

Utilização da embriogênese somática no processo de melhoramento da tamareira.¹

Regina Ferro de Melo Nunes²

Manoel Abilio de Queiróz²

Fernando Mendes Pereira³

Carlos Ferreira Damião Filho⁴

Euclides Braga Malheiros⁵

Introdução

A tamareira *Phoenix dactilifera* L. é uma palmeira do gênero *Phoenix* que produz frutos comestíveis que fazem parte de uma dieta básica de povos de vários países do Oriente Médio (Bailey, 1944). Suas flores frescas são a base para uma bebida destilada (“tora water”). Uma goma medicinal (“kukm chil”) é feita de seu palmito, sendo de comprovada eficácia em doenças do aparelho respiratório. Porções de frutos maduros são utilizados na confecção de bandagens, usadas como antídoto na mordeduras de animais peçonhentos. As suas folhas picadas são matérias prima para confecção de sacos, cestas, leques, vasos ornamentais, entre outros (Datta, 1965; Munnier, 1973 e Gomes, 1975).

A principal limitação para instalação de um tamareiral são os seus propágulos, em número e qualidade, apropriadas. É consenso entre os pesquisadores e produtores de tamareira, que este é o item que mais onera a implantação de um tamareiral.

A tamareira pode ser propagada de diversas formas por sementes, rebentos, gemas e por cultivo “in vitro” de seus tecidos. Cada um deste processos apresenta vantagens e desvantagens, sendo a adoção de cada destes uma função dos objetivos a serem alcançados.

Escolheu-se a embriogênese somática que, segundo alguns autores, é uma promissora ferramenta para a rápida propagação da espécie (Bhansali & Kaul, 1991). É definida como o processo de desenvolvimento de embriões, a partir de células somáticas. Podendo distinguir duas maneiras: - direta, na qual os embriões se originam diretamente dos tecidos, sem a proliferação do calo e – indireta, na qual o calo é formado, mantido e proliferado antes do desenvolvimento dos embriões. Em ambos os casos, os embriões passam pelo estado globular, cordiforme e torpedo seguindo pela formação da planta (Collin & Grosser, 1984).

A formação de raízes e partes aéreas “in vitro” é controlada pela relação entre as concentrações (dentro de certos limites) de auxinas e citocininas presentes no meio de cultivo. Várias combinações destes hormônios, em diferentes espécies ou mesmo dentro de cultivares de uma mesma espécie

¹ Parte da tese de doutorado

² Eng. Agr. Ph.D. Pesquisador da Embrapa Semi-Árido, Caixa Postal 23, 56300-000, Petrolina-PE.

³ Eng. Agr. Ph.D. Professor Titular da FCAVJ – Departamento de Horticultura.

⁴ Eng. Agr. Ph.D. Professor da FCAVJ – Departamento de Biologia Aplicada a Agropecuária.

⁵ Eng. Agr. Ph.D. Professor da FCAVJ – Departamento de Ciências Exatas, FCAVJ-UNESP – 14870-000, Jaboticabal-SP

promovem o desenvolvimento de embriões somáticos em plantas (Evans *et al*, 1983, Grattapaglia & Machado, 1990; Damião Filho, 1995).

De maneira geral, a embriogênese somática de palmeiras é obtida pela utilização de elevadas concentrações de ácido 2,4 – Diclorofenoxiacético (2,4-D) nas doses de 10 a 100 mg/l de meio de cultura, sendo estas as comumente utilizadas por diversos autores em seus trabalhos com indução de embriões na tamareira (Al-Sali *et al.*, 1987; Demason *et al*, 1992).

O emprego de 2,4-D para a produção de propágulos de tamareira, via embriogênese somática, é muito utilizada, apesar de ser uma técnica de risco quando da utilização de altas doses, podendo implicar em produção de plantas aberrantes. Comparando-se com o ácido naftalemoacético (NAA) o 2,4-D tem mais implicação na frequência de anormalidade genéticas (George Sharrington 1984 a).

Calero (1989) e Calero *et al* (1990), estudaram os efeitos da luz vermelha, azul e branca em explantes de tamareira cultivados em meio de cultura de Shenck & Hildebrant sobre a indução de embriogênese somática. Verificaram que a luz vermelha, isoladamente foi efetiva no processo quando comparada com os efeitos da luz azul, branca e do escuro. Verificaram também, que havia uma correlação negativa com a produção de embriões e o conteúdo de leucoantocianina.

Reuveni *et al.* (1972) estudando novos e rápido métodos para a propagação vegetativa da tamareira citam que os métodos que utilizam a cultura de tecido de plantas, só tinham sucesso quando eram cultivados os embriões, e os meios de cultura apropriados para o cultivo destes, falhavam quando se utilizam outros tecidos, que não os embriões (Melo, 1980; Deberch & Zimmerman, 1991; Hervan *et ali* 1991).

Tisserat & Demason (1980) verificaram que nas culturas de calos originados de gemas auxiliares haviam células morfológicamente competentes que proliferaram formando embriões. A transparência de tais calos para o meio de reguladores de crescimento, aumentou o desenvolvimento de tais embriões, até o surgimento de plântulas completas (Andreoli, 1985).

Sharma *et al* (1984) obtiveram sucessos na formação de embriões somáticos de tamareira cv. Khadrawi, e na formação de plantas viáveis a partir destes. Para tanto estabeleceram culturas de calos obtidos de gemas auxiliares e extremidade de ápices caulinares, retirados de plantas com 4-6 anos de idade. Os melhores resultados foram obtidos quando tais explantes foram cultivados no meio de Murashige & Skoog (1962), contendo carvão ativado (0,3%), NaH₂ PO₄ (170 mg/l), KH₂PO₄ (200 mg/l), 2,4-D (100 mg/l), Benziladenina (BA) (5 mg/l) e Tiamina (1 mg/l) (Hu & Wang, 1986).

Matter (1986) teve sucesso na obtenção de embriões e no transplante oriundo destes, para as condições de campo. Para tal, explantes de ápice meristemático das variedades de tamareira Barhee e Hallaway foram cultivados em meio de Murashige e Skoog (1962) suplementado com BA e Kiv (cinetina) e as auxinas (NAA e 2,4-D) nas concentrações de 0 a 100 mg/l. Observou que houve vigoroso crescimento de calos nos meios onde houve suplementação a partir de 10 mg/l até 100 mg/l das auxinas testados (Pasqual & Pinto, 1988).

Falcone & Marcheschi (1988) observaram que baixas doses de 2,4-D (1 mg/l) e de NAA (10 mg/l) foram suficientes para induzirem calos embriogênicos na cultivar Deglet Nour. A transferência de tais calos para meio de cultura, sem

reguladores de crescimento resultou na produção de embriões os quais desenvolveram-se em plântulas.

Uma das mais recente citação encontrada sobre a produção de embriões de tamareira foi a de Nazeri *et al* (1993). Os autores estudaram a embriogênese somática de tamareira nas variedades “Estamaram” e “Kabkab”. Extremidades de caules, gemas laterais e parte de folhas hovens de tais variedades foram cultivadas sobre meio de Murashige e Skoog, com diferentes concentração de reguladores de crescimento. As culturas foram mantidas sob ambiente controlado a 28°C, 2000 lux de intensidade luminosa a 16 horas de fotoperíodo. Os autores observaram que a embriogênese somática foi induzida em meio suplementado com 100 mg/l de 2,4-D ou 20 mg/l de NAA. Observações citológicas revelaram que os embriões possuíam diferentes estágios de crescimento e tinham capacidade de germinação (Torres & Caldas, 1990) (Nazir *et al*, 1994; Pierik, 1990).

Com relação ao método que emprega a cultura “in vitro” para obtenção de propágulos, o estudo da literatura indica que o mais freqüentemente utilizado é o da embriogênese somática.

Objetivou-se no presente trabalho, comparar o potencial de obtenção de propágulos de tamareira via embriogênese somática, nas diferentes variedades estudadas, utilizando meio de cultura definido e em interação com luz vermelha.

Material e métodos

Local

O experimento foi conduzido em uma primeira fase no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, do Departamento de Biologia Aplicada a Agropecuária e, numa Segunda fase de desenvolvimento, em condições de ripado, localizado na Fazenda Experimental de Horticultura, ambos departamentos da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – UNESP.

Foram utilizados como material biológico, sementes de 5 variedades de tamareira, as quais foram adquiridas junto ao Centro de Pesquisa Agropecuária do Trópico Semi-Árido – CPATSA da Embrapa, em Petrolina-PE.

Variedades

Dentre as variedades de tamareira, estudou-se: Medjool, Zahidi, Deglet Nour, Khadrawy e Halawy, listadas entre as mais importantes, de cultivo disperso mundialmente. As sementes das variedades foram obtidas de frutos maduros, provenientes de plantas de climax de maturação. Após a retirada das “sementes”, as mesmas foram lavadas em água corrente, secas à sombra selecionadas e separadas aleatoriamente em lotes submetidos aos diferentes tratamentos.

Indução de embriogênese somática

Foram obtidas 50 plântulas, de cada variedade, pelo processo descrito por Tisserat (1982). Tais plântulas foram fontes de explantes, constituídos pelos embriófitos (“bainhas” cotiledonares).

Os embrióforos foram excisados com auxílio de lâmina de bisturi, na sua porção terminal, que compreende um pedaço de aproximadamente 0,5 cm de comprimento, contendo o eixo embrionário ou parte deste. Os explantes foram submetidos a esterilização superficial, constando de imersão em solução aquosa de etanol a 70%, seguindo-se de enxágües com água destilada para retirada do agente e, em seguida, por imersão (sob agitação contínua) em solução aquosa de alvejante comercial clorado a 20%, durante 10 minutos. Após, foram conduzidos à câmara asséptica, onde foram enxaguadas com água destilada e esterilizada, sendo inoculados, individualmente, no meio da cultura.

O meio da cultura foi o de Shenck & Hildebrandt (1972) e teve a seguinte composição a composição do Tabela 1.

Tabela 1 - Meio de cultura de Shenck & Hildebrandt (1972) para indução da embriogênese somática em tamareira.

MACRONUTRIENTES	QUANTIDADE (mg/l)
KNO ₃	2500
CaCl ₂ . 2H ₂ O	200
MgSO ₄ . 7H ₂ O	400
NH ₄ H ₂ PO ₄	300
MICRONUTRIENTES	
MnSO ₄ . 4H ₂ O	10,0
MnSO ₄ . H ₂ O	1,0
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	5,0
H ₃ BO ₃	1,0
KI	0,2
CuSO ₄ . 2H ₂ O	0,1
Na ₂ MoO ₄ . 6H ₂ O	0,1
Citrato de FeII	15,0
NaFeEDTA	20,0
VITAMINAS	
mio-inositol	1000
Tiamina HCl	5,0
Ácido nicotínico	5,0
Piridoxina	0,5

O meio de Shenck & Hildebrandt (1972) foi suplementado com 1,0 mg/l de 2,4-D; 0,1 mg/l de benziladenina (BA) e 10 g/l de sacarose.

O meio da cultura foi semi solidificado com ágar (0,8% p/v) e o pH foi acertado para 5,8 antes da autoclavagem. Foram distribuídos alíquotas de 10 ml do meio da cultura, em tubos de vidro, sendo os mesmos selados com tampa plástica e esterilizados em autoclave, durante 20 minutos, à pressão de 1 atm e 120°C. Para cada variedade, foram feitas 50 repetições (50 tubos de cultura) mantendo-se tal número por substituição dos frascos eventualmente contaminados.

Após a incubação, os explantes foram imediatamente submetidos a luz vermelha (655 ± 20 nm).

Como fonte de luz foram utilizadas três lâmpadas do tipo GRO-lux (que emitem 39,92% na faixa do vermelho, 630-700nm), montadas em caixa provida

de janela. Tal janela foi coberta por camadas de papel celofane vermelho, em número suficiente para aumentar e selecionar a emissão de luz na faixa do vermelho, em 655nm. Para determinação da luz emitida, foi utilizado um quantômetro (sensor de quantum), marca QSPAR, da Hansatech, específico para a região do vermelho.

O tratamento com luz vermelha foi fornecido durante duas semanas. Findo o período de tratamento, os calos, obtidos dos explantes, foram transferidos para o meio de cultura de Murashide & Skoog (1962), livre de reguladores de crescimento, para iniciação dos embriões somáticos. Tais culturas foram mantidas sob luz (3000 lux), com fotoperíodo de 16 horas, a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, por duas a três semanas. Os embriões somáticos, após período especificado, foram transferidos para novo meio de cultura de Murashide & Skoog (1962), agora suplementado com 2 mg/l de cada um dos reguladores de crescimento: ácido naftalenoacético (NAA); ácido naftoxiacético (NOA) e benziladenina (BA), objetivando o crescimento dos embrióides em plântulas completas com raízes e caules (Lizt & Jarret, 1991).

Após três semanas de manutenção no último meio de cultura, as plântulas foram submetidas a tratamento “endurecedor”, aumentando-se a temperatura de 28°C para 32°C . Após o “endurecimento”, as plantas foram removidas dos tubos de cultura, lavadas com água corrente, tratadas com carbendazim (0,2%) e estreptomicina (0,1%), cada um destes aplicados por meio minuto, e novamente lavadas com água esterilizada, antes do plantio em embalagens plásticas (30x15x10cm), contendo mistura de terra, areia e matéria orgânica, na proporção de 1:1:1, previamente esterilizada. As plantas foram mantidas sob condições de alta umidade (70-90%), cobrindo-se as embalagens com sacos plásticos. No prazo de dois meses, após a condução das plantas “*ex vitro*”, as mesmas estavam em condições de serem transferidas para condições de campo.

Resultados e discussão

Semeadura “in vitro” de variedades de tamareira

As análises estatísticas foram realizadas considerando-se um delineamento inteiramente casualizado num esquema em parcelas subdivididas no “tempo” tendo como parcelas as cinco variedades de tamareira estudadas e como subparcelas os oito tempos de germinação.

Os resultados das análises para as variáveis porcentagem de germinação e comprimento do embrióforo são apresentados nas Tabelas 2 e 3. Verifica-se na Tabela 2 que para a porcentagem de germinação não houve interação significativa entre os fatores analisados variedades x tempo de germinação. Observa-se na Tabela 2 e Figura 1 que para as diferentes variedades, houve diferença significativa na porcentagem de germinação sendo a variedades Zahidi a que menor porcentagem apresentou e em maior tempo. Observações semelhantes foram registradas por Tisserat (1979 a) e Nasir *et al* (1994) e Al-Maarri & Alchamdi (1995).

Tabela 2 - Valores de F. Coeficiente de Variação (CV) e média obtidas na análise de Variância das variáveis estudadas.

ESTATÍSTICAS	VARIÁVEIS		
	GL	Porc. Germ. ¹ (%)	Comp. mbr. ² (cm)
Parcelas:			
F para VARIEDADE(V)	4	5,13**	4,75**
Sub-parcelas:			
F para TEMPO(T)	7	11,44**	3457,94**
F para interação(V*T)	28	0,71 ^{NS}	2,61
CV%		34,35	13,66
Médias: V1 (Medjool)		0,707 ^B	13,55 ^A
V2 (Zahidi)		0,430 ^A	13,11 ^A
V3 (Deglet Nour)		0,706 ^B	13,69 ^{AB}
V4 (Kdadrawy)		0,534 ^{AB}	14,72 ^B
V5 (Halawy)		0,500 ^{AB}	14,54 ^B
Médias: Tempo 1***		0,450 ^C	2,82 ^A
Tempo 2		0,528 ^{BC}	3,19 ^A
Tempo 3		0,546 ^{BC}	7,72 ^{A^B}
Tempo 4		0,664 ^A	10,47 ^B
Tempo 5		0,636 ^A	12,02 ^{BC}
Tempo 6		0,604 ^{A^B}	19,74 ^C
Tempo 7		0,593 ^B	28,39 ^{CD}
Tempo 8		0,596 ^B	31,03 ^D

¹ Porcentagem de germinação (V x)² Comprimento do embrióforo (cm)

* Teste Significativo ao nível de 5% de probabilidade

** Teste significativo ao nível de 1% de probabilidade

***Intervalos semanais

NS Teste não significativo ao nível de 5% de probabilidade

+ Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 3 - Valores dos comprimentos médios dos embrióforos obtidos em avaliações semanais das cinco variedades estudadas.

VARIEDADES**	AVALIAÇÕES*							
	Temp1	Temp2	Temp3	Temp4	Temp5	Temp6	Temp7	Temp8
V1	3,05 ^{A+}	3,18 ^{AB}	7,50 ^{AB}	10,95 ^A	12,02 ^{AB}	18,75 ^{AB}	27,47 ^{AB}	30,07 ^{AB}
V2	2,44 ^A	2,55 ^A	6,09 ^A	9,13 ^A	10,52 ^A	17,73 ^A	26,64 ^A	29,63 ^A
V3	3,04 ^A	3,49 ^B	8,29 ^B	11,12 ^A	12,84 ^B	21,30 ^B	28,91 ^{AB}	31,20 ^{AB} _C
V4	2,70 ^A	3,10 ^{AB}	7,95 ^B	10,66 ^A	12,04 ^{AB}	20,90 ^{AB}	29,13 ^{AB}	32,13 ^C
V5	2,60 ^A	3,38 ^B	7,87 ^B	9,45 ^A	11,12 ^{AB}	19,48 ^{AB}	29,61 ^B	32,03 ^{BC}

+ Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade

* Avaliações: tempo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 = intervalos semanais

**Variedades: 1 – Medjool; 2 – Zahidi, 3 – Deglet Nour, 4 – Khadrawy e 5 – Halawy.

Com relação ao número de raízes e comprimento de raízes secundárias verifica-se pela Tabela 4 que a variedade Medjool foi a que melhor se apresentou estatisticamente não diferindo da Deglet Nour e da Khadrawy, estes resultados evidenciaram que estas variedades são importantes ao trabalho de multiplicação da tamareira e estão de acordo com Rhiss *et al.* (1979) e Kackar *et al.* (1989).

A análise estatística revelou diferença entre as variedades quanto ao número de raízes no processo de multiplicação “in vitro”. Quanto maior o tempo que permanece no cultivo há maior comprimento de raízes, porém o número de folhas não alterou. Estes resultados corroboram afirmações feitas por Duarte (1982) e Pierik (1990) que encontraram alto número de raízes em variedades cultivadas em um período de mais tempo de cultivo “in vitro”.

COMPRIMENTO DO EMBRIÓFORO

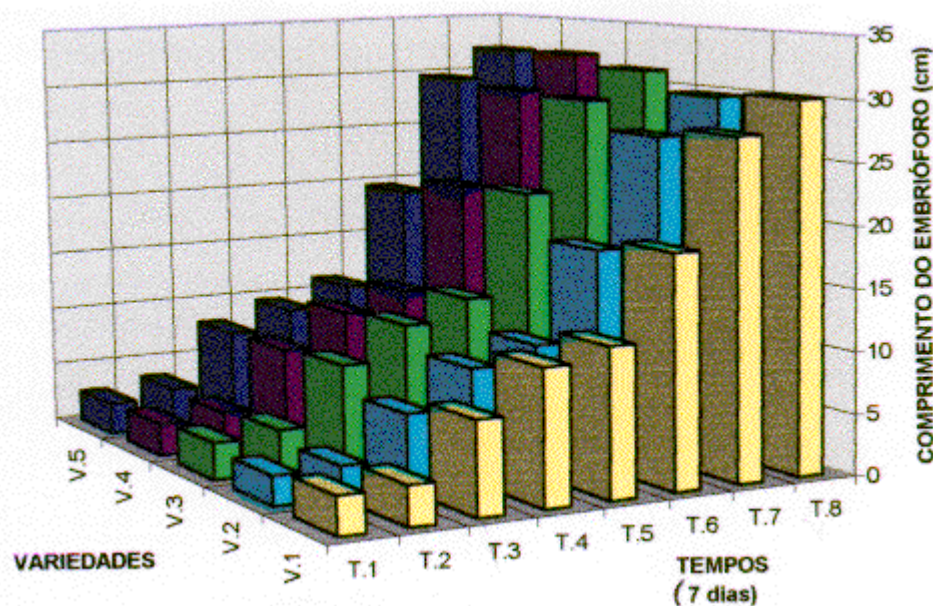


Figura 1 - Comprimento médio dos embrióforos das 5 variedades estudadas expresso em intervalos semanais. (V1-Medjool; V2-Zahidi; V3-Deglet Nour; V4-Khadrawy e V5-Halwy).

Tabela 4 - Valores de F, Coeficiente de Variação (CV) e médias obtidos na análise de variância para número e comprimento de raízes secundárias, comprimento de raiz primária, número e comprimento de folhas para as cinco variedades de tamareira, em intervalos semanais.

ESTATÍSTICAS	VARIÁVEIS				
	NRS ¹	CRP ²	CRS ³	NF ⁴	CF ⁵
F PARA VARIEDADE(V)	9,07**	7,53**	3,82**	1,29 ^{NS}	9,45**
CV%	32,93	40,96	34,48	17,96	19,35
Médias: V1***	2,28 ^{A+}	4,90 ^{AB}	24,30 ^{AB}	1,28 ^A	11,65 ^A
V2	1,60 ^B	3,87 ^B	22,17 ^{AB}	1,19 ^A	9,95 ^{BC}
V3	1,92 ^{A^B}	4,10 ^B	26,55 ^A	1,20 ^A	10,80 ^{A_B}
V4	1,58 ^B	5,75 ^A	21,28 ^B	1,19 ^A	9,45 ^C
V5	1,83 ^B	3,95 ^B	20,55 ^B	1,22 ^A	9,40 ^C

¹ Número de raízes secundárias (V x)

² Comprimento de raízes primárias

³ Comprimento de raízes secundárias

⁴ Número de folhas (V x)

⁵ Comprimento de folhas

** Teste significativo ao nível de 1% de probabilidade

***V1 = Medjool, V2 = Zahidi, V3 = Deglet Nour, V4 = Khadrawy e V5 = Halawy

NS Teste não significativo ao nível de 5% de probabilidade

+ Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Durante a execução deste experimento foi tomadas medidas de temperatura como observa-se na Tabela 5. Temperatura mais alta provavelmente contribui para um aumento na produção de raízes Carpenter (1988) observou que a temperatura ideal para a germinação de sementes de palmeiras está entre 10 a 35°C e que acima ou abaixo desses valores não ocorre germinação.

Tabela 5 - Média das temperaturas (°C) máxima e mínima semanais dos meses de outubro a dezembro de 1996, durante o período experimental. Laboratório de Cultura de Tecidos, Departamento de Biologia Aplicada a Agropecuária FCAV-UNESP, Jaboticabal-SP.

Semana	Período	T. max.	T. min.	T. média
1 ^a	07 a 13/10	30,4	23,6	27,0
2 ^a	14 a 20/10	32,0	25,6	28,8
3 ^a	21 a 27/10	31,4	26,4	28,9
4 ^a	28 a 03/11	32,6	24,0	28,3
5 ^a	04 a 10/11	30,2	24,6	27,4
6 ^a	11 a 17/11	32,4	23,5	28,0
7 ^a	18 a 24/11	31,0	22,2	26,6
8 ^a	25 a 01/12	30,4	25,8	28,1
9 ^a	02 a 08/12	30,6	24,4	27,5
10 ^a	09 a 15/12	30,4	23,8	27,1
11 ^A	16 a 22/12	32,6	24,0	28,3
12 ^a	23 a 19/12	32,2	27,2	29,7

Número e comprimento de folhas por variedade

Não houve diferença significativa para o número de folhas entre as variedades, porém a Khadrawy apresentou-se com menor número conforme observa-se na Figura-2.

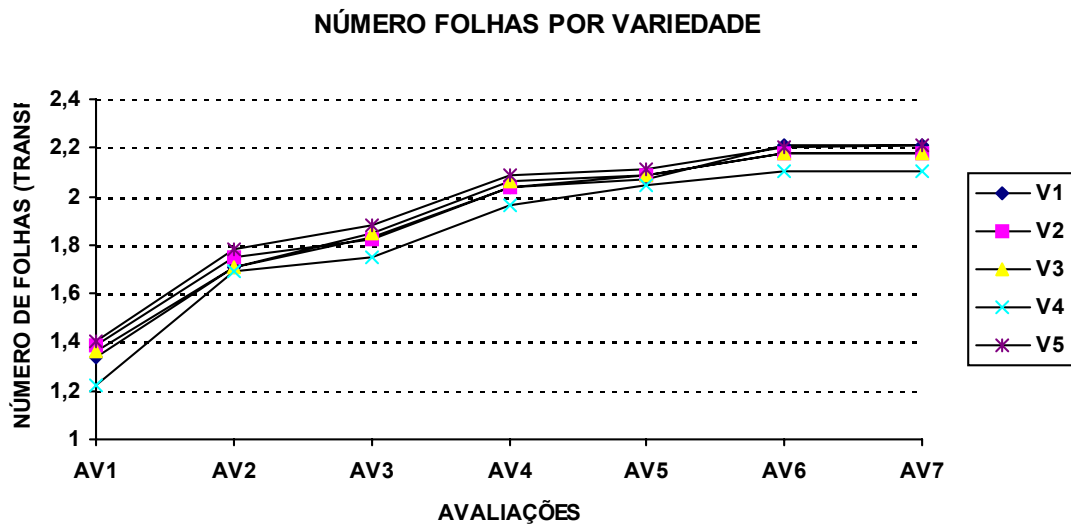


Figura 2 - Número de folhas de tamareira por variedade avaliada. (V1-Medjool; V2-Zahidi; V3-Deglet Nour; V4-Khadrawy; V5-Halawy).

As variedades diferiram entre si quanto ao comprimento de folha. As variedades Medjool e Deglet Nour tiveram comprimento médio e a variedade Halawy maior comprimento de folha. A Zahidi apesar de ter dado um comprimento de folha destacado, diferenciou-se muito pouco das demais variedades Figura 3.

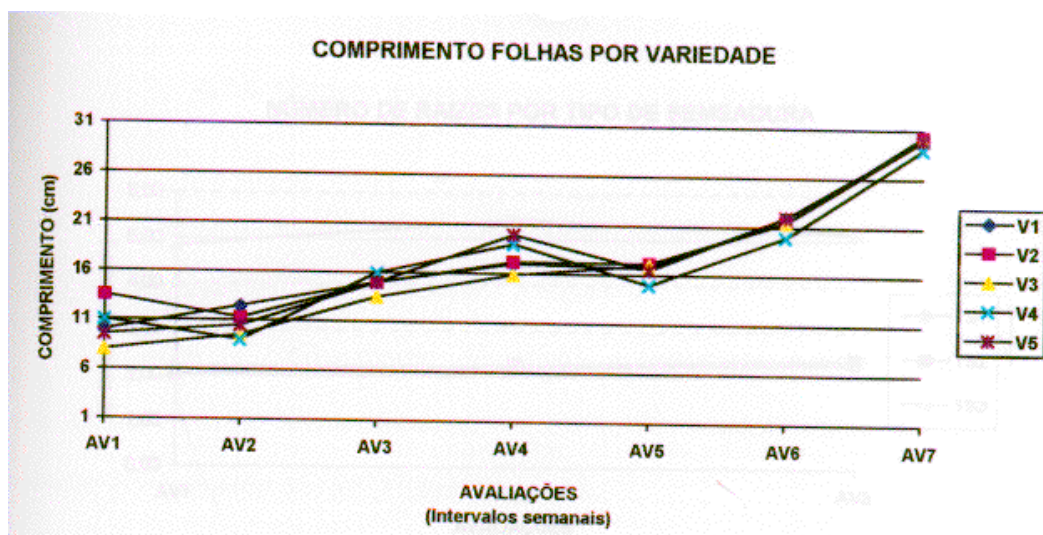


Figura 3 - Comprimento de folhas de tamareira por variedade analisada. (V1-Medjool; V2-Zahidi; V3-Deglet Nour; V4-Khadrawy; V5-Halawy).

Número e comprimento de raízes por variedade

A variedade Medjool apresentou maior número de raízes, porém, não diferiu dos demais (Figura 4).

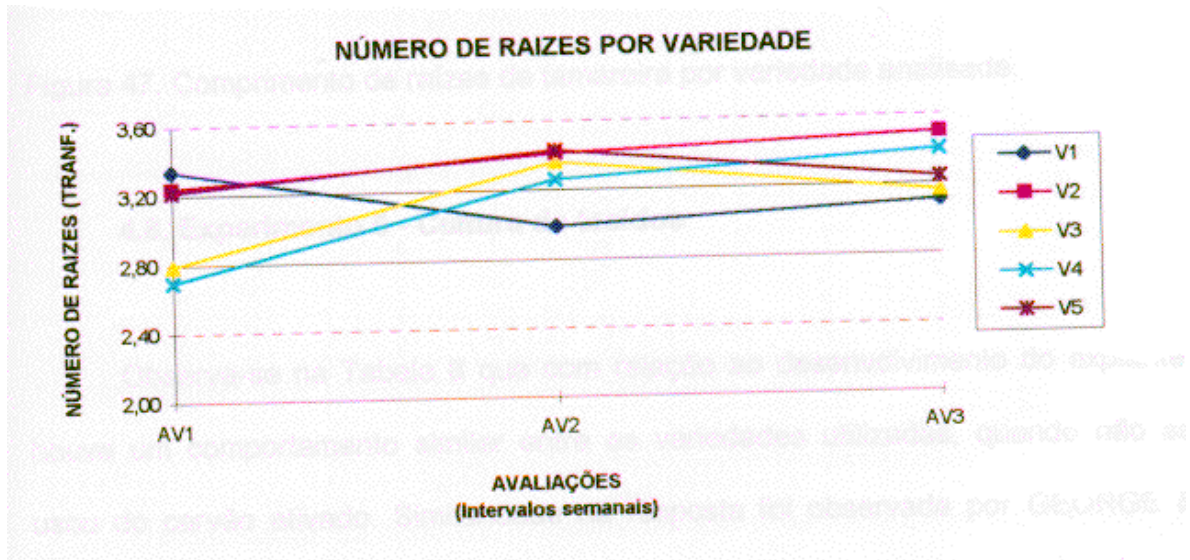


Figura 4- Número de raízes de tamareira por variedade avaliada. (v1-Medjool; V2-Zahidi; V3-Deglet Nour; V4-Khadrawy; V5-Halawy).

Quanto ao comprimento de raízes a variedade Halawy teve o maior comprimento e não deferiu das demais, somente a variedade Zahidi que apresentou menor comprimento de raiz (Figura 5).

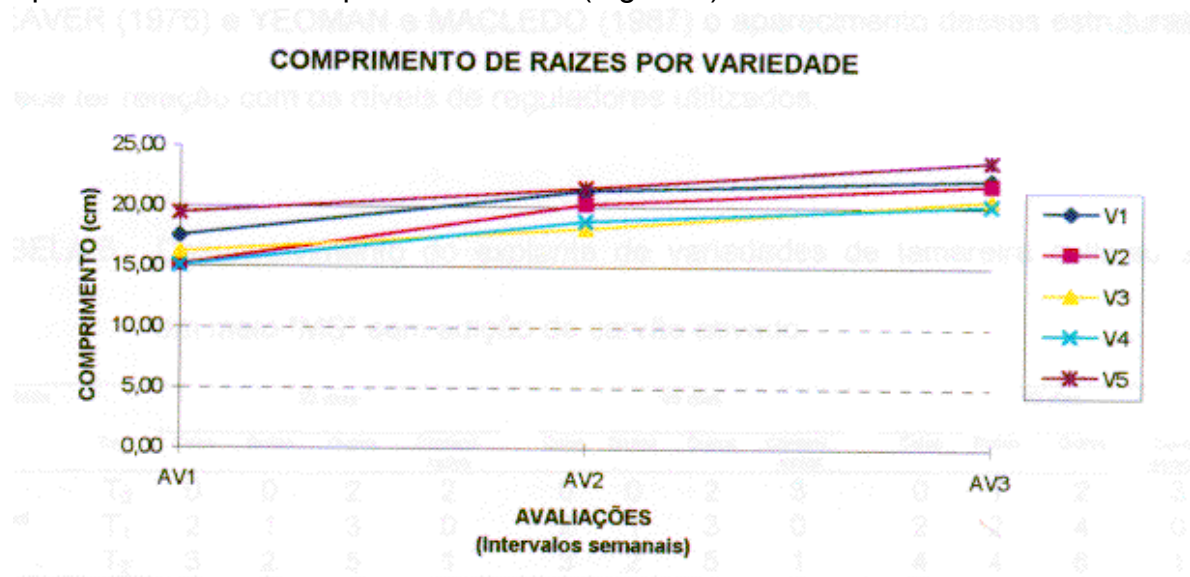


Figura 5 - Comprimento de raízes de tamareira por variedade analisada. (V1-Medjool; V2-Zahidi; V3-Deglet Nour; V4-Khadrawy; V5-Halawy).

Conclusões

Em função dos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir que:

- As variedades mostraram comportamento aproximados quanto a capacidade de germinação crescimento de plântulas em viveiros e a sobrevivência não chega a ser influenciada por nenhum dos fatores avaliados;
- O poder germinativo das sementes de tamareira se manteve acima de 50% mesmo para as variedades que apresentam índices menores de germinação como o Zahidi;
- A maior parte das variedades de tamareira estudadas quanto a formação de mudas “in vitro” após os tratamentos efetuados mostrou-se apta a ser usada para obtenção de plântulas em grande número.
- Melhores resultados foram obtidos com as variedades Medjool, Deglet Nour e Khadrawy que apresentam melhores plântulas em menor prazo de tempo.

Referências bibliográficas

- AL-MAARRI, K.W., AL-CHAMDI, A. D. Effect of culturing date on “in vitro” micropropagation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. “Hillaly Arab Universities Journal of Agricultural Science. Bagdad, v.3, n.1. p.151-167. 1995.
- AL-SALIH, A.A., BADER, S.M., JARRAH, A.Z., AL-DADI, M.T. A comparative morphological and anatomical study of seed embryo culture derived seedling of *Phoenix dactylifera* L. Date Palm Journal. Baghdad, v.4, n.2, p. 137-52. 1987.
- ANDREOLI, C. Cultura de embriões. In: Anais do 1º SIMPÓSIO NACIONAL DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS. Embrapa. Brasília, Brasil. 1985. p. 25-28.
- AMMIRATO, P.V. Embryogenesis. In: ENANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. ed. Handbook of planta cell cultures. Techniques for propagation and breeding. New York: Macmillán Publising. 1983. v.1. p. 82-123.
- BAILEY, L.H. The standard cyclopedia of horticulture. New York. The Macmillan Company. 1944. v. 1. 1200p.
- BHANSALI, R.R. e KAUL, R.K. ... into future. Date through tissue culture. Indian Horticulture. New Delhi, v.36. n.3., p.6-10. 1991.
- CALERO, N. Actions de radiations rouges et blues sur l’embryogenese somatique du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) en culture in vitro et sur sateneur en leucoanthocyanes. Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie et de ses Filiades, Paris, v. 183, n.4, p. 307-313. 1989,.
- CALERO, N., BLANC, A., BENDADIS, A. Effects conjugués de la BAP e de la lumière rouge sur l’embryogénese somatique dans des gaines cotyledonaires de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) en culture “in vitro”. Bulletin de la Societé Botanique de France, Lettres Botaniques. Paris. v. 137. n.1. p.13-19. 1990.
- CARPENTER, W.J. Temperature affects seed germination of four Florida Palm Species. HortScience. New York. V.23. n.2. p. 336-337. 1998.

- COLLINS, G.B. & GROSSER, J.W. Culture of embryos. In: VASIL, I.K. ed. Cell culture and somatic all genetics of plants. New York, Academic Press, 1984. v.1. p. 241-257.
- DAMIÃO FILHO, C.F. Micropropagação. Jaboticabal. FUNEP, 1995. 60p.
- DATTA, S.C. A Handbook systematic botany. Londres. Asia Publishing House. 1965. 435p.
- DEBERCH, P., ZIMMERMAN, R. Micropropagation: Netherlands Kluwer. 1991. 500p.
- DEMASON, D.A. WIDNEY, D. e STILLMAN, J.I. In vitro and transplantation experiments with germination of date embryos. Canadian Journal of Botany, Ottawa. v.70, n.5, p.965-974. 1992.
- DUARTE, O. Propagation methods for tropical and subtropical fruits. Proc. Intern. Hort. Cong. New York. v.1, n.21, p.415-424. 1982.
- EVANS, D.A., SHARP, W.R., AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. Handbook of plant cell culture. v.1. Techniques for propagation and breeding. New York: Macmillan. 1983. v.1. 970p.
- FALCONE, A.M.; MARCHESCHI. G.L. Embriogenini somatica "in vitro" da tessuti de palma de dattiers (*Phoenix dactylifera* L.) resultati preliminar. Revista de Agricoltura Subtropical e Tropicale. Florence, v.82. n.1-2. 1988. p.379-389.
- GEORGE, E.F., SHERRINGTON, P.D. Plant propagation by tissue culture. London, Great Britain: Eastem Press. 1984. 799p.
- GEORGE, E.F., SHERRINGTON, P.D. Plant propagation by tissue culture. Handbook and diretory of commercial laboratories. London: Exegetics, 1984. 709p.
- GOMES, P.A. Tamareira. In: GOMES, P.A. Fruticultura Brasileira. São Paulo, Nobel, 1975. p.204-222.
- GRATTAPAGLIA, D., MACHADO, M.A.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S. ed. Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília. ABCTP EMBRAPA-CNPq: 1990. p.99-169.
- HU, C.Y. Y WANG, P. Embryo culture. Tecniqe and aplicacions. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.A.; AMMIRATO, P.V. ed. Handbook of plant cell culture. Vol. 4. New York. Macmillan. 1986. v.2. p. 43-96.
- KACKAR, N.L., SOLANKI, N.R., JOSHI, S.P. Micropropagation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Khadrawy using tissue culture tecniqe. Annals of arid Zone. New Delhi. v.28, n.1-2. 1989. p. 137-141.
- LITZ, R.E. JARRET, R.L. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogêneses somatica Y organogênesis. In: ROCA, W.M.M MROGINSKI, L. 2ª ed. Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos Y aplicaciones. Cali: CIAT. 1991. p. 143-172.
- MATTER, A.A. "in vitro" propagation of *Phoenix dactylifera* L.. Date Palms Journal. Barsa. Bagdad. v.4, n.2. 1986. p. 137-152.
- MELO. M.E.C.C.M. A cultura de tecidos vegetais. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS SESSÃO I. BANCOS ATIVOS DE GERMOPLASMA., 1979. Brasília, Anais... Brasília. EMBRAPA/CENARGEM/EMBRAPA/DID. 1980. P. 33-38.
- MUNNIER, P. Le Palmier Dattier. Paris G.P. Maiseneuve e Larose. 1973. 221p.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tabaco tissue culture. Physiologia Plantarum, Copenhagen. v.15, n.7. p. 473-497. 1962.

- NASIR, I.A., KHAN, M.A., BUTT, S.J. In vitro culture of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) through excised embryo. Sarhad Journal of Agriculture. Bagdad, v.10, n.6, p. 633-637. 1994.
- NAZERI, D., KHOSHKAN, D., AFSHARI, M., SHAKIB, A.M. e MASIDI, E. Somatic embryogenesis in date palm varieties Estamara and Kabkab. Seed and Plant. Teerã, v.8, n.3-4. 1993. p. 16-20.
- PIERIK, R.L.M. Cultivo in vitro de las plantas superiores. Madrid: Mundi-Prensa. 1990. 325p.
- REUVENI, P., ADATO, Y. e LILIEN-KIPNIS, H. A study of new and rapid methods for the vegetative propagation of date palms: report. Bet Dagan: Report of Date e Growers Institute. Bet Dagan. 49: 17-24. 1972.
- RHISS, A., POULAIN, C., BEAUCHESNE, G. La culture "in vitro" appliquée à la multiplication végétative du palmier-dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Fruits. Paris. v.34. n.9. p.551-561. 1979.
- SCHENK, R.U. HILDERBRANDT, A. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures, Canadian. Journal of Botany. n.50, p.199-204, 1972.
- SHARMA, D.R., DAWRA, S., CHOWDHURY, J.B. Somatic embryogenesis and plant regeneration in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Khadrawy through tissue culture. Indian Journal of Experimental Biology. Hissar. v.22. n.11. 1984. p. 596-598.
- TISSERAT, B. Propagation of date-palm (*Phoenix dactylifera* L.) "in vitro". Journal Experimental Botany. New York. v.30. n.119. 1979a. p. 1275-1283.
- TISSERAT, B., DEMASOM, D.A. A histological study of development of adventitious embryos in organ culture of *Phoenix dactylifera* L. Annals of Botany, Ottawa. v. 46. n.4. 1980. P. 465-472.
- TISSERAT, B. Factors involved in the production of plantlets from date palm callus cultures. Euphytica. Wageningen. v.31. n.1. 1982. p.201-214.
- TORRES, A.C., CALDAS, L.S. Técnicas e aplicação de cultura de tecidos de plantas. Brasília: ABCTP/EMBRAPA, CNPH. 1990. 433p.