAPA-CENARGEN*, Brasília, 2: 6-9, abr. 1986.

EBERT, A. & TAYLOR, H.F. Assessment of the changes of 2,4-D dichlorophenoxyacetic acid concentrations in plant tissue culture media in the presence of activated charcoal. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, 20: 165-72, 1990.

EEUWENS, C. J. Mineral requirements for Growth and Callus Initiation of Tissue Explants Excised from Nature Coconut Palms (*Cocos nucifera* L.) and Cultured "in vitro". *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 36(1): 23-8, 1976.

EEUWENS, C. J. Effects of Organic Nutrients and Hormones on Growth and Development of Tissue Explants Excised from Coconut (*Cocos nucifera* L.) and date (*Phoenix dactylifera*) palms cultured "in vitro". *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 42(2): 173-8, 1978.

GEORGE, E.F. & SHERRINGTON, P.D. Plant propagation by tissue culture; handbook and directory of commercial laboratories. Basingstoke, Exegetics, 1984. 709p.

GEORGE, E.F.; PUTTOCK, D.J.M.; GEORGE, H.J. Plant culture media. Westburg, Exergetic, 1987. v.1, 567p.

GERLACH, D. Botanische mikrotechnik, eine einjuhrung. Stuttgart, Georg Thiene, 1969. 311p.

GONÇALVES, A.N. Reversion to juvenility and cloning of *Eucalyptus ucophyla* S.T. blake in cell and tissue culture systems. In: SIMPÓSIO IUFRO EM MELHORAMENTO GENÉTICO E PRODUTIVIDADE DE ESPÉCIES FLORESTAIS DE RÁPIDO CRESCIMENTO, Águas de São Pedro-SP, 1980. s.n.t. p1- 6.

- GUERRA, M. P. Embriogênese somática em *Euterpe edulis* Mart. (PALMAE). São Paulo, 1989. 233p. (Doutorado - Instituto de Biociências/USP).
- GUERRA, M. P. & HANDRO, W. Somatic embryogenesis and plant regeneration in embryo cultures of *Euterpe edulis* Mart. (PALMAE). *Plant Cell Reports*, Berlin, 7: 550-2, 1988.
- HAGEN, S. R.; MUNETA, P.; AUGUSTIN, J.; LETEURNEAN, D. Stability and utilization of picloram, vitamins and sucrose in a tissue culture medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, 25: 45-8, 1991.
- HANOVER, J. & PANNETIER, C. "In vitro" propagation of the oil palm *Elaeis guineensis* Jacq. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT TISSUE CULTURE, 5. Tokyo, 1982. *Proceedings*, edited by A. Fujiwara. Tokyo, Japanese Association For Plant Tissue Culture, 1982. p.745-6.
- JANSEN, M.A.R.; BOOLF, H.; SCHEL, J.H.N.; URIES, S.C. Calcium increases the yield of somatic embryos in carrot embryogenic suspension cultures. *Plant Cell Reports*, Berlin, 9: 221-3, 1990.
- JONES, L. Propagation of oil palm by tissue culture. *Oil Palms News*, London, 17: 1-9, 1974.

- JONES, L. H. Factores influencing embryogenesis in carrot cultures (*Daucus carota* L.). *Annals of Botany*, London, **38**: 1077-88, 1974.
- KANCHANAPOOM, K; KANCHANAPOOM, M.; CHOURYKAEW, B.; PATCHAKAPISUTSIN, V. Embryoid and plantlet formation from oil palm embryos cultured "in vitro". In: INTERNATIONAL CONGRESS PLANT TISSUE AND CELL CULTURE, 7., Amsterdam, 1990. *Abstracts*. Amsterdam, IAPTC, 1990. p.108.
- KOEBERNIK, J. Germination of Palm seed. *Principes*, Lawrence, **15**: 134-7, 1971.
- KOMANINE, A.; MATSUMOTO, M.; TSUKAHAPA, M.; FUJIWARA, A.; KUWAHARA, R.; ITO, M.; SMITH, J.; NOMURA, K.; FUJIMURA, T. Mechanismo of somatic embryogenesis in cell cultures physiology, biochemistry and molecular biology. In: INTERNATIONAL CONGRESS PLANT TISSUE AND CELL CULTURE, 7., Amsterdam, 1990. *Progress in plant celular and molecular biology*; proceedings, edited by H.J.J. Nijkamp and others. Dordrecht, Kluwer Academic, 1990. p.308-13.
- LLERAS, E. Acrocomia, um gênero com grande potencial. *Newsletter*. EMBRAPA-CENARGEN, Brasília, **1**: 3-5, 1985.

- MALAURIE, B. L' embriogenese somatique em milieu liquide du palmier á huile: *Elaeis guineensis* Jacq. & *E. melanococoa*. Premiers résultats. *Oleagineux*, Paris, 6: 217-22, 1987.
- MARKEY, K.S. Mbocayá of Paraguay cocopalm: an important source of oil. *Economic Botany*, Lancaster, 10: 3-32, 1956.
- MARTIN, J.P. & RABECHAUULT, H. Procède de multiplication vegetative de vegetaux et plants ainsi obnus. Patente Industrial (França) n 76,283361. 1978.
- MOREL, G. & WETMORE, R.H. Fern Callus tissue culture. *American Journal of Botany*, Columbus, 38: 141-3, 1951.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay wiyh tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 15: 473-97, 1962.
- NOVAES, R. F. Contribuição para o estudo do coco "macaúba". Piracicaba, 1952. 86p. (Doutorado- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- NOVAK, F.J. Chromossomal characteristics of long-term callus culture of *Allium sativum* L. *Cytologia*, Tokyo, 46: 371-9, 1981.

- NWANKWO, B.A. & KRIKORIAN, A.D. Morphogenetic potencial of embryo and seedlings-derived callus of *Elaeis guineensis* Jacq. var. *psifera* Becc. *Annals of Botany*, London, 51: 65-76, 1986.
- OMAR, M.S. Propagation of date palm through tissue culture. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT TISSUE AND CELL CULTURE, 6., Minneapolis, 1986. Abstracts. Minneapolis, International Association For Plant Tissue Culture. 1986. p.279.
- OMAR, M.S. & NOVAK, F.J. "In vitro" plant and ethylmethanesulphonate (EMS) uptake in somatic embryos of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, 20: 185-90, 1990.
- PANNETIER, C. & BUFFARD-MOREL, J. Coconut palm (*Cocos nucifera* L.). In: BAJAJ, Y.P.S. ed. *Biotechnology in agriculture and forestry 1. Trees*. I. Berlin, Springer-Verlag, 1986. p.430-53.
- PANNETIER, C.; ARTHUIS, P.; LIEVOUX, D. Néof ormation de jeunes plantes d' *Elaeis guineensis* à partir de calcs primaires obtenus sur fragments foliaires cultivés "in vitro". *Oleagineux*, Paris, 36(3): 119-22, 1981.

PARANJOTHY, K. & OTHAMAN, R. "In vitro" propagation of oil palm. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT TISSUE CULTURE, 5., Tokyo, 1982. **Proceedings**, edited by A. Fujiwara. Tokyo, Japanese Association For Plant Tissue Culture, 1982. p.747-8.

PINHEIRO, C.U.B. **Germinação de sementes de palmeiras.** Teresina, EMBRAPA-UEPAE, 1986. 102p.

RABECHAULT, H. & MARTIN, J. P. Multiplication vegetative du palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) à l'aide de cultures de tissus foliaires. **Comptes Rendus Hebdomadaires Seances de l' Academie des Sciences.** Paris, 283: 1735-7, 1976.

RABECHAULT, H.; AHÉE, J.; GUENIN, G. Colonies cellulaire et formes embryds obtenue "in vitro" a partir de cultures d' embryons de palmier à huile. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l' Academie Sciences,** Paris, 270: 3067-70, 1970.

RABECHAULT, H.; GUÉNIN, G.; AHÉE, J. Recherches sur la culture "in vitro" des embryons de palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq. var. *dura* Becc.). VIII Action du lait de coco autoclavé en presence ou non de gélose et de lumiere et en raison de l' âge des graines. **Oleagineux,** Paris, 27: 249-54, 1972.

- RABECHAUULT, H.; GUÉNIN, G.; AHÉE, J. Recherches sur la culture "in vitro" des embryons de palmier à luite (*Elaeis guineensis* Jacq. var. *dura* Becc.). IX. Activation de la sensibilité au lait de coco par une rehydratation des grines. *Oleagineux*, Paris, 28: 333-6, 1973.
- REYNOLDS, J.F. Vegetative propagation of palm trees. In: BONGA, J.M. & DURZAN, D.J., ed. *Tissue culture in forestry*. Dordrecht, Martinus Nijhoff, 1982. p.182-207.
- REYNOLDS, J.F. & MURASHIGE, T. Assexual embriogenesis in callus cultures of palms. *In vitro*, Gaiphersberg, 5: 383-5, 1979.
- ROCHA, O. O coco macaúba. *Revista de Agricultura*, Piracicaba 21 (1-2): 344-58, 1946.
- RODRIGUEZ, J.A. Produção de embrioides em dendê a partir da cultura de embriões imaturos. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, Londrina, 1(1): 119-20, 1989.
- SASS, J.E. *Botanical microtechnique*. Ames, The Iowa State College Press, 1951. 228 p.

- SCHWENDIMAN, J.; PANNETIER, C.; MICHAUX-FERRIERE, N.
Histology of somatic embryogenesis from leaf explants of
the oil palm *Elaeis guineensis*. *Annals of Botany*,
London, 62: 43-52, 1988.
- SHARP, W.R.; SONDAHL, M.R.; CALDAS, L.S.; MARAFFA, S.B. The
physiology on "in vitro" asexual embryogenesis.
Horticultural Reviews, Westport, 2: 268-310, 1980.
- SITTOLIN, I.M. & CUNHA, L.H.S. Cultura de embriões de
macaúba (*Acrocomia* sp.) "in vitro" visando a implantação
de um banco ativo de germoplasma. In: SIMPÓSIO NACIONAL
DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 2., Brasília, 1987.
Resumos. Brasília, ABCTP, 1987. p.13.
- SMITH, W.K. & THOMAS, J.A. The isolation and "in vitro"
cultivation of *Elaeis guineensis*. *Oleagineux*, Paris,
28: 123-7, 1973.
- SONDAHL, M.R. & TEIXEIRA, J.B. Tissue culture of palms.
In: CROCOMO, O.J.; SHARP, W.R.; MELO, M., ed.
Biotecnologia para produção vegetal. Piracicaba,
CEBTEC/FEALQ, 1991. p.205-48.

- SRINIVASAN, G.; LITZ, R.E.; BARKER, J.; NORSTOG, K. Somatic embryogenesis and plantlet formation from christmas palm callus. *Hortscience*, St. Joseph, 20(2): 278-80, 1985.
- SUNDERLAND, N. Nuclear cytology. In: STREET, H.E., ed. *Plant tissue and cell culture*. 2 ed. Oxford, Blackwell Scientific, 1977. p.177-205.
- SWANSON, E.B. & TOMES, D.T. "In vitro" responses of tolerant and susceptible lines of *Lotus coniculatus* L. to 2,4-D. *Crop Science*, Madison, 20: 792-5, 1980.
- TABAI, S.; MELO, M.; CROCOMO, O.J. Control of somatic embryos formation the palm macaúba (*Acrocomia aculeata*). In: INTERNATIONAL CONGRESS PLANT TISSUE AND CELL CULTURE, 7. Amsterdam, 1990. Abstracts. Amsterdam, IAPTC, 1990. p.248.
- TEIXEIRA, J.B. Multiplicação vegetativa de macaúba por cultura de tecidos. Newsletter. EMBRAPA-CENARGEN, Brasília, 1:9-10, 1985.
- TEIXEIRA, J.B. Development of "in vitro" techniques of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). New Brunswick, 1990. 152p. (PhD - Rutgers University).

- TEIXEIRA, J.B.; SONDAHL, M.R.; KIRBY, E.G. Assexual embryogenesis in mature embryo callus of palms (*Acrocomia aculeata* and *Elaeis oleifera*). In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT TISSUE CULTURE, 6., Mineapolis, 1986. Abstracts, edited by D.A. Sommers and others. Mineapolis, International Association For Plant Tissue Culture, 1986. p .191.
- TISSERAT, B. Propagation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) "in vitro". *Journal of Experimental Botany*, Oxford, 119: 1275-83, 1979.
- TISSERAT, B. Date palm. In: SHARP, W.R.; EVANS, D.A.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. ed. *Handbook of plant cell culture*. New York, Mcmillan, 1984. v.2, p.505-45.
- TISSERAT, B. Palms. In: BONGA, J.M. & DURZAN, D.J. ed. *Cell and tissue culture in forestry*. Dordrecht, Martinus Nijhoff, 1987. p.339-56.
- TISSERAT, B. & DE MASON, D.A. A histological study of development of adventice embryos in organ cultures of *Phoenix dactylifera* L. *Annals of Botany*, London, 46: 465-72, 1980.

- TURNHAM E. & NORTHCOTE, D.H. The use of acetyl-CoA carboxylase and changes in wall composition as measures of embryogenesis in tissue cultures of oil palm (*Elaeis guineensis*). *Biochemical Journal*, Essex, 208: 323-32, 1982.
- VALVERDE, R.; ARIAS, O.; THORPE, T.A. Picloram-induced somatic embryogenesis in pejyibe palm (*Bactris gasipaes* H.B.K.) *Plant Cell Tissue and Organ. Culture*, Dordrecht, 10(2): 149-56, 1987.
- VELLEGAS, T.L.; BROWN, D.C.W.; WEBB, J. "In vitro" somatic embryogenesis in *Medicago sativo* L. In: International Congress of Plant and Cell Culture, 6., Mineapolis, 1986. Abstracts, edited by D.A. Sommers and others. Minneapolis, International Association For Plant Tissue Culture, 1986. p.291.
- WANDECK, F.A. & JUSTO, P.G. Macaúba, fonte energética e insumo industrial. *Vida Industrial*, São Paulo, p.33-7, 1982.
- WILLIAMS, E.S. & MAHESWARAW, B. Somatic embryogenesis: Factores influencing coordinated behavior of cells as an embryogenetic group. *Annals of Botany*, London, 57: 443-62, 1986.

YAMAKAWA, T.; KURAHASHI, O.; ISHIDA, K.; KATO, S.; KODAMA, T.; MINODA, Y. Stability of indole-3-acetic to autoclaving, aeration and light illumination. *Agricultural and Biological Chemistry*, Tokyo, 43: 879-80, 1979.

ZIV, M. & GADASI, G. Enhanced embryogenesis and plant regeneration from cucumber (*Cucumis sativus* L.) callus by activated charcoal in solid/liquid double-layer culture. *Plant Science*, Limerick, 47: 115-22, 1986.