

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA-UnB
FACULDADE DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA FLORESTAL**

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E ANÁLISES
MORFOANATÔMICAS E POR CITOMETRIA DE FLUXO
EM AÇAIZEIRO (*Euterpe oleracea* Mart.)**

ELINEA DE OLIVEIRA FREITAS

**ORIENTADOR: JONNY EVERSON SCHERWINSKI-PEREIRA
COORIENTADOR: ANDERSON MARCOS DE SOUZA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FLORESTAIS

PUBLICAÇÃO: PPG/EFL. DM. 236/2014

BRASÍLIA, ABRIL/2014

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA-UnB
FACULDADE DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA FLORESTAL**

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E ANÁLISES
MORFOANATÔMICAS E POR CITOMETRIA DE FLUXO
EM AÇAIZEIRO (*Euterpe oleracea* Mart.)**

Dissertação apresentada ao Departamento de Engenharia Florestal da Universidade de Brasília-UnB, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Florestais

ELINEA DE OLIVEIRA FREITAS

BRASÍLIA, ABRIL/2014

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA-UnB
FACULDADE DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA FLORESTAL
PROGRAMA DE PÓSGRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FLORESTAIS**

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E ANÁLISES MORFOANATÔMICAS E POR
CITOMETRIA DE FLUXO EM AÇAIZEIRO (*Euterpe oleracea* Mart.).**

ELINEA DE OLIVEIRA FREITAS

**DISSERTAÇÃO DE Mestrado submetida ao Programa de
Pós-graduação em Ciências Florestais, do Departamento de
Engenharia Florestal, da Faculdade de Tecnologia da
Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários
para a obtenção do grau de Mestre.**

APROVADA POR:

Dr. Jonny Everson Scherwinski-Pereira
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
(Presidente)

Dra. Conceição Eneida dos Santos Silveira
Departamento de Botânica, UnB
(Examinador externo)

Dra. Maria Elvira de Rezende
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
(Examinador externo)

Dra. Gabriela Ferreira Nogueira
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
(Suplente)

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade de Brasília. Acervo 1015857.

F866e Freitas, Elínea de Oliveira.
Embriogênese somática e análises morfoanatômicas e por citometria de fluxo em açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) / Elínea de Oliveira Freitas. -- 2014.
73 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) - Universidade de Brasília, Faculdade de Tecnologia, Departamento de Engenharia Florestal, Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais, 2014.
Inclui bibliografia.

Orientação: Jonny Everson Scherwinski Pereira ;
Coorientação: Anderson Marcos de Souza.

1. Açaizeiro. 2. Euterpe. 3. Plantas - Propagação.
4. Morfogênese. 5. Anatomia vegetal. I. Scherwinski-Pereira, Jonny Everson. II. Souza, Anderson Marcos de. III. Título.

CDU 581.3

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

FREITAS, E.O. (2014). Embriogênese somática e análises morfoanatômicas e por citometria de fluxo em açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.). Dissertação de mestrado, Publicação PPG EFL. DM-236/2014, Departamento de Engenharia Florestal, Universidade de Brasília, DF, 73p.

CESSÃO DE DIREITOS

AUTOR: Elinea de Oliveira Freitas

TÍTULO: Embriogênese somática e análises morfoanatômicas e por citometria de fluxo em açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.).

GRAU: Mestre

ANO: 2014

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva outros direitos de publicação e nenhuma parte dessa dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem autorização por escrito do autor.

Dedico com eterno amor e gratidão,

Aos meus queridos pais, Elídio e Dalva, que com enorme afeto me trouxeram a este mundo, se dedicaram, cuidaram, se doaram por inteiro e as vezes renunciaram aos seus sonhos, para que pudesse realizar os de seus filhos... Espero ter sido digna do esforço dedicado por vocês em todos os aspectos. Vocês são os verdadeiros responsáveis por minhas realizações e pelo meu desejo de ser uma pessoa melhor a cada dia. Amo imensamente vocês!

Ofereço,

Aos meus queridos irmãos, Amanda, Egídio, Eletrícia e Beatriz, pelo carinho, incentivo constante e companheirismo em todos os momentos.

*Viver!
E não ter a vergonha
De ser feliz
Cantar e cantar e cantar
A beleza de ser
Um eterno aprendiz...*

*Ah meu Deus!
Eu sei, eu sei
Que a vida devia ser
Bem melhor e será
Mas isso não impede
Que eu repita
É bonita, é bonita...*

E é bonita!

Gonzaguinha

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

Aos meus pais, por TUDO que fizeram e fazem por mim e pelos valores transmitidos. Aos meus irmãos por sempre estarem ao meu lado. Muito obrigado!

Ao meu orientador Jonny Everson Scherwinski-Pereira por sua atenção e disponibilidade durante a realização deste trabalho.

Ao meu coorientador Anderson Marcos pelo apoio.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais da UnB, e aos secretários Chiquinho e Pedro pelo profissionalismo e por serem sempre tão atenciosos e pacientes.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo durante o curso de mestrado.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pela oportunidade de estudos e utilização das instalações para a realização dos experimentos.

À Dra. Maria do Socorro Padilha de Oliveira, pesquisadora da Embrapa Amazônia Oriental de Belém, por fornecer todo material vegetal utilizado neste estudo.

Aos membros da banca de avaliação, Dra. Conceição Eneida dos Santos Silveira e Dra. Maria Elvira de Rezende, por aceitarem participar e assim, contribuir ao presente estudo.

Ao André Luís, pelo profissionalismo e auxílio que me foi dado sempre que precisei.

Agradeço a todos os colegas do LCT II, pela agradável convivência, troca de conhecimento, cafezinhos e momentos de rizadas. Especialmente, ao Nero pela amizade e por todo auxílio nos experimentos realizados. À Patrícia e o Hugo, pela disponibilidade e dúvidas esclarecidas sempre que foi necessário. À Gabriela, por todo apoio e pela assistência nas análises por citometria de fluxo. E à Emília pela ajuda na obtenção das imagens anatômicas.

À minha amiga Tatiane Monteiro, pelo companheirismo, momentos de alegrias e por todo auxílio durante a realização deste trabalho. Sou imensamente grata.

Agradeço com todo meu carinho a todos que de alguma forma incentivaram e colaboraram com a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

RESUMO

O presente trabalho objetivou desenvolver e otimizar o protocolo de embriogênese somática em açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.), a partir do uso de propágulos formados por embriões zigóticos (EZ) oriundos de sementes em diferentes estádios de maturação, além de folhas e inflorescências imaturas provenientes de plantas adultas. Adicionalmente, análises morfo-anatômicas e por citometria de fluxo foram realizadas para melhor caracterizar e entender as etapas do processo. Na primeira parte deste trabalho, a embriogênese somática em EZ maduros e imaturos foi obtida, inicialmente a partir da indução de calos embriogênicos em meio de Murashige e Skoog (MS), suplementado com 2,5 g.L⁻¹ de carvão ativado e com a auxina picloram nas concentrações de 225 e 450 µM. Uma vez obtidos, calos embriogênicos com embriões somáticos em início de diferenciação foram transferidos para meio de cultura com 12,3 µM de 2iP e 0,6 µM de ANA, visando a diferenciação e maturação de embriões somáticos. A regeneração de plantas foi realizada em meio de cultura com 1,0 µM BAP e 0,5 µM AG₃. Em meio de indução foi possível observar a formação de calos embriogênicos em todos os tratamentos, independentemente do estádio de desenvolvimento dos EZ testados. O picloram na concentração de 450 µM proporcionou os melhores resultados para a formação de calos embriogênicos (84,7%). Na fase de diferenciação e maturação 100% dos explantes que apresentavam formação de calo embriogênico formaram embriões somáticos. A maior frequência de regeneração de plantas (58,7%) foi observada no tratamento em que se utilizou o meio de indução constituído por 450 µM de picloram e em embriões somáticos obtidos de explantes oriundos de EZ imaturos. A partir de análises morfoanatômicas comprovou-se que a indução da embriogênese somática apresentou estádios característicos do tipo indireto. As plantas regeneradas apresentaram desenvolvimento normal, com crescimento de raízes e parte aérea. Os calos, embriões somáticos e as plantas obtidas foram analisados por citometria de fluxo para verificar possíveis alterações no DNA, fato que não foi observado. A segunda parte deste trabalho utilizou explantes provenientes de inflorescências e folhas imaturas para a indução da embriogênese somática. Os explantes provenientes de plantas adultas, uma vez obtidos, foram colocados em meio de cultura de MS, suplementado com 2,5 g.L⁻¹ de carvão ativado e as auxinas picloram e 2,4-D na concentração de 450 µM para a indução de calos. Foram testadas inflorescências imaturas em diferentes estádios de desenvolvimento (estádios I= 6 cm; II= 8 cm e III= 12 cm), e folhas imaturas de diferentes regiões foliares do palmito (basal, mediano e apical). Para a diferenciação de embriões somáticos, calos embriogênicos e embriões somáticos foram transferidos para meio de cultura com as concentrações de picloram e 2,4-D reduzidas para 0,1 mg.L⁻¹. Embriões somáticos em início de diferenciação foram transferidos para meio de cultura com 12,3 µM de 2iP e 0,6 µM de ANA para a maturação de embriões somáticos. Verificou-se que a auxina picloram proporcionou os melhores resultados na indução de calos embriogênicos, tanto para inflorescências como para as folhas imaturas. Os diferentes estádios de desenvolvimento das inflorescências não apresentaram diferenças significativas nas respostas, enquanto que nas folhas imaturas resultados superiores na etapa de indução para a formação de calos foram observados quando os explantes eram provenientes das regiões basal e mediana do palmito. Na etapa de diferenciação, calos embriogênicos provenientes de inflorescências imaturas em meio de cultura com picloram apresentaram até 100% dos explantes diferenciando embriões somáticos, que progrediram lentamente para estádios de torpedo em meio de maturação. Já em calos embriogênicos provenientes de folhas imaturas a diferenciação de embriões somáticos foi observada somente em explantes cultivados originalmente em meio

suplementado com picloram em porcentagens que atingiram até 50% dos explantes da região mediana do palmito, embora, esses embriões somáticos não tenham apresentado progressão para estádios mais tardios de desenvolvimento. Os resultados obtidos sugerem que tanto os explantes provenientes de inflorescências como de folhas imaturas podem ser utilizados como fontes de explantes para a embriogênese somática em açaizeiro.

Palavras-chave: *Euterpe* spp., propagação vegetativa, micropropagação, morfogênese, anatomia, conteúdo de DNA

ABSTRACT

This study had the aim of developing and optimizing the protocol for somatic embryogenesis in açai palm (*Euterpe oleracea*) using explants from zygotic embryos removed from seeds at different stages of maturation and from leaf and immature inflorescences from adult plants. Moreover, morphological, anatomical and cytometry of flux analyses were achieved to a better characterization and comprehension of the process phases. At the first part of this work, somatic embryos (SE) were obtained from mature and immature zygotic embryos (ZE). Initially, embryogenic calli were induced on Murashige & Skoog (MS) medium supplemented with 2.5 g.L⁻¹ of activated charcoal and the auxin picloram at the concentration of 225 or 450 µM. Once developed, embryogenic calli carrying SE at the begin of differentiation were transferred to culture medium containing 12.3 µM of 2iP and 0.6 µM of NAA, in order to induce the differentiation and maturation of the somatic embryos. Plant regeneration occurred at culture medium supplemented with 1.0 µM BAP and 0.5 µM GA₃. At the induction medium, embryogenic calli were formed in all treatments, independently of the maturation state of the ZE used as explant, however, the medium with 450 µM picloram showed the best results for the formation of embryogenic calli (84.7%). At the differentiation and maturation phase, 100% of the explants containing embryogenic callus allowed the development of somatic embryos. The higher frequency of plant regeneration (58.7%) was obtained at the induction medium with 450 µM picloram and using the immature ZE explants. Through the morpho-anatomical analysis it could be proved that the induction of the somatic embryogenesis showed characteristics stages of the indirect development. The plants regenerated from the embryos showed a normal development, with a normal growing of roots and aerial part. At the end, the calli, SE and plants regenerated were analyzed by flow cytometry to quantify the amount of DNA, which showed no differences between the samples. At the second part of this work, explants from inflorescences and immature leaves were used to induce somatic embryogenesis. Those explants, from adult plants, were inoculated at culture medium MS supplemented with 2.5 g.L⁻¹ of activated charcoal and two auxins, picloram or 2,4-D, at the concentration of 450 µM for the callus induction. Immature inflorescences at three developmental states (I = 6 cm; II = 8 cm and III = 12 cm) and immature leaves from different regions (basal, median and apical) of the heart of palm were tested. To the differentiation of the somatic embryos, embryogenic calli and SE were transferred to a culture medium containing the same original auxin, picloram or 2,4-D, with the concentration reduced to 0.1 mg.L⁻¹. Somatic embryos at the beginning of differentiation were transferred to a culture medium containing 12.3 µM of 2iP and 0.6 µM of NAA for the maturation of the somatic embryos. The auxin picloram showed best results at embryogenic callus induction in both inflorescences and immature leaves. The inflorescences at different stage of development did not show significant differences at the end, while for the immature leaves, explants from the portions basal and median of the heart of palm gave rise to the best results at the induction of callus phase. At the differentiation phase, embryogenic calli from the immature inflorescences grown at medium containing picloram showed 100% of differentiation to somatic embryos, and these developed slowly to torpedo stage under the maturation medium. While considering the embryogenic calli from the immature leaves, the differentiation of somatic embryos occurred only on explants cultivated originally at medium supplemented with picloram, reaching the percentage of 50% for the explants from the median region, although, those somatic embryos did not developed to later stages of development. The results allow

suggesting that explants from both immature inflorescences and leaves from adult plants of açai palm can be used as explant sources to somatic embryogenesis.

Key-words: *Euterpe* spp., *in vitro* propagation, morphogenesis, anatomical, DNA content.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Aspectos botânicos do açaizeiro	4
2.2 Importância econômica do açaizeiro no Brasil	6
2.3 Propagação do açaizeiro	8
2.4 Propagação <i>in vitro</i>	9
2.5 Citometria de fluxo	13

3. CAPÍTULO I

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM AÇAIZEIRO (*Euterpe oleracea* Mart.) A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS, CARACTERIZAÇÃO MORFOANATÔMICA E ESTABILIDADE GENÔMICA POR CITOMETRIA DE FLUXO

RESUMO	15
3.1 INTRODUÇÃO	17
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	20
3.2.1 Material vegetal e desinfestação dos explantes	20
3.2.2 Meio de cultura básico e condições de cultivo	20
3.2.3 Indução da embriogênese somática	21
3.2.4 Diferenciação e maturação	21
3.2.5 Regeneração e aclimatização de plantas	21
3.2.6 Análises estatísticas	22
3.2.7 Análises anatômicas	23
3.2.8 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	23
3.2.9 Análises por citometria de fluxo	24
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
3.3.1 Indução da embriogênese somática	25
3.3.2 Diferenciação e maturação	28
3.3.3 Regeneração e aclimatização de plantas	29
3.3.4 Análises anatômicas	32
3.3.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	35
3.3.6 Análises por citometria de fluxo	36
CONCLUSÕES	39

4. CAPÍTULO II

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM AÇAIZEIRO (*Euterpe oleracea* Mart.) A PARTIR DE INFLORESCÊNCIAS E FOLHAS IMATURAS DE PLANTAS ADULTAS

RESUMO	40
4.1 INTRODUÇÃO	42
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	44
4.2.1 Material vegetal	44
4.2.2 Meio de cultura básico e condições de cultivo	44
4.2.3 Indução da embriogênese somática a partir de inflorescências imaturas	45
4.2.3.1 Indução de calos, diferenciação e maturação de embriões somáticos .	45
4.2.3.2 Análises estatísticas	46
4.2.4 Indução da embriogênese somática a partir de folhas imaturas	47
4.2.4.1 Indução de calos, diferenciação e maturação de embriões somáticos..	47
4.2.4.2 Análises estatísticas	48
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.3.1 Indução da embriogênese somática a partir de inflorescências imaturas.....	49
4.3.2 Indução da embriogênese somática a partir de folhas imaturas.....	53
CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

LISTA DE TABELAS

CAPITULO I

Tabela 1- Composição básica dos meios de cultura utilizados nos diferentes estádios da embriogênese somática em açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.).

Tabela 2- Efeito das concentrações de picloram (225 e 450 μM) e das características dos embriões zigóticos usados como explante (imaturo e maduro) sobre a porcentagem de calos não embriogênicos, embriogênicos e sobre o peso dos calos, após 30 semanas da indução, porcentagem de calos embriogênicos com embriões somáticos, após 12 semanas em meio de maturação, e frequência de regeneração em açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.).

Tabela 3- Conteúdo médio de DNA nuclear (pg) estimado por citometria de fluxo de estruturas embriogênicas e de plantas regeneradas por embriogênese somática em açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.), induzidos a partir de embriões zigóticos imaturos cultivados em meio de MS suplementado com 450 μM de picloram.

CAPITULO II

Tabela 1- Composição básica dos meios de cultura utilizados nos diferentes estádios da embriogênese somática em açazeiro, a partir de folhas e inflorescências imaturas de açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.).

Tabela 2- Efeito das auxinas picloram e 2,4-D sobre a porcentagem de explantes com formação de calos embriogênicos e calos com embriões somáticos diferenciados, durante a embriogênese somática de açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) a partir de inflorescências imaturas.

Tabela 3- Efeito de diferentes concentrações de picloram e 2,4-D (0 e 450 μM) e da região foliar (apical, mediana e basal) sobre a porcentagem de calos embriogênicos e de calos com embriões somáticos diferenciados durante a embriogênese somática do açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.), a partir de folhas imaturas.

LISTAS DE FIGURAS

CAPITULO I

Figura 1- Embriogênese somática e regeneração de plantas a partir de embriões zigóticos de açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.).

Figura 2- Caracterização histológica da embriogênese somática em açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.).

Figura 3- Eletromicrografia de varredura durante a indução de embriões somáticos de açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.).

Figura 4- Histogramas obtidos pela análise de citometria de fluxo em calos embriogênicos, calos com embriões globulares, calos com embriões torpedo e plantas regenerados, obtidos por embriogênese somática em açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.).

CAPITULO II

Figura 1- Aspectos morfológicos de calos e embriões somáticos obtidos durante a embriogênese somática em açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) a partir de inflorescências imaturas.

Figura 2- Formação de calos e embriões somáticos em folhas imaturas de açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.).

LISTA DE ABREVIATURAS

2-iP	2 isopentenil-adenina
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
μM	Micromolar
ANA	Ácido naftalenoacético
ES	Embriogênese somática
EZ	Embrião zigótico
MS	Meio de cultura formulado por Murashige e Skoog, 1962
Dicamba	Ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico
Picloram	Ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
BAP	N ⁶ -benzilaminopurina
AG₃	Ácido giberélico
Pg	Picograma
FAA	Formaldeído, ácido acético glacial e álcool etílico

1. INTRODUÇÃO GERAL

O açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) é uma palmeira nativa da Amazônia e que ocorre em grandes extensões no estuário amazônico. Nessa região é também conhecido por Açai-do-Pará, açai-do-Baixo Amazonas, açai-de-touceira, açai-de-planta e açai-verdadeiro. O açazeiro é utilizado de inúmeras formas: como planta ornamental (paisagismo), na construção rústica (de casas e pontes), como remédio (vermífugo e anti-diarréico), na produção de celulose (papel Kraft), na alimentação (polpa processada e palmito), na confecção de bijóias (colares, pulseiras etc.), ração animal e adubo, entre outras aplicações. Mas, apesar da grande utilidade, esta palmeira se destaca no fornecimento de dois produtos alimentares economicamente rentáveis: os frutos e o palmito (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Embora, o palmito seja considerado o produto nobre da espécie, a grande expansão da cultura do açazeiro nos últimos anos deve-se principalmente, ao aumento considerável do consumo da polpa dos frutos (OLIVEIRA *et al.*, 2009) . De fato, a polpa de açai passou por um processo de expansão da demanda, conquistando novos mercados e se consolidando no mercado nacional e até mesmo o internacional (SANTANA e COSTA, 2010). Esta expansão ocorreu após a divulgação de suas propriedades energéticas e tem despertado grande interesse, tanto científico como comercial, por seu elevado valor nutricional, alto teor de antocianinas e suas propriedades antioxidantes (COISSON *et al.*, 2005; GALLORI *et al.*, 2004; POZO-INSFRAN *et al.*, 2004).

A polpa processada dos frutos é comercializada nas mais diferentes formas, incluindo desde o consumo “in natura”, preferencialmente, no Pará e na região Amazônica, à congelada, adoçada e pasteurizada, com uso na fabricação de bebidas energéticas, geléias, sorvetes e picolés nos demais locais de consumo. Devido a sua alta qualidade nutricional, o açai é utilizado desde a época pré-colombiana pela população Amazônica, com grande aceitação em outras cidades brasileiras e alguns países, tendo necessidade de plantios em larga escala (OLIVEIRA *et al.*, 1998; ROGEZ, 2000; SANTANA e GOMES, 2005).

Embora a espécie apresente alto potencial para comercialização, o uso de técnicas impróprias de propagação e a falta de material genético melhorado tem contribuído negativamente para a exploração racional e econômica dessa espécie. Atualmente, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) tem desenvolvido pesquisas relacionadas aos sistemas de produção do açazeiro e promovido seu melhoramento

genético. A Embrapa desenvolveu também um conjunto de técnicas para o manejo do açaí nativo, reconhecidas e aceitas para aplicação em áreas de proteção ambiental (BRASIL, 2006).

No entanto, o açaizeiro, por ser espécie alógama (originária de cruzamentos), com ampla ocorrência na Amazônia Continental, apresenta grande variação de tipos para os mais diversos caracteres de interesse, como precocidade, produtividade de frutos, rendimento de polpa e época de produção. Essas características acarretam grandes desafios para o programa de melhoramento genético da cultura, que já são naturalmente demorados em razão de tratar-se de uma espécie perene, mas que são aprofundados pelas plantas terem como principal forma de reprodução por sementes, que inclusive são recalcitrantes (NOGUEIRA *et al.*, 2005). Entre outras consequências dessa forma de propagação, têm-se o fato dos plantios poderem originar populações heterogêneas quando no campo, além de, nos programas de melhoramento genético, haver dificuldades de perpetuação de caracteres agrônômicos de interesse em ciclos de seleção (FARIAS NETO *et al.*, 2005).

Dessa forma, a propagação por técnicas vegetativas pode ser uma alternativa à cultura, assim como tem sido observado em várias espécies de palmeiras, seja para a produção de mudas de variedades selecionadas, ou então, para acelerar ciclos de seleção durante o processo de melhoramento genético da cultura (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998; SARTORETTO *et al.*, 2008; BALZON *et al.*, 2013). De fato, a propagação vegetativa está entre os principais métodos de multiplicação de espécies florestais, a qual é extremamente vantajosa quando comparada à reprodução sexuada, pois permite reproduzir o componente genético total, com consequentes ganhos em uma mesma geração (ASSIS e TEIXEIRA, 1998). Nesse contexto, a cultura de tecidos destaca-se entre os métodos clássicos de propagação vegetativa, por necessitar de menor espaço físico e pelo fato de poder ser desenvolvida em qualquer época do ano. Na área florestal em particular, pode ser empregada na conservação de germoplasma *in vitro* (TORIBIO *et al.*, 2008; HERINGER *et al.*, 2013), na produção de mudas (SINGH *et al.*, 2011), rejuvenescimento de clones selecionados na fase adulta (DUTRA *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2012), além de apresentar potencialidade na obtenção de sementes sintéticas (NIEVES *et al.*, 2003; JUNG *et al.*, 2004; UTOMO *et al.*, 2008), dentre outras aplicações (XAVIER *et al.*, 2009).

Em palmeiras, o uso de técnicas da cultura de tecidos de plantas parece de fundamental importância frente aos longos períodos necessários à multiplicação e

crescimento das plantas (KARUN *et al.*, 2004; GUEYE *et al.*, 2009; STEINMACHER *et al.*, 2011; SCHERWINSKI-PEREIRA *et al.*, 2012).

A embriogênese somática é uma técnica da cultura de tecidos de plantas que envolve a regeneração de plantas por meio de obtenção de embriões geralmente a partir de tecido somático. De modo geral, a principal aplicação comercial da embriogênese somática em espécies florestais tem sido a multiplicação de genótipos superiores, mas também, a multiplicação de genótipos nos diferentes ciclos de seleção genética (SUTTON, 2002). Nesse sentido, protocolos de embriogênese somática já foram descritos para algumas espécies de palmeiras, como *Cocos nucifera* (VERDEIL *et al.*, 1994), *Areca catechu* (KARUN *et al.*, 2004), *Euterpe edulis* (SALDANHA *et al.*, 2006), *Elaeis guineensis* (TEIXEIRA *et al.*, 1994; THUZAR *et al.*, 2012; BALZON *et al.*, 2013), *Phoenix dactylifera* (FKI *et al.*, 2003; GUEYE *et al.*, 2009), *Euterpe oleracea* (SCHERWINSKI-PEREIRA *et al.*, 2012) e *Bractis gasipaes* (STEINMACHER *et al.*, 2011).

Apesar das vantagens da embriogênese somática, a ocorrência de variações genéticas foi observada em algumas espécies (ENDEMANN *et al.*, 2001; KUBIS *et al.*, 2003; RIVAL *et al.*, 2009). Assim, a avaliação da estabilidade genética de plantas obtidas por cultura de tecidos é importante para verificar a fidelidade das plantas regeneradas às características da planta matriz.

O risco de variações genéticas são geralmente maiores quando as plantas originam-se por embriogênese somática indireta que se deve ao longo período da fase de calogênese (LARKINS e SCOWEROFF, 1981; BAIRU *et al.*, 2011). Dentre as técnicas empregadas para analisar possíveis variações genéticas em plantas micropropagadas está a citometria de fluxo que, além de poder proporcionar importantes informações a respeito das diferentes formações *in vitro*, também tem a capacidade de detectar precocemente possíveis alterações no conteúdo de DNA nuclear das células, tecidos ou órgãos em cultivo, incluindo plantas completas (ORBOVIE *et al.*, 2008; MEDRANO *et al.*, 2014).

Diante dos aspectos supramencionados, o objetivo geral deste trabalho foi o desenvolver e otimizar o protocolo de embriogênese somática em açazeiro (*Euterpe oleracea*), a partir do uso de propágulos formados por embriões zigóticos oriundos de sementes em diferentes estádios de maturação, além de folhas e inflorescências imaturas provenientes de plantas adultas. Adicionalmente, análises morfo-anatômicas e por citometria de fluxo foram realizadas para melhor caracterizar e entender as etapas do processo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos botânicos do açazeiro

As espécies da família Arecaceae foram descritas como uma das mais interessantes e importantes plantas tropicais, as quais pertencem a ordem Arecales, constituída por cerca de 236 gêneros e 3.400 espécies (JOLY, 1998). No Brasil existem cerca de 120 espécies distribuídas em 39 gêneros (LORENZI *et al.*, 1996, 2004). As espécies do gênero *Euterpe* estão distribuídas em cinco subfamílias: a Arecoideae, Calamoideae, Coryphoideae, Ceroxyloideae e Nypoideae (HENDERSON, 2000).

O açazeiro (*Euterpe oleracea*) pertence a divisão Magnoliophyta (Angiospermae), classe Liliopsida (monocotyledoneae), subclasse Arecidae (espadiciflorae), família Arecaceae (palmae), subfamília Arecoideae e inserida no gênero *Euterpe* (HENDERSON; GALEANO, 1996).

A espécie *Euterpe oleracea* é nativa do estuário Amazônico, ocorrendo nos estados do Pará, Amazonas, Maranhão e Amapá, atingindo também as Guianas e a Venezuela, onde formam populações densas, sendo frequente em solos alagados e várzeas (OLIVEIRA, 2002; LORENZI *et al.*, 1996). No entanto, é na região do estuário do Rio Amazonas que se encontram as maiores e mais densas populações naturais dessa palmeira, adaptada às condições elevadas de temperatura, precipitação pluviométrica e umidade relativa do ar (NOGUEIRA *et al.*, 2006). De acordo com Poulet (1998), é uma planta heliófila, necessitando de ambiente aberto para que seu crescimento seja mais rápido. É considerada uma importante fonte natural de recursos para os nativos e um dos frutos mais importantes da vida alimentar e cultural da população local.

Algumas espécies pertencentes ao gênero *Euterpe* como *Euterpe edulis* (juçara) e *Euterpe espirosantensis* (açai vermelho) ocorrem na Floresta Tropical Atlântica, desde o Sul da Bahia até o Norte do Rio Grande do Sul. Já a espécie *Euterpe precatoria* (açai solteiro) apresentam ocorrência comum nas matas da Amazônia Ocidental, nos estados do Amazonas, Acre, Rondônia e Roraima (RIBEIRO, 2004). Uma característica comum às três espécies citadas acima é o não perfilhamento, pois são monocaulas ou solitárias (SOUSA, 2006).

O açazeiro (*Euterpe oleracea*) é uma palmeira cespitosa com até 25 estipes por touceira em diferentes estádios de desenvolvimento, raramente aparecendo solitário. Seu

estipe é delgado, alcançando de 3 a 20 m de altura e de 7 a 18 cm de diâmetro quando adulta. Sustenta um capitel de 8 a 14 folhas contemporâneas por haste; possui 40 a 80 pares de pinas, distribuídas uniformemente e dispostas num mesmo plano, porém, pêndulas (HENDERSON, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 1998).

Segundo Cavalcante (1988), a inflorescência (espádice) desenvolve-se com a queda da folha um pouco abaixo da região colunar. A espádice de ramificação simples é protegida por uma espata e uma espatela que são formações de consistência coreacea que abrigam as flores antes da antese. O açazeiro inicia sua fase reprodutiva por volta de quatro anos, com floração e frutificação contínuas, cujo pico de florescimento ocorre de fevereiro a julho. Estima-se que 70-80% da produção de frutos ocorra no período de julho a dezembro, período considerado como safra. Mas, podem variar conforme a variedade e a procedência (ROGEZ 2000; DIMENSTEIN e FARIAS NETO, 2008).

A inflorescência propriamente dita é caracterizada como tipo cacho, constituída por um eixo central (ráquis), tendo, em média, 37,0 cm de comprimento e 23,4 cm de diâmetro e 69 ramificações laterais (ráquilas) medindo 31,6 cm de comprimento cada uma, nas quais estão inseridas flores sésseis unissexuais com 18.478 masculinas e 4.857 femininas, em média, por inflorescência. Nas ráquilas, as flores mostraram-se distribuídas em espiral, com a maior concentração das masculinas no final e no meio e, na base, organizadas em tríade: uma feminina em desenvolvimento ladeada por duas masculinas já desenvolvidas (HENDERSON e GALEANO, 1996; OLIVEIRA, 2002). A polinização das flores é cruzada e se dá por insetos. Os prováveis polinizadores são quatro coleópteros (JARDIM, 1994).

O fruto do açazeiro é uma drupa globosa, de 1 a 2 cm de diâmetro e peso médio de 1,5 gramas em média. O epicarpo possui aspecto liso e dependendo da espécie, possui coloração roxa ou verde na maturação. O mesocarpo polposo envolve o endocarpo duro e fibroso que abriga a semente em seu interior (CAVALCANTE, 1991; HENDERSON e GALEANO, 1996; OLIVEIRA *et al.*, 1998).

O sistema radicular é do tipo fasciculado relativamente denso, com raízes emergindo do estipe da planta adulta acima da superfície do solo cerca de 30 a 40 cm. Nessa situação, As raízes apresentam coloração avermelhada e aproximadamente, 1,0 cm de diâmetro (HENDERSON e GALEANO, 1996).

2.2 Importância econômica do açaizeiro no Brasil

O açaí é um fruto de grande importância sócio-econômica e cultural para a região da Amazônia, sendo consumido diariamente como parte da dieta alimentar da população, além de contribuir, robustamente, para a renda das populações ribeirinhas (PALACIO, 2008).

O caroço é principal subproduto do processamento do açaí, constituindo cerca de 85% do peso total do fruto (TINOCO, 2005). A composição química do caroço do açaí possui uma boa quantidade de celulose, lignina e baixo teor de cinza e umidade que são importantes para a produção de briquetes. A utilização de briquetes dos resíduos de açaí como fonte energética pode ser uma solução viável para o aproveitamento do resíduo deste fruto; principalmente, na região norte do Brasil onde o açaí é abundante (REIS *et al.*, 2002). Além disso, o caroço também pode ser utilizado para produção de cosméticos e biojóias, as fibras em móveis, placas acústicas, xaxim, compensados, indústria automobilística, na torrefação de café, panificação, extração de óleo comestível, fitoterápicos e ração animal. Além, do uso na geração de vapor, carvão vegetal e adubo orgânico. A polpa representa 15% e, é aproveitada de forma tradicional no consumo alimentar e outros produtos derivados (TINOCO, 2005).

O fruto do açaizeiro (*Euterpe oleracea*) se destaca em meio às frutas da região amazônica pelo excelente sabor de sua polpa, sendo habitualmente consumido com farinha de mandioca, associado ao peixe, camarão ou carne, constituindo um alimento básico para as populações de origem ribeirinha. Com o fruto também são fabricados sorvetes, licores, doces, néctares e geléias, podendo ser aproveitado, também, para a extração de corantes (NOGUEIRA, 2006). Além disso, o líquido extraído dos frutos também é tradicionalmente, utilizado para tratar a dor, a gripe e a febre (MENEZES *et al.*, 2005). O óleo extraído do fruto é usado na medicina rural, principalmente, como agente antidiarréico (SCHAUSS *et al.*, 2006).

De acordo com Rogez (2000), a polpa do açaí se constitui em fonte de a-tocoferol (vitamina E), fibras, manganês, cobre, boro e cromo. Destaca-se, dentre as frutas, quanto ao teor de lipídios, capaz de suprir cerca de 65% das necessidades teóricas recomendadas para um homem adulto. Em se tratando de proteínas, pode prover entre 25 e 65% das quantidades recomendadas; contém ainda: cálcio, magnésio, potássio e níquel. Porém, é pobre (inferior a 25% do valor diário recomendado) em açúcares totais, fósforo, sódio,

zinco e ferro. Conclui o autor que o açaí pode ser tido como um dos frutos mais nutritivos da Amazônia. Além disso, é um dos produtos mais ricos em antocianinas que são antioxidantes e anti-radicais livres (SANTOS *et al.*, 2008).

O extrativismo vegetal não madeireiro do açaizeiro se concentra na Região Norte. O Pará mantém-se como o maior produtor nacional do fruto, produzindo em torno de 110.937 toneladas de açaí por ano. A valorização do fruto vem despertando o interesse de outros estados da região, como por exemplo, o Amazonas, que nesse ano contribuiu com 44% da produção nacional (MENDES *et al.*, 2012).

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) e divulgados pela Secretaria de Agricultura do Estado (SEAGRI), até novembro de 2012 os municípios paraenses haviam atingido o total de 817.246 toneladas de açaí, em área de 91.426 hectares (fruto plantado e manejado), com aumento de área e produção em relação ao ano anterior (POLL *et al.*, 2013).

Ressalta-se também que, além de fornecer um importante alimento para as populações locais, o açaizeiro constitui-se como uma das principais fontes de matéria-prima para a agroindústria de palmito (NOGUEIRA e HOMMA, 1998). Embora, *Euterpe oleracea* seja uma das principais espécies exploradas para o palmito, as instituições de pesquisa detentoras de germoplasma dessa espécie têm voltado sua atenção para o agronegócio de frutos. Dentre elas está a Embrapa Amazônia Oriental que iniciou os primeiros trabalhos de melhoramento genético da cultura ainda na década de 80 com a realização de coletas e o estabelecimento de bancos de germoplasma. O programa concentrou-se na década de 90 com a avaliação e caracterização do germoplasma disponível, favorecendo a seleção fenotípica de dezenas de indivíduos (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Em 2004, o programa de melhoramento genético do açaizeiro, deu origem à cultivar BRS-Pará, a primeira de *Euterpe oleracea* a ser lançada e, também, a única existente até o momento. Esta cultivar foi selecionada para as condições de terra firme, cujas características desejáveis são: bom perfilhamento, precocidade de produção, boa produtividade, frutos de coloração violácea e bom rendimento de polpa. A BRS-Pará produz frutos em quase todos os meses e apresenta bons níveis de produtividade, em torno de 10 t/ha/ano a partir do 10º ano de plantio, e bom rendimento de polpa, entre 15% e 25% (OLIVEIRA e FARIAS NETO, 2004).

2.3 Propagação do açazeiro

O açazeiro propaga-se por sementes ou por perfilhos (brotos). A propagação por sementes é o método mais usual e recomendado, por apresentar as melhores vantagens em relação à propagação por perfilhos. As sementes devem ser provenientes de matrizes sadias e vigorosas, que apresentam precocidade, boa produtividade e frutos grandes com polpa suculenta (MARTINS *et al.*, 1999). Deve-se trabalhar sempre com sementes recém-coletadas e hidratadas; pois, as sementes do açazeiro são recalcitrantes, apresentando baixa longevidade e sensibilidade à desidratação (MARTINS *et al.*, 2004).

A propagação assexuada pode ser obtida pela retirada de perfilhos ou brotações que surgem de forma espontânea na base da planta-mãe. Todavia, o índice de pegamento é baixo (60%) permitindo a produção de no máximo seis mudas por planta ao ano. Outro fato a ser considerado é que a quantidade dessas brotações depende da influência do genótipo e do ambiente e que, algumas plantas não exibem a capacidade de emitir brotações, apresentando estipe solitário (OLIVEIRA *et al.*, 2007). Além disso, esse método demanda mão-de-obra e é bastante demorado (NOGUEIRA, 1995). Em virtude dos baixos índices de sobrevivência dos perfilhos em campo, essa técnica tem uso limitado e não é indicada para produção de mudas em escala comercial (NASCIMENTO *et al.*, 2009).

A propagação por sementes é a prática mais comum; entretanto, o processo germinativo é relativamente lento e desuniforme e há a formação de plantas heterogêneas (NASCIMENTO, 2008).

Nos últimos anos está sendo realizado estudos sobre propagação *in vitro* de *Euterpe oleracea*, aplicados aos embriões zigóticos (LEDO *et al.*, 2001) e somáticos (LEDO *et al.*, 2002; SCHERWINSKI-PEREIRA *et al.*, 2012).

2.4 A propagação *in vitro*

As técnicas biotecnológicas, aplicadas como ferramenta auxiliar aos métodos convencionais de melhoramento genético, podem contribuir para a sustentabilidade da agricultura, pela produção de cultivos melhorados e mais compatíveis com o ambiente (XAVIER, 2013).

Dentre as diferentes técnicas biotecnológicas existentes, a propagação *in vitro* é uma das que mais tem atraído a atenção de vários pesquisadores, desde meados do século XX, quando os primeiros laboratórios no Brasil foram criados (BORÉM, 2007).

A cultura de células, tecidos e órgão de plantas compreendem diversas técnicas dentre as quais, destacam-se a germinação *in vitro* e a micropropagação, que são técnicas de propagação vegetativa *in vitro*. Essas técnicas caracterizam-se pelo cultivo asséptico de partes das plantas em condições controladas de nutrição, umidade, luz e temperatura e constituem-se as aplicações mais direta da cultura de células e tecidos (HEERDT, 2008).

A micropropagação proporciona rapidez em relação as outros métodos de propagação vegetativa, obtenção de mudas livres de vírus e outros patógenos, além da possibilidade de sua utilização quando a propagação por técnicas convencionais for muito difícil ou até impossível de ser realizada (HEERDT, 2008). A micropropagação é um método de reprodução assexuada, em que se utilizam explantes do vegetal os quais, por meio de divisões celulares induzidas pelos fitorreguladores, produzem grande quantidade de indivíduos, genética e fenotipicamente idênticos, podendo ser conduzida por organogênese e/ou embriogênese (CARVALHO *et al.*, 2006; BHOJWANI e DANTU, 2013).

A organogênese relaciona-se com a obtenção de eixos caulinares ou radiculares monopolares originados de gemas pré-existentes ou neoformadas. A organogênese pode ser direta ou indireta. No primeiro caso, a partir de um explante primário há a formação de um eixo caulinar a partir de gemas apicais, laterais ou axilares. No segundo caso ocorre a desdiferenciação do explante, resultando na formação de calos, que podem ser definidos como a proliferação de células não diferenciadas, originado meristemóides (TAHIR e STASOLLA, 2006).

Na embriogênese somática, adventícia ou assexual, células somáticas haplóides ou diplóides se diferenciam em plantas completas seguindo estádios de citodiferenciação embriogênicos característicos (GUERRA *et al.*, 1999). Este processo constitui um exemplo

da expressão da totipotencialidade das células das plantas, postulado por Haberlandt (1902) apud VASIL (2008), que afirmava teoricamente que todas as células somáticas, em uma determinada planta, contêm toda a informação genética necessária para a geração de uma nova planta.

Os embriões somáticos tanto de monocotiledôneas como de dicotiledôneas, apresentam características morfológicas semelhantes às do embrião zigótico, tendo uma estrutura bipolar constituída de ápice caulinar e radícula, e passando pelos estágios de desenvolvimento pró-embriônico e embriônico, isto é, globular, cordiforme e torpedo, em dicotiledôneas; globular, torpedo e cotiledonar, em monocotiledôneas (TOONEN e VRIES, 1996; JIMÉNEZ, 2001; PEREIRA, 2007). Essas estruturas se transformam em plantas completas, por meio de uma série de processos clássicos que correspondem aos que ocorrem nos embriões zigóticos (TITON *et al.*, 2007). As semelhanças entre os dois processos envolvem aspectos morfológicos, bioquímicos e moleculares, incluindo a expressão protéica (HAKMAN, 1993; HVOSLEF-EIDE e CORKE, 1997; SGHAIER *et al.*, 2008), gênica (THIBAUD-NISSEN *et al.*, 2003; IKEDA e KAMADA, 2005; SCHMIDT *et al.*, 2006) e diferentes metabólitos (KORMUTÁK *et al.*, 2006; TERESO *et al.*, 2007; FLOH *et al.*, 2007).

Dois padrões distintos de expressão da embriogênese somática *in vitro* são constatados: o padrão indireto e o direto. No padrão direto, os embriões somáticos originam-se de tecidos matrizes, sem a formação de calos (GAJ, 2004; TAHIR e STASOLLA, 2006). No padrão indireto, há um estágio intermediário de calo que apresenta células em distintos estágios de diferenciação, as quais podem adquirir novas competências mediadas por mensageiros químicos específicos e, posteriormente, a formação dos embriões somáticos (GAJ, 2004; SUGIMOTO *et al.*, 2011).

Acredita-se que o padrão direto da embriogênese somática seja característico de explantes que possuem células pré-determinadas para a rota embriogenética, como consequência da retenção de algumas propriedades das células meristemáticas parentais, das quais as células do explante derivam. Isto poderia explicar a tendência da embriogênese somática ocorrer preferencialmente, em explantes derivados de tecidos embrionários ou juvenis. Todavia, a embriogênese somática indireta é considerada como característica de explantes derivados de tecidos mais diferenciados, ou maduros, nos quais as células devem passar por vários ciclos antes de adquirir a condição embriogênica (GUERRA *et al.*, 1999; HARTMANN *et al.*, 2002).

A embriogênese somática é altamente dependente da divisão e desdiferenciação celular para a aquisição de competência celular embriogênica, considerada um dos passos críticos no processo. A desdiferenciação é um processo pelo qual os padrões de transcrição e tradução genômica são alterados, de forma a permitir às células, a definição de um novo padrão de desenvolvimento (FEHÉR *et al.*, 2002).

Alguns autores sugerem uma estratégia a ser aplicada para a indução e a modulação da embriogênese somática. O primeiro passo nessa estratégia consiste em determinar a melhor fonte de explante. No primeiro ciclo, um explante juvenil ou embrionário, como por exemplo, um embrião zigótico imaturo, é excisado e inoculado em meio de cultura suplementado com alguma auxina como o 2,4-D (2,4- diclorofenoxiacético) (GELDNER *et al.*, 2000; GUERRA *et al.* 2006; VIÑAS e JIMÉNEZ, 2011). As culturas são normalmente, mantidas no escuro e geram complexos ou massas celulares pró-embrionárias. Por embriogênese repetitiva, representada por clivagem ou gemação, os complexos pró-embrionários resultam em um ciclo repetitivo de divisões celulares, formando complexos celulares, suspensor-embrionário e embriões somáticos globulares (GUERRA *et al.*, 2006).

Os principais fatores que afetam a indução na formação de embriões somáticos são o genótipo, a origem do explante, a composição do meio de cultura e, particularmente, os reguladores de crescimento. É importante destacar que a seleção do estágio específico de desenvolvimento do explante, as transferências seqüenciais e as condições apropriadas de cultivo como temperatura e luz, são importantes para o sucesso da embriogênese, especialmente, no que se refere à aquisição de competência embriogênica (TORRES *et al.*, 1998).

Em palmeiras, utilizam-se diversas fontes de explantes no cultivo *in vitro*, tais como: embriões zigóticos, tecidos foliares jovens, ápices caulinares, gemas laterais, ápices radiculares e inflorescências (TEIXEIRA *et al.*, 1994; VERDEIL *et al.*, 1994; GUERRA, 1999; TAHIR e STASOLLA, 2006; VIÑAS e JIMÉNEZ 2011; ALMEIDA *et al.*, 2012; SCHERWINSKI-PEREIRA *et al.*, 2012).

O uso de embriões zigóticos como explantes é conveniente, pois os frutos estão facilmente disponíveis, possuem elevado grau de uniformidade fisiológica e podem ser transportados para longas distâncias sem danos aos tecidos (SCHERWINSKI-PEREIRA *et al.*, 2012). As inflorescências constituem um dos explantes mais promissores para o cultivo *in vitro* de palmeiras, uma vez que pode existir mais de 3.000 meristemas florais em cada inflorescência (VERDEIL *et al.*, 1994). O cultivo de ápices caulinares tem sido pouco

frequente em palmeiras, com algumas exceções, tendo em vista o crescimento monopodial que provocaria a eliminação da planta doadora de explante. Entretanto, em plantas que produzem perfilhos na base do estipe como a pupunheira, a tamareira e o açazeiro, os ápices caulinares podem representar uma importante fonte de explante (ASLAM *et al.*, 2011; ALMEIDA *et al.*, 2012).

Para a regeneração de embriões somáticos em monocotiledôneas é muito importante a seleção de explantes contendo regiões meristemáticas (BENSON, 2000). A capacidade de uma célula ou grupo de células tornarem-se embriogênicas também depende do estágio fisiológico e de diferenciação dos tecidos (GUEYE *et al.*, 2009). Tecidos maduros, por exemplo, têm um maior grau de metilação do DNA, o que provoca baixa capacidade de desdiferenciação (TERZI e LO SCHIAVO, 1990). Por isso em palmeiras frequentemente utiliza-se tecido somático imaturo (VIÑAS e JIMÉNEZ, 2011).

Os meios nutritivos utilizados nas diferentes etapas da propagação *in vitro* precisam fornecer as substâncias fundamentais para o crescimento das culturas. Normalmente, são compostos por macro e micronutrientes em diferentes proporções, vitaminas, aminoácidos, fontes de carbono e reguladores de crescimento, além de outras substâncias, como: inositol e ágar (TORRES *et al.*, 1998).

Para completar os compostos sintetizados pelas células, outras substâncias orgânicas podem ser acrescentadas ao meio de cultura. Estas visam suprir as necessidades metabólicas energéticas e estruturais, tais como, aminoácidos e carboidratos. A demanda nutricional varia entre espécies, fato que leva às diferenças entre formulações salinas dos meios de cultura (DUNSTAN *et al.*, 1995).

A indução embriogênica de uma célula somática não é unicamente, dependente do uso de reguladores de crescimento. Choques térmicos, variações nos níveis de pH e utilização de outros produtos químicos podem também induzir competência embriogênica em células somáticas (GUERRA *et al.*, 1999).

Em palmeiras, a embriogênese somática não está completamente estabelecida. Geralmente o uso de auxinas e a indução de calos são pré-requisitos fundamentais para que a célula adquira competência embriogênica (VIÑAS e JIMÉNEZ, 2011). Portanto, o componente fundamental usado como regulador de crescimento para a ativação da divisão celular, tanto *in vivo* quanto *in vitro* é a auxina. De maneira geral, as auxinas sintéticas consideradas potentes, como por exemplo, o 2,4-D, o picloram e o dicamba, são amplamente empregadas em protocolos de embriogênese somática para a maioria das

espécies de palmeiras estudadas (TITON *et al.*, 2007; STEINMACHER *et al.*, 2007; SCHERWINSKI-PEREIRA *et al.*, 2012).

Entre os agentes gelificantes mais utilizados em meios semi-sólidos estão o ágar, o agargel, o phytigel, e a agarose (TORRES, 1998). O carvão ativado pode ser acrescentado ao meio para a absorção de metabólitos que podem ser tóxicos ao cultivo e para prevenir o escurecimento do tecido causado pela oxidação de polifenóis presentes nos explantes (PAN e VAN STADEN, 1998; COSTA *et al.*, 2006; CANTERLE, 2007; SÁENZ *et al.*, 2010). Além disso, a exclusão da luz pela presença do carvão ativado pode exercer um efeito benéfico, proporcionando um ambiente escuro no frasco de cultivo, tendo em vista que a luz aumenta a atividade de enzimas relacionadas a oxidação fenólica (BANDEIRA, 2008; ZAVATTIERI *et al.*, 2010; VIÑAS e JIMÉNEZ, 2011).

Para plantas lenhosas, a embriogênese somática representa um importante método de propagação, já que na organogênese, muitas vezes, há pouca produção de brotos por explante, não compensando o seu uso comercial. Entre as gimnospermas, há exemplos de sistemas de embriogênese somática altamente regenerativos em *Picea abies* (VON ARNOLD *et al.*, 2002) e *Araucaria angustifolia* (GUERRA *et al.*, 1999; FARIAS, 2013).

De modo geral, a principal aplicação comercial da embriogênese somática em espécies florestais tem sido a multiplicação de genótipos superiores (SUTTON, 2002). Em comparação as demais técnicas, a micropropagação apresenta varias vantagens: permite a obtenção de grande quantidade de propágulos (embriões somáticos); possibilita elevado grau de automação, baixando os custos por unidade produzida com a utilização, por exemplo, de biorreatores; os embriões somáticos podem ser produzidos de forma sincronizada; e pode ser utilizada como uma ferramenta integrada em programas de melhoramento genético florestal, em especial quando associada à técnica de criopreservação (BORÉM, 2007). Essa técnica também tem sido utilizada na produção de sementes sintéticas (KIM *et al.*, 2005).

2.5 Citometria de fluxo

As plantas obtidas por cultura de tecidos vegetais são em teoria, clones idênticos às matrizes, pois o crescimento de células *in vitro* e a sua regeneração é um processo assexuado, envolvendo somente divisões mitóticas que, de certo modo, não causam nenhuma variação genética (BAIRU *et al.*, 2011). Contudo, variabilidade genética tem sido observada em várias plantas durante o desenvolvimento *in vitro*. Esse fenômeno é normalmente relacionado à falta de estabilidade genética do material produzido (LARKIN e SCOWCROFT, 1981), caracterizado por uma variação fenotípica de origem genética, ou seja, uma variação cromossômica que pode se tornar herdável nas gerações seguintes, ou epigenética, que é uma variação transitória devido ao estresse fisiológico que o material sofre, quando submetido ao cultivo *in vitro* (ILLG, 1990; BAIRU *et al.* 2011). O risco de variações genéticas são geralmente maiores quando as plantas são adventícias, ou seja, originam-se por meio de calo, de suspensão celular, de protoplastos e de embriogênese somática (BARRUETO, 2010). Phillips *et al.* (1994) consideram esses aspectos e indicam que as variações decorrentes do cultivo *in vitro* apresentariam características de mutagênese auto-imposta devido à quebra do controle do ciclo celular normal.

Dentre as técnicas empregadas para analisar essas variações genéticas está a técnica de citometria de fluxo, que foi originalmente desenvolvida no fim dos anos 50 para contagem e análise de células sanguíneas. Os estudos utilizando citometria de fluxo em espécies vegetais ocorreram apenas no início dos anos 80. Essa tecnologia envolve a análise das propriedades ópticas (dispersão da luz e fluorescência) de partículas que fluem numa suspensão líquida e baseia-se, na intensidade de fluorescência relativa dos núcleos corados específicos para o DNA (LOUREIRO e SANTOS, 2004). Atualmente, a citometria está sendo empregada para avaliar a estabilidade genômica de plantas micropropagadas e vem sendo amplamente utilizada em vários estudos, tais como nas espécies *Juniperus phoeniceae* (LOUREIRO *et al.*, 2007), *Scutellaria baicalensis* (ALAN *et al.*, 2007), *Eucalyptus globulus* (PINTO *et al.*, 2004) e *Quercus robur* (ENDEMANN *et al.*, 2001).

3. CAPITULO I

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM AÇAIZEIRO (*Euterpe oleracea* Mart.) A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS, CARACTERIZAÇÃO MORFOANATÔMICA E ESTABILIDADE GENÔMICA POR CITOMETRIA DE FLUXO

RESUMO

Este estudo teve como objetivos, otimizar o protocolo de embriogênese somática em açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) a partir de EZ maduros e imaturos, caracterizar morfoanatomicamente as diferentes etapas do processo e avaliar a estabilidade genômica de calos, embriões somáticos e plantas regeneradas por citometria de fluxo. Para indução de calos embriogênicos foi testada a auxina picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico) nas concentrações de 225 e 450 μM , e dos estádios fisiológicos de maturação dos EZ (maduro e imaturo). O meio utilizado foi o de MS (Murashige e Skoog) com 30 g.L^{-1} de sacarose, 2,5 g.L^{-1} de Phytigel, 2,5 g.L^{-1} de carvão ativado e 0,5 g.L^{-1} de L-glutamina. Calos embriogênicos com embriões somáticos em início de diferenciação foram transferidos para meio de cultura com 12,3 μM de 2iP e 0,6 μM de ANA e 300 mg.L^{-1} de carvão ativado, visando a diferenciação e maturação de embriões somáticos. A regeneração de plantas foi realizada em meio com 1,0 μM de BAP (N^6 -benzilaminopurina) e 0,5 μM de AG_3 (ácido giberélico). Em meio de indução foi possível observar a formação de calos embriogênicos em todos os tratamentos, independentemente do estágio de desenvolvimento dos EZ testados. O picloram na concentração de 450 μM proporcionou os melhores resultados na formação de calos embriogênicos (84,7%). Na fase de diferenciação e maturação, 100% dos explantes que apresentavam formação de calo embriogênico, formaram embriões somáticos. A maior frequência de regeneração de plantas (58,7%) foi observada no tratamento em que se utilizou meio de indução constituído por 450 μM de picloram e em embriões somáticos obtidos de EZ imaturos. A partir de análises morfoanatômicas comprovou-se que a indução da embriogênese somática apresentou estádios característicos do tipo indireto. As plantas regeneradas apresentaram desenvolvimento normal, com crescimento de raízes e parte aérea. Os calos, embriões somáticos e as plantas obtidas foram analisados por citometria de fluxo, e não apresentaram diferenças significativas no valor estimado do conteúdo de DNA.

Palavras-chave: *Euterpe oleracea*, embriogênese somática, picloram.

CHAPTER I

SOMATIC EMBRYOGENESIS IN AÇAÍ PALM (*Euterpe oleracea* Mart.) FROM ZYGOTIC EMBRYOS, MORPHO-ANATOMICAL CHARACTERIZATION AND GENOMICAL ESTABILITY BY FLUX CITOMETRY

ABSTRACT

This study aimed to developing and optimizing the protocol for somatic embryogenesis in açai palm (*Euterpe oleracea*) from mature and immature zygotic embryos (ZE), to characterize morphologically and anatomically the phases of the process and to analyze the genome stability of calli, somatic embryos (SE) and regenerated plants by citometry of flux. To induce embryogenic calli, the auxin picloram (4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid) was used at the concentration of 225 or 450 μM and both developmental states of the zygotic embryos (mature and immature) were tested. The culture medium was the Murashige & Skoog (MS) supplemented with 30 g.L^{-1} of sucrose, 2.5 g.L^{-1} of Phytigel, 2.5 g.L^{-1} of activated charcoal and 0.5 g.L^{-1} of L-glutamin. Embryogenic calli carrying SE beginning to differentiate were transferred to culture medium containing 12.3 μM of 2iP and 0.6 μM of NAA, and 300 mg.L^{-1} of activated charcoal, in order to induce the differentiation and maturation of the somatic embryos. The regeneration of plants occurred on a medium containing 1.0 μM of N^6 -benzilaminopurin (BAP) and 0.5 μM of giberelic acid (GA_3). At the inducing medium, it was possible to observe the callus formation in all treatments, independently of the developmental stage of the ZE. Using picloram at the concentration of 450 μM gave rise to the best results of embryogenic callus formation (84.7%). At the differentiation and maturation phase, 100% of the explants that showed embryogenic calli leded to the formation of somatic embryos. The highest frequency of plant regeneration (58.7%) was observed on the treatment using immature EZ on an inducing medium containing 450 μM of picloram. Through the morpho-anatomical analysis it could be proved that the induction of somatic embryogenesis showed characteristics stages of the indirect development. The plants regenerated from the embryos showed a normal development, with a normal growing of roots and aerial part. The calli, SE and plants regenerated were analyzed by flow cytometry to quantify the amount of DNA, which showed no differences between the samples.

Key-words: *Euterpe oleracea*, somatic embryogenesis, picloram.

3.1 INTRODUÇÃO

O açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) é uma palmeira encontrada mais frequentemente no estuário do Rio Amazonas (SHANLEY *et al.*, 2010). Os frutos representam o principal produto utilizado pela população amazônica, com os quais prepara-se a bebida "açai", bastante popular no mercado regional (MENEZES *et al.*, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2007). Porém, nas últimas décadas, o mercado para a comercialização do açai vem se expandindo no Brasil e no exterior, com consequente aumento no interesse de produtores brasileiros em cultivar a espécie em escala comercial, ampliando ainda mais as área plantada com essa fruteira na Amazônia (OLIVEIRA *et al.*, 2002; JARDIM, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Apesar dos avanços das pesquisas nos últimos anos, inexistem métodos eficientes de propagação vegetativa das palmeiras, tornando os sistemas de cultivo *in vitro* ferramentas eficientes para viabilizar programas de melhoramento genético e introduzir novos híbridos ou variedades comerciais ao sistema produtivo (SARTORETTO *et al.*, 2008; GOLLE *et al.*, 2009; XAVIER *et al.*, 2013).

Convencionalmente, esta espécie de açazeiro pode ser propagada assexuadamente pela retirada de perfilhos, mas até o momento essa técnica tem uso limitado, permitindo a produção máxima de seis mudas por planta ao ano. Assim o principal mecanismo de propagação utilizado tem sido por sementes (OLIVEIRA *et al.*, 2007), embora seja relativamente lento e desuniforme, ocasionando não raramente a formação de plantas heterogêneas (NASCIMENTO, 2008). Além disso, as sementes do açazeiro são recalcitrantes, apresentando baixa longevidade e sensibilidade à desidratação (MARTINS *et al.*, 2004).

Considerando as dificuldades de propagação e a expansão do mercado para a comercialização de frutos do açazeiro, há necessidade significativa de aumento de plantio e produtividade, sendo necessário a utilização de métodos alternativos de propagação, como a propagação *in vitro*. Neste contexto, a embriogênese somática surge como uma excelente alternativa para a multiplicação de populações mais homogêneas ou para acelerar programas de melhoramento genético por meio da clonagem de híbridos (XAVIER, 2009).

A embriogênese somática tornou-se possível devido à notável plasticidade que as células vegetais possuem (FEHÉR, 2008). Na embriogênese somática, células diferenciadas ou indiferenciadas adquirem a habilidade de tornarem-se embriogênicas

quando geralmente são expostas a um estresse que pode ser provocado pela adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura (THOMPSON, 2008). A partir de então, essas células sofrem uma série de alterações morfológicas e bioquímicas, tornando-se capaz de reverter seu estado de diferenciação em condições específicas, e entrar novamente no ciclo mitótico seguindo rotas morfogênicas que resultam no desenvolvimento de embriões somáticos (GUERRA *et al.*, 1999; FÉHER *et al.*, 2003; GUEYE *et al.*, 2009).

Para a indução da embriogênese somática em monocotiledôneas é muito importante a seleção de explantes contendo regiões meristemáticas (BENSON, 2000). A capacidade de uma célula ou grupo de células se tornarem embriogênicos também depende do estágio fisiológico e de diferenciação dos tecidos dos explantes (GUEYE *et al.*, 2009). Tecidos maduros, por exemplo, geralmente apresentam baixa capacidade de desdiferenciação (TERZI e LO SCHIAVO, 1990). Por isso, em palmeiras, frequentemente utiliza-se tecidos imaturos (VIÑAS e JIMÉNEZ, 2011).

Estudos sobre embriogênese somática a partir do uso de embriões zigóticos como explantes, foram desenvolvidos para algumas espécies de palmeiras como: *Phoenix dactylifera* L. (ASLAM *et al.* 2011; SANÉ *et al.*, 2012), *Elaeis guineensis* Jacq. (AHÉE *et al.*, 1981; TEIXEIRA *et al.*, 1993; SILVA *et al.*, 2012), *Euterpe edulis* Mart. (SALDANHA *et al.*, 2006), *Euterpe oleracea* Mart. (LEDO *et al.*, 2002; SCHERWINSKI-PEREIRA *et al.*, 2012) e *Bactris gasipaes* Kunth (STEINMACHER *et al.*, 2007; ALMEIDA *et al.*, 2012; HERINGER *et al.*, 2013).

Embora, a embriogênese somática seja apontada como um método relativamente seguro de propagação *in vitro*, a ocorrência de variações genéticas no material regenerado tem sido demonstrada (JAIN, 2001; KUBIS *et al.*, 2003; RIVAL *et al.*, 2009). Portanto, a disponibilidade de um protocolo de embriogênese somática, que minimize ou elimine a presença da variação genética do material multiplicado é fundamental para aumentar a eficiência da clonagem assexuada de genótipos elite de *Euterpe oleracea*. Como medida preventiva, recomenda-se a avaliação periódica da estabilidade genômica de materiais sob cultivo. Isto pode ser feito a partir de métodos rápidos e precisos, como a análise por citometria de fluxo. Esta técnica tem a capacidade de detectar precocemente possíveis alterações no conteúdo de DNA nuclear das células, tecidos ou órgãos em cultivo, incluindo plantas completas (RIVAL *et al.*, 1997; NAING *et al.*, 2013; MEDRANO *et al.*, 2014).

Os objetivos deste estudo foram otimizar o protocolo de embriogênese somática em açazeiro a partir de embriões zigóticos maduros e imaturos; caracterizar morfoanatomicamente as diferentes etapas do processo e avaliar a estabilidade genômica de calos, embriões somáticos e plantas regeneradas por citometria de fluxo.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos II da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF.

3.2.1 Material vegetal e desinfestação dos explantes

Neste estudo, utilizaram-se embriões zigóticos oriundos de frutos maduros (160-180 dias pós-antese) e imaturos (90-100 dias pós-antese) de *Euterpe oleracea*, coletados de plantas adultas pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma de açaizeiro da Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA.

Inicialmente, em condições de laboratório, os frutos foram submetidos a um processo de lavagem superficial com água corrente e detergente comercial. Em seguida, os frutos foram manualmente despolidos e levados para a câmara de fluxo laminar para desinfestação, antes da retirada dos embriões zigóticos para cultivo. Para a desinfestação, os frutos foram imersos em álcool 70% por 3 minutos, seguida de imersão em hipoclorito de sódio (contendo 2,5% de cloro ativo) por 30 minutos. Posteriormente, os frutos foram enxaguados por três vezes em água destilada e autoclavada para a remoção residual dos agentes desinfestantes utilizados.

Após a desinfestação, os frutos foram colocados para secarem em placas de Petri contendo discos estéreis de papel filtro por 20 a 30 minutos, sendo então, abertos com o auxílio de pinças e bisturis para a extração dos embriões zigóticos.

3.2.2 Meio de cultura básico e condições de cultivo

O meio básico utilizado em todos os experimentos consistiu de sais e vitaminas do meio de MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), adicionado de 30 g.L⁻¹ de sacarose e 2,5 g.L⁻¹ de Phytigel. A adição de outros componentes orgânicos e inorgânicos aos meios de cultura, além de reguladores de crescimento, foram específicos para cada etapa do cultivo (Tabela 1). O pH dos meios de cultura foi sempre ajustado para $5,8 \pm 0,1$ com 0,1 N de HCl ou 0,1N de NaOH antes da esterilização realizada por 20 minutos em autoclave a 121 °C e pressão de 1,5 kgf/cm².

Nas etapas de indução da embriogênese somática, de diferenciação e maturação de embriões somáticos, os cultivos foram mantidos sob condições de escuro, enquanto que, na fase de regeneração, os cultivos foram colocados em condições de luminosidade de $50 \mu\text{m} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas. Durante todo o experimento a temperatura da sala de crescimento foi de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.2.3 Indução da embriogênese somática

Uma vez excisados, os embriões zigóticos foram cultivados em placas de Petri (90 x 15 mm), seladas com parafilme, contendo 20 mL de meio de MS, acrescido de $2,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de carvão ativado, $0,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de L-glutamina e suplementado com picloram nas concentrações de $225 \mu\text{M}$ e $450 \mu\text{M}$. Os explantes foram mantidos neste meio de cultura por até 30 semanas.

Os subcultivos foram realizados a cada 30 dias. Nesta etapa do experimento foram avaliados a porcentagem de formação de calos não embriogênicos e calos embriogênicos por até 210 dias de cultivo, sendo que também foi avaliado o peso dos calos formados ao final do processo.

3.2.4 Diferenciação e maturação

Para a maturação dos embriões somáticos diferenciados no meio de indução foi utilizado o mesmo meio de cultura de indução, sendo desta vez suplementado com $12,3 \mu\text{M}$ de 2-isopentenil-adenina (2iP) e $0,6 \mu\text{M}$ de ácido naftalenoacético (ANA), além de $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de carvão ativado (Tabela 1). Assim como na fase anterior, os calos embriogênicos foram inoculados em placas de petri (90 x 15 mm), contendo 20 mL de meio de MS. As culturas embriogênicas permaneceram nessas condições por até 12 semanas. Nesta etapa foi avaliada a porcentagem de calos com formação de embriões somáticos.

3.2.5 Regeneração e aclimatização de plantas

Após a diferenciação e maturação, calos com embriões somáticos foram transferidos para meio de regeneração. Nesta etapa avaliou-se o efeito do N^6 -benzilaminopurina (BAP) e do ácido giberélico (AG_3) nas concentrações de $1,0 \mu\text{M}$ e $0,5 \mu\text{M}$, respectivamente. O

AG₃ foi inserido ao meio de cultura por filtração a frio (filtro de 0,22 µm Millipore®) após a autoclavagem do meio de cultura.

Os explantes foram inoculados em frascos de vidro de 250 mL de capacidade, preenchidos com 30 mL de meio de cultura de regeneração, onde permaneceram até que os agrupamentos de embriões somáticos apresentassem crescimento suficiente para serem individualizados. Em meio de regeneração foi avaliada a porcentagem de conversão dos embriões somáticos em plantas.

As plantas regeneradas do processo embriogênico foram retiradas dos tubos de ensaio após atingirem cerca de 5 cm, momento em que foram submetidas à lavagem de suas raízes em água corrente para eliminar o excesso de meio de cultura. Em seguida, as plantas foram plantadas em copos descartáveis de 250 mL de capacidade, preenchidos com Bioplant® e areia lavada (3:1 v/v). Posteriormente, os copos plásticos foram cobertos com pequenos sacos plásticos transparentes com pequenas aberturas e fixados com barbante, para evitar a desidratação dos brotos, sendo mantidos em câmara incubadora a 25 ± 1 °C durante 3 semanas. Posteriormente, as plantas foram transferidas para condições de casa de vegetação.

Tabela 1. Composição básica dos meios de cultura utilizados nos diferentes estádios da embriogênese somática em açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.)

Componentes	Indução	Diferenciação	Regeneração
Meio de cultura	MS	MS	MS
Picloram (µM)	225 e 450	-	-
ANA (µM)	-	0,6	-
2iP (µM)	-	12,30	-
BAP (µM)	-	-	1,0
AG ₃ (µM)	-	-	0,5
Glutamina (g.L ⁻¹)	0,500	-	-
Sacarose (g.L ⁻¹)	30	30	30
Phytigel (g.L ⁻¹)	2,5	2,5	2,5
Carvão ativado (g.L ⁻¹)	2,5	0,300	1,5

3.2.6 Análises estatística

Em todas as etapas o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 2, com duas concentrações de picloram (225 µM e 450 µM) e dois tipos de explantes (embriões zigóticos maduros e imaturos), num total de 4

tratamentos. Cada tratamento foi composto por 15 repetições (placas) contendo oito explantes (embriões zigóticos) por repetição. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade, com auxílio do programa de análises estatísticas Sisvar. (FERREIRA, 2011).

3.2.7 Análises anatômicas

Para as análises anatômicas das diferentes etapas envolvidas com a embriogênese somática em açazeiro, amostras de calos e embriões somáticos foram seccionados e imersos em solução fixadora FAA 70 (Formaldeído, ácido acético e etanol 70%, em razão de 1:1:18 v/v (JOHANSEN, 1940), sob vácuo por 24 h. Subsequentemente, as amostras foram desidratadas em série alcoólica crescente (70-100%), sob vácuo por 1 hora cada série e infiltradas em historesina (Leica®). Cortes seriados transversais e longitudinais (5 µm de espessura) foram obtidos em micrótomo rotativo manual (Leica modelo RM 2125), distendidos e aderidos às lâminas microscópicas em placa aquecida a 40 °C. Posteriormente, os cortes foram corados com azul de Toluidina (O' BRIEN *et al.*, 1965), seguido da montagem entre lâmina-lamínula com Entellan. As fotografias foram realizadas no Laboratório de Fisiologia Vegetal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (UnB), e obtidas em microscópio Leica DM 500, com câmera fotográfica digital Leica (ICC50) e programa Leica Application Suite EZ.

3.2.8 Microscopia eletrônica de varredura

Amostras com calos embriogênicos e embriões somáticos foram processados para análise com microscopia eletrônica de varredura. Para tanto, as amostras foram fixadas em Karnovisk (JOHANSEN, 1940) por 24 h. Em seguida foram lavadas cinco vezes em tampão de cacodilato de sódio a 0,05 M, pH ajustado para 7,1 e pós-fixadas em tampão cacodilato de sódio contendo tretóxido de ósmio 2% (1:1, v/v) por 3 horas. As amostras foram lavadas mais três vezes no mesmo tampão e, então, desidratadas em série alcoólica com etanol a 20, 30, 50, 70, 80, 90% e três passagens em álcool 100%.

Ao final da desidratação alcoólica, as amostras foram levadas para o aparelho de ponto crítico para completar a secagem por meio de CO₂ líquido. As amostras foram

montadas em suporte de alumínio (*stubs*) e aderidas com fita de carbono dupla face e metalizadas com ouro pelo evaporador de ouro SDC 050. Após a metalização as amostras foram observadas em microscópio eletrônico de varredura modelo Zeiss DSM 962.

3.2.9 Análise por citometria de fluxo

Os materiais biológicos utilizados nas análises de citometria de fluxo compreenderam em calos embriogênicos, embriões somáticos em estágio globular e torpedo, além de folhas de plantas regeneradas por embriogênese somática. A amostragem dos calos embriogênicos e embriões somáticos foi realizada no tratamento que promoveu os melhores resultados quanto à regeneração dos embriões somáticos.

Para obtenção da suspensão de núcleos, o material vegetal (calos, embriões somáticos no estágio globular e torpedo e plantas regeneradas) foi inicialmente triturado em 1,0 mL de tampão *Marie* (MARIE e BROWN, 1993), adicionado à placa de Petri na presença de gelo. Em seguida, o tecido triturado em suspensão foi aspirado através de pipeta de *Pasteur* e, posteriormente, filtrado em malha de 42 µm (Millipore®) para remoção de restos celulares. Por fim, a suspensão de núcleos foi corada com 25 µL de uma solução de iodeto de propídeo (1 mg/mL). Em cada amostra, pelo menos 20 mil núcleos foram analisados quanto à emissão de fluorescência para quantificação relativa do DNA nuclear. As análises foram realizadas em Citômetro de Fluxo Accuri C6 (Becton Dickinson®) e os histogramas gerados foram analisados no software *BD Accuri Cflow Plus*. As quantidades de DNA (pg) foram obtidas por meio da equação:

Quantidade de DNA (pg) = (posição do pico G1 da amostra/posição do pico G1 da referência) x DNA padrão.

Foi utilizado como padrão externo de referência, folhas jovens de soja (*Glycine max*) 2C= 2,65 pg (DOLEZEL *et. al.*, 1998). A quantidade de DNA estimada foi comparada mediante aplicação do teste de Tukey ($p < 0,05$) pelo programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Indução da embriogênese somática

Os embriões zigóticos (EZ) de açazeiro (Figura 1-A) inoculados em meio de cultura para formação de calos, apresentaram aparente intumescimento e início de formação de calos a partir de três semanas de cultivo em todos os tratamentos testados (Figura 1-B). A formação de calos primários ocorreu após 60 dias de cultivo em meio de indução, principalmente, na região proximal do EZ (Figura 1-C). Esses calos progrediram para calos embriogênicos a partir aos 90 dias de cultivo (Figura 1-D). Neste período, os calos formados foram classificados em dois tipos, de acordo com o aspecto e coloração. O primeiro tipo foi classificado como embriogênico e apresentava aspecto granular e coloração amarelada (Figura 1-D). O segundo tipo, caracterizado como não embriogênico, apresentava aspecto esponjoso e coloração esbranquiçada (Figura 1-E).

Aproximadamente após 160 dias, verificou-se que a maioria dos calos embriogênicos apresentaram a formação inicial de estruturas nodular amareladas e translúcidas (Figura 1-F), que desenvolveram embriões somáticos globulares na superfície do calo aos 180 dias de cultivo (Figura 1-G). Aos 210 dias foi possível observar que as estruturas globulares desenvolveram-se em embriões globulares conectados através de estruturas semelhantes a suspensor (Figura 1-H). Neste estágio, notou-se uma alta frequência de formação de embriões somáticos sobre a superfície dos explantes (Figura 1-I), fato que levou a transferência dos explantes para o meio de diferenciação e maturação.

Na etapa de indução, verificou-se que as concentrações de picloram utilizadas proporcionaram diferenças significativas ($P \leq 0,05$) em relação a porcentagem de formação de calos embriogênicos e não embriogênico. A concentração de 450 μM proporcionou média de 84,7%, significativamente superior quando comparada à concentração de 225 μM (44,9%) para formação de calos embriogênicos. Adicionalmente, não foram observadas respostas diferenciadas dos explantes utilizados (EZ imaturo e maduro) em relação à formação de estruturas embriogênicas (Tabela 2). Entretanto, a indução da embriogênese somática em *Euterpe oleracea*, já foi relatada utilizando-se como explantes, embriões zigóticos maduros (LEDO *et al.*, 2002), e imaturos (SCHERWINSKI-PEREIRA *et al.*, 2012).

Os protocolos de embriogênese somática, para a maioria das espécies de Arecaceae, descrevem que os meios de cultura de indução precisam ser constituídos por altas

concentrações de auxinas consideradas fortes, como o 2,4-D ou picloram (GUERRA e HANDRO, 1998; PÉREZ-NUÑEZ *et al.*, 2006; SÁENZ *et al.*, 2006; SCHERWINSKI-PEREIRA *et al.*, 2012).

A auxina picloram tem sido empregada em algumas espécies de palmáceas com sucesso na obtenção de culturas embriogênicas, como em *Euterpe oleracea* (SCHERWINSKI-PEREIRA *et al.*, 2012), *Phoenix canariensis* e *Areca catechu* (KARUN *et al.*, 2004), *Bactris gasipaes* (STEINMACHER *et al.*, 2007) e *Elaeis guineensis* (SCHERWINSKI-PEREIRA *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2012; BALZON *et al.*, 2013). Neste trabalho, o uso de picloram proporcionou mais de 84% de formação de calos embriogênicos quando na concentração de 450 µM, corroborando com os resultados obtidos para outras espécies do gênero.

Tabela 2. Efeito das concentrações de picloram (225 e 450 μM) e das características dos embriões zigóticos usados como explante (imaturo e maduro) sobre a porcentagem de calos não embriogênicos, embriogênicos e sobre o peso dos calos após 30 semanas de indução. Porcentagem de calos embriogênicos com embriões somáticos após 12 semanas em meio de maturação e frequência de regeneração em açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.)

Picloram	Indução da embriogênese somática						Diferenciação/ Maturação			Regeneração					
	Calos não embriogênicos (%)			Calos embriogênico (%)			Peso de calos (g)			Calos embriogênicos com embriões somáticos (%)			Frequência de regeneração (%)		
	EZ imaturo	EZ maduro	Média	EZ imaturo	EZ maduro	Média	EZ imaturo	EZ maduro	Média	EZ imaturo	EZ maduro	Média	EZ imaturo	EZ maduro	Média
225 μM	53,7aA	54,9Aa	54,3a	46,4bA	43,5bA	44,9b	0,52aA	0,62aA	0,57a	100,0	100,0	100,0a	25,0aA	11,7aA	18,3a
450 μM	16,0bA	14,5bA	15,2b	84,0aA	85,4aA	84,7a	0,70aA	0,63aA	0,66a	100,0	100,0	100,0a	58,7aA	0,0aB	29,3a
Média	34,8A	34,7A		65,2A	64,4A		0,61A	0,61A		100,0A	100,0A		41,8A	5,8B	

Letras distintas minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.3.2 Diferenciação e maturação

Após 30 dias de cultivo em meio de diferenciação e maturação verificou-se o desenvolvimento de embriões globulares brancos e compactos (Figura 3-J). Observou-se também nesta etapa, a ocorrência de embriogênese secundária, onde novos embriões somáticos foram formados sobre os embriões somáticos já existentes (Figura 1-L). Resultados semelhantes foram evidenciados em estudos com outras palmeiras, onde os embriões somáticos apresentavam ocorrência de embriogênese secundária (STEINMACHER *et al.*, 2007; SCHERWINSKI-PEREIRA *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2012). Isto pode ser vantajoso para a propagação de plantas, devido ao aumento do número de embriões somáticos formados ao final do processo de embriogênese (RAEMAKERS *et al.*, 1995).

Ainda nesta etapa, foi observado aumento no número de agrupamentos ('clusters') de embriões somáticos com aspecto translúcidos na fase torpedo (Figura 1-M). Aos 80 dias, notou-se a presença de aglomerados de embriões no estágio de torpedo com aspecto leitoso, fato característico de embriões somáticos maduros, prontos para iniciarem a germinação (Figura 1-N).

A expressão de um modelo de embriogênese somática direta, repetitiva e não sincronizada de alta frequência foi alcançada em embriões zigóticos maduros de *Euterpe oleracea*, após a formação de calos e transferência destes, para meio de maturação e diferenciação, na presença de ANA e 2iP (LEDO *et al.*, 2002). Resultados semelhantes também foram obtidos na fase de maturação do palmito *E. edulis*, ao eliminar a auxina do meio de cultura e substituí-la por 2iP e ANA para prosseguir com a expressão da ES em embriões somáticos (GUERRA, 1988; GUERRA e HANDRO, 1998). No presente trabalho, observou-se que 100% dos explantes que apresentaram formação calo embriogênico na fase de indução formaram embriões somáticos (Tabela 2). Os resultados obtidos podem caracterizar este protocolo como sendo um modelo de embriogênese de alta frequência, repetitiva e não sincronizada, muito embora tenha ocorrido de maneira indireta, ou seja, passando por um estágio de formação de calos, contrariamente aos resultados observados nos estudos conduzidos por Ledo *et al.* (2002), Guerra (1988) e Guerra e Handro (1998).

3.3.3 Regeneração e aclimatização de plantas

Após 12 semanas em meio de diferenciação e maturação, os explantes com embriões somáticos diferenciados foram transferidos para meio de regeneração contendo BAP (N⁶-benzilaminopurina) e AG₃ (ácido giberélico) nas concentrações de 1,0 µM e 0,5 µM, respectivamente. Verificou-se que após 60 dias de cultivo em meio de regeneração ocorreu o início da germinação dos embriões somáticos (Figura 1-O). A maioria das plantas regeneradas apresentou desenvolvimento normal, com desenvolvimento de parte aérea e raízes (Figura 1-P). A maior frequência de conversão de embriões somáticos em plantas foi observado em embriões somáticos provenientes de EZ imaturos induzidos em meio com picloram na concentração de 450 (58,7%) conforme Tabela 2.

Ledo *et al.* (2002) e Scherwinski-Pereira *et al.* (2012), utilizaram para regeneração de *Euterpe oleracea*, meio de cultura sem adição de reguladores de crescimento, e obtiveram a germinação de embriões somáticos. Em protocolos de embriogênese somática, a germinação dos embriões somáticos é usualmente realizada em meios de cultura livre de reguladores de crescimento. Contudo, em algumas espécies, o uso de alguns tipos de citocininas como o BAP melhoram o desenvolvimento e, conseqüentemente, as taxas de germinação dos embriões somáticos (SWATI *et al.*, 2002). Como no presente estudo, em que o uso de meio de cultura contendo BAP e AG₃ também proporcionou a germinação de embriões somáticos de *Euterpe oleracea*. Em *Melia azedarach*, a germinação de 100% dos embriões somáticos foi obtida quando esses foram transferidos para um meio com baixas concentrações de AG₃ e BAP e livre de auxinas (SHARRY *et al.*, 2006).

Em palmeiras, a baixa conversão de embriões somáticos em plantas tem sido relada como uma das dificuldades de desenvolver protocolos eficientes de embriogênese somática (MOURA *et al.*, 2009; SÁENZ *et al.*, 2006; PÉREZ-NUÑES *et al.*, 2006). No presente estudo, a maior taxa de conversão de embriões somáticos em plantas foi de 58,7%, quando cultivados em meio contendo BAP e AG₃. Isto sugere que esses reguladores podem ser indicados para a conversão de embriões somáticos em plantas de açaizeiro.

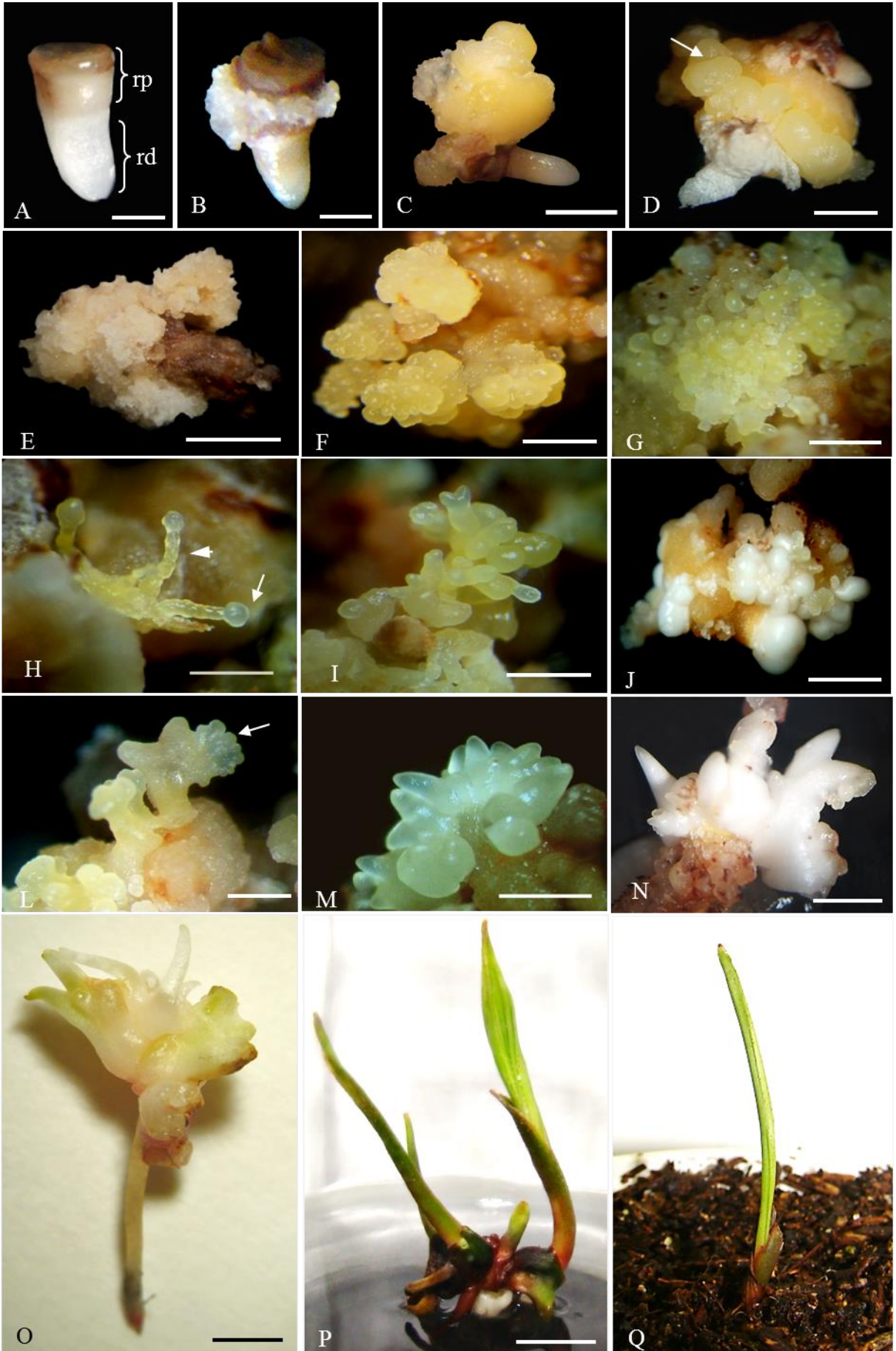


Figura 1. Embriogênese somática e regeneração de plantas a partir de embriões zigóticos de açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.). **A-** Aspecto do embrião zigótico utilizado nos experimentos. RP: região proximal, RD: região distal (barra=1 mm); **B-** Embrião zigótico intumescido na região proximal e início da formação de calo primário, após três semanas de cultivo em meio de indução (barra= 1 mm); **C-** Desenvolvimento do calo primário, após 60 dias de cultivo em meio de indução (barra=2 mm); **D-** Crescimento do calo primário e início do desenvolvimento de calo embriogênico (seta), aos 90 dias após cultivo em meio de indução (barra= 2 mm); **E-** Calo não embriogênico (barra= 5 mm); **F-** Calo embriogênico apresentando o desenvolvimento de estruturas granulares embriogênicas, aos 160 dias após cultivo em meio de indução (barra= 2 mm); **G-** Desenvolvimento de embriões globulares na superfície do calo embriogênico, aos 180 dias após cultivo em meio de indução (barra= 4 mm); **H-** Detalhe do desenvolvimento dos embriões somáticos globulares (seta) e do suspensor (cabeça da seta), aos 210 dias após cultivo em meio de indução (barra= 1 mm); **I-** Agrupamento ('cluster') de embriões somáticos, após 210 dias de cultivo em meio de indução (barra= 4 mm); **J-** Diferenciação e maturação de embriões somáticos, após 30 dias de cultivo em meio de diferenciação e maturação (barra= 4 mm); **L-** Embriões somáticos com início de embriogênese secundária (seta) (barra= 2 mm); **M-** Agrupamento ('cluster') de embriões somáticos transparentes (imaturos) no início do estágio torpedo (barra=1 mm); **N-** Embriões somáticos no estágio torpedo com aspecto leitoso (maduro para a germinação), após 80 dias de cultivo em meio de diferenciação e maturação (barra= 4 mm); **O-** Embriões somáticos em estágio cotiledonar (barra= 4mm); **P-** Plantas completas obtidas a partir de embriões somáticos (barra=1cm); **Q-** Aclimatização de plantas regeneradas por embriogênese somática.

3.3.4 Análises anatômicas

Aos 60 dias após cultivo em meio de indução verificou-se o desenvolvimento de calos de coloração amarelo claro e aspecto friável. Por meio de secções histológicas desse tipo de calo, observou-se a formação de camadas de células meristemáticas (regiões mais coradas) (Figura 2-A). Estas regiões se diferenciaram das demais regiões dos calos embriogênicos por apresentarem agrupamentos de células pequenas, isodiamétricas, de citoplasma denso e núcleo conspícuo, com regiões em intensa divisão celular, constituindo centros meristemáticos (Figura 2-B). De acordo com Fehér *et al.* (2003), a formação de centros meristemáticos, e finalmente, de um órgão, está relacionada à capacidade de uma célula em responder a sinais específicos, provavelmente de natureza hormonal.

No estágio embriogênico dos calos, ocorreram agrupamentos de células indicando a formação de pró-embriões, observados isolados e na periferia dos calos, sendo formados por células com núcleos evidentes (Figura 2-C). No presente estudo, pró-embriões foram visualizados entre células de regiões meristemáticas, sugerindo um padrão de origem multicelular.

Na região periférica de calos embriogênicos foram visualizados embriões em fase globular com suspensor (Figura 2-D). De acordo com Heidstra (2007), a presença de um suspensor confirma a origem unicelular desses embriões, uma vez que tal estrutura indica que suspensor e o embrião são formados a partir da divisão assimétrica de uma única célula. Moura *et al.*, (2008), relataram que em *Acrocomia acuelata*, a formação de pró-embriões teve origem unicelular, além destes, embriões somáticos globulares de origem multicelular também se formaram. Em *Cocos nucifera*, a embriogênese somática teve origem unicelular (DUSSERT *et al.*, 1995) e multicelular (FERNANDO *et al.*, 2003; SAÉNZ *et al.*, 2006) e também foi observada a partir de regiões meristemáticas.

Aos 140 dias após cultivo em meio de indução, notou-se aglomerados de embriões somáticos com protoderme diferenciada (Figuras 2-E e F). Observou-se também desenvolvimento de embriões globulares isolados (Figuras 2-G e H). Histologicamente, os embriões de origem multicelular apresentam-se fusionados ao tecido de origem, podendo ocorrer também, a fusão de embriões somáticos (WILLIAMS e MAHESWARAN, 1986).

Em meio de diferenciação, foram observados embriões somáticos já formados com polaridade estabelecida, evidenciada pelo desenvolvimento de cotilédone nos embriões somáticos em fase torpedo com células parenquimáticas, protoderme delimitada e presença

do procâmbio (Figura 2-I). Além disso, foram observados cordões de procâmbio já apresentando elementos traqueais, que estavam dispostos em vários planos no calo (Figura 2-I, J), e idioblastos contendo ráfides (Figura 2-L). Desenvolvimentos semelhantes aos observados no presente estudo, ocorreram em outras espécies de palmeiras como, *Cocos nucifera* (FERNANDO *et al.*, 2003), *Phoenix dactylifera* (SANÉ *et al.*, 2006) e *Elaeis guineenses* (SILVA *et al.*, 2012), que também apresentaram embriões somáticos apresentando bipolaridade e cotilédones diferenciados.

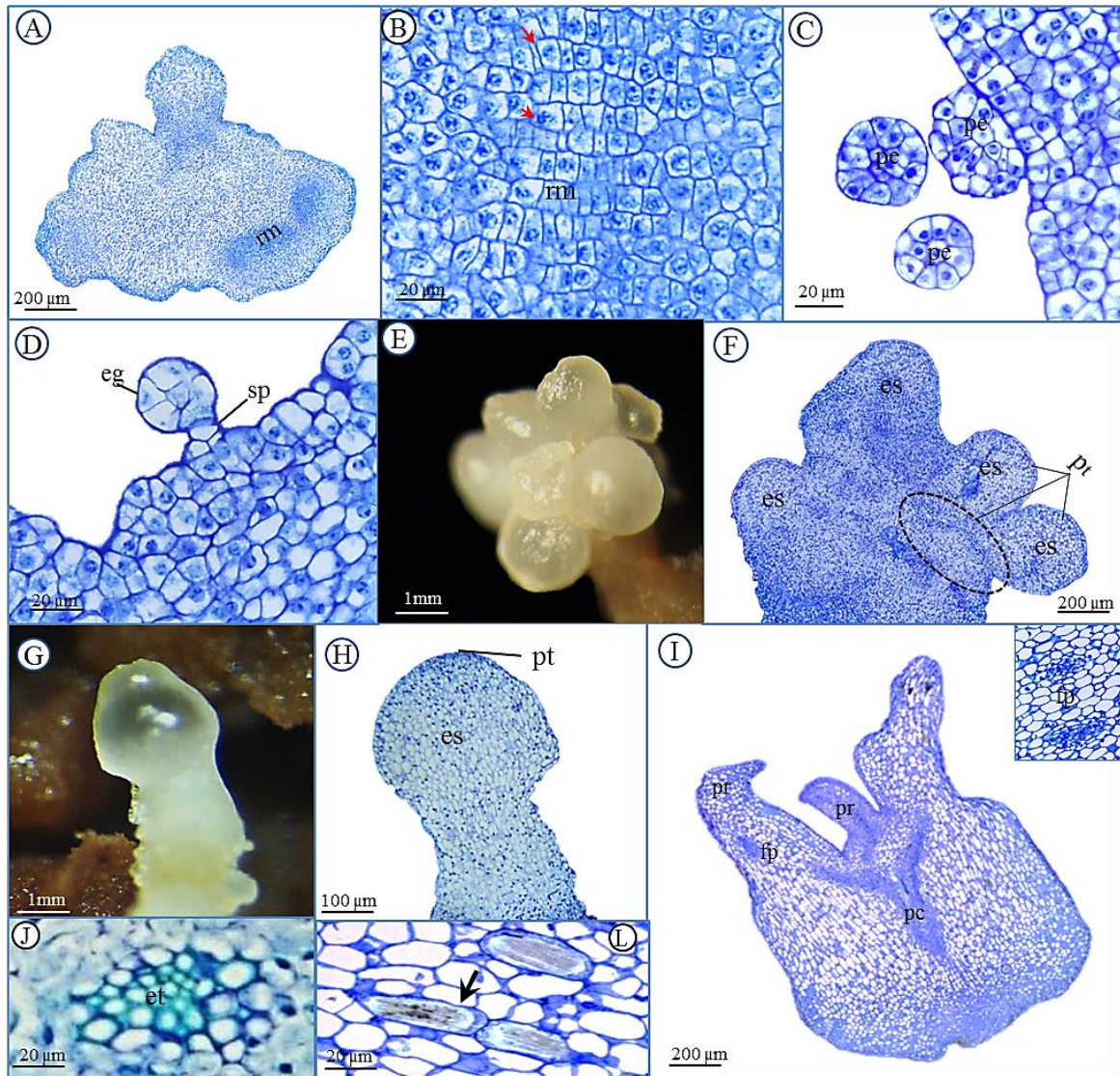


Figura 2. Caracterização histológica da embriogênese somática em açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.). **A:** Calo embriogênico nodular constituído por regiões meristemáticas; **B:** Detalhe da região meristemática em intensa divisão celular (setas); **C:** Desenvolvimento de pró-embriões; **D:** Embrião somático globular apresentando suspensor; **E:** Desenvolvimento de embriões somáticos em estágio globular; **F:** Secção longitudinal de embriões somáticos fusionados apresentando protoderme definida; **G:** Embrião somático em estágio globular; **H:** Secção longitudinal de embrião globular; **I:** Embriões somáticos em estágio torpedo apresentando protoderme e feixes procambiais, detalhe do feixe procambial e início de desenvolvimento de colédone; **J:** Detalhe de cordões de procâmbio apresentando elementos traqueais; **L:** idioblastos contendo ráfides (seta), observados em embrião torpedo. **eg**=embrião globular, **es**=embrião somático, **et**= elementos traqueais, **fp**=feixes procambiais, **pe**= pró-embrião, **pt**=protoderme, **rm**= região meristemática, **sp**=suspensor.

3.3.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Através dos estudos de MEV constatou-se o desenvolvimento de estruturas com morfologia celular isodiamétrica (Figura 3- A), característica de calos embriogênicos (APPEZZATO-DA-GLÓRIA e CARMELLO-GUERREIRO, 2003). Foi possível observar o início do desenvolvimento de embriões somáticos em estágio globular na superfície de calos embriogênicos (Figura 3-B), os quais progrediram para a formação de embriões globulares característicos e embriões somáticos com suspensor (Figura 3-C). O desenvolvimento foi assincrônico e em número elevado, sendo possível observar também diversos embriões somáticos agrupados em uma massa comum (Figura 3-D). Além das formas da embriogênese somática primária, os estudos através da MEV mostraram uma a formação de embriões advindos de embriogênese secundária (Figuras 3-E e F).

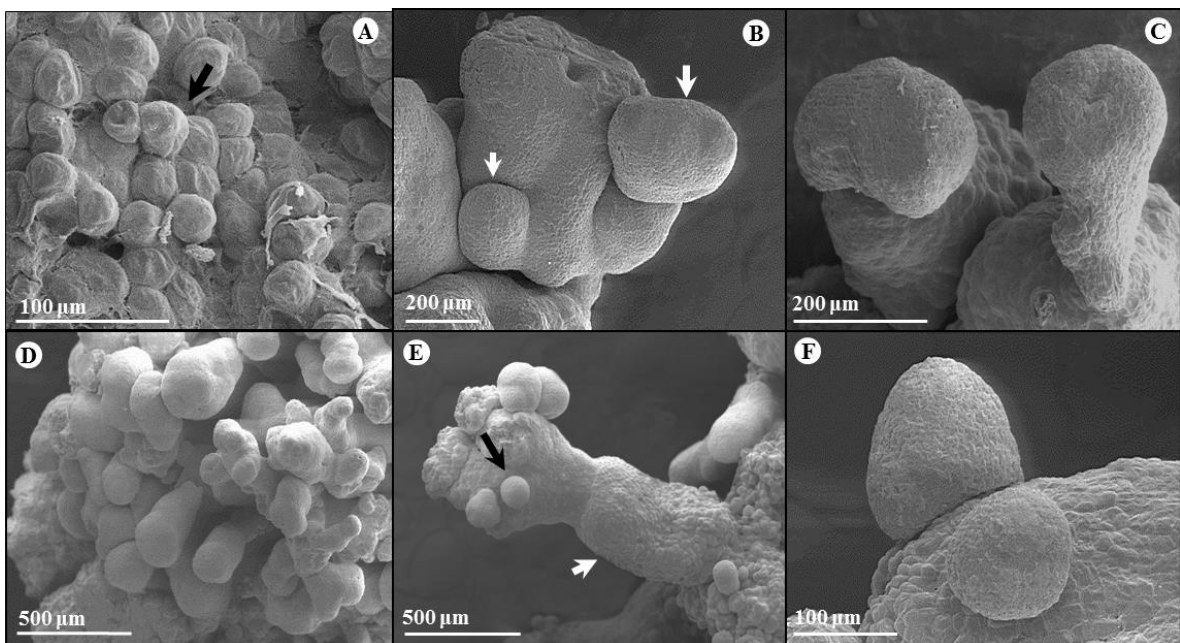


Figura 3. Eletromicrografia de varredura durante a indução de embriões somáticos de açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.). **A:** Calo com células isodiamétricas; **B:** Desenvolvimento inicial de estrutura globular (seta) e embrião somático globular (seta maior); **C:** Embrião somático com suspensor; **D:** “Cluster” de embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento; **E:** Embrião somático globular com suspensor (seta branca), apresentando desenvolvimento de embriões somáticos secundários (seta preta); **F:** Figura E (seta preta) ampliada, embriões somáticos secundários.

3.3.6 Análise por citometria de fluxo

As amostras de plantas regeneradas, embriões somáticos e calos embriogênicos, foram analisadas por citometria de fluxo. O valor estimado do conteúdo de DNA nuclear nos diferentes estádios de desenvolvimento da embriogênese somática não apresentaram diferenças significativas. Os valores estimados do conteúdo de DNA nuclear para calo embriogênico, calo com embriões globulares, calos com embriões torpedo e plantas regeneradas foram de 7,82 pg, 7,92 pg, 8,04 pg e 8,09 pg, respectivamente (Tabela 3).

As condições de estresse impostas pelo sistema *in vitro* durante o isolamento de explantes e a reprogramação celular podem favorecer a ocorrência de variações genéticas (JAIN, 2001). Além da composição física e/ou química do meio de cultivo, o tipo de explante e o genótipo também influenciam a extensão dessa instabilidade genética (JAIN, 2001; BENNICI *et al.*, 2004; ALAN *et al.* 2007). Outro fator que pode favorecer o aumento da instabilidade genética de cultivos *in vitro* é o estabelecimento de culturas prolongadas (JAIN, 1998; VON ARNOLD *et al.*, 2002; ETIENNE e BERTRAND, 2003). No entanto, apesar do longo tempo de cultivo *in vitro* e das elevadas concentrações de auxina utilizadas neste estudo, não houve variação significativa nos conteúdos de DNA nuclear em nenhuma das etapas do estudo, incluindo as plantas regeneradas.

Até o momento, só existe um trabalho estimando a quantidade de DNA em plantas de *Euterpe oleracea*, mas não há relatos de estudos avaliando a estabilidade genômica de plantas dessa espécie obtidas a partir de cultivos *in vitro*. De acordo com o trabalho realizado por Oliveira (2011), a quantidade relativa de DNA nuclear em *Euterpe olerace* é de 8,44 pg, um valor bastante próximo do obtido em nosso trabalho. Essas pequenas discrepâncias com relação ao conteúdo de DNA de açazeiro podem ser devido às diferenças entre a origem do material vegetal, metodologia e padrão de referência utilizados.

A ES indireta é caracterizada pela presença de uma fase de formação de calo antes do desenvolvimento de estruturas organizadas (COSTA *et al.* 2006). Geralmente, culturas de calos embriogênicos têm sido consideradas mais susceptíveis às variações genéticas (BERTIN e BOUHARMONT 1997, SKIRVIN *et al.*, 2000, SMÝKAL *et al.* 2007). Neste estudo a ES seguiu o padrão indireto, e ao avaliar o conteúdo de DNA de calos embriogênicos, além de embriões somáticos e plantas regeneradas, não foram detectadas variações em nenhuma das fases analisadas (Tabela 3 e Figura 4). Resultados semelhantes

aos obtidos nesse estudo, foram observados ao analisar calos e plantas de *Elaies guineenses* (RIVAL *et al.*, 1997), embriões somáticos e plantas de *Chrysanthemum morifolium* (NAING *et al.*, 2013), plantas de híbridos de *Pennisetum* sp. (CAMPOS *et al.*, 2009) e plantas de *Musa acuminata Colla* (MEDRANO *et al.*, 2014), nos quais não foram encontradas variações no conteúdo de DNA em nenhum dos estádios estudados.

Tabela 3. Conteúdo médio de DNA nuclear (pg) estimado por citometria de fluxo de estruturas embriogênicas e de plantas regeneradas por embriogênese somática em açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.), induzidos a partir de embriões zigóticos imaturos cultivados em meio MS suplementado com 450 µM de picloram

Estádio de desenvolvimento	Média do pico	Conteúdo de DNA nuclear (pg/2C)	Genoma 1C (Mpb)	CV (%)
Calo embriogênico	526,49 ± 11 ^x	7,82 ± 0,16 a ^y	3823,98 ^z	4,64 ^v
Embrião globular	535,80 ± 15	7,92 ± 0,21 a	3872,88	4,71
Embrião torpedo	544 ± 27	8,04 ± 0,38 a	3931,56	5,00
Plantas regeneradas	540,37 ± 16	8,09 ± 0,18 a	3956,01	4,73

^x Média do pico G0/G1 de *Euterpe oleracea* em relação ao padrão de referência externo *Glycine max* acrescido do desvio padrão médio; ^y Médias seguidas por mesma letra não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade; ^z Média do tamanho do genoma 1C, onde 1 pg DNA = 978 Mpb (DOLEZEL *et al.*, 2003); ^v Média do coeficiente de variação do pico G0/G1

A confiabilidade na estimativa de DNA nuclear obtidas neste trabalho por meio de citometria de fluxo pode ser comprovada de acordo com os coeficientes de variação (CVs) que apresentaram média de 4,77%. De acordo com Dolezel e Bartos (2005), valores de até 5% são considerados aceitáveis em estudos de citometria de fluxo vegetal.

Os histogramas obtidos por meio das análises por citometria de fluxo em cada etapa de desenvolvimento da ES em *Euterpe oleracea* (calo embriogênico, embrião somático, torpedo e plantas regeneradas), geraram picos bem afilados, indicando boa qualidade e confiabilidade dos resultados obtidos. Os histogramas representativos a cada etapa da ES podem ser observados nas Figuras 4- A, B, C e D.

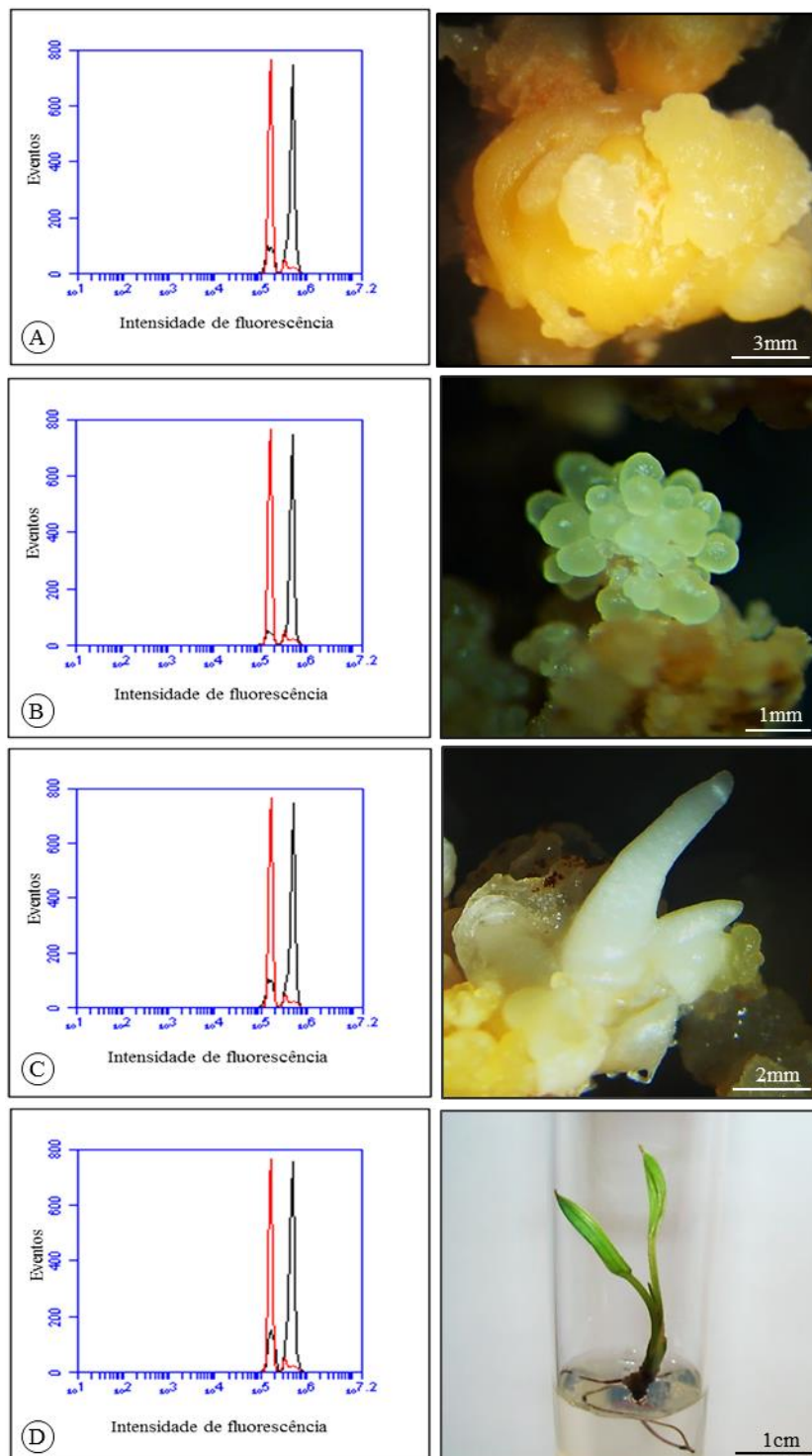


Figura 4. Histogramas obtidos pela análise de citometria de fluxo nas diferentes etapas da embriogênese somática em açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.). Os picos à esquerda de cada histograma correspondem ao G1 do padrão externo de referência *Glycine max* e os picos à direita correspondem aos de açazeiro. A: calos embriogênicos; B: embriões em estágio globular; C: embrião torpedão; D: plantas regeneradas.

CONCLUSÕES

- A embriogênese somática a partir de embriões zigóticos de açazeiro segue um modelo indireto, de alta frequência e repetitivo;
- A concentração mais responsiva de picloram para a indução da embriogênese somática de açazeiro a partir de embriões zigóticos é de 450 μM ;
- Não há diferenças nas taxas de indução da embriogênese somática em açazeiro quando se usa embriões zigóticos maduros ou imaturos;
- Explantes embriogênicos provenientes de embriões zigóticos imaturos são explantes mais responsivos para regeneração de plantas de açazeiro quando comparados aos embriões zigóticos maduros;
- Os diferentes estádios de desenvolvimento da embriogênese somática em açazeiro, a partir de embriões zigóticos, analisados por citometria de fluxo, não apresentam diferenças significativas no valor do conteúdo de DNA nuclear.

4. CAPITULO II

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM AÇAIZEIRO (*Euterpe oleracea* Mart.) A PARTIR DE INFLORESCÊNCIAS E FOLHAS IMATURAS DE PLANTAS ADULTAS

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo induzir a embriogênese somática em açaizeiro a partir de folhas e inflorescências imaturas de plantas adultas, além de avaliar tipos de auxinas e a influência dos diferentes estádios de desenvolvimento das inflorescências e das diferentes regiões das folhas utilizadas como explantes. Para tanto, explantes provenientes de inflorescências e folhas imaturas foram colocadas em meio de cultura de MS, adicionado de 30 g.L⁻¹ de sacarose, 0,5 g.L⁻¹ de L-glutamina, 2,5 g.L⁻¹ de carvão ativado e 2,5 g.L⁻¹ de Phytigel, além das auxinas picloram e 2,4-D na concentração de 450 µM. Foram testadas inflorescências imaturas em diferentes estádios de desenvolvimento (estádios I= 6 cm; II= 8 cm e III= 12 cm), e folhas imaturas de diferentes regiões foliares do palmito (basal, mediano e apical). Para a diferenciação de embriões somáticos, calos embriogênicos e embriões somáticos foram transferidos para meio de cultura com as concentrações de picloram e 2,4-D reduzidas para 0,1 mg.L⁻¹. Embriões somáticos em início de diferenciação foram transferidos para meio de cultura com 12,3 µM de 2iP e 0,6 µM de ANA para a maturação de embriões somáticos. Verificou-se que a auxina picloram proporcionou os melhores resultados na indução de calos embriogênicos em ambos os explantes testados. Os diferentes estádios de desenvolvimento das inflorescências não apresentaram diferenças significativas entre os estádios testados, enquanto que nas folhas imaturas resultados superiores para a formação de calos foram observados em explantes provenientes das regiões basal e mediana do palmito. Na etapa de diferenciação, calos embriogênicos provenientes de inflorescências imaturas em meio de cultura com picloram apresentaram até 100% dos explantes diferenciando embriões somáticos, que progrediram lentamente para estádios de torpedo em meio de maturação. Já em calos embriogênicos provenientes de folhas imaturas a diferenciação de embriões somáticos foi observada somente em explantes cultivados em meio suplementado com picloram, em porcentagens que atingiram até 50% dos explantes da região mediana do palmito, embora esses embriões somáticos não tenham apresentado progressão para estádios mais tardios de desenvolvimento. Os resultados obtidos sugerem que tanto os explantes provenientes de inflorescências como de folhas imaturas podem ser utilizados como fontes de explantes para a embriogênese somática em plantas adultas de açaizeiro.

Palavras chaves: *Euterpe oleracea*, inflorescência imatura, folha imatura e embriogênese somática

CHAPTER II

SOMATIC EMBRYOGENESIS IN AÇAÍ PALM (*Euterpe oleracea* Mart.) FROM INFLORESCENCES AND IMMATURE LEAVES OBTAINED FROM ADULT PLANTS

ABSTRACT

This study aimed to induce somatic embryogenesis in açai palm using inflorescences and immature leaves explants from adult plants and to analyse the influence of two auxins and the developmental stages of the explants on the embryogenic answer. The explants from inflorescences and immature leaves were inoculated at culture medium MS supplemented with 30 g.L⁻¹ of sucrose, 2.5 g.L⁻¹ of Phytigel, 2.5 g.L⁻¹ of activated charcoal and 0.5 g.L⁻¹ of L-glutamin, 2.5 g.L⁻¹ of activated charcoal and two auxins, picloram or 2,4-D, at the concentration of 450 µM for the callus induction. Immature inflorescences at three developmental states (I = 6 cm; II = 8 cm and III = 12 cm) and immature leaves from different regions (basal, median and apical) of the heart of palm were tested. To the differentiation of the somatic embryos, embryogenic calli and SE were transferred to a culture medium containing the same original auxin, picloram or 2,4-D, with the concentration reduced to 0.1 mg.L⁻¹. Somatic embryos at the beginning of differentiation were transferred to a culture medium containing 12.3 µM of 2iP and 0.6 µM of NAA for the maturation of the somatic embryos. The auxin picloram showed best results at embryogenic callus induction in both inflorescences and immature leaves. The inflorescences at different state of development did not show significant differences at the end, while for the immature leaves, explants from the portions basal and median of the heart of palm showed higher results at the induction of callus phase. At the differentiation phase, embryogenic calli from the immature inflorescences grown at medium containing picloram showed 100% of differentiation to somatic embryos, and these developed slowly to torpedo stage under the maturation medium. While considering the embryogenic calli from the immature leaves, the differentiation of somatic embryos occurred only on explants cultivated originally at medium supplemented with picloram, reaching the percentage of 50% of the explants from the median region, although, those somatic embryos did not developed to later stages of development. The results suggest that explants from both immature inflorescences and leaves from adult plants of açai palm can be used as explant sources to somatic embryogenesis.

Key-words: *Euterpe oleracea*, immature inflorescence, immature leaf, somatic embryogenesis

4.1 INTRODUÇÃO

O açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) é uma espécie de elevado potencial socioeconômico na exploração de frutos e de palmito. No entanto, os programas de melhoramento genético desta palmeira têm focado seus esforços principalmente, na seleção de progênies para a produção de frutos. Atualmente, os frutos do açazeiro são os produtos florestais não madeireiros (PFNM) de maior valor produzido anualmente no Brasil. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2013), em 2011, o valor comercializado de frutos do açazeiro alcançou R\$ 304,4 milhões, sendo que 99,9% produzido na Amazônia. De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2013), a demanda atual de frutos é crescente e vem provocando a escassez do produto e a elevação dos preços. Além disso, a maior parte da produção é extrativista, demonstrando que a atividade é ainda dependente de populações de *Euterpe oleracea* nativas (FARIAS NETO *et al.*, 2012). Assim, para suprir o crescimento de demanda é imperativo o aumento de plantios e produtividade dessa espécie, sendo necessário o desenvolvimento de sistemas de cultivo apropriados com tecnologias que incluam a seleção e a propagação de genótipos elites.

A principal forma de propagação do açazeiro é por meio de sementes. Mas esse método de propagação apresenta formação de plantios heterogêneos, ocasionando desuniformidade na produção e dificultando o manejo da cultura (FARIAS NETO *et al.*, 2005). Além disso, a propagação vegetativa por divisão de touceiras é limitada porque poucas plantas são produzidas e as taxas de sobrevivência no campo são muito baixas (NASCIMENTO *et al.*, 2009). A cultura de tecidos vegetais, por meio de técnicas de micropropagação, pode se tornar uma ferramenta importante para superar os problemas inerentes à espécie, sendo uma alternativa para se obter um processo de multiplicação em larga escala de clones de genótipos selecionados, ou mesmo, auxiliar programas de melhoramento genético pela fixação de ganhos genéticos em ciclos de seleção, desde que protocolos eficientes sejam desenvolvidos (LEDO *et al.*, 2002; SCHERWINSKI-PEREIRA *et al.*, 2012).

A embriogênese somática é uma técnica da cultura de tecidos onde células, incluindo as já diferenciadas, são induzidas e tornam-se determinadas a seguir rotas morfogênicas específicas que culminam com a formação de embriões somáticos (VON ARNOLD *et al.*, 2008; VASIL, 2008). Mas, para que as células possam tornar-se

determinadas para originarem embriões somáticos deve-se atentar para os principais fatores que influenciam a embriogênese somática, como os reguladores de crescimento, os tipos de explante, as formulações de meios de cultura, além do genótipo (BADAWY *et al.*, 2005; ASEMOTA *et al.*, 2007; NAMASIVAYAM, 2007; STEINMACHER *et al.*, 2007; GUEYE *et al.*, 2009; PERERA *et al.*, 2009).

Protocolos de embriogênese somática já foram descritos para algumas espécies de palmeiras utilizando como explantes folhas imaturas (SCHWENDIMAN *et al.*, 1988; GUERRA e HANDRO, 1998; GUEYE *et al.*, 2009) e inflorescências (VERDEIL *et al.*, 1994; TEIXEIRA *et al.*, 1994; FKI *et al.*, 2003; KARUN *et al.*, 2004; STEINMACHER *et al.*, 2007; GUEDES *et al.* 2011). Em açazeiro, resultados têm sido alcançados com o uso de embriões zigóticos (LEDO *et al.*, 2002; SCHERWINSKI-PEREIRA *et al.*, 2012). No entanto, até o momento, não há relatos na literatura sobre o uso de tecidos somáticos, como folhas e inflorescências de plantas adultas como explantes, na indução da embriogênese somática desta espécie.

O objetivo deste trabalho foi induzir a embriogênese somática em plantas adultas de açazeiro a partir de folhas e inflorescências imaturas. Para tanto, a influência das características dos explantes, além dos tipos e concentrações de auxinas foram avaliadas.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos II da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF.

4.2.1 Material vegetal

Neste estudo, utilizaram-se explantes provenientes de folhas e inflorescências imaturas de açaizeiro, coletados de plantas adultas pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma de açaizeiro da Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA.

Para melhor caracterizar os resultados, os diferentes explantes utilizados foram avaliados em experimentos individuais, totalizando 2 experimentos.

4.2.2 Meio de cultura básico e condições de cultivo

Para ambos os experimentos, o meio básico utilizado consistiu de sais e vitaminas do meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), adicionado de 30 g.L⁻¹ de sacarose e 2,5 g.L⁻¹ de Phytigel. A adição de outros componentes aos meios de cultura, notadamente reguladores de crescimento, foi específica para cada etapa do cultivo (Tabela 1). O pH dos meios de cultura foi sempre ajustado para $5,8 \pm 0,1$ com 0,1N de HCl ou 0,1N de NaOH, antes da esterilização realizada por 20 minutos em autoclave a 121°C e pressão de 1,5kgf/cm².

Para a etapa de indução da embriogênese somática, além da etapa de diferenciação e maturação de embriões somáticos, os cultivos foram mantidos sob condições de escuro. Durante todas as fases dos experimentos a temperatura da sala de crescimento foi de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

De maneira geral, os subcultivos foram realizados a cada 30 dias em placas de petri (90 x 15 mm), com aproximadamente 20 mL de meio de cultura por placa.

4.2.3 Indução da embriogênese somática a partir de inflorescências imaturas

Neste experimento foram utilizados como explantes, inflorescências imaturas, ainda protegidas por espatas não abertas, as quais foram coletadas de plantas adultas em três estádios de desenvolvimento. Para melhor classificar os tipos de explantes, as inflorescências foram classificadas de acordo com o tamanho da espata, como segue: estágio I (6 cm), estágio II (8 cm) e estágio III (12 cm). As espatas, onde no seu interior se localizavam as inflorescências, eram aclorofiladas, tendo sido coletadas entre as folhas internas aclorofiladas do palmito.

Uma vez obtidas, em condições de laboratório, as espatas fechadas com as inflorescências no seu interior foram submetidas inicialmente, a um processo de lavagem superficial com água corrente e detergente comercial. Posteriormente, os materiais foram levados para a câmara de fluxo laminar, onde sofreram a desinfestação por meio da imersão em álcool 70% por 3 minutos, seguida de tratamento com hipoclorito de sódio (contendo 2,5% de cloro ativo) por 30 minutos. Em seguida, as espatas foram enxaguadas por três vezes em água destilada e autoclavada para a remoção residual dos agentes desinfestantes utilizados.

Após a desinfestação, em câmara de fluxo e com o auxílio de pinças e bisturis, as espatas foram cuidadosamente abertas, expondo as ráquulas que se encontravam internamente. As ráquulas foram seccionadas transversalmente em segmentos de aproximadamente, 5 mm de comprimento, os quais foram depositados sobre os meios de cultura para a indução de calos.

4.2.3.1 Indução de calos, diferenciação e maturação de embriões somáticos

Para a etapa de indução de calos, nos explantes provenientes de inflorescências imaturas, foram avaliados dois tipos de auxinas: picloram e 2,4-D na concentração de 450 μM . Ao meio de cultura básico de Murashige e Skoog (1962) utilizado foi ainda adicionado 0,5 g.L^{-1} de L-glutamina e 2,5 g.L^{-1} de carvão ativado (Tabela 1). Os explantes permaneceram no meio de indução até a obtenção de calos embriogênicos, sendo os subcultivos realizados a cada 30 dias.

Para a diferenciação de embriões somáticos, os explantes contendo calos embriogênicos foram transferidos para a mesma formulação de sais do meio de cultura da

etapa de indução, mas desprovido de carvão ativado e com as concentrações de picloram e 2,4-D reduzidas para 0,1 mg.L⁻¹.

Após 24 semanas em meio de diferenciação, os explantes com embriões somáticos diferenciados foram transferidos para novo meio de cultura, suplementando com 0,6 µM de ácido naftalenoacético (ANA) e 12,30 µM de 2-isopenteniladenina (2iP), visando a maturação e início da germinação. Os explantes permaneceram nessa condição por mais 8 semanas.

Tabela 1. Composição básica dos meios de cultura utilizados nos diferentes estádios da embriogênese somática em açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.), a partir de folhas e inflorescências imaturas

Componentes	Inflorescências imaturas			Folhas imaturas		
	Indução	Diferenciação	Maturação	Indução	Diferenciação	Maturação
Meio de cultura	MS	MS	MS	MS	MS	MS
Picloram	450(µM)	0,1 mg.L ⁻¹	-	450(µM)	0,1 mg.L ⁻¹	-
2,4-D	450(µM)	0,1 mg.L ⁻¹	-	450(µM)	0,1 mg.L ⁻¹	-
ANA (µM)	-	-	0,6	-	-	0,6
2iP (µM)	-	-	12,30	-	-	12,30
Glutamina (g.L ⁻¹)	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500
Cisteína (g.L ⁻¹)	-	-	-	0,1	0,1	0,1
Sacarose (g.L ⁻¹)	30	30	30	30	30	30
Phytigel (g.L ⁻¹)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Carvão ativado (g.L ⁻¹)	2,5	-	-	2,5	-	-

4.2.3.2 Análises estatísticas

Em todas as etapas, o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com pelo menos 10 repetições. Cada repetição foi representada por uma placa de petri contendo seis explantes (aproximadamente, 5 mm de ráquulas com inflorescências).

Os dados obtidos foram avaliados segundo um esquema fatorial 2 x 3, com dois tipos de auxinas (picloram e 2,4-D) e três estádios de desenvolvimento dos explantes (estádio I, estágio II e estágio III), totalizando 6 tratamentos. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade, com auxílio do programa de análises estatísticas Sisvar (FERREIRA, 2011).

4.2.4 Indução da embriogênese somática a partir de folhas imaturas

Neste experimento foram utilizados como explantes folhas imaturas aclorofiladas, protegidas por camadas de bainhas externas, coletadas da região central do palmito de plantas adultas. A região do palmito utilizada foi de cerca de 40 cm acima do meristema apical da planta

Após a coleta do palmito em campo, em condições de laboratório foram retiradas as bainhas foliares externas que cobrem o palmito, sendo mantida somente a região do cilindro central formado pelas folhas internas. Uma vez obtido, o material foi levado para câmara de fluxo laminar, onde se realizou a desinfestação, por imersão em álcool 70% por 3 minutos, seguida de tratamento em hipoclorito de sódio (contendo 2,5% de cloro ativo) por 40 minutos. Logo após, o material sob desinfestação foi enxaguado por três vezes em água destilada e autoclavada para a remoção residual dos agentes desinfestantes utilizados.

Após a desinfestação, as extremidades foram excluídas, sendo então a parte mais central do palmito restante, dividida em três regiões de aproximadamente 10 cm cada. Para melhor caracterizar a região de resposta, as regiões foram classificadas como: basal, mediana e apical. As regiões foram classificadas de acordo com a proximidade do meristema apical do caule, sendo basal a mais próxima ao meristema e a apical a mais afastada do meristema. Em sequência, as folhas imaturas foram então cuidadosamente isoladas e seccionadas transversalmente em retângulos de aproximadamente 0,5 cm x 1,0 cm, e inoculada em placas de petri preenchidas com meio de cultura para indução de calos.

4.2.4.1 Indução de calos, diferenciação e maturação de embriões somáticos

Para indução de calos em explantes foliares foram avaliados dois tipos de auxinas: picloram e 2,4-D, ambas utilizadas na concentração de 450 μM . Ao meio de cultura básico de Murashige e Skoog utilizado foi adicionado ainda 0,1 g.L^{-1} de cisteína, 0,5 g.L^{-1} de L-glutamina e 2,5 g.L^{-1} de carvão ativado. Assim, como no experimento com inflorescências imaturas, os explantes provenientes de folhas permaneceram no meio de indução até a obtenção de calos embriogênicos, sendo os subcultivos realizados a cada 30 dias.

Para a diferenciação de embriões somáticos, os explantes contendo calos embriogênicos foram transferidos para a mesma composição do meio de cultura da etapa de

indução, mas sem a adição de carvão ativado e com as concentrações de picloram e 2,4-D reduzidas para $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$.

Após 12 semanas em meio de diferenciação, os explantes com embriões somáticos diferenciados foram transferidos para novo meio de cultura para a maturação e início do desenvolvimento, formado pelos sais e vitaminas de MS e adicionado de 30 g.L^{-1} de sacarose e $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de L-glutamina, além dos reguladores de crescimento $0,6 \text{ }\mu\text{M}$ de ANA e $12,30 \text{ }\mu\text{M}$ de 2iP. Os explantes permaneceram nessa condição por 8 semanas.

4.2.4.2 Análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com pelo menos cinco repetições, sendo cada repetição representada por uma placa de petri contendo seis explantes. Os dados obtidos com os tipos e concentrações de auxinas, além das regiões do palmito (classificadas como basal, mediana e apical) foram avaliadas segundo um esquema fatorial 2×3 (auxinas x região foliar) totalizando, 6 tratamentos.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade, com auxílio do programa de análises estatísticas Sisvar (FERREIRA, 2011).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Indução da embriogênese somática a partir de inflorescências imaturas

Durante o processo de indução, observou-se que as inflorescências (Figura 1- A) desenvolveram-se lentamente, sendo as primeiras alterações notadas após 12 semanas de cultivo com o intumescimento e aumento de tamanho dos explantes, principalmente na região de desenvolvimento das estruturas florais das ráquulas (Figura 1- B). Após 20 semanas de cultivo verificou-se o início da formação de calos primários esbranquiçados, que progrediram para a formação de calos primários característicos (Figura 1-C-D). Após 32 semanas em meio de indução, foi nítido o aumento em tamanho dos calos primários que originaram porções embriogênicas quase que completamente sobre os calos primários. Nesta etapa também foi possível observar o surgimento dos primeiros embriões somáticos em fase globular, entre as porções embriogênicas dos calos, facilmente identificáveis em razão da coloração amarelada dos embriões somáticos. A indução de embriões somáticos seguiu a rota indireta, com a formação de calos antes da formação dos embriões somáticos, os quais se desenvolveram de forma assíncronica, sendo possível observar calos e embriões somáticos em diferentes fases de desenvolvimento em um mesmo explante (Figura 1- E, F). Respostas embriogênicas foram observadas nos tratamentos contendo as auxinas, picloram e 2,4-D e, em todos os estádios de desenvolvimento das inflorescências testadas.

Uma vez obtidos calos embriogênicos em início de diferenciação, os materiais foram transferidos para meios de diferenciação e maturação de embriões somáticos. Após três meses de cultivo neste meio de cultura foi observado a progressão do desenvolvimento dos embriões somáticos que tornaram-se mais alongados (Figura 1-G). No final desta etapa, notou-se também o desenvolvimento de embriões somáticos na fase de torpedo, já com coloração branca e prontos para iniciarem a germinação (Figura 1- H, I), e alguns ainda com aspecto translúcido, indicando, possivelmente, a ocorrência de embriogênese secundária (Figura 1-I).

As inflorescências imaturas de palmeiras são explantes bastante interessantes para serem utilizados na cultura de tecidos, devido a grande quantidade de tecidos meristemáticos que a compõe (TEIXEIRA *et al.*, 1994; VERDEIL *et al.*, 1994). A obtenção de embriões somáticos e regeneração de plantas utilizando esse tipo de explante

já foi descrito para espécies de palmeiras, entre as quais se incluem *Elaeis guineensis* (TEIXEIRA *et al.*, 1994.), *Cocos nucifera* (VERDEIL *et al.*, 1994), *Euterpe edulis* (GUERRA e HANDRO, 1998), *Phoenix dactylifera* (FKI *et al.*, 2003) e *Areca catechu* (KARUN *et al.*, 2004).

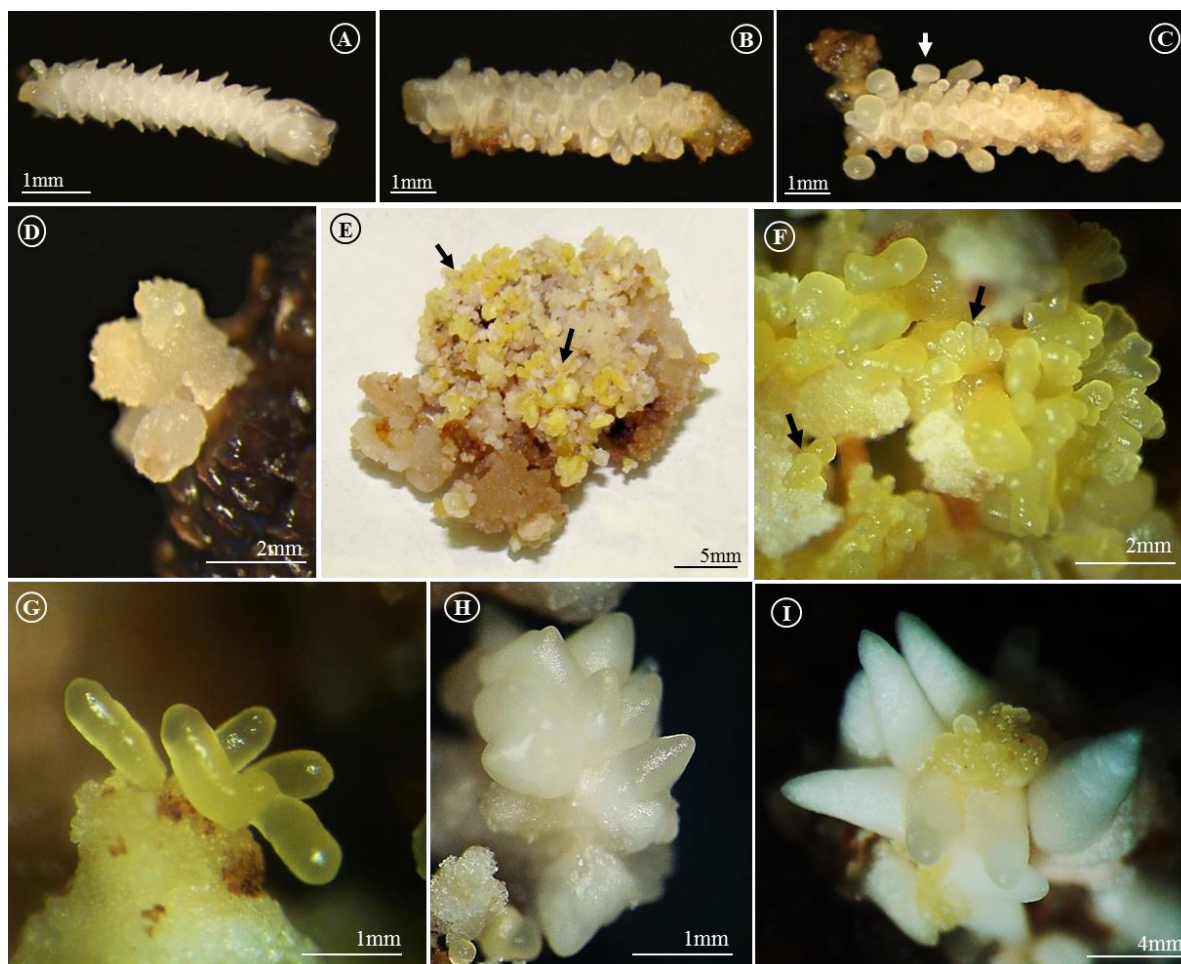


Figura 1. Aspectos morfológicos de calos e embriões somáticos obtidos durante a embriogênese somática de açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.), a partir de inflorescências imaturas. **A-** Explante inicial: Inflorescência imatura estágio II, **B-** Inflorescência intumescida, **C-** Início do desenvolvimento de calos primário, **D-** Calo primário, **E-** Calo embriogênico em início de diferenciação de embriões somáticos (setas), **F-** Embriões somáticos diferenciados (setas), **G-** Embriões somáticos alongados, **H-** Início de desenvolvimento de embriões somáticos em estágio torpeda, **I-** Embriões somáticos em estágio torpeda em início de germinação.

Em relação à formação de calos embriogênicos, os melhores resultados foram verificados no tratamento em que se utilizou picloram (38,0%), quando comparados ao tratamento com 2,4-D (19,7%) conforme Tabela 2. Na formação de calos em

inflorescências de *Bactris gasipaes* (STEINMACHER *et al.*, 2007) e de *Areca catechu* (KARUN *et al.*, 2004), o picloram também se mostrou como a auxina mais responsiva.

Tabela 2. Efeito das auxinas picloram e 2,4-D sobre a porcentagem de explantes com formação de calos embriogênicos e calos com embriões somáticos diferenciados, durante a embriogênese somática de açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) a partir de inflorescências imaturas

Inflorescência	Indução			Diferenciação		
	Calos embriogênicos (%)			Calos embriões somáticos diferenciados (%)		
	Picloram	2,4-D	Média	Picloram	2,4-D	Média
Estádio I	41,6aA	12,5aB	27,0a	100,0aA	50,0aB	75,0a
Estádio II	45,0aA	24,0aB	34,5a	100,0aA	60,0aB	80,0a
Estádio III	27,5aA	22,7aA	25,0a	100,0aA	62,0aB	81,0a
Média	38,0A	19,7B		100,0A	57,3B	

Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Os resultados obtidos utilizando inflorescências em diferentes estádios de desenvolvimento podem variar de acordo com as espécies. Para *Cocos nucifera*, os melhores resultados foram obtidos em inflorescências mais desenvolvidas com espata medindo cerca de 45 cm (VERDEIL *et al.*, 1994), enquanto que em *Bactris gasipaes*, as mais responsivas foram as inflorescência menos desenvolvidas com espata em torno de 8,5 cm (STEINMACHER *et al.*, 2007). Guerra e Handro (1998) citam que a embriogênese somática em *Euterpe edulis* foi observada em inflorescências em estádios iniciais do desenvolvimento. Em *Areca catechu* inflorescências entre 8 e 12 cm produziram maiores médias de calos, ao contrário de inflorescências maiores 16 cm (KARUN *et al.*, 2004). No presente estudo, não foram verificadas diferença significativa entre os diferentes estádios testados, mas todos apresentaram formação de calos e embriões somáticos (Tabela 2). Possivelmente, tais resultados observados devem-se ao fato de todas as inflorescências testadas estarem em estádios imaturos, corroborando com a teoria de que explantes mais

jovens são mais sensíveis do que as derivados de tecidos adultos (RAEMAKERS *et al.* 1995).

Na etapa de diferenciação verificou-se que 100% dos calos embriogênicos formados durante a indução e cultivados em meio suplementado com picloram diferenciaram em embriões somáticos (Tabela 2). No tratamento com a auxina 2,4-D também foi observada a diferenciação de embriões somáticos, porém, em porcentagens menores (60%). Estes explantes com embriões somáticos diferenciados, uma vez transferidos para meio de maturação e germinação, progrediram lentamente para estádios de torpedo, não tendo sido, contudo, observado a germinação e formação de plantas completas ao final do tempo avaliado, sugerindo que o processo requer um tempo relativamente longo para que plantas sejam obtidas e há a necessidade de se aperfeiçoar o meio de cultura para a germinação e desenvolvimento dos embriões somáticos formados. Tal formulação do meio de cultura de maturação (MS adicionado de 0,6 μ M de ANA e 12,30 μ M de 2-iP) também foi utilizado por Ledo *et al.* (2002) para a etapa de maturação dos embriões somáticos de *Euterpe oleracea*, embora o padrão de embriogênese somática expressado pelos autores em seus experimentos tenha sido alcançado pela via direta.

4.3.2 Indução da embriogênese somática a partir de folhas imaturas

Em explantes foliares de açaizeiro, o início da formação de calos primários foi verificado após 12 semanas de cultivo em meio de indução. O desenvolvimento de calos não apresentou um padrão nos explantes, sendo a ocorrência destes observada tanto nas bordas, como no centro das folhas (Figura 2-A, B). Após 36 semanas em meios de indução verificou-se a progressão dos calos primários para estádios embriogênicos (Figura 2-C). Nesta etapa, ocorreu intensa oxidação dos explantes, fato caracterizado pelo aspecto escurecido dos explantes em cultivo.

Em palmeiras, a oxidação de tecidos cultivados *in vitro* é um problema recorrente (SUGIMURA e SALVANA, 1989; TEIXEIRA *et al.*, 1994; Al-KHAYRI, 2005; STEINMACHER *et al.*, 2007; SAENZ *et al.*, 2010), principalmente quando são cultivados em meio de cultura que contém concentrações elevadas de auxinas (LEDO *et al.*, 2002). A oxidação é resultado da liberação de compostos fenólicos *in vitro*, precursores da síntese de lignina pelo tecido injuriado (SANTOS *et al.*, 2001; VAN WINKLE *et al.*, 2003; XAVIER *et al.*, 2009). O carvão ativado é comumente usado para diminuir problemas de oxidação durante embriogênese somática em palmeiras, principalmente por reduzir as taxas de oxidação (VIÑAS e JIMÉNEZ 2011). Segundo Pan e Van Staden (1998), o carvão ativado adsorve os fenóis e inativa as enzimas polifenol oxidase e peroxidase, ajudando na diminuição da oxidação dos tecidos. No entanto, no presente trabalho, apesar do meio de cultura ter sido adicionado de carvão ativado, essa medida não foi suficiente para controlar os níveis de oxidação dos explantes, uma vez que em determinados tratamentos, especialmente quando se utilizou 2,4-D, os níveis de oxidação chegaram a atingir 100% dos explantes em cultivo (dados não mostrados), fato que pode ter prejudicado a resposta dos explantes quanto à formação de calos.

Na etapa de indução de calos houve diferença significativa em relação às auxinas utilizadas, sendo os melhores resultados (15,5%) obtidos em meio contendo a auxina picloram, que diferiu significativamente quando a auxina 2,4-D foi utilizada (Tabela 3). Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos em *Bactris gasipaes*, onde a indução da embriogênese somática em explantes foliares também foi responsiva com a utilização de elevadas concentrações de picloram (STEINMACHER *et al.*, 2007). As auxinas são utilizadas em altas concentrações com o objetivo de causar um estresse aos tecidos e estes

serem reprogramados e responderem aos tratamentos de indução da embriogênese (DODEMAN *et al.*, 1997, FEHÉR *et al.*, 2003).

Tabela 3. Efeito da auxina (picloram e 2,4-D) e da região foliar (apical, mediana e basal) sobre a formação de calos embriogênicos e de calos com embriões somáticos diferenciados durante a embriogênese somática do açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.), a partir de folhas imaturas

Tratamento	Indução				Diferenciação			
	Formação de calos embriogênicos (%)				Calos embriogênicos com embriões (%)			
	Apical	Mediano	Basal	Média	Apical	Mediano	Basal	Média
Controle	0,0 aA	0,0 aA	0,0 aA	0,0 b	0,0 aA	0,0 bA	0,0 aA	0,0 b
Picloram	0,0 aB	16,5 aAB	30,0 aA	15,5 a	0,0 aB	50,0 aA	16,6 aAB	21,4 a
2,4-D	4,0 aA	0,0 aA	0,0 aA	1,3 b	0,0 aA	0,0 bA	0,0 aA	0,0 b
Media	1,3 A	5,5 A	10,0 A		0,0 A	16,6 A	5,5A	

Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Em relação as diferentes regiões testadas do palmito, não houve diferenças significativas, embora as maiores porcentagens de formação de calo embriogênico tenham sido observadas em explantes provenientes das regiões basal (30%) e mediana (16,5%), quando estas foram cultivadas em meio com picloram (Tabela 3). Corroborando com os resultados alcançados neste estudo, na indução da embriogênese somática de *Elaeis guineenses*, o picloram foi a auxina mais responsiva em relação ao 2,4-D. Além disso, em estudos com dendezeiro os explantes foliares provenientes da região basal também foram os que apresentaram maior formação de calo embriogênico (SCHERWINSKI-PEREIRA *et al.*, 2010).

Em palmeiras, a obtenção de calos na etapa de indução, a partir de explantes foliares, tem sido obtida geralmente utilizando-se o 2,4-D, como observado em *Euterpe edulis* (SALDANHA *et al.*, 2006), *Areca catechu* (WANG *et al.*, 2006), *Phoenix dactylifera* (GUEYE *et al.*, 2009) e *Elaeis guineenses* (HAPSORO, 2011). Em bases foliares de *E. edulis* inoculadas em meio MS líquido, suplementado com 2,4-D, houve o

surgimento de estruturas nodulares aos 30 dias em cultura (GUERRA *et al.*, 2000). Na palmeira *Phoenix dactylifera*, foram induzidos calos quando primórdios foliares foram inoculados por 12 semanas em meio de cultura contendo 2,4-D (AL-KHAYRI e AL-BAHRANY, 2004). Apesar desses relatos, em nosso trabalho tais resultados não foram observados quando se utilizou o 2,4-D na indução de calos.

O processo de embriogênese somática segue um duplo-ciclo. No primeiro ocorre a indução e o desenvolvimento de células embriogênicas em altos níveis de auxina. No segundo, os pró-embriões recebem estímulos para desenvolverem-se, pela redução ou completa remoção da fonte de auxina, ou ainda, outros tratamentos que promovam tal condição. Nesse ciclo ocorre a formação dos embriões somáticos propriamente ditos (GUERRA *et al.*, 1999; FEHÉR *et al.*, 2003; STEINER *et al.*, 2008). No presente trabalho, a transferência de calos em meio suplementado com elevadas concentrações de auxinas para meio com as concentrações reduzidas para $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$, estimulou a formação de embriões somáticos (Figura 2-D e E), somente em meio enriquecido com picloram (Tabela 3).



Figura 2. Formação de calos e embriões somáticos em folhas imaturas de açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.). **A:** Explante foliar com formação de calo (região pontilhada) na borda da folha, **B:** Desenvolvimento de calo primário (seta) na região do centro da folha, **C:** Calo primário em início de progressão para o estágio embriogênico (seta), **D:** Embriões somáticos em fase globular em meio de diferenciação, **E:** Embriões somáticos com suspensor após 12 semanas em meio de diferenciação.

Além disso, no presente estudo, os embriões somáticos obtidos não apresentaram progressão para estádios mais tardios de desenvolvimento, até 8 semanas de cultivo em meio de maturação. Contudo, Scherwinski-pereira *et al.*, (2010) verificaram estádios tardios de desenvolvimento, incluindo o início da germinação de embriões somáticos obtidos de explantes foliares de *Elaeis guineenses*, quando estes foram cultivados em meio de cultura MS contendo 0,6 μM de ANA e 12,30 μM de 2-iP, após 4 semanas de cultivo. Assim como no experimento onde se utilizou inflorescências, o uso de folhas imaturas também necessita de mais tempo de cultivo para que embriões somáticos em estádios mais avançados de desenvolvimento possam começar a surgir e desenvolverem-se em plantas, não se descartando também, a necessidade de otimizar-se os meios de cultura utilizados nestas etapas.

CONCLUSÕES

- Inflorescências imaturas, caracterizadas por espatas ainda aclorofiladas e com tamanho variando entre 6 e 12 cm, são importantes fontes de explantes para a indução da embriogênese somática em plantas adultas de açazeiro;
- Folhas imaturas coletadas de plantas adultas, localizadas entre as regiões basais e medianas do palmito em relação ao ápice apical da planta, podem ser indicadas como explantes responsivos à embriogênese somática de açazeiro;
- O picloram na concentração de 450 μM é mais eficiente do que o 2,4-D e é a auxina mais responsiva e indicada para a indução da embriogênese somática em inflorescências e folhas imaturas de plantas adultas de açazeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHÉE J, ARTHUIS P, CAS G, DUVAL Y, GUÉNIN G, HANOWER J, HANOWER P, LIEVOUX D, LIORET C, MALAURIE B, PANNETIER C, RAILLOT D, VARECHON C, ZUCKERMAN L. La multiplication vegetative *in vitro* du palmier à huile par embriogenèse somatique. *Oléagineux*, v. 36, p.113-117, 1981.

ALAN A, ZENG H, ASSANI A, SHI WL, MCRAE HE, MURCH SJ, SAXENA PK. Assesment of genetic stability of the germplasm lines of medicinal plant *Scutellaria baicalensis* Georgi (Huang-qin) in long-term, *in vitro* maintained cultures. *Plant Cell Reports*, v.26, p.1345-1355, 2007.

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

AL-KHAYRI JM. Date palm *Phoenix dactylifera* L. In: JAIN SM, GUPTA PK. (eds.). Protocol for somatic embryogenesis in woody plants. *The Netherlands: Springer*. p.309-319. 2005.

ALMEIDA M, ALMEIDA CV, GRANER EM, BRONDANI GE, ABREU-TARAZI, MF. Pre-procambial cells are niches for pluripotent and totipotent stem-like cells for organogenesis and somatic embryogenesis in the Peach palm: a histological study. *Plant Cell Reports*, v.31, p.1495-1515, 2012.

APPEZZATO BG, CARMELLO SMG. *Anatomia Vegetal*, Viçosa - Editora UFV, p.438, 2003.

ASEMOTA O, EKE CR, ODEWALE JO. Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) *in vitro* morphogenesis in response to growth regulators, sucrose and nitrogen. *African Journal of Biotechnology*, v.6, p.2353-2357, 2007.

ASLAM J, KHAN SA, CHERUTH AJ, MUJIB A, SHARMA MP, SRIVASTAVA PS. Somatic embryogenesis, scanning electron microscopy, histology and biochemical analysis at different developing stages of embryogenesis in six date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars. *Saudi Journal of Biological Sciences*, v.18, p.369-380, 2011.

ASSIS TF, TEIXEIRA SL. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES AC, CALDAS LS, BUSO JA. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Embrapa-cnph, p.261-296, 1998.

BADAWY EM., HABIB AMA, EL-BANA A, YOSRY GM. Propagation of date palm (*Phoenix dactylifera*) plants by using tissue culture technique. *Arabian Journal of Biotechnology*, v.8, p.343-354. 2005.

BAIRU MW, AREMU AO, VAN STADEN J. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regul.* v.63, p.147-173, 2011.

BALZON TA, LUIS ZG, SCHERWINSKI-PEREIRA JE. New approaches to improve the efficiency of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) from

mature zygotic embryos. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, v.49, p.41-50, 2013.

BANDEIRA FS. Cultivo *in vitro* e embriogênese somática de embriões zigóticos de Macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Loddiges), *Tese* (Doutorado), UFV, p.108, 2008.

BARRUETO LP. *Cultivo in vitro de plantas*. Embrapa, Brasília, p.56-57, 2010

BENNICI A, ANDIZEI M, VENDRAMIN GG. Genetic stability and uniformity of *Foeniculum vulgare* Mill. regenerated plants through organogenesis and somatic embryogenesis. *Plant Science*, v.166, p.221-227, 2004.

BENSON EE. *In vitro* plant recalcitrance: An introduction. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, v.36, p.141-148, 2000.

BERTIN P, BOUHARMONT J. Use of somaclonal variation and *in vitro* selection for chilling tolerance improvement in rice. *Euphytica*, v.96, p.135- 142, 1997.

BHOJWANI SS, DANTU PK. *Plant Tissue Culture: an Introductory Text*. p.75-92, 2013.

BORÉM A. *Biotecnologia Florestal*, Universidade Federal de Viçosa, p.387, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Embrapa Amazônia Oriental. *Sistema de Produção do Açaí*, v. 4, 2006.

CAMPOS JMS, CALDERANO CA, PEREIRA AV, DAVIDE LC, VICCINI LF, SANTOS MO. Embriogênese somática em híbridos de *Pennisetum* sp. e avaliação de estabilidade genômica por citometria. *Pesquisa agropecuária brasileira*. v.44, p.38-44, 2009.

CANTERLE VA. *Desenvolvimento de embriões somáticos de BRS clara em diferentes meios de cultura*, Monografia. Bento Gonçalves-RS, p.22, 2007.

CARVALHO JMFC, LIMA MMA, AIRES PSR, VIDAL MS, PIMENTEL NW. *Embriogênese somática*, (Documentos 152) – Campina Grande, PB. Embrapa Algodão, p. 35, 2006.

CAVALCANTE PB. *Frutas Comestíveis da Amazônia*. 4ª ed. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, p.279, 1988.

CAVALCANTE PB. *Frutas comestíveis da Amazônia*. 5ª ed. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, p.279, 1991.

COISSON J, TRAVAGLIA F, PIANA G, CAPASSO M, ARLORIO M, *Euterpe oleracea* juice as functional pigment for yogurt. *Food Research International*, v.38, p.839-897, 2005.

CONAB – *Companhia Nacional de Abastecimento*. Ministério da agricultura pecuária e abastecimento. Açaí (fruto), conjuntura mensal, setembro 2013. Disponível em:

http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_10_08_10_53_18_acaiaitembr o2013.pdf, Acesso em: 20.12.2013.

COSTA FHS., SCHERWINSKI-PEREIRA JE, PEREIRA MAA., OLIVEIRA JP. Efeito da interação entre carvão ativado e N6-benzilaminopurina na propagação *in vitro* de bananeira, cv. Grande Naine (AAA). *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.28, p.280-283, 2006.

COSTA MAPC, SOUZA AS, ALMEIDA WAB. Morfogênese *in vitro*. In: SOUZA, AS, JUNGHANS TG. Introdução à Micropropagação de Plantas. *Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical*, p.115-130. 2006.

DIMENSTEIN L, FARIAS NETO JT. Dados preliminares para a produção de frutos em açazeiros sob irrigação em terra firme no Estado do Pará. In: DIMENSTEIN L, FARIAS NETO JT. Irrigação e fertirrigação em fruteiras. Fortaleza: Instituto Frutal, p.139-144, 2008.

DODEMAN VL, DUCREUX G, KREIS M. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *Journal of Experimental Botany*, v.48, p.1493-1509, 1997.

DOLEZEL J, BARTOS J, VOGLMAYR H, GREILHUBER J. Conteúdo de DNA nuclear e tamanho do genoma de truta e humano. *Citometria* v.51, p.127 -128, 2003.

DOLEZEL J, BARTOS J, Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany*, v. 95, p.99–110, 2005.

DOLEZEL J, GREILHUBER J, LUCRETTI S, MEISTER A, LYSÁK MA, NARDI L, OBERMAYER R. Plant genome size estimation by flow cytometry: Inter-laboratory comparison. *Annals of Botany*, v.82, p.17-26, 1998.

DUNSTAN DI, TAUTORUS TE, THORPE TA. Somatic embryogenesis in woody plants. In: THORP TA. *In vitro* embriogenesis in plants. Dordrech: Kluwer Academic, 1995.

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

DUTRA LF, WENDLING I, BRONDANI GE. A micropropagação de eucalipto. *Pesquisa Florestal Brasileira*, Colombo, n.58, p.49-59, 2009.

ENDEMANN M, HRISTOFOROGLU K, STAUBER T, WILHELM E. Assessment of age-related polyploidy in *Quercus robur* L. somatic embryos and regenerated plants using DNA flow cytometry. *Biol Plant* (Prague), v.44, p.339–345, 2001.

ETIENNE H, BERTRAND B. Somaclonal variation in *Coffea arabica*: effects of genotype and embryogenic cell suspension age on frequency and phenotype of variants. *Tree Physiology*, v.23, p.419-426, 2003.

- FARIAS NETO JT, OLIVEIRA MSP, MULLER AA, NOGUEIRA OL, ANAISSI D FSP. Variabilidade genética em progênies jovens de açazeiro. *Cerne*, v.11, p.336-341, 2005.
- FARIAS NETO JT, OLIVEIRA MSP, RESENDE MDV, RODRIGUES JC. Parâmetros genéticos e ganhos com a seleção de progênies de *Euterpe oleracea* na fase juvenil. *Cerne*, Lavras, v.18, p.515-521, 2012.
- FARIAS FL. embriogênese zigótica e somática em araucaria *Angustifolia* (bertol.) Kuntze: parâmetros celulares e bioquímicos associados. 2013.
- FEHÉR A, PASTERNAK T, DUDITS D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.74, p.201-228, 2003.
- FEHÉR A, PASTERNAK T, ÖTVÖS K, MISKOLCZI P, DUDITS D. Induction of embryogenic competence in somatic plant cells: a review. *Biologia, Bratislava*, v.57, 2002.
- FEHÉR A. The initiation phase of somatic embryogenesis: what we know and what we don't. *Acta Biologica Szegediensis*, v.52, p.53-56, 2008.
- FERNANDO SC, VERDEIL JL, HOCHER V, WEERAKOON LK, HIRIMBUREGAMA K, Histological analysis of plant regeneration from plumule explants of *Cocos nucifera*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.72, p.281-284, 2003.
- FERREIRA DF. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, v.35, p.1039-1042, 2011.
- FKI L, MASMOUDI R, DRIRA N, RIVAL A, An optimized protocol for plant regeneration from embryogenic suspension cultures of date palm, *Phoenix dactylifera* L., cv. Deglet Nour. *Plant Cell Reports*, v.21, p.517-524, 2003.
- FLOH IES, SANTA-CATARINA C, SILVEIRA V, Marcadores bioquímicos e moleculares para estudo da morfogênese *in vitro*. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*; v.13, p.1992-2001, 2007.
- GAJ MD. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regul*, v.43, p.27-47, 2004.
- GALLORI S, BILIA AR, BERGONZI MC, BARBOSA LR, VINCIERI FF. Polyphenolic constituents of fruit pulp of *Euterpe oleracea* Mart. (açai palm). *Chromatographia*, v.59, p.739-743, 2004.
- GARCIA R, CIDADE D, CASTELLAR A, LIPS A, MAGIOLI C, CALLADO C, MANSUR E. *In vitro* morphogenesis patterns from shoot apices of sugarcane are determined by light and type of growth regulator., *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.90, p.181-190, 2007.

- GELDNER N, HAMANN T, JURGENS G. Is there a role for auxin in early embryogenesis?, *Plant Growth Regulation*, v.32, p.187-191, 2000.
- GOLLE DP, REINIGER LRS, CURTI AR, BEVILACQUA CB, Melhoramento florestal: ênfase na aplicação da biotecnologia. *Ciência rural*, v.39, p.1606-1613, 2009.
- GRATTAPAGLIA D, MACHADO MA. Micropropagação. In: TORRES AC, CALDAS LS, BUSO JA. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa. v.1, p.183-242, 1998.
- GUEDES RS, SILVA TL, LUIS ZG, SCHERWINSKI-PEREIRA JE. Initial requirements for embryogenic calluses initiation in thin cell layers explants from immature female oil palm inflorescences. *African Journal of Biotechnology*, v.10, p.10774-10780, 2011.
- GUERRA MP, HANDRO W. Somatic embryogenesis and plant regeneration in embryo cultures of *Euterpe edulis* mart. (Palmae). *Plant Cell Report*, v.7, p.550-55, 1988.
- GUERRA MP, HANDRO W. Somatic embryogenesis and plant regeneration in diferente organs of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae): control and structural features. *Journal of Plant Research*, v.111, p.65-71, 1998.
- GUERRA MP, TORRES AC, TEIXEIRA JB. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES AC, CALDAS LS, BUSO JA. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: SPI/EMBRAPA, v.2, p.533-568, 1999.
- GUERRA MP, NODARI RO, PEIXOTO ML, QUINTA M. Embriogênese somática e micropropagação do palmitero. *Sellowia*, Itajaí, v.49, p.150-162, 2000.
- GUERRA MP, NODARI RO. Introdução ao conceito de Biotecnologia, *Apostila de biotecnologia-CCA/UFSC-* (Edição da Steinmacher), p.35, 2006.
- GUEYE B, MORCILLO F, COLLIN M, GARGANI D, OVERVOORDE P, ABERLENC-BERTOSSI F, TRANBARGER TJ, SANE D, TREGEAR JW, BORGEL A, VERDEIL J. Acquisition of callogenic capacity in date palm leaf tissues in response to 2,4-D treatment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, v.99, p.35-45, 2009.
- HABERLANDT G. Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. Sitzungsber K Preuss Akad Wiss Wien, Math Naturwiss, 111:69-92. 1902. In: VASIL IK. A history of plant biotechnology: from the cell theory of Schleiden and Schwann to biotech crops. *Plant Cell Reports*, v.27, p.1423-1440, 2008.
- HAKMAN I. Embryology in Norway spruce (*Picea abies*). An analysis of the composition of seed storage proteins and deposition of storage reserves during seed development and somatic embryogenesis. *Plant Physiology*; v.87, p.148-159, 1993.
- HAPSORO D. *In Vitro* callus induction and embryogenesis of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) from leaf explants. *Hayati Journal of Biosciences*, v.18, p.1-5, 2011.

- HARTMANN HT, KESTER DE, DAVIES FTJR, GENEVE RL. *Plant Propagation: principles and practices*. Prentice hall, 7 ed., p.639-643, 2002.
- HEERDT E. Indução da embriogênese somática em cana-de-açúcar, *Dissertação* (mestrado), Viçosa (MG), Brasil, p.55, 2008.
- HEIDSTRA R. Asymmetric cell division in plant development. *Progress In Molecular and Subcellular Biology* v.45, p.1-37, 2007.
- HENDERSON A, GALEANO G. Euterpe, prestoea, and neonicholsonia (palmae: euterpeinae). New York: New York Botanical Garden, (*Flora neotropica*, 72). Hodge, w.h. Palm Cabbage. *Principes*, v.9, p.124-131, 1996.
- HENDERSON A. *The genus Euterpe in Brazil*. In: REIS, M. S.; REIS, A. (Ed.) *Euterpe edulis* Martius (palmitheiro): biologia, conservação e manejo. Itajaí: Botânicos do Herbário Barbosa Rodrigues, 2000.
- HERINGER AS, STEINMACHER DA, FRAGA HPF, VIEIRA LN, REE JF, GUERRA MP. Global DNA methylation profiles of somatic embryos of peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth) are influenced by cryoprotectants and droplet-vitrification cryopreservation, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (PCTOC), v.114, p.365-372, 2013.
- HERINGER AS, STEINMACHER DA, SCHMIDT ÉC, BOUZON ZL, GUERRA MP. Survival and ultrastructural features of peach palm (*Bactris gasipaes*, Kunth) somatic embryos submitted to cryopreservation through vitrification. *Protoplasma* v.250, p.1185–1193, 2013.
- HVOSLEF-EIDE AK, CORKE FMK. Embryogenesis specific protein changes in birch suspension cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*; v.51, p.35-41, 1997.
- IKEDA M, KAMADA H. Comparison of molecular mechanisms of somatic and zygotic embryogenesis. In: MUJIB A, SAMAJ J. (Eds.) *Plant Cell Monographs: Somatic embryogenesis*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2005.
- ILLG RD. Variação somaclonal. In: TORRES AC, CALDAS LS. *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. EMBRAPA, p.287-295, 1990.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE), Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura, Disponível em: <http://saladeimprensa.ibge.gov.br/noticias?view=noticiaeid=1ebusca=1eidnoticia=2533> IBGE Acesso em: 15/02/2014.
- JAIN SM, KLERK G. Somaclonal variation in breeding and propagation of ornamental crops. *Plant tissue culture and biotechnology*, v.4, p.63-75, 1998.
- JAIN SM. Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica*, v.118, p.153-166, 2001.

JARDIM MAG, KAGEYAMA PY. Fenologia de floração e frutificação em população natural de açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) no Estuário Amazônico. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi*, v.10, p.77-82, 1994.

JARDIM MAG. Possibilidade do cultivo do açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) em áreas de capoeira como alternativa para agricultores do nordeste Paraense. Museu Paraense Emílio Goeldi/Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. *Relatório Técnico-Científico*, p.35, 2005.

JIMÉNEZ VM. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. *Revista brasileira de fisiologia vegetal*, v.13, 2001.

JOHANSEN DA. *Plant microtechnique*. New York, McGraw-Hill Book Co. Inc., p.523, 1940.

JOLY AB. *introdução á taxonomia vegetal*, São Paulo: Companhia nacional, p.439, 1998.

JUNG SJ, YOON ES, JEONG JH, CHOI YE. Enhanced post-embryonic growth of encapsulated somatic embryos of siberian ginseng by carbohydrate addition to the encapsulation matrix. *Plant cell rep.*, v.23, p.365-370, 2004.

KARUN A, SIRIL EA, RADHA E, PARTHASARATHY VA. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from leaf and inflorescence explants of arecanut (*Areca catechu* L.). *Current Science* v.86, p.1623-1628, 2004.

KHONAR RN, NAKARAJA K. Morphogenesis of isolated floral buds of *Ranunculus scelerantus* L. *in vitro*. *Acta Botanica*, v.18, p.680-699, 1969.

KIM TD, ANBAZHAGAN VR, PARK JI. Somatic embryogenesis in *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. *In vitro cellular and Development Biology*, n.3, p.253-257, 2005.

KOMANIME A, KAWAHARA R, MATSUMOTO S, SUNABORI S, TOYA T, FUJIWARA A, TSUKAHARA M, SMITH J, ITO M, FUKUDA H, NOMURA K, FUJIMURA T. Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures: physiology, biochemistry and molecular biology. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, v.28, p.11-14, 1992.

KORMUTÁK A, SALAJ T, VOOKOVÁ B. Storage protein dynamics in zygotic and somatic embryos of white fir. *Biologia (Bratislava)*, v.61, p.479-486, 2006.

KUBIS SE, CASTILHO AM, VERSHININ AV, HESLOP-HARRISON JS. Retroelements, transposons and methylation status in the genome of oil palm (*Elaeis guineensis*) and the relationship to somaclonal variation. *Plant Molecular Biology*, v.52, p.69-79, 2003.

LARKIN PJ, SCOWEROFT WR. Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical Applied Genetic*, v.60, p.197-214, 1981.

LEDO AS, LAMEIRA OA, BENBADIS AK, MENEZES IC, LEDO CAS, OLIVEIRA MSP. Cultura *in vitro* de embriões zigóticos de açaizeiro. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.23, p.468-472, 2001.

LEDO AS, LAMEIRA OA, MENEZES IC. *Embriogênese somática e regeneração de plantas em açaizeiro*. Rio Branco: Boletim de Pesquisa-Embrapa, n.34, p.22, 2002.

LORENZI H, SOUZA HM, COSTA JTM, CERQUEIRA LSC, BEHR N. Palmeiras do Brasil: nativas e exóticas. Nova Odesa: *Instituto Plantarum*, p.303, 1996.

LORENZI H, SOUZA HM., COSTA JTM, CERQUEIRA LSC, FERREIRA E. Palmeira brasileira e exóticas cultivadas. *Nova Odesa: Instituto Plantarum*, 2004.

LOUREIRO J, CAPELO A, BRITO G, RODRIGUEZ E, SILVA S, PINTO G, SANTOS C. Micropropagation of *Juniperus phoenicea* from adult plant explants and analysis of ploidy stability using flow cytometry. *Biologia Plantarum*, v.51, p.7-14, 2007.

LOUREIRO J, SANTOS C. Aplicação da citometria de fluxo ao estudo do genoma vegetal. *Boletim de Biotecnologia*, São Paulo, v.77, p.18-29, 2004.

MARIE D, BROWN SC. A cytometric exercise in plant DNA histograms with 2C values for 70 species. *Biology of the Cell*, v.78, p.41-51, 1993.

MARTINS CC, NAKAGAWA J, BOVI MLA, STANGUERLIM H. Teores de água crítico e letal para sementes de açaí (*Euterpe oleracea* Mart. – Palmae). *Revista Brasileira de Sementes*, n.1, p.125-132, 1999.

MARTINS CC, BOVI MLA, NAKAGAWA J, JÚNIOR GG. Temporary storage of Jussara palm seeds: effects of time, temperature and pulp on germination and vigor. Brasília: *Horticultura Brasileira*, n.2, p.71-276, 2004.

MAXIMOVA SN, ALEMANO L, YOUNG A, FERRIERE N, TRAO-RE A, GUILTINAN MJ. Efficiency, genotypic variability, and cellular origin of primary and secondary somatic embryogenesis of *Theobroma cacao* L., *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, v.38, p.252-259, 2002.

MEDRANO RMEG, BORGES JIM, TAN MJB, GONZÁLEZ NV, KU-CAUICH JR. Using flow cytometry and cytological analyses to assess the genetic stability of somatic embryo-derived plantlets from embryogenic *Musa acuminata* Colla (AA) ssp. *malaccensis* cell suspension cultures. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, v.116, p.175-185, 2014.

MENDES AM, LOPES MLB, FALES LA, FILGUEIRAS GC, O mercado de açaí no estado do Pará: uma análise recente. *Amazônia: Ciência e desenvolvimento*, Belém, v.8, p.105-119, 2012.

MENEZES EMS., TORRES AT, SRURR AUS. Valor nutricional da polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Mart) liofilizada. *Acta Amazonica*, v.38, p.311-316, 2008.

MENEZES FS, FALCÃO DQ, MENDONÇA RFW, SILVEIRA CS, RENNÓ MN, RODRIGUES VP, MOREIRA DL, MATHEUS ME, FERNANDES PD, KAPLAN MAC. Chemical and pharmacological survey on Brazilian medicinal plants using ethnopharmacological information as a tool. *Acta Horticulturae*, v. 675, p.89-95, 2005.

MOURA EF, MOTOIKE SY, VENTRELLA MC, JUNIOR AQS, CARVALHO M. Somatic embryogenesis in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from zygotic embryos. *Scientia Horticulturae*, v.119, p.447-454, 2009.

MOURA EF, VENTRELLA MC, MOTOIKE SY, SÁ JÚNIOR AQ, CARVALHO M, MANFI CE. Histological study of somatic embryogenesis induction on zygotic embryos of macaw palm (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd.ex Martius). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.95, p.175-184, 2008.

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

NAING AH, MIN JS, PARK K, CHUNG MY, LIM SH, LIM KB, KIM CK. Primary and secondary somatic embryogenesis in *Chrysanthemum morifolium* cv. 'Baeksun' and assessment of ploidy stability of somatic embryogenesis process by flow cytometry, *Acta Physiol Plant*, v.35, p.2965-2974, 2013.

NAMASIVAYAM P. Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.90, p.1-8, 2007.

NASCIMENTO WMO. *Açaí Euterpe oleracea Mart.*, Informativo Técnico Rede de Sementes da Amazônia n.18, Embrapa Amazônia Oriental, 2008.

NASCIMENTO WMO, CARVALHO JEU, OLIVEIRA MSP. Avaliação da porcentagem de sobrevivência em perfilhos de açaizeiro de diferentes matrizes. In: *Simpósio de recursos genéticos para américa latina y el caribe*. p.169-170, 2009.

NIEVES N, ZAMBRANO Y, TAPIA R, CID M., PINA D, CASTILLO R. Field performance of artificial seed-derived sugarcane plants. *Plant cell, tissue and organ culture*, v.75, p.279-282, 2003.

NOGUEIRA OL. *A cultura do açaí*. Embrapa-SPI. Brasília-DF, p.50, 1995.

NOGUEIRA OL, FIGUEIRÊDO FJC, MÜLLER AA, Sistema de Produção do Açaí, Embrapa Amazônia Oriental, Sistemas de Produção, p.4, 2005. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Acai/SistemaProducaoAcai/index.htm> (acesso em: 28/01/2014).

NOGUEIRA OL, HOMMA AKO. Importância do manejo de recursos extrativos: o caso de açaizeiros (*Euterpe oleracea* Mart.) no estuário amazônico. In: AGUIAR D.R.D., PINHO J.B., *Agronegócio brasileiro: desafios e perspectivas*, v.2, p.139-150, 1998.

NOGUEIRA OL. Sistema de produção do Açaí. Embrapa Amazônia Oriental. *Sistemas de Produção*, n.4, 2006.

O' BRIEN TP, FEDER N, MCCULLY ME. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue, *Protoplasma*, v.59, p.368-373, 1965.

OLIVEIRA LC. Palinologia, Citogenética conteúdo de DNA nuclear em espécies do gênero *Euterpe*, *Dissertação* (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) Universidade Federal de Lavras. 2011.

OLIVEIRA LS, XAVIER A, DIAS PC, CORREIA ACG, BORGES SR, TAKAHASHI EK, PAIVA HN. Enraizamento de miniestacas e microestacas de clones de *Eucalyptus urophylla* x e. *Globulus* e de *eucalyptus grandis* x e. *Globulus*, *Scientia Forestalis*, v.40, p.507-516, 2012.

OLIVEIRA MSP. Biologia floral do açaizeiro em Belém do Pará. Embrapa Amazônia Oriental. *Boletim de Pesquisa* 08, 26p. 2002.

OLIVEIRA MSP, CARVALHO JEU, NASCIMENTO WMO. *Cultivo do Açaizeiro para Produção de Frutos*. Embrapa Amazônia Oriental, Circular Técnica 26, 2002.

OLIVEIRA MSP, FARIAS NETO JT. *Cultivar BRS-Pará: Açaizeiro para a produção de frutos em terra firme*. Belém-pa: Embrapa amazônia oriental, (comunicado técnico, n.114, p.3, 2004.

OLIVEIRA MSP, FARIAS NETO JT, PENA RS. Açaí: técnicas de cultivo e processamento. Fortaleza: *Instituto Frutal*, p.104, 2007.

OLIVEIRA MSP, LEMOS M A, SANTOS EO, SANTOS VF. *Variação fenotípica em acessos de açaizeiro (Euterpe oleracea Mart.) para caracteres relacionados à produção dos frutos*. Belém: Embrapa-cpatu, n.23, p.6-19, 1998.

OLIVEIRA MSP, MOCHIUTTI S, FARIAS NETO JT, Domesticação e melhoramento do açaizeiro. In: BORÉ A, LOPES MTG., CLEMENT CR, *Domesticação e melhoramento: espécies amazônicas*. Universidade Federal de Viçosa. p.207-236, 2009.

ORBOVIE V, CALOVIE M, VILORIA Z, NIELSEN B, GMITTER FG JR., CASTLE WS, GROSSER JW. Analysis of genetic variability in various tissue culture-derived lemon plant populations using RAPD and flow cytometry. *Euphytica*. v.161, p.329–335, 2008.

PALACIO DN. Concentração de suco clarificado de açaí por osmose inversa. *Dissertação* (mestrado em tecnologia de processos químicos e bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, p.73, 2008.

PAN MJ, VAN STADEN J. The use of charcoal in *in vitro* culture - a review. *Plant Growth Regulation*, v.26, p.155-163, 1998.

PEREIRA AR, CARVALHO SP, PASQUAL M, SANTOS FC. Embriogênese somática direta em explantes foliares de *Coffea arabica* cv. Acaíá Cerrado: efeito de cinetina e ácido giberélico. *Ciência e Agrotecnologia*, v.31, p.332-336, 2007.

PERERA PIP, VIDHANAARACHCHI VRM, GUNATHILAKE TR, YAKANDAWALA DMD, HOCHER V, VERDEIL JL, WEERAKOON LK. Effect of plant growth regulators on ovary culture of coconut (*Cocos nucifera* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.99, p.73-81, 2009.

PÉREZ-NUÑEZ MT, CHAN JL, GONZÁLEZ T, SAÉNZ L, VERDEIL JL, OROPEZA C. Improved somatic embryogenesis from *Cocos nucifera* (L.) plumule explants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, v.42, p.37-43, 2006.

PHILLIPS RL, KAEPLER SM, OLHOFT P. Genetic instability of plant tissue cultures: Breakdown of normal controls. *Proceedings of the National Academy Science*, v.91. p.5222-5226, 1994.

PINTO G, LOUREIRO J, LOPES T, SANTOS C. Analysis of genetic stability of *Eucalyptus globulus* Labill.somatic embryos by flow cytometry. *Theoretical and Applied Genetics*, v.109, p.580-587, 2004.

POLL H. *Anuário brasileiro da fruticultura*. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, p.42-45, 2013.

POULET D. *Açaí: estudo da cadeia produtiva - fruto e palmito*. Macapá: IEPA, 43, 1998.

POZO-INSFRAN D, BRENES CH, TALCOTT ST. Phytochemical composition and pigment stability of Acai (*Euterpe oleracea* Mart.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.52, p.1539-1545, 2004.

RAEMAKERS CJJ, JACOBSEN E, VISSER RGF. Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. *Euphytica* v.81, p.93-107, 1995

RAJESH RC, LUIS ZG, SCHERWINSKI-PEREIRA JE. Differential responses to somatic embryogenesis of different genotypes of Brazilian oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.111, p. 59-67, 2012.

REIS BO, SILVA IT, SILVA IM, ROCHA BR. Produção de briquetes energéticos a partir de caroços de açaí. In: encontro de energia no meio rural, 4. Anais. 2002.

RIBEIRO ASS, PALHA MDC, TOURINHO MM, WHITEMAN CW, SILVA ASL. Utilização dos Recursos Naturais por communities Humanas do Parque Ecoturístico do Guamá. *Acta Amazonica*, v.37, p.235-240, 2007.

RIBEIRO JD. Açaí-solteiro (*Euterpe precatoria* Mart.) uma boa opção de exploração agrícola em Rondônia. *Fruticultura Irrigada*, 2004.

RIVAL A, BEULE T, BARRE P, HAMON S, DUVAL Y, NOIROT M. Comparative flow cytometric estimation of nuclear DNA content in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq) tissue cultures and seed-derived plants, *Plant Cell Reports* v.16, p.884-887, 1997.

RIVAL A, JALIGOT E, BEULÉ T, TREGGAR JW, FINNEGAN J. The oil palm "mantled" somaclonal variation: a model for epigenetic studies in higher plants. *Acta Horticulturae*, v.829, p.177-182, 2009.

ROGEZ H. *Açaí: preparo, composição e melhoramento da conservação*. Belém: EDUFPA. p.313, 2000.

SAÉNZ L, AZPEITIA A, CHUC-ARMENDARIZ B, CHAND JL, VERDEIL JL, HOCHER V, OROPEZA C. Morphological and histological changes during somatic embryo formation from coconut plumule explants. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*. v.42, p.19-25, 2006.

SAÉNZ L, HERRERA G, UICAB-BALLOTE F, CHAN JL, OROPEZA C. Influence of form of activated charcoal on embryogenic callus formation in coconut (*Cocos nucifera*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.100, p.301-308, 2010.

SALDANHA CW, MARTINS-CORDER MP, STEINMACHER DA, GUERRA MP. *In vitro* morphogenesis in zygotic embryos and leaf sheaths of *Euterpe edulis* Martius (Arecaceae). *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v.6, p.228-235, 2006.

SANÉ D, ABERLENC-BERTOSSI F, DIATTA LID, GUÈYE B, DAHER A, SAGNA M, DUVAL Y, BORGEL A. Influence of growth regulators on callogenesis and somatic embryo development in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) Sahelian cultivars. *The Scientific World Journal*, p.8, 2012.

SANÉ D, ABERLENC-BERTOSSI F, GASSAMA-DIA YK, SAGNA M, TROUSLOT MF, DUVAL Y, BORGEL A. Histocytological analysis of callogenesis and somatic embryogenesis from cell suspensions of date palm (*Phoenix dactylifera*). *Annals of Botany*, v.98, p.301-308, 2006.

SANTANA AC, COSTA FA. Mudanças recentes da oferta e demanda do açaí no estado do Pará. In: SANTANA, A.C., CARVALHO. D.F., MENDES, F.A.T. *Organização e competitividade das empresas de polpa de frutas do estado do Pará: 1995 a 2004*. UNAMA, 2010.

SANTANA AC, GOMES SC. Mercado, comercialização e ciclo de vida do mix de produtos do açaí no Estado do Pará. In CARVALHO D.F.F., (Org.) *Ensaio selecionados sobre a economia da Amazônia nos anos 90*. p.85-115, 2005.

SANTOS GM, MAIA GA, SOUSA PH, COSTA JMC, FIGUEIREIDO RW, PRADO GM. Correlação entre atividade antioxidante e compostos bioativos de polpas comerciais de açaí (*Euterpe oleracea* Mart). *Archivos latino americanos de nutricion*, v.58, p.187-192, 2008.

SANTOS RB, PAIVA R, PAIVA PDO, SANTANA JRF. Problemas no cultivo *in vitro*: *Cultura de tecidos*. Paiva e Paiva, UFLA, Lavras, M.G. v.9, p.73-79, 2001

SARTORETTO LM, SALDANHA CW, CORDER MPM. Transformação genética: estratégias e aplicações para o melhoramento genético de espécies florestais. *Ciência*

rural, v.38, p.861-871, 2008.

SCHAUSS AG, WU X, PRIOR RB, PATEL D, HUANG D, KABABICK JP. Phytochemical and nutrient composition of freeze-dried Amazonian palm berry *Euterpe oleracea* Mart. (açai). *J Agric Food Chem.* v.54, p.8598-8603, 2006.

SCHERWINSKI-PEREIRA JE, GUEDES RS, FERMINO PCP, SILVA TL, COSTA FHS. Somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm using the thin cell layer technique. *In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, v.46, p.378-385, 2010.

SCHERWINSKI-PEREIRA JE, GUEDES RS, SILVA RA, FERMINO JR, LUIS ZG, FREITAS EO. Somatic embryogenesis and plant regeneration in açai palm (*Euterpe oleracea*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.109, p.501-508, 2012.

SCHIMIDT T, EWALD A, SEYRING M, HOHE A. Comparative analysis of cell cycle events in zygotic and somatic embryos of *Cyclamen persicum* indicates Strong resemblance of somatic embryos to recalcitrant seed. *Plant Cell Reports*; v.25, p.643-650, 2006.

SCHWENDIMAN J, PANNETIER C, MICHAUX-FERRIERE N. Histology of somatic embryogenesis from leaf explants of the oil palm *Elaeis guineensis*. *Annals of Botany*, v.62, p.43-52, 1988.

SGHAIER B, BAHLOUL M, BOUZID RG, DRIRA N, Development of zygotic and somatic embryos of *Phoenix dactylifera* L. cv. Deglet Nour: Comparative study. *Scientia Horticulturae*; v.116, p.169-175, 2008.

SHANLEY P, SERRA ., MEDINA G. Frutíferas e plantas úteis na vida Amazônia. *Centro Internacional para Pesquisa Florestal (CIFOR)*, p.167-175, 2010.

SHARRY S, CABRERA-PONCE JL, HERRERA-ESTRELLA L, RANGEL- CANO RM, LEDE S, ABEDINI W. An alternative pathway for plant *in vitro* regeneration of chinaberry –tree *Melia azedarach* l. derived from the induction of somatic embryogenesis *Electronic Journal of Biotechnology*, v.9, p.187-194, 2006.

SILVA RC, LUIS ZL. SCHERWINSKI-PEREIRA J.E., Differential responses to somatic embryogenesis of different genotypes of Brazilian oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* v.11, p.59-67, 2012.

SINGH HP, SELVARAJAN SU, KARIHALOO JL. Micropropagation for production of quality banana planting material in asia-pacific. Nova delli: APCOAB/APAARI, p.94, 2011.

SKIRVIN RM, COYNER M, NORTON MA, MOTOIKE S, GORVIN D. Somaclonal variation: do we know what *causes it*? *AgBiotechNet*, v.2, p.1-4, 2000.

SMÝKAL P, VALLEDOR L, RODRÍGUEZ R, GRIGA M. Assessment of genetic and epigenetic stability in long-term *in vitro* shoot culture of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Cell Reports*, v.26, p.1985-1998, 2007.

SOUSA LAS. Desenvolvimento de plantas jovens de açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) plantado em área com vegetação secundária (capoeira) na localidade de Benjamin Constant, município de Bragança, estado do Pará. *Dissertação* (Mestrado), Belém-PA, p.62, 2006.

STEINER N, SANTA-CATARINA C, ANDRADE JBR, BALBUENA TS, GUERRA MP, HANDRO W, FLOH EIS, SILVEIRA V. Araucaria angustifolia Biotechnology. Functional, *Plant Science and Biotechnology*; v.2, p.20-28, 2008.

STEINMACHER DA, GUERRA MP, SAARE-SURMINSKI K, LIEBEREI RA, Temporary immersion system improves *in vitro* regeneration of peach palm through secondary somatic embryogenesis. *Annals of Botany*, v.108, p.1463–1475, 2011.

STEINMACHER DA, CLEMENT CR, GUERRA MP, Somatic embryogenesis from immature peach palm inflorescence explants: towards development of an efficient protocol. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.89, p.15-22, 2007.

SUGIMOTO K, GORDON SP, MEYEROWITZ EM, Regeneration in plants and animals: dedifferentiation, transdifferentiation, or just differentiation? *Trends in Cell Biology*, v.21, p.212-218, 2011.

SUGIMURA Y, SALVAÑA MJ. Induction and growth of callus derived from rachilla explants of young inflorescences of coconut palm. *Canadian Journal of Botany*, v.67, p.272-274, 1989.

SUTTON B. Commercial delivery of genetic improvement to conifer plantations using somatic embryogenesis, *INRA, EDP Sciences*, v.59, p.657–661, 2002.

TAHIR M, STASOLLA C. Shoot apical development during *in vitro* embryogenesis. *Canadian Journal of Botany*, v.84, p.1650-1659, 2006.

TEIXEIRA JB. SONDAHL M.R, KIRBY E.G., Somatic embryogenesis from immature inflorescences of oil palm. *Plant Cell Reports*, v.13, p.247-250, 1994.

TEIXEIRA JB. SONDAHL M.R., KIRBY E.G., Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of oil palm. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.34, p.227-233, 1993.

TEIXEIRA JB. SONDAHL M.R., KIRBY E.G., Somatic embryogenesis from immature inflorescences of oil palm. *Plant Cell Reports*. v.13, p.247–250, 1994.

TERESO S, ZOGLAUER K, MILHINHOS A, MIGUEL C, OLIVEIRA MM. Zygotic and somatic embryo morphogenesis in *Pinus pinaster*: comparative histological and histochemical study. *Tree Physiology*; v.27, p.661-669, 2007.

- TERZI M, LO-SCHIAVO F. Somatic embryogenesis. In: Bhojwani, *Plant tissue culture: applications and limitations*. The Netherlands: Elsevier. p.54-66, 1990.
- THIBAUD-NISSEN F, SHEALY RT, KHANNA A, VODKIN LO. Clustering of microarray data reveals transcripts patterns associated with somatic embryogenesis in soybean. *Plant Physiology*; v.132, p.118-136, 2003.
- THOMPSON DS. Space and time in the plant cell wall: relationships between cell type, cell wall rheology and cell function. *Annals botany*, v.2, p.203-211, 2008.
- THUZAR M, VANAVICHIT A, TRAGOONRUNG S, JANTASURIYARAT C. Recloning of regenerated plantlets from elite oil palm (*Elaeis guineensis* jacq.) Cv. Tenera. *African Journal of Biotechnology*, v.11, p.14761-14770, 2012.
- TINOCO AC. *Açaí amazônico: novas perspectivas de negócio*. Embrapa Amazônia Oriental, Trabalho apresentado no Workshop Regional do Açaizeiro: pesquisa, produção e comercialização, Belém, PA, 2005.
- TITON M, XAVIER A, OTONI WC, MOTOIKE SY. Efeito dos reguladores de crescimento dicamba e picloram na embriogênese somática em *Eucalyptus grandis*. *Revista Árvore*, v.31, n.3, 2007
- TOONEN MAJ, VRIES SC. Initiation of somatic embryos from single cells. In: WANG TL, CUMING A. Embryogenesis: the generation of a plant. *Oxford: Bios Scientific*, p.173–189, 1996.
- TORIBIO M, FERNANDÉZ C, CELESTINO C, MARTINEZ MT, SAN-JOSÉ MC, VIEITEZ AM. Somatic embryogenesis in mature *Quercus robur* trees. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, v.76, p.283-287, 2008.
- TORRES AC, CALDAS LS, BUSO JA. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: EMBRAPA, v.1, p.509, 1998.
- UTOMO HS, WENEFRIDA, MECHE MM, NASHPLANT JL. Synthetic seed as a potential direct delivery system of mass produced somatic embryos in the coastal marsh plant smooth cordgrass (*Spartina alterniflora*). *Plant cell tiss. organ. cult.*, v.92, p.281–291, 2008.
- VAN WINKLE SC, PULLMAN GS. The combined impact of pH and activated carbon on the elemental composition of a liquid conifer embryogenic tissue initiation medium. *Plant Cell Reports*, v.22, p.303–311, 2003.
- VASIL IK. A history of plant biotechnology: from the cell theory of Schleiden and Schwann to biotech crops. *Plant Cell Reports*, v.27, p.1423–1440, 2008.
- VERDEIL JL, HUET C, GROSDEMANGE F, BUFFARD-MOREL J. Plant regeneration from cultured immature inflorescences of coconut (*Cocos nucifera* L.): evidence for somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*, v.13, p.218-221, 1994.

VIÑAS M, JIMÉNEZ VM. Factores que influyen en la embriogénesis somática *in vitro* de palmas (Arecaceae). *Revista Colombiana de Biotecnología*, v.2, p.229-242, 2011.

VON ARNOLD S, SABALA I, BOZHOKOV P, DYACHOK J, FILONOVA L. Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.9, p.233-24, 2002.

VON ARNOLD S. Somatic embryogenesis. In: GEORGE EF, KLERK GJ. Plant propagation by tissue culture. *The Netherlands: Springer*. Capítulo 9. 3ed, p.335-354, 2008.

WANG HC, CHEN JT, CHANG WC. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf, root and stem-derived callus cultures of *Areca catechu*. *Biologia Plantarum*, v.50, p.279-282, 2006.

WILLIAMS EG, MAHESWARAN G. Somatic embryogenesis: factors influencing behaviour of cells as an embryogenic group. *Annals of Botany*, v.57, p.443-462, 1986.

XAVIER A, WENDLING L, SILVA RL. *Silvicultura clonal: princípios e técnicas*. 2.ed. Viçosa, MG: Ed. da UFV, 279 p. 2013.

XAVIER A, WENDLING I, SILVA RL. *Silvicultura clonal: princípios e técnicas*. Viçosa: Ed. UFV. 272 p. 2009.

ZAVATTIERI M, FREDERICO A, LIMA M, SABINO R, ARNHOLDT-SCHMITT B. Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions. *Electronic Journal of Biotechnology*, v.13, 2010.