

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Avaliações morfofisiológicas do desenvolvimento de microplantas de
pupunheiras submetidas a tratamentos com biorreguladores**

Érika Mendes Graner

Dissertação apresentada para obtenção do título
de Mestre em Ciências. Área de concentração:
Fisiologia e Bioquímica de Plantas

**Piracicaba
2009**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Érika Mendes Graner
Bióloga

**Avaliações morfofisiológicas do desenvolvimento de microplantas de pupunheiras
submetidas a tratamentos com biorreguladores**

Orientador:
Prof. Dr. **MARCÍLIO DE ALMEIDA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em
Ciências. Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica de
Plantas

Piracicaba
2009

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Graner, Érika Mendes

Avaliações morfofisiológicas do desenvolvimento de microplantas de pupunheiras submetidas a tratamentos com biorreguladores / Érika Mendes Graner. - - Piracicaba, 2009. 242 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2009. Bibliografia.

1. Micropropagação vegetal 2. Morfogênese vegetal 3. Pupunha 4. Reguladores de crescimento vegetal I. Título

CDD 634.6
G756a

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Ao meu querido filho Matheus,
Ofereço.

Aos meu pais Elisabete e Murilo e
meus irmãos Karen e Edgard, por
acreditarem em mim,
Dedico.

**"A mente que se abre a uma nova
idéia jamais voltará ao seu
tamanho original".**

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Gostaria de prestar meus sinceros agradecimentos ao Prof. Dr. Marcílio de Almeida, pela confiança, paciência, amizade, serenidade e pelos conhecimentos transmitidos;

À Dra. Cristina Vieira de Almeida, pelo imenso carinho, amizade, alegria, conhecimentos transmitidos e pela grandiosa colaboração às correções deste trabalho;

À técnica do laboratório Cássia Regina Fernandes Figueiredo, pela sincera amizade, paciência, conhecimento transmitido e pelo auxílio prestado;

Ao Prof. Dr. Décio Barbin pelas sugestões prestadas à análise estatística;

Ao Gilvano Ebling Brondani, pela amizade e pelas análises estatísticas efetuadas;

À Monita Fiori de Abreu Tarazi, pela amizade, sugestões e pelas traduções ao inglês;

À Maria Solizete Granziol Silva por toda atenção prestada durante o curso;

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP) e ao Departamento de Ciências Biológicas, pela assistência e colaboração nos serviços prestados;

A CAPES, pela concessão da bolsa durante o curso;

Ao Prof. Dr. Francisco André Ossamu Tanaka pela força e pela grande amizade;

Aos funcionários da biblioteca Central e à Beatriz, da biblioteca Setorial do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, pela simpatia e eficiência;

Às queridas amigas e estagiárias Gabriela, Marcela, Maria Luisa e Laura pelo auxílio laboratorial prestado;

À Katherine e ao Fernando pela amizade e auxílio à formatação deste trabalho;

À Thaís, Natália, Maysa, Clarissa, Joice e Josina; ao Marcelo e todos aqueles com quem compartilhei amizade no decorrer do curso. Amo vocês;

À Carolina, Lívia e Aline, pela amizade e carinho;

À Cidinha, Neide ao Romeu, ‘Pequeno’ e Francisco pela amizade e alegria transmitidas;

A todos os meus familiares, por todo apoio, paciência e compreensão;

Ao meu doce filho Matheus, pela paciência, compreensão e companheirismo.

Não há palavras que expresse minha gratidão a todos vocês.

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
LISTA DE ABREVIATURAS.....	15
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	17
1.1 Revisão bibliográfica.....	18
1.1.1 Pupunheira (<i>Bactris gasipaes</i> Kunth-Arecaceae).....	18
1.1.1.1 Taxonomia e origem da espécie	18
1.1.1.2 Descrição botânica.....	20
1.1.1.3 Condições edafoclimáticas	23
1.1.1.4 Relações Ecológicas	24
1.1.1.4.1 Pragas e predadores	24
1.1.1.4.2 Microrganismos-plantas	25
1.1.1.4.2.1 Patógenos.....	25
1.1.1.4.2.2 Endófitos.....	25
1.1.1.5 Importância econômica.....	26
1.1.2 Morfogênese e padrões morfogenéticos.....	31
1.1.3 Biorreguladores	36
1.1.3.1 O sinergismo auxinas/citocininas	36
1.1.3.2 As auxinas na micropropagação.....	40
1.1.3.3 As citocininas na micropropagação.....	43
1.2 Objetivos.....	47
1.2.1 Objetivos gerais	47
1.2.2 Objetivos específicos.....	47
Referências	48
CAPÍTULO 2 - ATUAÇÃO DE BIORREGULADORES NA MORFOGÊNESE DE MICROPLANTAS DE PUPUNHEIRAS	65
Resumo	65
Abstract.....	66
2.1 Introdução.....	67

2.2 Material e métodos.....	69
2.2.1 Local de realização do experimento.....	69
2.2.2 Material vegetal.....	69
2.2.3 Meios de cultura e condições de cultivo	70
2.2.4 Coleta de dados	71
2.2.4.1 Avaliações morfofisiológicas.....	71
2.2.4.1.1 Número de gemas adventícias.....	71
2.2.4.1.2 Número de embriões somáticos	71
2.2.4.1.3 Porcentagem de enraizamento	71
2.2.4.1.4 Número de raízes	72
2.2.4.1.5 Tipo morfológico de raiz e ramificação.....	72
2.2.4.1.6 Comprimento radicular	72
2.2.5 Delineamento estatístico	72
2.3 Resultados	73
2.3.1 Avaliações morfofisiológicas.....	73
2.3.1.1 Número de gemas adventícias.....	73
2.3.1.2 Número de embriões somáticos	76
2.3.1.3 Avaliações morfofisiológicas.....	77
2.3.1.4 Porcentagem de enraizamento	77
2.3.1.5 Número de raízes	80
2.3.1.6 Tipo morfológico e ramificação.....	83
2.3.1.7 Comprimento radicular	85
2.4 Discussão	89
2.5 Considerações finais	108
2.6 Conclusões	110
Referências.....	111
CAPÍTULO 3 - AVALIAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DA PARTE AÉREA DE MICROPLANTAS DE PUPUNHEIRAS SUBMETIDAS À DISTINTOS BIORREGULADORES.....	117
Resumo.....	117
Abstract	118

3.1	Introdução.....	119
3.2	Material e métodos	122
3.2.1	Local de realização do experimento	122
3.2.2	Material vegetal	122
3.2.3	Meios de cultura e condições de cultivo.....	123
3.2.4	Coleta de dados.....	124
3.2.4.1	Avaliações morfofisiológicas	124
3.2.4.1.1	Comprimento da parte aérea.....	124
3.2.4.1.2	Taxa de crescimento da parte aérea.....	124
3.2.4.2	Avaliações morfofisiológicas foliares	124
3.2.4.2.1	Número de folhas.....	124
3.2.4.2.2	Oxidação.....	125
3.2.5	Delineamento estatístico.....	125
3.3	Resultados.....	125
3.3.1	Avaliações morfofisiológicas	125
3.3.1.1	Comprimento da parte aérea.....	126
3.3.1.2	Taxa de crescimento da parte aérea.....	128
3.3.2	Avaliações morfofisiológicas foliares	130
3.3.2.1	Número de folhas	130
3.3.2.2	Oxidação.....	133
3.4	Discussão	135
3.5	Considerações finais.....	151
3.6	Conclusões.....	154
	Referências	155
CAPÍTULO 4 - ROTAS E PADRÕES MORFOGÊNICOS EM MICROPLANTAS DE PUPUNHEIRAS SUBMETIDAS A TRATAMENTOS COM BIORREGULADORES		161
	Resumo	161
	Abstract:	163
4.1	Introdução.....	164
4.2	Material e métodos	166
4.2.1	Local de realização do experimento	166

4.2.2 Material vegetal.....	166
4.2.3 Meios de cultura e condições de cultivo	167
4.2.4 Coleta de dados	168
4.2.4.1 Análise histológica.....	168
4.2.4.2 Avaliação do número de centros meristemáticos na região basal.....	169
4.2.4.3 Avaliação do número de centros meristemáticos nos primórdios foliares.....	170
4.2.4.4 Avaliação do número de complexos celulares pró-embriogênicos.....	171
4.2.4.5 Avaliação das rotas e padrões morfogênicos	171
4.2.5 Delineamento estatístico	171
4.3 Resultados	172
4.3.1 Avaliação do número de centros meristemáticos na região basal.....	172
4.3.2 Avaliação do número de centros meristemáticos nas bainhas dos explantes e primórdios foliares dos propágulos.....	182
4.3.3 Avaliação do número de complexos celulares pró-embriogênicos.....	189
4.3.4 Avaliação das rotas e padrões morfogênicos	196
4.4 Discussão	213
4.5 Considerações finais	228
4.6 Conclusões	231
Referências.....	233
ANEXOS	238

RESUMO

Avaliações morfofisiológicas do desenvolvimento de microplantas de pupunheiras submetidas a tratamentos com biorreguladores

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a atuação de biorreguladores (ANA, BAP, TDZ e 2iP) no desenvolvimento morfofisiológico de microplantas de pupunheiras. Para tanto, a cada 28 dias aferiram-se o número de propágulos, o desenvolvimento radicular, o comprimento e a taxa de crescimento da parte aérea, número de folhas, oxidação, número de centros meristemáticos na região basal dos explantes e nas bainhas e/ou nos primórdios foliares dos propágulos, número de complexos celulares pró-embriogênicos e as rotas e padrões morfofisiológicos. Todos os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado. Os dados qualitativos foram apresentados como porcentagens e médias gerais e os dados quantitativos foram submetidos à análise de regressão polinomial ou exponencial. As avaliações morfofisiológicas evidenciaram que o TDZ isoladamente favoreceu o desenvolvimento de gemas adventícias, embora curtas e por vezes, com acúleos. Embriões somáticos somente não se desenvolveram em tratamentos contendo a presença isolada de BAP, TDZ e 2iP, nos demais tratamentos observou-se um comportamento exponencial, cujo número foi reduzido e variou apenas em função do período de cultivo. Maior número de raízes foi observado no tratamento contendo ANA em associação ao BAP, embora o tratamento controle tenha induzido maior porcentagem de explantes enraizados e com maior comprimento, sendo o único a evidenciar ramificação. A presença isolada do TDZ promoveu maior comprimento da parte aérea e sua associação ao ANA promoveu a maior taxa de crescimento. O melhor desenvolvimento da parte aérea de microplantas e explantes de pupunheiras ocorreu em meio de cultura MS isento de biorreguladores ou em meio constituído pela associação entre ANA/TDZ aos 140 dias de cultivo, sendo que o acréscimo isolado das citocininas BAP, TDZ e 2iP no meio de cultura MS promoveu tardiamente a taxa máxima de crescimento. A adição isolada do 2iP no meio de cultura promoveu intensa oxidação nas primeiras folhas desenvolvidas das microplantas em explantes de pupunheiras e a aplicação isolada do TDZ ou associada à ANA promoveu anomalias como dobramento foliar e desenvolvimento de acúleos. O monitoramento das rotas e padrões morfofisiológicos evidenciou que embriões somáticos com origem multicelular originaram-se diretamente na região central da base dos explantes nos tratamentos isentos de biorreguladores, na presença isolada de ANA e de TDZ ou na associação de ambos. Pró-embriões com origem unicelular foram induzidos também na presença isolada de ANA ou TDZ e nas associações ANA/BAP ou ANA/TDZ, sendo que pró-embriões com origem multicelular foram induzidos na presença isolada do TDZ a partir da atividade meristemática apical caulinar e a partir da (bi) polarização de elevado número de centros meristemáticos presentes na extremidade distal da base destes explantes. Gemas adventícias com origem multicelular diretamente da extremidade proximal da base dos explantes foram induzidas em maior frequência no tratamento isento de biorreguladores e no tratamento contendo ANA/TDZ. Entre os primórdios foliares dos explantes, estas estruturas foram frequentemente induzidas em tratamentos contendo a presença isolada de ANA.

Palavras-chave: Pejibaye; Micropropagação; Reguladores de crescimento; Morfogênese

ABSTRACT

Morphophysiological evaluations of the development of pejibaye microplants treated with bioregulators

This study aimed to evaluate the role of bioregulators (NAA, BAP, TDZ and 2iP) on the morphogenetic development of pejibaye microplants. For this, every 28 days, the number of propagules, the root development, the length and the growth rate of shoots, the number of leaves, the oxidation, the number of meristematic centers in the explants basal region and in the leaf sheaths and/or in the propagules leaf primordia, the number of pro-embryogenic cell complex and the morphogenic routes and patterns were measured. All experiments were conducted in a randomized design. Qualitative data were presented as percentages and general averages, and quantitative data were subjected to polynomial regression or exponential analysis. The morphophysiological evaluations showed that the TDZ alone favored the development of adventitious buds, although short, and sometimes with thorns. Only in the treatments with the isolated presence of BAP, TDZ and 2iP, somatic embryos were not developed. For the other treatments there was an exponential behavior, in which the number of somatic embryos was reduced and varied according only to the cultivation period. Although a greater number of roots was observed in the treatment, in which NAA was associated with BAP, the control treatment has induced the highest rate of rooted explants and with greater root length, and has been the single one that produced branches. The isolated presence of TDZ promoted the greater shoot length, and its association with ANA promoted the highest growth rate. The best shoot development of pejibaye microplants and explants occurred in the MS bioregulator-free culture medium or in the medium with NAA/TDZ association, at 140 days of cultivation. Moreover, the isolated addition of the cytokinins BAP, TDZ and 2iP in the medium, later promoted the highest growth rate. In pejibaye explants the addition of 2iP alone promoted intense oxidation of the first developed leaves and the application of TDZ alone or associated with ANA promoted anomalies such as folding leaf and thorn development. The monitoring of the morphogenetic routes and patterns showed that in the treatments that were bioregulator-free, or with the isolated presence of NAA and TDZ, or the association of both, somatic embryos, from multicellular origin, raised up directly in the central region of the explants base. Pro-embryos from unicellular origin were also induced in the isolated presence of NAA or in NAA/BAP and NAA/TDZ associations. Moreover, in the isolated presence of TDZ, pro-embryos from multicellular origin were induced from shoot apical meristem activity and from the (bi) polarization of a large number of meristematic centers in the distal extremity of the explants base. Adventitious buds with multicellular origin from the proximal extremity of the explants base were induced more frequently in the bioregulator-free treatment and in the treatment with NAA/TDZ. Between the leaf explants primordia, adventitious buds were often induced by the treatments with the isolated presence of ANA.

Keywords: Pejibaye, Micropropagation, Growth regulators; Morphogenesis

LISTA DE ABREVIATURAS

AIA - Ácido indolacético

ANA - Ácidonaftalenoacético

BAP - 6-Benzilaminopurina

GA₃ - Ácido giberélico

MS - Murashige e Skoog

mg.L⁻¹ - Miligramas por litro

Picloram - Àcido 3,5,6-tricloro-4-amino-2-piridinocarboxílico

TDZ - Thidiazuron

WPM - Lloyd e McCowm

Y3 - Eeuwens

Zea - Zeatina

2,4-D - Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

2iP - 2-isopenteniladenina

4-PU-30 - [N1-(2-cloro-4-piridil)-N2-feniluréia

μM - Micromolar

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

O processo extrativista irracional vem ocasionando a extinção das palmeiras *Euterpe edulis* Mart. e *E. oleracea* Mart., espécies nativas produtoras dos palmitos juçara e açaí, respectivamente (BOVI, 1993). O cultivo da pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth–Arecaceae) representa uma alternativa ecologicamente viável e uma forte pressão contra a exploração extrativista do palmito, sendo que a espécie vem se expandindo no mercado brasileiro e apresenta elevada tendência a dominar o mercado mundial (MORA URPI, 1999a), principalmente devido ao seu elevado potencial econômico (CLEMENT, 1987) e ao grau de aceitação organoléptica deste produto pelo consumidor brasileiro, o qual é favorável em relação ao palmito juçara (FERREIRA *et al.*, 1982a). Além disso, de acordo Bovi (1993), as principais características da pupunheira que interessam para a produção de palmito são: o perfilhamento e à precocidade.

As sementes de germoplasma mais amplamente utilizadas são as procedentes de Yurimáguas no Peru, San Carlos na Costa Rica e no Brasil, de Benjamin Constant no estado do Amazonas. As de procedência de Yurimáguas tem sido as mais procuradas devido a menor incidência de acúleos nas mudas, pois esses são indesejáveis não apenas por dificultar o corte da planta para obtenção do palmito, mas também por afetarem sua qualidade para a comercialização, e por essa razão, mudas com espinhos são descartadas.

Outro aspecto a ser considerado na produção de plantas de pupunhas a partir de sementes relaciona-se à alogamia, característica inerente à espécie e que confere elevado índice de sementes inviáveis. Desta forma, a procura por sementes com genótipos superiores por parte da iniciativa privada vem se intensificando, justificando, assim, o emprego da técnica da micropropagação, a qual permite também, a clonagem de matrizes altamente selecionadas segundo os interesses regionais.

Embora a regeneração direta *in vitro* de *Bactris gasipaes* Kunth. via organogênese e (ou) embriogênese somática tenha obtido resultados satisfatórios com as pesquisas realizadas por Almeida (1994), Almeida e Kerbauy (1996) e Almeida e Almeida (2006), o protocolo para micropropagação de pupunheiras necessita de otimização, pois as palmeiras, em geral, são recalcitrantes (FERREIRA; SANTOS, 1992; BOVI, 1993; BOVI; MARTINS; SPIERING, 2004), principalmente no que diz respeito à fase de aclimatização (BATAGIN, 2008). Não

obstante, as plantas tendem a responder diferentemente às formulações dos meios de cultivo *in vitro*, principalmente em relação aos reguladores de crescimento, nos níveis endógenos do balanço auxina/citocinina e por meio de alterações na sensibilidade das células responsivas (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999). Desta forma, distintos eventos fisiológicos podem ser desencadeados, como a promoção ou inibição no desenvolvimento do vegetal para o crescimento, desenvolvimento de folhas, formação do sistema radicular e principalmente, a definição de rotas e padrões morfogênicos, além de promover um incremento na taxa de multiplicação *in vitro*. Neste contexto, o trabalho teve por objetivo avaliar a atuação de biorreguladores (ANA, BAP, TDZ e 2iP) no desenvolvimento morfo genético de microplantas de pupunheiras.

1.1 Revisão bibliográfica

1.1.1 Pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth-Arecaceae)

1.1.1.1 Taxonomia e origem da espécie

De acordo com o sistema de Cronquist (1981), a pupunheira é classificada como *Bactris gasipaes* Kunth - Arecaceae, apresentando inúmeras sinonímias, dentre as quais se destacam: *Bactris gasipaes* L.H.Bailey; *Guilielma chontaduro* Triana, *Guilielma gasipaes* (Kunth) L.H. Bailey, *Guilielma insignis* Mart., *Guilielma speciosa* Mart., *Guilielma speciosa* var. *flava* Barb. Rodr., *Guilielma speciosa* var. *coccinea* Barb. Rodr., *Guilielma speciosa* var. *ochracea* Barb. Rodr., *Guilielma speciosa* var. *mitis* Drude, *Martinezia ciliata* Ruiz e Pavón (LORENZI *et al.*, 2004), *Guilielma utilis* Oerst., *Bactris insignis* (Mart.) Baillon, *Bactris utilis* (Oerst.) Benth e Hook. f. ex Hemsl., *Bactris speciosa chichagui* H. Karst, *Bactris speciosa* var. *chichagui* (Mart.) H. Karst. (FERREIRA, 2005).

Dentre a nomenclatura popular salienta-se: Pupunha, Pupunheira, Pupunha-Marajá, Pirajá-Pupunha (Brasil); Tembe e Palmeira-de-castilha (Bolívia); Chonta (Bolívia e Equador); Cachipay (Colômbia); Chontaduro (Colômbia e Equador); Pejibaye (Costa Rica e Nicarágua); Paripie (Guiana); Parépou (Guiana Francesa); Piba e Pisbae (Panamá); Pijuayo (Peru); Paripoe (Suriname); Peach Palm e Pawa Palm (Trinidad); Pejiguao, Macana e Gachipaes (Venezuela). *Gasipaes* é o cognome botânico derivado de “cachipay”, oriundo do vale do Rio Magdalena na Colômbia (FERREIRA, 2005; CHAIMSOHN, 2001 apud SILVA, 2008).

O local de origem da pupunheira é incerto, pois nativos de vários países das Américas do Sul e Central (Ameríndios) têm cultivado essa palmeira há centenas de anos, havendo indícios

que sua origem provém de determinadas regiões do Equador, Peru, Bolívia e do Panamá (MORA-URPÍ, 1983). Um “ancestral pré-histórico” do táxon ou grupo taxonômico *Guilielma*, oriundo da América do Sul diversificou-se antes da cordilheira dos Andes tornar-se uma barreira ecológica e inacessível por essa palmeira, então, sua distribuição se estendeu através de um largo corredor cercando os Andes e parte da costa amazônica entre Bolívia e Colômbia (MORA URPI, 1999b). De acordo com o autor, as populações silvestres foram separando-se reprodutivamente e tornando-se espécies irmãs, as quais, em decorrência do contato com o homem, foram domesticadas independentemente, originando *Bactris gasipaes* (Kunth) propriamente dita e diversas raças e cultivares primitivos desta com conseqüente ampliação da variabilidade genética. Em outras palavras, *Bactris gasipaes* Kunth é uma espécie oriunda da hibridização de várias espécies silvestres, resultando numa ‘espécie sintética’.

Uma espécie biológica reprodutivamente isolada de outras espécies é designada como ‘genepool’ (HARLAN; WET, 1971) e neste contexto, para abordar o taxon *Guilielma*, Clement, 1995 apud Mora-Urpí, Weber e Clement (1997) consideraram a pupunha como ‘genepool’ primário (GP1), a qual contém ainda, duas outras subespécies: *utilis*, abrangendo grande parte dos nomes reconhecidos como sinônimos da pupunha cultivada e as raças cultivadas, e *speciosa*, abrangendo os demais táxons afins, sinônimos de *Bactris gasipaes*, prováveis ancestrais da pupunha (*B. ciliata*, *B. dahlgreniana*, *B. insignis*, *B. macana*). No táxon *Guilielma*, genepool secundário (GP2), estariam todas as espécies relacionadas a este e no grupo terciário (GP3), as demais espécies do gênero *Bactris* estariam incluídas. Em decorrência à grande variabilidade observada neste grupo de táxons e ao elevado número de nomes específicos ou subespecíficos atribuídos à *Guilielma*, Mora-Urpí, 1993 apud Mora-Urpí, Weber e Clement (1997) sugeriram que esta seria uma coenoespécie (um grupo de táxons em via de especiação) e propôs uma revisão de nomes.

Dada à incerteza da origem da pupunheira, da importância potencial de populações selvagens e das espécies relatadas em programas de melhoramento genético, uma revisão taxonômica deveria ser baseada em análises da variação dentro do complexo *Guilielma* e na variação entre as espécies atualmente aceitas (MORA-URPÍ; WEBER; CLEMENT, 1997).

No Brasil, a pupunheira foi domesticada há mais de 10.000 anos pelos primeiros povos na Região Amazônica, iniciando a prática da agricultura a fim da exploração inicial de sua madeira e posteriormente, de frutos ricos em óleo (CLEMENT; BOVI, 1999). Os milênios de domesticação

permitiram a exploração dessa palmeira para outras finalidades, principalmente como fonte de amido, o que promoveu perda parcial de sua adaptação ecológica original para adaptações aos sistemas agrícolas, agroflorestais e aos jardins caseiros das aldeias indígenas. Isto explica, ainda, a elevada adaptação da pupunheira à agricultura familiar tradicional e à agricultura para exploração de insumos, como por exemplo, a do palmito (CLEMENT; BOVI, 1999). Além de ser cultivada em pequenos pomares e quintais na Amazônia, a pupunha é cultivada em grandes escalas no Pará, Acre, Rondônia e Mato Grosso e encontra-se em amplo processo de disseminação em praticamente todo o Estado de São Paulo (ALMEIDA; YARA; ALMEIDA, 2005). Extensas áreas de cultivo ocorrem também no Rio de Janeiro, Pernambuco, Mato Grosso do Sul, Bahia e na Região Sul do país, com destaque para o Estado do Paraná, mais especificamente nas regiões do Litoral, Alto Ribeira e Noroeste (SANTOS *et al.*, 2001).

1.1.1.2 Descrição botânica

A espécie *Bactris gasipaes* Kunth é uma palmeira cespitosa (multi-caule) que pode atingir até 16m de altura, cujo diâmetro do estipe chega a medir entre 9 e 18 cm. Os entrenós são constituídos por numerosos espinhos rígidos, embora a variedade proveniente de Yurimáguas (Peru) não os possua (LORENZI, 2004). Bovi (1993) observou que apenas 5% das plantas originárias dessa população nativa apresentam espinhos, superando, assim, as procedentes de Benjamim Constant. A presença de espinhos é um caráter primitivo no gênero *Bactris* (MORA-URPÍ, 1984), porém, a seleção de progênies para caráter inerme promove baixa incidência de espinhos nas gerações F1 e F2, indicando a ocorrência de segregação genética (FILHO *et al.*, 2002).

Fenótipos sem espinhos são importantes nos sistemas de produção de frutos e do palmito, visto que sua presença dificulta sobremaneira a colheita, plantio e tratos culturais, sendo viáveis apenas ao ataque predatório por insetos, pequenos mamíferos (inclusive por humanos) e especificamente no estipe, permitindo que este permaneça relativamente seco por mais tempo, reduzindo assim, a germinação e crescimento de epífitas e plantas parasitas (MORA-URPÍ; WEBER; CLEMENT, 1997; BOVI, 1993). Não obstante, os espinhos conferem proteção ao meristema em *Bactris* e são classificados como emergentes em decorrência de sua origem epidérmica e ausência total de vascularização (TOMLINSON, 1962).

Uma correlação negativa entre a presença de espinhos e o peso do palmito pode ser observada (BOVI *et al.*, 1992), além disso, pupunheiras inermes apresentam frutos maiores e ricos em carboidratos e vitamina A (YUYAMA, 2005).

O tronco (estipe) é monopodial, marcado por cicatrizes foliares transversais e apresenta coloração que varia do branco ao cinza pardo e verde, sendo sua madeira dura, preta e com listras amarelas (BARBOSA, 1993). O ápice do estipe da pupunheira sustenta uma coroa de 8 a 16 folhas pinatisectas, arqueadas, densamente espinhosas ou com espinhos presentes apenas nas margens das pinas; raque de 1,5 a 2,5 m de comprimento com 88 a 120 pinas em cada lado; pinas lineares com ápice pêndulo e irregularmente arranjadas em grupos e dispostas em mais de três planos (LORENZI, 2004). O pecíolo é canaliculado e pode medir de 70 a 130 cm de comprimento e em sua base, alarga-se formando a bainha, estrutura tubular que envolve o caule (BARBOSA, 1993). As folhas jovens, a presença da gema apical e da folha mais externa, um pouco mais desenvolvida, constituem o palmito, produto de grande importância econômica (FAO/WHO, 1978). À medida que se desenvolvem, as bainhas das folhas mais jovens são envoltas pelas mais velhas, formando um arranjo alterno espiralado, que confere proteção aos tecidos mais tenros (palmito) (BARBOSA, 1993).

O palmito da pupunha é constituído de três partes: 1) caulinar ou basal, com maior diâmetro, situado na região proximal (inferior) do talo do palmito e comercializado como conserva em vidro nas formas de rodela inteira, metades, triângulos, picadinho e, recentemente, em bolas; 2) foliar ou apical, localizado na região distal (superior) do talo e apresentando aspecto foliar e com diâmetro reduzido, sendo comumente empregado como picadinho na conserva; 3) coração, tolete ou creme de palmito, situado na região mediana do talo, entre as partes caulinar e apical, é foliar e constitui a porção mais nobre do palmito, com elevado valor comercial, principalmente na forma de conserva (RAUPP; CHAIMSOHN, 2001). Silva (2008) verificou que o palmito basal da pupunha possui textura mais macia quando comparado ao do tolete, podendo ser comercializado como palmito de primeira qualidade e quando comparado ao palmito foliar (apical), as análises evidenciaram que ambos possuem as mesmas características físicas, químicas e sensoriais. Bovi, Saes e Godoy (1992) e Padilha, Oliveira e Mota (2001), dentre várias características vegetativas analisadas, concluíram que quanto maior o diâmetro do estipe da pupunheira, maior é o número de folhas internas do palmito. A mesma correlação foi observada por Uzzo *et al.* (2002) em avaliações efetuadas na palmeira real australiana (*Archontophoenix*

alexandrae Wendl e Drude), evidenciando também que, tanto o diâmetro da planta, como sua altura são importantes critérios fenotípicos à seleção de plantas aptas à colheita, para a seleção de plantas matrizes ou para o emprego posterior em programas de melhoramento genético.

Na parte basal do estipe formam brotações (perfilhos) laterais, as quais recebem distintas terminologias segundo a posição na touceira e (ou) estipe e forma de crescimento: 1) perfilho epígeo, originado sobre o nível do solo; 2) perfilho periférico, localizado na periferia da touceira que está em contato com o solo, cuja parte inferior agrega tecido rizógeno; 3) perfilho hipógeo: desenvolve-se abaixo da superfície do solo e segundo sua posição pode ser classificado como **axilares ou proximais**, cujo desenvolvimento ocorre próximo a planta-mãe apresentando um sistema radicular rudimentar com grande dependência do sistema radicular da planta-mãe ou **distais**, com origem mais afastada e parcialmente dependentes do sistema radicular da planta-mãe pois, com o passar do tempo desenvolvem suas próprias raízes (CHAIMSOHN, 2001)

As inflorescências da pupunheira são monóicas e em forma de racimo, abrindo-se nas axilas das folhas senescentes ou já mortas, o cálice é persistente, podendo ser arredondado, pré-dentado ou irregular, cuja coloração varia do verde, vermelho alaranjado ao amarelo (BARBOSA, 1993).

Após a polinização, os cachos da pupunheira apresentam entre 50 e 1000 frutos, podendo pesar de 1 até 25 kg. Diversos fatores, como nutrição ou polinização deficiente, estiagem, competição e ataque de insetos e doenças podem causar o aborto e contribuir para o baixo peso médio do cacho. Os frutos individuais pesam entre 10 e 250 g e tradicionalmente representam seu principal uso econômico (MORA-URPÍ, 1982, 1984). Em decorrência à heterogeneidade do tamanho dos frutos, a pupunheira foi agrupada em três raças distintas: **microcarpa**, produtora de frutos pequenos com até 20 g de peso; **mesocarpa**, pupunheira que produz frutos com tamanho intermediário e pesando entre 20 e 70 g e **macrocarpa**; cujos frutos produzidos pesam entre 70 e 150 g (CLEMENT, 1987; MORA-URPÍ; WEBER; CLEMENT, 1997).

O fruto maduro possui um epicarpo liso e fibroso que varia de cor, podendo ser vermelho, laranja ou amarelo, e um mesocarpo amiláceo a oleoso e úmido, com um endocarpo com três poros envolvendo um endosperma fibroso e oleoso (MORA-URPÍ, 1982, 1984). O endocarpo, em decorrência da condição alógama da planta, varia consideravelmente quanto à forma, às dimensões e ao peso em: ovóide, elíptico, redondo, oblongo ou cuneiforme; 1-4 cm de altura, 1-2 cm de largura e peso de 1-9 g. Dos três poros, dois encontram-se alinhados e o terceiro, o poro

germinativo, localiza-se imediatamente acima destes (MORA-URPÍ; WEBER; CLEMENT, 1997). Os autores salientam ainda, que o endocarpo escuro contendo a semente, normalmente localiza-se na região central do fruto, embora possa ser encontrado na extremidade distal. Por serem recalcitrantes, as sementes perdem rapidamente a viabilidade à medida que o teor de umidade vai sendo reduzido, sendo a germinação praticamente nula quando os níveis de umidade são inferiores a 17% (FERREIRA; SANTOS, 1992; BOVI; MARTINS; SPIERING, 2004).

As raízes da pupunheira, assim como a de algumas palmeiras, são superficiais, embora haja uma variação em relação ao local de cultivo. Além disso, são escassas as pesquisas sobre o sistema radicular desta espécie e também existe certa ausência de padronização para a idade das plantas estudadas na literatura vigente. Ferreira, Clement e Ranzani (1980) relataram que 58% da biomassa radicular das plantas com 13 anos de idade cultivadas em solo Latossolo amarelo, textura mediana, localizaram-se num raio e profundidade 20 cm. Novas pesquisas realizadas com pupunheiras apresentando 17 anos de idade e em regiões de pastagem (solo Latossolo amarelo, textura fina), evidenciaram maior concentração de biomassa radicular (80%) em relação à análise anterior num mesmo raio e profundidade de 20 cm (FERREIRA *et al.*, 1995).

1.1.1.3 Condições edafoclimáticas

A pupunheira é uma palmeira rústica, adaptada a diferentes condições ecológicas, cuja ocorrência dá-se próxima ao nível do mar até aproximadamente 2.000 metros de altitude (ALMEYDA; MARTIN, 1980) e entre latitudes 16°S e 17°N no trópico úmido das Américas (MORA-URPÍ, 1997). Seu desenvolvimento é ótimo em temperaturas tropicais entre 24°C e 28°C e apresenta ampla distribuição em áreas cujo regime anual de chuvas estão compreendidos entre 1500 a 6000 mm, embora o crescimento seja favorecido em áreas com chuvas abundantes e bem distribuídas (MORA-URPÍ, 1982; BOVI, 1998b; GUERREIRO, 2002).

A pupunheira não é exigente em solos, tolerando solos pobres e ácidos com pH entre 3,6 e 4,5 desde que apresentem textura média a leve e com boa drenagem, embora sua preferência seja em solos com boa fertilidade (BOVI, 1993; BERGO; LUNZ, 2000). Ferreira (1987) relata ainda que a pupunheira obtém melhor desenvolvimento em solos arenosos e friáveis à solos pesados e argilosos. Cabe salientar que, adubações anuais parceladas devem ser realizadas para a reposição de nutrientes na produção de palmito em áreas de baixa fertilidade e, para o plantio, é

recomendável que seja realizado em áreas planas ou levemente onduladas facilitando sobremaneira a condução, a colheita e o transporte do palmito (BOVI, 1993).

Segundo Kulchetscki, Chaimsohn e Gardino (2001), a pupunheira apresenta, também, relativa resistência a períodos secos ou de baixa pluviosidade por até quatro meses.

Na Amazônia Central, a pupunheira floresce de agosto a outubro, com o principal período de frutificação entre dezembro e março. No entanto, em condições edafoclimáticas favoráveis, pode ocorrer um período de menor florescimento durante maio-junho, com frutificação em agosto-setembro, especialmente após um ano de pouca frutificação. Na costa Atlântica de Costa Rica, a principal época de frutificação ocorre de agosto a novembro (MORA-URPÍ, 1984) e, no Estado de São Paulo, geralmente ocorre de janeiro a abril (BARBOSA, 1993).

1.1.1.4 Relações Ecológicas

1.1.1.4.1 Pragas e predadores

As pragas mais comuns em viveiro de pupunheiras mal arejado são os gafanhotos e os ácaros, os quais podem ser controlados mediante a aplicação de inseticidas apropriados. As formigas cortadeiras também devem ser controladas através do uso de iscas (BOVI, 1993). Villachica (1996a) descreve que os coleópteros mais frequentes em pupunheira são: *Rhynchophorus palmarum*, vetor do nematóide *Rhadinaphelenchus cocophilus*, causador do conhecido anel vermelho do coco e *Metamasius hemipterus*, promotor da queda de racemos ou das inflorescências. O ácaro da folhas (*Retracus jobnstoni*) ocorre principalmente em viveiros, no período mais seco (Villachica, 1996b). Thomanzini (2004) analisou também, a ocorrência de lagartas do gênero *Herminodes* sp. em plantas de pupunha nos Estados do Acre e Rondônia, verificando que esta se aloja na junção da bainha da folha com o estipe, na base do palmito, se alimentando neste local. Como consequência, o estipe torna-se rachado, deformado, podendo haver acúmulo de água e apodrecimento, com decorrente quebra do estipe e morte da planta.

Animais silvestres tais como capivaras, pacas e veados são potenciais predadores da pupunha enviveirada, recomendando-se, assim, cercar a área do viveiro (BOVI, 1993).

1.1.1.4.2 Microrganismos-plantas

1.1.1.4.2.1 Patógenos

Dentre os patógenos já isolados de pupunheiras, merecem destaque: o fungo *Morilia* spp, agente etiológico que promove a podridão branca em frutos, *Diplodia* spp, causador da podridão basal dos frutos; *Thielaviopsis paradoxa*, *Chalaropsis* spp, promotores da podridão negra dos frutos os quais acometem inclusive as sementes e *Ceratocystis* sp.

Doença muito comum em mudas ainda em viveiro, é a antracnose, principalmente nas épocas mais frias, cujo controle deve ser efetuado por meio da utilização de fungicidas e pela redução na irrigação (BOVI, 1993). O agente etiológico desta doença tem sido reportado como sendo o fungo *Colleotrichum gloesporioides*, acometendo as folhas mais jovens das pupunheiras e apresentando sintomatologia típica, como manchas arredondadas e deprimidas, coloração marrom com anéis concêntricos onde aparecem as estruturas do fungo (SANTOS *et al.*, 2001). Os autores relatam ainda, que, os fungos *Fusarium* sp. e *Cladosporium* sp. são outros agentes etiológicos que acometem também as folhas, causando a queima dessas em plantas jovens de pupunheira.

Fusarium solani foi descrito também, como um dos principais agentes etiológicos responsável pela queda na germinação de sementes de pupunha (FERREIRA, 1988 apud COSTA NETO, 2002). De acordo com Bovi (1988), a contaminação provém do manuseio e armazenamento inadequados, embora Vargas (1993) relate que os fungos penetram na semente antes mesmo de sua colheita.

De qualquer forma, o levantamento sistemático regional da ocorrência das doenças que acometem as plantas jovens ainda em viveiro e em fase inicial de plantio em campo, é uma medida importante para subsidiar ações de pesquisa epidemiológica e o manejo destas doenças, uma vez que sementes e mudas circulam de uma região para outra do país, disseminando as doenças para as diferentes regiões do Brasil (SANTOS *et al.*, 2001).

1.1.1.4.2.2 Endófitos

Não existe uma exata distinção entre as categorias de microrganismos endofíticos, epifíticos e patogênicos, mas há um gradiente com interfaces entre eles, visto que, eventualmente, microrganismos epifíticos podem ser localizados dentro de um vegetal; da mesma forma que microrganismos endófitos, em certas condições, podem tornarem-se patógenos e estes por sua

vez, podem não afetar seu hospedeiro, podendo ser considerados nessa situação como endófitos (AZEVEDO *et al.* 2002). Hallmann *et al.* (1997) descrevem os microrganismos endofíticos como aqueles que não causam danos ao hospedeiro, podendo ser isolados do interior dos tecidos vegetais superficialmente desinfestados.

De fato, bactérias endofíticas têm sido constatadas em tecidos saudáveis para muitas espécies cultivadas (JACOBS; BUGBEE; GABRIELSON, 1985; STURZ, 1995; PALUS *et al.*, 1996 apud BATAGIN, 2008). Segundo os autores, inúmeras populações de bactérias endofíticas são encontradas em tecidos de plantas saudáveis, muitas das quais não são cultiváveis e, portanto, não identificadas.

COSTA NETO (2002) isolou microrganismos endofíticos observados em fragmentos do mesocarpo, endocarpo e amêndoa isolados de pupunheiras cultivadas *in vivo*, verificando que *Thielaviopsis paradoxa* e *Ceratocystis paradoxa*, além de terem apresentado maior frequência de isolamento, mostraram certa especificidade por parte do fruto. Segundo o autor, *C. paradoxa* foi isolado com maior frequência do mesocarpo e *T. paradoxa* do endocarpo e da amêndoa, sugerindo ainda, que a ocorrência de endófitos em sementes de *Bactris gasipaes* Kunth., seja oriunda da transmissão de uma geração para a outra entreplantas.

Almeida, Yara e Almeida (2005) isolaram fungos endofíticos de *B. gasipaes* axênicas assintomáticas e relataram que *Epicoccum nigrum* e *Neotyphodium* sp., apresentam potencial para uso no controle biológico de patógenos de pupunheiras cultivadas *in vivo*.

Estas observações muito provavelmente se aplicam não somente aos endófitos fúngicos, mas também às bactérias endofíticas, visto que BRUNNER SCUTTI (2000), ao introduzir *in vitro* meristemas apicais e axilares da guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* BERG.) observou que eliminando a contaminação bacteriana, houve inibição ao desenvolvimento de posteriores contaminações, porém, não houve desenvolvimento ou multiplicação de meristemas.

1.1.1.5 Importância econômica

O processo extrativista das palmeiras *Euterpe edulis* Mart. e *Euterpe oleracea* Mart., espécies nativas produtoras dos palmitos juçara e açai, respectivamente, foi responsável pela queda na produção nacional desta matéria-prima e pelo esgotamento de inúmeras reservas naturais.

As indústrias de conservas, atraídas pela abundância da matéria-prima e simplicidade da tecnologia de processamento, esgotaram os maciços naturais da Floresta Atlântica, provocando a migração destas para a Região Norte, dando início à exploração das grandes reservas de açaí, palmito nativo da região (CRONBERG, 1993; BOVI, 1998a; RAMOS; HECK, 2003).

De acordo com Ramos e Heck (2003), o Brasil foi até 1995, o maior exportador de palmito do mundo cuja receita anual atingiu US\$ 30 milhões, detendo 90% do comércio internacional (GUERREIRO, 2002). O autor relatou que a participação brasileira neste mercado sofreu brusca redução em 1997, detendo apenas 26% da participação do comércio externo, com nova queda em 2000 (16%).

O evento mundial “Rio 92” promoveu um acordo entre os países participantes, válido desde 2000, onde a importação de palmito fosse oriunda de florestas plantadas, coibindo a extração de matas nativas (GUERREIRO, 2002). Desde então, as palmeiras mais precoces e produtoras de palmito de boa qualidade têm sido alvo de pesquisas e de crescente interesse pelos agricultores, podendo alterar o quadro atual, através da redução da pressão de exploração sobre as espécies nativas e atendendo ao acordo firmado no evento (INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS, 2003). Bovi em 1998a, já salientava que a produção racional desse produto ampliaria o espaço brasileiro no mercado externo.

Uma excelente alternativa nesse mercado foi a implantação do cultivo da pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth.), que, assim como a palmeira real australiana (*Archontophoenix alexandrae* Wendel e Drude), apresenta precocidade e têm obtido boa aceitação no mercado consumidor, pois através do cultivo racional reduz a pressão de exploração de espécies nativas e amplia o espaço no mercado externo.

Ferreira *et al.* (1982a,b) relataram que o grau de aceitação organoléptica do palmito pupunha no mercado brasileiro é favorável em relação ao palmito juçara (*Euterpe edulis* Mart.). Os autores mostraram ainda, que o palmito dessa palmeira não sofre oxidação e nem escurece como as espécies de *Euterpe*, fato este decorrente da presença quase nula das enzimas peroxidase e polifenol oxidase.

Silva (2008), avaliando as características físicas, químicas e sensoriais do palmito basal e apical de *B. gasipaes* provenientes de sementes coletadas em Yurimáguas na Amazônia Peruana e pertencentes ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) evidenciou que ambos podem ser comercializados como palmito de primeira qualidade. O corte do palmito pode ser

feito durante todo o ano, embora deva ser evitado em períodos secos, comprometendo o peso final do palmito, pois possui em sua constituição aproximadamente 90% de água (BERGO; LUNZ, 2000). A primeira colheita ocorre entre o 18º e 24º mês do plantio, pois o seu retardamento atrasa sobremaneira o desenvolvimento de perfilhos e afeta a produtividade do plantio. *Bactris gasipaes* Kunth. é portanto, uma espécie precoce em relação a *Euterpe edulis* Mart. (juçara ou palmitreiro) e *Euterpe oleracea* Mart. (açazeiro), uma vez que ambas demandam no mínimo seis anos para o primeiro corte. O segundo corte pode ser realizado de seis a oito meses a partir dos perfilhos da pupunheira, outra vantagem em relação à *E. edulis*, visto que se trata de uma palmeira monocaule (BERGO; LUNZ, 2000; YUYAMA, 2005). Embora a pupunha seja uma planta perenifólia (CAVALCANTI, 1991 apud BATAGIN, 2008) e apresente múltiplas brotações a partir da base de seu caule, à medida que a planta envelhece, o rizoma perde a capacidade de produzir novas brotações, sendo que essa capacidade pode ser mantida e preservada indefinidamente por meio de sucessivas podas (MORA-URPÍ *et al.*(1984).

Além da prática da agricultura, sua madeira quando beneficiada, é usada na fabricação de instrumentos musicais, pisos, peças de artesanato, produção de celulose para papel, podendo ainda, ser transformada em celofane e crayon (MORA-URPÍ *et al.*, 1984; COUTO *et al.*, 1999; CHAIMSOHN, 2001). Embora os autores relatem que a madeira (estipe) é relativamente pesada, bastante dura e resistente a intempéries, Abreu e Jesus (2004) descreveram o estipe da pupunheira como não durável em ambientes externos, visto que são susceptíveis ao ataque de térmitas e besouros, recomendado assim, o uso em ambientes residenciais internos ou ainda externo desde que, para este último caso, seja aplicado um produto preservante.

O fruto da pupunheira possui elevado conteúdo nutricional, sendo rico em proteínas e lipídeos, quantidade razoável de amido, elevado valor de ácido ascórbico, (CLEMENT, 1987), altamente energético e contendo β -caroteno (YUYAMA *et al.*, 1999). A polpa do fruto (mesocarpo), embora rica em gordura, é suficientemente amilácea para o preparo da farinha (FERREIRA; PENA, 2003), a qual pode ser consumida ao natural ou em mingaus, bolos (YUYAMA *et al.*, 2003) ou no preparo de massas, como o espaguete (de OLIVEIRA *et al.*, 2006). O óleo extraído do fruto da pupunheira é interessante no ponto de vista nutricional e industrial (CHAIMSOHN, 2001), por conter elevados níveis de ácidos graxos insaturados, superando aqueles presentes no azeite-de-dendê (HARTLEY, 1977).

Na Amazônia Brasileira, a pupunheira é exclusivamente cultivada para fruto, principalmente por agricultores de baixa renda e consumido inteiro, cozido no café da manhã ou como parte do lanche da tarde (MORA-URPÍ; WEBER; CLEMENT, 1997). Segundo os autores, em decorrência à domesticação desta palmeira, os frutos se diferenciam amplamente no tamanho e pela percentagem de óleo. Leeuwen (2006) acredita que a fruto da pupunha não obteve uma participação significativa no mercado durante os últimos anos como ocorreu para os frutos de diversas espécies nativas, por não haver no mercado, variedades da pupunheira com características de fruto bem definidas, o que gera insatisfação inclusive, ao consumidor da própria região.

Possuindo a Amazônia vantagens em relação às outras regiões de plantio de pupunha, ou seja, frutos e sementes, e pela forte demanda que apresenta, parece lógico que os programas de melhoramento de pupunha nesta região deveriam concentrar esforços para este mercado. Porém, para que a produção de sementes seja viável, há necessidade de mercado para o seu principal subproduto, a polpa, e infelizmente, produtores da Amazônia têm pouca força para influenciar no orçamento federal (CLEMENT; YUYAMA; CHÁVEZ FLORES, 2001).

Outras partes das pupunheiras são aproveitadas: a raiz, como vermicida; as flores masculinas, como tempero e as folhas são matéria-prima para confecção de telhados, cestos, utensílios domésticos e forragem para animais (BONACCINI, 1997).

As pupunheiras apresentam-se em permanente estágio vegetativo (CLEMENT; ARADHYA; MANSARDT, 1997) e por ser cultivada em alta densidade (mínimo de 5.000 plantas por hectare) visando a exploração do palmito, a competição intraespecífica afeta não só a produção, mas também a própria fisiologia da planta. Além disso, a emissão abundante de perfilhos pode ser prejudicial ao desenvolvimento dos demais caracteres da planta, acarretando uma queda na produção de palmito (PADILHA; OLIVEIRA; MOTA, 2001).

A coleção dos recursos genéticos de uma espécie é o primeiro passo em um programa de melhoramento genético e a América Latina possui numerosas coleções de germoplasma de pupunha, mas apenas o Brasil (Instituto Agrônomo de Campinas) e a Costa Rica (Universidade da Costa Rica) têm programas de melhoramento com escala e continuidade necessárias para obtenção de resultados significativos (CLEMENT *et al.*, 2001). Além disso, o INPA (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia) contribuiu de forma significativa para o avanço do

conhecimento sobre os recursos genéticos da pupunha usando esses recursos em benefício da agroindústria e dos pequenos produtores da Amazônia (CLEMENT *et al.*, 1997).

A propagação sexuada em pupunha foi o método mais amplamente utilizado (HUERTE; ARIAS, 1981), embora a reprodução por sementes seja limitada devido a ocorrência de auto-incompatibilidade genética, garantindo a alogamia para esta espécie (MORA-URPÍ, 1984). Na população de Benjamim Constant, Clement e Arkcoll (1984) observaram uma variação na taxa de auto-incompatibilidade compreendida entre 0 e 88%, sugerindo a possibilidade de elevadas taxas de endogamia, as quais apoiam-se nas heterozigoses observadas.

Outra restrição à propagação via sementes e, conforme já mencionado, é a perda da viabilidade destas em decorrência à recalcitrância, afetando negativamente a germinação à medida que os níveis de umidade vão sendo reduzidos. Em valores de umidade inferiores a 17%, a germinação é praticamente nula (FERREIRA; SANTOS, 1992; BOVI; MARTINS; SPIERING, 2004). Além disso, somente após cerca de dois anos a pupunha inicia a produção de sementes e as limitações de polinização cruzada reduzem consideravelmente a produção de frutos por cacho. A ocorrência de frutos partenocárpicos é também muito comum (HUERTE; ARIAS, 1981).

Sob condições naturais, em pupunha, a reprodução assexuada ocorre pela formação de brotos na base do estipe (FERREIRA *et al.*, 1995). Os primeiros povos informaram aos portugueses e espanhóis que era possível separar perfilhos das matrizes para propagar a pupunha. No entanto, o êxito desse processo é reduzido a 25% de sobrevivência inicial (GARCIA, 1988), seguida de morte gradual até ao redor de 90%, produzindo, além disso, plantas que não perfilham, ou perfilham pouco, e raramente florescem. Sattler (1986) descobriu que a porcentagem de sobrevivência e crescimento normal (ou seja, com perfilho e flores) melhorava se a separação dos perfilhos de uma touceira ocorresse algum tempo após o corte da planta-mãe para palmito. Este método é mais promissor, mas segundo Mora-Urpí, Weber e Clement (1997), necessita de refinamento.

O desenvolvimento de métodos de propagação vegetativa é essencial, tanto por técnicas *in vitro* como por técnicas convencionais que, embora bastante simples, precisam ser aperfeiçoados. Esses ensaios, por sua vez, identificarão genótipos adaptados a cada região, que podem ser distribuídos aos produtores de sementes, reduzindo a necessidade futura de importar sementes.

É notável, portanto, a importância da ampliação das pesquisas com essa espécie principalmente no que diz respeito à otimização das técnicas de cultivo das mesmas. Muitas são

as áreas de pesquisa com essa espécie, abrangendo fisiologia (BOVI; MARTINS; SPIERING, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2005), fitopatologia (PIZZINATTO *et al.*, 2001; SANTOS *et al.*, 2004), trato cultural (ALVES JR. *et al.*, 2005) e propagação vegetativa *in vitro* (ARIAS, 1985; VALVERDE *et al.*, 1987; VALVERDE; ARIAS; THORPE, 1992; ALMEIDA, 1994; ALMEIDA; KERBAUY, 1996; STEINMACHER, 2005; ALMEIDA; ALMEIDA, 2006; STEINMACHER; CLEMENT; GUERRA, 2007; STEINMACHER *et al.*, 2007). Avaliações sobre a presença e comportamento de microrganismos endofíticos e endosimbiontes de pupunheiras também têm sido avaliadas (COSTA NETO, 2002; PEREIRA; MATTOS; FORTES, 2003; ALMEIDA; YARA; ALMEIDA, 2005; ALMEIDA *et al.*, 2009) e tem sido de grande colaboração na tentativa para a resolução de tantos problemas apresentados na micropropagação dessa espécie.

Apesar da técnica *in vitro* ser promissora para a obtenção de propágulos, ela apresenta uma série de dificuldades, como a morosidade na resposta a estímulos morfogênicos e aclimatização das microplantas.

1.1.2 Morfogênese e padrões morfogenéticos

Moore (1979) definiu a diferenciação celular como a transformação de células geneticamente idênticas, derivadas de um zigoto ou outra célula qualquer, em células especializadas bioquímica, fisiológica e estruturalmente. Em última análise, a diferenciação celular é um processo que reflete o efeito de pelo menos três fatores: 1) genético: estabelecido na fertilização e incorpora o ‘estoque’ de potencialidades que pode ser expresso durante o desenvolvimento; 2) as características originadas na ontogênese, as quais, embora sejam respostas iniciais aos estímulos ambientais, uma vez estabelecidas tendem a se manter de forma estável ou permanente e 3) as características cuja expressão depende apenas do ambiente (KERBAUY, 1999). Provavelmente, um dos fatores básicos desencadeadores da diferenciação celular é o estabelecimento da polaridade, a qual mantém condições metabólicas em sítios distintos de uma célula recém dividida, embora em alguns casos, a polaridade pareça preceder a divisão celular, tornando difícil definir se esta é um fator de diferenciação ou se é uma manifestação dessa diferenciação (WAREING; PHILLIPS, 1981). A partir da diferenciação, os novos tecidos se arranjam de forma a constituir novos órgãos que vão crescendo no espaço e

promovendo alterações morfológicas visíveis em microscópio estereoscópico (TERMIGNONI, 2005).

De acordo com Handro e Floh (1990), quando as células são liberadas do controle a que estavam sendo submetidas no organismo íntegro e são expostas a uma nova condição (meio de cultura), podem se desdiferenciar com a possibilidade do genoma ser expresso de outras formas, levando-as a novos padrões de diferenciação, para então, formar novas estruturas organizadas. Em plantas, ao contrário dos animais, a diferenciação celular é reversível, particularmente quando células diferenciadas são removidas da planta e estabelecidas em cultura de tecidos (TAIZ; ZEIGER, 2006).

A desdiferenciação inicial dos explantes resulta na formação de células ou grupos de células competentes aos efeitos estimulatórios do meio de cultura; as quais, após transferência para meios específicos à formação de propágulos, tornam-se determinadas. (KERBAUY, 1999). O processo de regeneração que é precedido pela formação de calo e envolve desdiferenciação celular, é denominado modelo (padrão) indireto, ao passo que no modelo (padrão) direto ocorre rediferenciação, alterando determinação e conferindo novas competências às células responsivas presentes nos explantes (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999). De acordo com os autores, na maioria dos modelos de embriogênese induzida *in vitro*, as auxinas são as principais substâncias desencadeadoras dos processos de desdiferenciação e rediferenciação.

Por competência celular, define-se a capacidade das células reagirem a sinais específicos de desenvolvimento, dentre os quais encontram-se os hormônios vegetais (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999). Os autores mencionam como exemplos de células-alvo com competência para responder a hormônios específicos, a camada de aleurona presente nas sementes de cereais (respondem à giberelina) e o periciclo, que em muitas espécies responde a elevados níveis de auxina, originando os primórdios radiculares.

Por determinação celular, compreende-se o processo no qual o potencial de desenvolvimento de uma célula torna-se limitado a uma rota específica (CHRISTIANSON, 1985). De acordo com Kerbauy (1999), o estado determinado é estável e pode ser transmitido de forma intacta durante diversas gerações celulares. Desta forma, os primórdios foliares, até determinado estágio de desenvolvimento, apresentam determinação irreversível, impossibilitando-os de originar gemas vegetativas. O autor relata ainda que, até o próprio meristema apical caulinar pode apresentar propriedades de determinação, como a formação de

flores quando alcançam a condição madura e mediante fatores ambientais favoráveis, embora não haja evidência direta de que as células meristemáticas sejam determinadas.

Taiz e Zeiger (2006) reconhecem a importância da citocinese na organização de tecidos em muitas plantas, cujo padrão de divisões origina fileiras que se estendem desde o meristema até a base da planta. De acordo com os autores, quando as células-tronco se dividem, uma das células-filhas normalmente mantém a identidade, enquanto a outra é obrigada a seguir uma rota particular de desenvolvimento. Castro, Kluge e Peres (2005) relatam que em algumas células e tecidos vegetais têm sido possível demonstrar a influência exercida pela luz, gravidade, pressão e pela auxina no plano de divisão celular; assim como a participação dos microtúbulos no posicionamento do núcleo na célula, na separação do material genético durante o processo de divisão e na formação e localização da nova parede celular, salientando que a potencialidade da regeneração de plantas (desde que submetidas a tratamentos adequados) a partir da autonomia das células é reconhecida pelos pesquisadores como totipotência (CHRISTIANSON; WARNICK, 1978; KERBAUY, 1999). Neste contexto, a técnica da micropropagação baseia-se no conhecimento morfogenético decorrente dos processos celulares integrados de divisão, crescimento e diferenciação, que conduzem a um nível de organização supracelular (HANDRO; FLOH, 1990), conhecida como morfogênese (MOORE, 1979). De acordo com Handro e Floh (1990), tais processos dependem de certos sinais (principalmente fitormônios e luz) que, agindo direta ou indiretamente em nível gênico, desencadeiam processos específicos de síntese, e como consequência, alterações bioquímicas e metabólicas diversas.

O crescimento em plantas é definido como um aumento irreversível de volume, cujo maior componente é a expansão celular, governada pela pressão de turgor (TAIZ; ZEIGER, 2006), o qual normalmente, mas não necessariamente, é acompanhado por um aumento no peso seco e na totalidade do protoplasma (MOORE, 1979). Todas as células vivas e nucleadas são passíveis de crescimento quando isoladas da planta que lhe deu origem, desde que encontrem condições hormonais e nutricionais adequadas, bem como fatores do meio (TERMIGNONI, 2005).

A ativação seletiva e diferencial de genes (reprogramação celular), envolvendo células receptivas ou tecidos responsivos refere-se à epigenia, que de acordo com Guerra, Torres e Teixeira (1999) está diretamente relacionada à presença e ao número de receptores de fitormônios envolvidos no controle direto da atividade gênica em nível de transcrição e tradução, em um

elevado número de processos. A expressão morfogenética é, por conseguinte, a resposta final em dois níveis básicos: embriogênese somática e organogênese.

Kerbaui (1999) ressalta que, ao contrário das mutações, as alterações epigenéticas são reversíveis e direcionadas, ou seja, ocorrem em resposta a um indutor específico. Como exemplo de eventos epigenéticos, o autor menciona a habituação ou autonomia, processo relacionado à mudança (ou perda) estável e transmissível da necessidade celular em relação a determinados fatores de crescimento, principalmente às auxinas e citocininas. Neste caso, as células não mais prescindiriam da presença destas substâncias no meio de cultura.

A organogênese está relacionada à obtenção de eixos caulinares monopolares e provenientes de gemas pré-existentes ou neoformadas, a qual pode constituir um processo (padrão) direto ou indireto (GUERRA; NODARI, 2006). No clássico trabalho de Skoog e Miller (1957), os autores observaram em medula de tabaco, que a manipulação da organogênese depende do tipo e da concentração relativa dos reguladores de crescimento. Segundo os autores, meios de cultura contendo níveis mais elevados de citocininas promovem a formação de brotações aéreas e que concentrações mais elevadas de auxina induzem a formação de raízes.

Gemas adventícias são, portanto, aquelas provenientes de locais distintos de onde se formam no curso normal de desenvolvimento da planta, cuja formação ocorre de maneira direta (organogênese direta), a partir de tecidos que apresentam potencial morfogenético, mas que, normalmente, não se expressa ou indireta (organogênese indireta), quando o processo de regeneração de gemas ocorre a partir de células não-organizadas do calo (GRATTAPLAGLIA; MACHADO, 1990).

A embriogênese somática é considerada um caso particular da morfogênese, pois são formadas estruturas muito semelhantes aos embriões zigóticos a partir de tecidos do explante (embriogênese direta) ou de uma célula ou grupo destas em calos previamente formados (embriogênese indireta) (HANDRO; FLOH, 1990). Os autores ressaltam ainda, que os embriões somáticos destacam-se com facilidade da massa de tecidos que as originaram e apresentam organização nitidamente bipolar (pólos caulinar e radicular).

A via indireta é a de maior ocorrência nos sistemas de embriogênese somática (GRATTAPLAGLIA; MACHADO, 1990), sendo característica de explantes provenientes de tecidos mais diferenciados, os quais necessitam sofrer desdiferenciação antes da aquisição de competência para a rota embriogênica (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999). Os embriões

somáticos originados pelo processo direto podem originar-se a partir de camadas internas ou superficiais num explante (HANDRO; FLOH, 1990). Embora Parrot, Merkle e Williams (1991) relatem que os embriões somáticos originam de células únicas e que o desenvolvimento de centros meristemáticos seja característico da organogênese, Almeida e Almeida (2006) obtiveram embriões somáticos diretamente a partir da polarização de centros meristemáticos (complexo pré-embriogênico) oriundos de células parenquimáticas do mesofilo de primórdios foliares de plantas adultas de pupunheiras cultivadas *in vitro*, sem a precedência de calos. Resultados semelhantes foram obtidos por Vidal, Vargas e García (2000) a partir de primórdios foliares de *Musa* sp. Nestes casos, as células passam pelo processo de rediferenciação, alterando a determinação e conferindo novas competências às células responsivas (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999).

Os centros meristemáticos, ou meristemóides surgem na forma de nódulos, com disposição celular concêntrica em calos, aonde serão gerados traqueídeos e elementos de tubo crivado, também em disposição concêntrica (TERMIGNONI, 2005). Os centros meristemáticos são constituídos ainda, por grupos de células pequenas e com citoplasma denso, os quais originam órgãos adventícios em tecidos de calos, (THORPE; MURASHIGE, 1970; THORPE, 1980) bem como nos explantes primários (HANDRO; FLOH, 1990).

Sob o ponto de vista da micropropagação visando a obtenção em massa de linhagens idênticas a da planta mãe (clones), o padrão indireto para a organogênese e embriogênese somática é inviável, pois, segundo Grattapaglia e Machado (1990) e Guerra e Nodari (2006), a variabilidade genética (poliploidização e aneuploidização) resulta da passagem pela fase de calo. Segundo os autores, neste estado, as células estariam mais sujeitas a sofrerem alterações.

Formação de meristemóides diretamente dos explantes foram observados por ALMEIDA, 1994; HUTCHINSON; KRISHNARAJ; SAXENA, 1996; ALOUFA, 2002; PAIVA NETO *et al.*, 2003; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, *et al.*, 2005; ALMEIDA; ALMEIDA, 2006; ANDRADE; ALMEIDA; GONÇALVES, 2006. Aloufa (2002) verificou ainda, que plantas de batata-doce cv *Leucorhiza* só poderiam ser regeneradas a partir de meristemóides em explantes de discos radiculares quando algum tecido materno estivesse presente. Segundo o autor, isto sugere que os tecidos maternos das raízes fornecem alguma substância reguladora de crescimento ou nutrientes necessários ao crescimento e desenvolvimento de meristemóides.

Tecidos meristemáticos provenientes do meristema apical caulinar são conhecidos como meristemas residuais, os quais eventualmente se diferenciam no sistema vascular (procâmbio) ou

em outras estruturas não vasculares (ESAU, 1949) e, portanto, passíveis de regenerar plantas inteiras via embriogênese somática direta mediante a ocorrência da polarização.

Dos vários trabalhos em culturas *in vitro* com palmáceas, poucos induziram organogênese e (ou) embriogênese somática diretamente do explante (padrão direto) (ALMEIDA, 1994; ALMEIDA; KERBAUY, 1996; LEDO *et al.*, 2002; ALMEIDA; ALMEIDA, 2006; COSTA; ALOUFA, 2006; SALDANHA, 2007), dentre outros.

Pela via indireta, a indução de organogênese e (ou) embriogênese somática, este número é bem mais representativo (ENGELKE; HAMZI; SKOOG, 1973; MATER, 1990; TISSERAT; DeMASON, 1980; ARIAS, 1985; SIQUEIRA; VALVERDE *et al.*, 1987; INQUE, 1992; VALVERDE; ARIAS; THORPE, 1992; KANCHANAPOOM; DOMYOAS, 1999; NUNES *et al.*, 1999; MONTOVANI *et al.*, 1999; PEREIRA *et al.*, 2000; BRUNER SCUTTI, 2001; KARUN *et al.*, 2004; ESHRAGHI; ZARGHAI; MIRABDULBAGHI, 2005; STEINMACHER, 2005; SANÉ *et al.*, 2006; ASEMOTA; EKE; ODEWALE, 2007; MOURA, 2007; STEINMACHER; CLEMENT; GUERRA, 2007; STEINMACHER *et al.*, 2007), dentre outros.

Em pupunha, somente as pesquisas realizadas por Almeida (1994), Almeida e Kerbauy (1996) e Almeida e Almeida (2006) promoveram a regeneração via organogênese e (ou) embriogênese somática pelo padrão direto. Embora Salazar, 1986 apud Almeida (1994) tenha observado elevada eficiência organogenética e obtenção de embriogênese somática diretas na cultura de ápices caulinares desta espécie, o autor não caracterizou anatomicamente as estruturas por ele designadas por embriões somáticos.

1.1.3 Biorreguladores

1.1.3.1 O sinergismo auxinas/citocininas

Os reguladores de crescimento vegetais são uma classe de compostos químicos endógenos, facilmente transportados para células responsivas (providas de receptores específicos) controlando sobremaneira a atividade gênica em nível de transcrição e tradução e em numerosos outros processos (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999), sendo que a expressão gênica exerce controle principalmente no ciclo celular pela codificação de proteínas quinases (Cdks) e ciclinas (Cyclin) (LEHNINGER, 1972; PLENTZ, 2004; TAIZ; ZEIGER, 2006).

Em cultura de tecidos, os principais fatores que controlam a morfogênese são os reguladores vegetais, particularmente o balanço auxina/citocinina no meio de cultura (SKOOG;

MILLER, 1957), embora a completa expressão da organogênese esteja relacionada a demais fatores como o nível e fonte de nitrogênio, nível e tipo de sacarose, constituintes de ácidos nucléicos e vitaminas (HANDRO; FLOH, 1990). De acordo com Schultheis, Chée e Cantliffe (1990), o balanço auxina/citocinina, além de promover a formação de raízes e partes aéreas, favorece, por meio de várias combinações destes, o desenvolvimento de embriões somáticos, como observado por Hutchinson, Krishnaraj e Saxena (1996).

Conforme mencionado, meios de cultura contendo níveis mais elevados de citocininas promovem a formação de brotações aéreas e concentrações mais elevadas de auxina induzem a formação de raízes (SKOOG; MILLER, 1957; SILVA JÚNIOR, 2007). Entretanto, taxas elevadas na multiplicação de brotos e bom crescimento da parte aérea com níveis mais elevados de auxina em relação à citocinina também foram observados por Abreu *et al.* (2003). Os autores observaram que este balanço, por vezes, pode não ser muito satisfatório à rizogênese, mas a inversão nesta relação, ou seja, o emprego de níveis mais altos de citocinina em relação à auxina pode promover maior número de raízes e desfavorecer a taxa de multiplicação e o crescimento.

Os efeitos fisiológicos parecem variar conforme a citocinina empregada, pois, o número de brotos pode ser consideravelmente pequeno ao empregar a auxina ANA (em níveis reduzidos) associada à citocinina TDZ (em níveis mais elevados) ou muito satisfatório quando o TDZ é substituído pelo BAP, nas mesmas concentrações, como observado por Santarém e Astarita (2003).

Em palmáceas, tem sido observado que níveis mais elevados de auxina em relação à citocinina podem exercer o mesmo evento fisiológico proposto por Skoog e Miller (1957) em relação à capacidade organogenética, evento este observado para a pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth.), além de favorecer consideravelmente o crescimento da parte aérea (ALMEIDA, 1994) e promover a polarização de centros meristemáticos, com conseqüente desenvolvimento de embriões somáticos (ALMEIDA; ALMEIDA, 2006).

A macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Martius), é a única palmácea, cujo emprego do TDZ em associação ao 2,4-D ou picloram, num balanço favorável à auxina, induziu calos embriogênicos em embriões zigóticos maduros excisados de sementes, porém, a presença do TDZ foi deletéria ao desenvolvimento de estruturas globulares semelhantes à embriões somáticos (MOURA, 2007).

A presença de ANA e BAP no meio de cultura MS favorece o desenvolvimento de embriões zigóticos maduros excisados de sementes de açaizeiros (*Euterpe oleracea* Mart.) em plântulas e, um balanço favorável às auxinas (em baixas concentrações) em relação às citocininas proporciona maior crescimento da parte aérea. A presença destes reguladores de crescimento favoreceu o desenvolvimento de maior número de raízes em relação à testemunha (isento de reguladores de crescimento), independentemente das concentrações de ANA (LEDO *et al.*, 2001). Maior concentração de ANA em relação ao BAP também favoreceu tanto a reversão de gemas florais em gemas vegetativas, como a regeneração de brotos em pupunheiras, porém, a rizogênese foi mais efetiva em meio desprovido de reguladores de crescimento (ALMEIDA; KERBAUY, 1996).

Steinmacher *et al.* (2007) desenvolveram embriões somáticos a partir de calos embriogênicos induzidos em embriões zigóticos maduros excisados de sementes de *Bactris gasipaes* Kunth. Os autores verificaram que a indução dos calos embriogênicos foi satisfatória com o emprego de Picloram isoladamente ou associado a 2i-P nas concentrações mais baixas testadas. Saldanha (2007) induziu embriogênese somática direta a partir de embriões zigóticos imaturos excisados de sementes do palmitreiro (*Euterpe edulis* Martius) cultivados em meio suplementado com elevadas concentrações de 2,4-D, porém, associado a baixas concentrações de 2iP.

Em *Bactris gasipaes* Kunth., a associação ANA/BAP, num balanço favorável à auxina, promoveu a melhor resposta ao crescimento médio de ápices caulinares, além disso, quando este mesmo balanço foi utilizado em concentrações menores, após cultivo prévio em meio contendo apenas o BAP, foram observadas as maiores respostas à regenerações de gemas (ALMEIDA, 1994). Ledo *et al.* (2001), também observaram que um balanço ANA/BAP, favorável à auxina proporcionou resultados satisfatórios ao crescimento da parte aérea em microplantas de açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) germinadas *in vitro* a partir de embriões zigóticos maduros excisados de sementes. Maior número médio de raízes nesta espécie foi obtido também com o balanço entre os biorreguladores supracitados, porém, as maiores médias foram verificadas nas mais elevadas concentrações de ANA testadas.

Tisserat e DeMason (1980) observaram que altas concentrações da auxina 2,4-D em relação à citocinina 2iP induziram a embriogênese somática a partir de calos desenvolvidos em gemas de *Phoenix dactylifera* L., porém, altas concentrações de 2iP e reduzidas de ANA,

promoveram a conversão dos embriões somáticos em plântulas. De forma semelhante, um balanço favorável às concentrações de 2iP em relação ao ANA favoreceu, porém ambos em elevadas concentrações, a conversão de plântulas obtidas a partir de calos embriogênicos desenvolvidos em ápices caulinares em dois cultivares de tamareira iranianas (*Phoenix dactylifera* L. cv. Khanizi e Mordarsing) (ESHLAGHI; ZARGHAMI; MIRABDULBAGHI, 2005).

Steinmacher *et al.* (2007) observaram calos embriogênicos desenvolvidos em embriões zigóticos maduros excisados de sementes de *Bactris gasipaes* Kunth., onde reduzidas concentrações de ANA associada a altas concentrações de 2iP promoveram a conversão dos embriões somáticos em microplantas. Já, Ledo *et al.* (2002) evidenciaram embriogênese somática diretamente de embriões zigóticos maduros excisados de sementes de açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) quando cultivados em meio MS contendo ANA e 2iP, num balanço favorável a este último e precedidos pela inoculação em meio MS contendo 2,4-D em elevadas concentrações.

Microplantas de coqueiro-anão (*Cocos nucifera* L.) obtidas a partir de embriões zigóticos maduros excisados de sementes e cultivados em meio Y3 (EEWENS, 1976) suplementado com distintas concentrações de sacarose e de sulfato de ferro (II), apresentaram um incremento no sistema radicular e das partes aéreas (comprimento e número de folhas) quando cultivados em meio contendo também, concentrações mais elevadas de citocinina (BAP) em relação à auxina (ANA) (LÉDO *et al.*, 2007).

Tisserat e DeMason (1985) observaram que embriões zigóticos excisados de sementes e ápices caulinares de tamareiras (*P. Dactylifera* L.) cultivados em meios acrescidos de ANA a baixas concentrações associada às citocininas BAP, KIN ou 2iP em concentrações mais elevadas, não aumentaram significativamente o brotamento, mas promoveram a reversão de gemas vegetativas em gemas florais em 5% dos explantes.

Silva (2002) verificou que as associações da auxina AIA com a citocinina BAP, ambas em concentrações crescentes, não favoreceram o desenvolvimento *in vitro* de embriões zigóticos maduros excisados de sementes de coqueiro (*Cocos nucifera* L.), bem como na testemunha (meio isento de biorreguladores).

Meios de cultura MS contendo AIA associado à BAP em concentrações equitativas, não favoreceram a formação de brotos em pecíolos cotiledonares de tamareira (*Phoenix dactylifera*

L.), mas foram eficazes na diferenciação das partes aérea e radicular (SENA COSTA; ALOUFA, 2006).

Convém lembrar que, muitos tecidos *in vitro* são capazes de sintetizar auxinas e citocininas (autonomia), capacidade esta já presente ou adquirida em cultura (Kerbauy *et al.* 1986, 1988; apud HANDRO; FLOH, 1990; GUERRA; NODARI, 2006), enquanto outros são totalmente dependentes da adição exógena de reguladores de crescimento (PINTO; PASQUAL, 1990). Algumas vezes, o nível de auxina presente no tecido pode ser suficiente para estabelecer o balanço auxina/citocinina e iniciar um processo organogênico (VILLALOBOS-AMADOR; HERNÁNDEZ; PÉREZ-MOLPHEBALCH, 2002) ou inibi-lo (DORE; WILLIAMS, 1956 apud ORI, 2006). Estes últimos verificaram que a presença de elevada concentração de auxinas em ápices radiculares de *Armoracea rusticana* inibiu a formação de gemas, todavia, em concentrações baixas foram estimulatórias.

As auxinas naturais são sintetizadas geralmente, no meristema apical caulinar, em folhas jovens, frutos em desenvolvimento e em sementes, enquanto as citocininas são predominantemente produzidas nas raízes; embora tenha sido constatado que em uma epífita acaule e em uma epífita sem o sistema radicular apresentam capacidades biossintéticas igualmente elevadas em um único órgão para estes dois hormônios, ou seja, na raiz e no caule, respectivamente (PERES *et al.*, 1997; KERBAUY, 2004). Não obstante, níveis endógenos hormonais podem ser fortemente alterados pela aplicação exógena de biorreguladores e exercer efeitos significativos nas respostas morfogênicas (ZAERR; MAPES, 1982; MOK *et al.*, 1987; HUTCHINSON; KRISHNARAJ; SAXENA, 1996; ZAFFARI *et al.*, 2000; MONCALEÁN, *et al.*, 2005), particularmente para as citocininas exógenas.

1.1.3.2 As auxinas na micropropagação

Dentre as auxinas utilizadas para indução de calos embriogênicos em culturas de tecidos, destacam-se o AIA (ácido indolacético), ANA (ácido naftalenoacético) e 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) (HANDRO; FLOH, 1990; SCHULTHEIS; CHÉE; CANTLIFFE, 1990; GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999).

O 2,4-D é uma auxina forte, sendo um herbicida potencial, o qual promove crescimentos anormais que usualmente acarretam a morte do vegetal, exercendo, porém, pouco efeito em monocotiledôneas (SINNOTT, 1960), embora BESSE *et al.* (1992) tenham observado a

regeneração de plantas anormais a partir de calos friáveis e nodulares em *Elaias guineensis* Jack. Embora esta auxina seja amplamente utilizada na embriogênese somática de palmeiras, pesquisas realizadas com este biorregulador em plantas cultivadas *in vitro* revelaram variações genéticas e epigenéticas quando mantido por períodos longos, afetando sobremaneira o potencial embriogênico (CALIGARI; SHOHET, 1993 apud GUERRA, TORRES e TEIXEIRA, 1999). Além disso, a ação das auxinas no desenvolvimento de embriões somáticos é primariamente inibitória, se manifestando nos estádios subseqüentes ao globular (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999). Cabe salientar que, em meios de multiplicação, os quais objetivam promover a divisão e diferenciação celular (GUERRA; NODARI, 2006), as concentrações de auxina são freqüentemente baixas se comparadas às das citocininas para manter um balanço auxina/citocinina menor que 1, sendo que as mais utilizadas são ANA (ácido naftalenoacético), seguido de AIB (ácido indolbutírico) e AIA (ácido indolacético) (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990).

A auxina possui, ainda, capacidade de promover a diferenciação vascular em gemas apicais e em tecidos do caule, cuja formação de floema e xilema encontra-se na dependência das concentrações deste hormônio, fato este observado quando uma gema apical é enxertada em grupo de células não diferenciadas (calo), ocorrendo diferenciação dos tecidos abaixo do enxerto (TAIZ; ZAIGER, 2006). Conforme relataram os autores, altas concentrações deste hormônio induzem floema e xilema, enquanto que baixas concentrações promovem a diferenciação apenas do floema.

Eventualmente, em algumas espécies, o emprego isolado do ANA em baixas concentrações favorece o alongamento da parte aérea, o desenvolvimento de elevado número de folhas (PRAXEDES *et al.*, 2001; RUBIN *et al.*, 2007) e elevada taxa de multiplicação de brotos (RUBIN *et al.*, 2007).

Conforme supracitado, normalmente utiliza-se auxinas fortes, como o 2,4-D para a indução e formação de embriões somáticos e, em alguns casos, a retirada deste regulador de crescimento ou sua diminuição no meio, estimula o ciclo repetitivo, o desenvolvimento e conversão dos embriões somáticos, conforme verificado por Brunner Scutti (2000) utilizando como fonte de explante embriões zigóticos maduros excisados de frutos de guabirobeira em fase inicial de maturação (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.). Asemota, Eke e Odewale (2007), entretanto, induziram satisfatoriamente calos e elevado número de raízes em folhas jovens

unipinadas de tamareira (*Phoenix dactylifera* L.) empregando ANA em elevadas concentrações, embora a formação de embriões somáticos somente tenha ocorrido em outro experimento, a partir de calos induzidos em meio de cultura isento de biorreguladores e acrescido da associação KNO_3/NH_4 (nitrato de potássio/amônia) em distintas combinações.

As auxinas são amplamente utilizadas em culturas de tecidos com o propósito de estimular a iniciação radicular, embora a mesma concentração que estimula o surgimento dos primórdios radiculares possa exercer ação inibitória no posterior alongamento das raízes (KERBAUY, 2004; CASTRO; KLUGE; PERES, 2005), conforme verificado por Picoli e Otoni (2001) e Centellas *et al.* (1999).

Hu e Wang (1983) verificaram que o ANA parece ser a auxina mais eficaz ao estímulo do enraizamento *in vitro*, conforme observaram Abdullah, Grace e Yeoman (1989); Rahman *et al.* (1992); Lopes *et al.* (2001), Praxedes *et al.* (2001), embora tenham sido observados resultados indesejáveis como raízes grossas e presença de calo na base de brotações (CENTELLAS *et al.*, 1999). De forma semelhante, Guidolin (2003) observou que as raízes desenvolvidas em brotos de feijão originados a partir de calos, apresentavam-se grossas com o emprego de ANA por longos períodos de tempo, mesmo em concentrações reduzidas; embora tenha sido o tratamento mais favorável quanto à taxa de enraizamento em relação ao AIB.

Centellas *et al.* (1999), Brunner Scutti, (2000) e Silva Júnior (2007) verificaram que nem sempre a presença de auxinas é necessária para o enraizamento *in vitro* e, em alguns casos, a ausência de reguladores de crescimento parece favorecer consideravelmente a taxa de enraizamento (GUIDOLIN, 2003). Não obstante, a presença de auxinas, podem não induzir a rizogênese, mesmo que em baixas concentrações (SOARES *et al.*, 2007).

Em palmáceas, Saldanha (2007), avaliando as concentrações de sais do meio MS (MS e MS/2) e a concentração de sacarose (20, 30 e 40 g.L^{-1}) na germinação *in vitro* de embriões zigóticos imaturos excisados de sementes de palmito (*Euterpe edulis* Mart.), observou que em meio MS acrescido de sacarose a 30 g.L^{-1} e desprovido de biorreguladores resultou boa porcentagem de germinação, altura média dos explantes e número de raízes. Já, o ANA em baixas concentrações, favoreceu o desenvolvimento de raízes em embriões somáticos originados a partir de suspensões celulares de calos desenvolvidos em folhas e ápices caulinares de microplantas de tamareira (*Phoenix dactylifera* L.) (SANÉ *et al.*, 2006). Além disso, Melo *et al.* (2001) observaram que o ANA favoreceu consideravelmente o alongamento (comprimento)

radicular em plântulas jovens de guarirobeiras [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.] podadas e estabelecidas *in vitro*.

Tisserat e DeMason (1985) observaram que embriões zigóticos excisados de sementes e ápices caulinares de tamareiras (*P. Dactylifera* L.) cultivados em meios acrescidos de ANA em baixas concentrações, desenvolveram brotações, porém, a maioria dos ápices caulinares desenvolveu-se em uma única microplanta.

1.1.3.3 As citocininas na micropropagação

As citocininas induzem a divisão, diferenciação e alongamento celular na presença de auxina (CASTRO; KLUGE; PERES, 2005) e, em células vegetais diferenciadas como as do córtex e/ou floema, promovem o retorno da divisão para formarem meristemas secundários, como câmbio vascular e o felogênio (TAIZ; ZAIGER, 2006). De acordo com Grattapaglia e Machado (1990), o BAP (6-Benzilaminopurina) parece ser a citocinina por excelência para multiplicação de partes aéreas e gemas adventícias em diversas espécies, seguidos pela cinetina (KIN) e 2iP (2-isopenteniladenina), uma citocinina natural. Todavia, para Handro e Floh (1990), em geral, as respostas às diferentes citocininas são muito semelhantes na maioria dos casos, optando-se por citocininas mais baratas, como o BAP e KIN (cinetina), porém, o emprego de citocininas naturais como a 2iP, pode ser mais efetivo em alguns casos.

Outra citocinina comumente empregada na cultura de tecidos é o TDZ (thidiazuron; N-fenil-N'-1,2,3-tiadiazol-5,1-uréia), composto pertencente à classe das tiadiazoluréias (MOK *et al.*, 1982) e que apresenta atividade citocínica, promotora do crescimento e utilizada inicialmente como desfoliador na cultura do algodão, facilitando sobremaneira a colheita mecânica (ANTUNES; RASEIRA, 2006). Segundo os autores, o TDZ também promove crescimentos mais rápidos e (ou) mais vigorosos em campo, decorrente de sua ação nas divisões celulares. O thidiazuron é também, um composto altamente estável, resistente às oxidases e biologicamente ativo em concentrações menores que as citocininas do tipo adenina (MOK *et al.*, 1987; PERES, 2002; KERBAUY, 2004). É importante considerar que, as citocininas, ao serem aplicadas a um tecido vegetal, poderão ser metabolizadas e a resposta ocorrerá em função da capacidade do tecido em questão (KERBAUY, 2004).

As citocininas constituem o grupo de reguladores vegetais imprescindíveis à quebra de dominância apical e indução de proliferação de gemas axilares, cujos tipos e concentrações são os

que mais influenciam na multiplicação *in vitro* (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990), embora elevadas concentrações possam ser tóxicas (BLAKESLEY, 1991; LIMA; GONÇALVES, 1998; PEREIRA *et al.*, 2000; DZAZIO; BIASI; ZANETTE, 2002).

Barros e Azevedo (2001) ressaltaram que tratamentos acrescidos de pequenas concentrações de citocininas reduzem a probabilidade de indução de variação somaclonal.

O uso de BAP isoladamente na cultura *in vitro* favorece, em muitos casos, a multiplicação de brotos (PEREIRA *et al.*, 2000; ZAFFARI *et al.*, 2000; BORGES-JÚNIOR; SOBORSA; MARTINS-CODER, 2004; DZAZIO; BIASI; ZANETTE, 2002; BERTONI *et al.*, 2006; FURTADO *et al.* 2007), a indução de embriogênese somática direta (ALMEIDA, 1994; AYUB; GEBIELUCA, 2003, ALMEIDA; ALMEIDA, 2006) e o desenvolvimento de elevado número de folhas em altas concentrações (PEREIRA *et al.*, 2000).

Em concentrações elevadas, o BAP promove sintomas de vitrificação (MONTOVANI *et al.*, 1999; DZAZIO; BIASI; ZANETTE, 2002; SOUZA *et al.*, 2003; BERTONI *et al.*, 2006), proporciona elevada taxa de multiplicação de brotos, porém, com tamanhos reduzidos (VILLA *et al.*, 2005), diminui consideravelmente o número de folhas (DZAZIO; BIASI; ZANETTE, 2002; VILLA *et al.*, 2005), além de promover nestas últimas, tamanhos e formas atípicos (PEREIRA *et al.*, 2000). Sintomas de vitrificação em concentrações mais baixas do BAP também foram reportados por Cuzzuol *et al.* (1995).

Em alguns casos, a regeneração de brotos pode ocorrer embora em proporções reduzidas, independentemente do acréscimo de citocininas ao meio de cultura (FURTADO *et al.* 2007; SOARES *et al.*, 2007). Rubin *et al.* (2007) verificaram que o BAP pode exercer estímulos negativos à brotação e ao alongamento da parte aérea, quando empregado tanto isoladamente, como em associação com ANA, além de desenvolver menor número de folhas em relação a ANA.

Meios isentos de reguladores de crescimento ou o decréscimo nas concentrações do BAP também têm proporcionado bom crescimento de brotações ou dos explantes em relação às crescentes concentrações do BAP (MONTOVANI *et al.*, 1999; PEREIRA *et al.*, 2000; LIMA *et al.*, 2007), conforme observado, também, na guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* BERG.), além de favorecer consideravelmente a multiplicação de brotos (BRUNNER SCUTTI, 2000). O inverso, ou seja, concentrações crescentes de BAP, ou até determinado incremento na

concentração, já foram reportados como favoráveis ao crescimento e desenvolvimento de folhas dos explantes (LIMA *et al.*, 2007).

Inibições à rizogênese vêm sendo observadas com o emprego da citocinina BAP em elevadas concentrações (PEREIRA *et al.*, 2000; SILVA JÚNIOR, 2007). A rizogênese pode, então, ser favorecida, com a redução na concentração de BAP ou com a retirada deste biorregulador (PEREIRA *et al.*, 2000). A remoção do BAP do meio de cultura favoreceu, também, o enraizamento de micro-estacas de microplantas assépticas de guabiroba (*C. xanthocarpa*) (BRUNNER SCUTTI, 2000).

Em palmáceas, o BAP favoreceu o desenvolvimento de embriões somáticos a partir de suspensões celulares de calos secundários obtidos em folhas ou ápices caulinares de tamareira germinadas *in vitro* (*Phoenix dactylifera* L.) (SANÉ *et al.*, 2006). Similarmente, Karun *et al.* (2004) obtiveram excelentes resultados do BAP sobre germinação de embriões somáticos após indução de calos em folhas jovens de *Areca catechu* L. utilizando Picloram em concentrações sucessivamente reduzidas, seguida pela transferência em meio isento de reguladores de crescimento, o qual induziu a embriogênese somática. O crescimento, rizogênese e desenvolvimento de folhas foram satisfatórios com a permanência dos embriões somáticos em meio suplementado com a mais reduzida concentração de BAP utilizada no experimento por um período de seis semanas.

Em *Bactris gasipaes* Kunth., a presença isolada do BAP em cultura de ápices caulinares de pupunha após cultivo prévio em meio desprovido de biorreguladores, promoveu bom crescimento médio da parte aérea, seguido pelo 2iP, ANA e GA₃, embora as melhores respostas ao estímulo ao crescimento tenha ocorrido com a associação BAP/ANA, num balanço favorável à auxina, conforme mencionado no item 1.1.3.1 (ALMEIDA, 1994). Na mesma espécie, centros meristemáticos ou complexos celulares pró-embriogênicos foram induzidos com o emprego do BAP em elevadas concentrações, cuja polarização e conversão em embriões somáticos, conforme já mencionado, foi obtida com o balanço ANA/BAP favorável à auxina (ALMEIDA; ALMEIDA, 2006). Almeida (1994) observou que o desenvolvimento de embriões somáticos diretamente de gemas isoladas de rizoma originados em ápices caulinares desta mesma espécie cultivadas *in vitro*. Para tanto, as gemas permaneceram em meio MS suplementado com BAP isoladamente, cuja resposta morfogênica pôde ser observada após 25 dias de cultivo. Além disso, o autor

observou, que o emprego tanto do BAP como do 2iP isoladamente, não promoveram a regeneração de gemas adventícias na cultura de ápices caulinares para esta espécie.

Em alguns casos, o emprego de citocininas isoladamente, como o BAP e o TDZ não tem exercido efeitos satisfatórios à multiplicação *in vitro* (SANTARÉM; ASTARITA, 2003).

Souza *et al.* (1998) relataram que o TDZ tem apresentado resultados superiores em relação às outras citocininas na indução e multiplicação de brotos em diversas espécies cultivadas *in vitro* quando aplicado em concentrações reduzidas e, segundo Huetteman e Preece (1993), nas concentrações iguais ou superiores a 1,0 μM (0,22 mg.L^{-1}), possui excelente ação estimulante para a formação de calos.

Eventos morfogênicos relacionados ao emprego do TDZ isoladamente na multiplicação de brotos *in vitro* de algumas espécies também têm sido reportados (GOSUKONDA *et al.*, 1995; FURTADO *et al.* 2007; NICOLOSO; MALDANER, 2007) e na indução da embriogênese somática (HUTCHINSON; KRISHNARAJ; SAXENA,1996; AYUB; GEBIELUCA, 2003; FERREIRA *et al.*, 2005), embora normalmente seja inibitório à rizogênese (HUTCHINSON; KRISHNARAJ; SAXENA,1996; FLORES; NICOLOSO; MALDANER, 2007) ou promova o desenvolvimento de gemas com tamanhos reduzidos (LIMA; GONÇALVES, 1998; CORDEIRO DE SOUSA *et al.*, 2000; FLORES; NICOLOSO; MALDANER, 2007).

Assim como o BAP, o TDZ em elevadas concentrações, na maioria dos casos, promove vitrificação (NIEUWKERK; ZIMMERMAN, 1986; SCHUCH; PETERS, 2002; SOUZA *et al.*, 2003), necrose dos tecidos e crescimento anormal das folhas (NIEUWKERK; ZIMMERMAN, 1986).

Em macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Martius) relatou-se a indução de calos embriogênicos em embriões zigóticos maduros excisados de sementes com o emprego do TDZ, porém em associação ao 2,4-D ou picloram. (MOURA, 2007). De acordo com o autor, a presença do TDZ foi deletéria ao desenvolvimento de estruturas globulares semelhantes a embriões somáticos.

Em experimentos empregando gemas apicais de três cultivares paquistaneses de tamareira (*Phoenix dactylifera* L.) com dois a três anos de idade em meio de multiplicação suplementados com a associação das citocininas TDZ e o dobro em concentração de 2iP, demonstraram ser favoráveis à multiplicação de brotos (HUSSAIN *et al.*, 1995).

Hu e Wang (1983) relataram que o 2iP é uma citocinina que permite o desenvolvimento normal de propágulos, porém, sem desenvolver brotações múltiplas, a exemplo do observado por Collussi, Dabul e Ayub (2008) e Figueiredo *et al.* (2008). Em alguns casos, a formação de calos embriogênicos foi favorecida na presença de Picloram em baixas concentrações, conforme observado em *Bactris gasipaes* Kunth. (STEINMACHER *et al.*, 2007).

A aplicação isolada da citocinina 2iP em concentrações 1,0 μM (0,2 mg.L^{-1}) ou maiores que esta, pode não ser satisfatória no que se refere à taxa de multiplicação, além de promoverem a formação de calos (BORGES-JÚNIOR; SOBORSA; MARTINS-CODER, 2004), desenvolvimento reduzido no número de folhas (FIGUEIREDO *et al.*, 2008) e a oxidação do explante (SILVA *et al.*, 2006). Em algumas culturas, brotações oriundas diretamente do explante, sem a precedência de calos podem ser observadas em concentrações não superiores a 1,0 μM (ENGELKE; HAMZI; SKOOG, 1973; COLLUSSI; DABUL; AYUB, 2008).

O emprego isolado de 2iP na cultura de ápices caulinares de microplantas de pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth.), não favoreceu o desenvolvimento de gemas adventícias (ALMEIDA, 1994), além disso, não há relatos na literatura sobre a promoção de embriogênese somática direta com o emprego isolado das citocininas TDZ ou 2iP em palmáceas.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivos gerais

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a atuação de biorreguladores (ANA, BAP, TDZ e 2iP) no desenvolvimento morfo genético de microplantas de pupunheiras.

1.2.2 Objetivos específicos

- Otimizar a relação auxina/citocininas na micropropagação de pupunheira;
- Avaliar por meio de análises morfofisiológicas o desenvolvimento da parte aérea de microplantas submetidas a tratamentos com biorreguladores;
- Identificar por meio de análises histológicas as rotas e padrões morfo genéticos das microplantas de pupunheiras submetidas aos diferentes tratamentos com biorreguladores.

Referências

ABDULLAH, A.A.; GRACE; YEOMAN. Rooting and establishment of calabrian pine plantlets propagated *in vitro*: influence of growth substances, rooting medium and origin of explant. **New Phytologist**, Oxford, v.113, p.193-202, 1989.

ABREU, R.L.S; JESUS, M.A. Durabilidade natural do estipe de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth, Areaceae) II: Insetos. **Acta Amazônica**, Manaus, v.34, n.3, p.459-465, 2004.

ABREU, I.N.; PINTO, J.E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V.; MORAIS, A.R.; GEROMEL, C.; LADEIRA, A.; LAMEIRA, O.A. Propagação *in vivo* e *in vitro* de *Cissus sicyoides*, uma planta medicinal. **Acta Amazônica**, Manaus, v.33, n.1, p.1-7, 2003.

ALMEIDA, C.V.; ANDREOTE, F.D.; YARA, R.; TANAKA, F.A.O.; AZEVEDO, J.L.; ALMEIDA, M. Bacteriosomes in axenic plants: endophytes as stable endosymbionts. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, London, 2009. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/e207030156303261/fulltext.pdf>>. Acesso em: 30 maio 2009.

ALMEIDA, C.V.; YARA, R.; ALMEIDA, M. Fungos endofíticos isolados de ápice caulinar de pupunheira cultivados *in vivo* e *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, n.5, p.467-470, 2005.

ALMEIDA, M. **Emprego da Cultura “in vitro” para multiplicação vegetativa em pupunha (*Bactris gasipaes* H.B.K.)** Palmae. 1994. 121p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências –Universidade de São Paulo, São Paulo, 1994.

ALMEIDA, M., ALMEIDA, C.V. Somatic embryogenesis and *in vitro* plant regeneration from pejibaye adult plant leaf primordial. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.9, p.1449-1452, 2006.

ALMEIDA, M.; KERBAUY, G.B. Micropropagation of *Bactris gasipaes* H.B.K. (Palmae) through flowers bud culture. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Lavras, v.8, p.215-217, 1996.

ALMEIDA, W.A.B. **Caracterização anatômica da organogênese *in vitro* e transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens* em citrus sp.** 2002. 138p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

ALMEYDA, N.; MARTIN, F.W. **Cultivation of neglected tropical fruits with promise: the pejibaye.** New Orleans, Ed. Mayaguez, 1980. pt.8, 10p.

ALOUFA, M.A. Some factors affecting the callus induction and shoot formation in two cultivars of sweet potato *Ipomoea batatas* (L.) POIS. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.26, n.5, p.964-969, 2002.

ALVES JÚNIOR, J.; LOPES, A.S.; HERNANDEZ, F.B.T.; DOS SANTOS, R.A.; BERGAMASCHINE, A.F. Produção de matéria verde em pupunheira irrigada. **Irriga**, Botucatu, v.10, n.4, p.349-356, 2005.

ANDRADE, W.F. **Atuação de “pulse” na organogênese de *Eucliptus grandis* cultivado *in vitro***. 2005. 55p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

ANDRADE, W.F.; ALMEIDA, M.; GONÇALVES, A.N. Multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* sob estímulo com benzilaminopurina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.12, p.1715-1719, 2006.

ANTUNES, L.E.C.; RASEIRA, M. do C.B. (Ed.). In: SIMPÓSIO NACIONAL DO MORANGO; 3.; ENCONTRO DE PEQUENAS FRUTAS NATIVAS DO MERCOSUL, 2006, Piracicaba. **Palestras...** Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2006. 145p. (Documento, n.171).

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; FERNANDO, J.A.; MACHADO, S.R.; VIEIRA, M. L. C. Estudos morfológicos, anatômicos, histoquímicos e ultra-estruturais da organogênese *in vitro* do maracujazeiro. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (Ed.). **Maracujá - germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: EMBRAPA Cerrados 2005. cap.16, p.387-408, 2005.

ASEMOTA, O.; EKE, C.R.; ODEWALE, J.O. Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) *in vitro* morphogenesis in response to growth regulators, sucrose and nitrogen. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.6, n.20, p.2353-2357, 2007.

ARIAS, O. Propagación vegetative por cultivos de tejidos del pejobaye (*Bactris gasipaes* H.B.K.) **Asbana**, San Jose, v.24, p.459-465, 1985.

AYUB, R.A.; GEBIELUCA, A.N. Embriogênese somática em genótipos de café (*Coffea arabica*) é citocinina dependente. **Exact Soil Science, Agricultural Science Engineering**, Ponta Grossa, v.9, n.2, p.25-30, 2003.

AZEVEDO, J.L.; JR. MACCHERONI, W.; ARAÚJO, W.L.; PEREIRA, J.O. Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. In: SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Biociência: avanços na agricultura e na agroindústria**. 2002. Caxias do Sul: EDUCS, p.233-268.

BARBOSA, A.M.M. Pupunha (*Bactris gasipaes*). In: FURIA, L.R.R. (Ed.). **Encontro sobre produção de palmito**. Piracicaba: CALQ/Departamento de Agricultura, 1993. p.12-23, 1993.

BATAGIN, K.D. **Análise anátomo-fisiológicas de folhas de pupunheiras cultivadas *in vitro*, *ex vitro* e *in vivo* visando otimizar o protocolo de aclimatização**. 2008. 107p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

BERGO, C.L.; LUNZ, A.M.P. **Cultivo da pupunha para palmito no Acre**. Rio Branco: Embrapa Acre, 2000. 15p. (Circular Técnica, 31).

BERTONI, B.W.; DAMIÃO FILHO, C.F.; MORO, J.R.; FRANÇA, S.C.; PEREIRA, A.M.S. Micropropagação de *Calendula officinalis* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.8, n.2, p.48-54, 2006.

BESSE, I.; VERDEIL, J.L.; DUVAL, Y.; SOTA, B.; MALDNEY, R. ; MIGIRIAC, E. Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) clonal fidelity: endogenous cytokinins and indolacetic acid in embryogenic callus cultures. **Journal of Experimental Botany**, New Jersey, v.43, n.252, p.983-989, 1992.

BLAKESLEY, D. Update and metabolismo of 6-benzyladenine in shoots cultures of *Musa* and *Rhododendron*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.25, n.1, p.69-74, 1991.

BONACCINI, L.A. **Produza palmito: a cultura da pupunha**. Cuiabá: SEBRAE/MT, 1997. 100p. (Coleção Agroindústria, 12).

BORGES JÚNIOR, N.; SOBORSA, R.C.; MARTINS-CODER, M.P. *In vitro* multiplication of black wattle (*Acacia mearnsii* De Wild.) axillary buds. **Revista Árvore**, Viçosa, v.28, n.4, p.493-498, 2004.

BOVI, M.L.A. Palmito pupunha-informações básicas para o cultivo. In: FURIA, L.R.R. (Ed.). **Encontro sobre produção de palmito**, Piracicaba, CALQ/Departamento de Agricultura, 1993. p.12-23.

_____. **Cultivo da palmeira real australiana visando à produção de palmito**. Campinas: Instituto Agrônomo, 1998a. 26p. (Boletim Técnico 172).

_____. **Palmito de pupunha: informações básicas para o cultivo**. Campinas: Instituto Agrônomo, 1998b. 50p. (IAC. Boletim Informativo, 173).

BOVI, M.L.A.; MARTINS, C.C.; SPIERING, S.H. Desidratação de sementes de quatro lotes de pupunheira: efeito sobre a germinação e vigor. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, n.1, 109-112, 2004.

BOVI, M.L.A.; SAES, L.A.; GODOY JR.,G. Correlações fenotípicas entre caracteres não destrutíveis e palmito de pupunheira. **Revista Turrialba**, San Jose, v.42, p.382-390, 1992.

BRUNNER SCUTTI, M. Propagação vegetativa da guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* BERG.) *in vitro* e por estaquia. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.1, n.1-2, p.75-82, 2000.

CENTELLAS, A.Q.; FORTES, G.R.L.; MÜLLER, N.T.G.; ZANOL, G.C.; FLORES, R.; GOTTINARI, R.A. Efeito das auxinas sintéticas no enraizamento *in vitro* da macieira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n.2, p.181-186, 1999.

CARVALHO, J.M.F.C.; VIDAL, M.S. **Noções de cultivo de tecidos vegetais**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2003. 39p.

CASTRO, P.R.C.; KLUGE, R.A.; PERES, L.E.P. **Manual de fisiologia vegetal: teoria e prática**. Piracicaba: Editora Agronômica Ceres, 2005. 650p.

CHAIMSOHN, F P. Cultivo de pupunha para palmito: importância, mercado e aspectos biológicos e agronômicos. In: _____. (Org.). **Curso sobre cultivo, processamento e comercialização de palmito de pupunha**. Londrina, IAPAR, 2001. p.7-69.

CHRISTIANSON, M.L. An embryogenic culture of soybean: towards a general theory of somatic embryogenesis. In: HENKE, R.R.; HUGHES, K.W.; CONSTANTIN, M.J.; HOLLAENDER, A. (Ed.). **Tissue culture in forestry and agriculture**. New York: Plenum Press, 1985. p.83-103.

CLEMENT, C.R. Pupunha uma árvore domesticada. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, n.5, p.42-49, 1987.

CLEMENT, C.R.; ARKCOLL, D.B. Observações sobre auto-compatibilidade em pupunha (*Bactris gasipaes* H.B.K.). **Acta Amazônica**, Manaus, v.14, ns. 3-4, p.337-342, 1984.

CLEMENT, C.R.; ARADHYA, M.K.; MANSHARDT, R.M.. Allozyme variation in spineless pejibaye (*Bactris gasipaes* Palmae) {Variação isoenzimática em pupunha inerme}. **Economic Botany**, Lawrence, v.51, n.2, p.149-157, 1997.

CLEMENT, C.R.; YUYAMA, K.; CHÁVEZ FLORES, W.B.. Recursos genéticos de pupunha {genetic resources of pejibaye}. In: Sousa, N.R.; Souza, A.G.C. (Ed.). **Recursos fitogenéticos na Amazônia Ocidental: conservação, pesquisa e utilização**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2001. p.143-187.

COLUSSI, F.; DABUL, A.N.G.; AYUB, R.A. Regeneração de *Euphorbia heterophylla* L. *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.32, n.4, p.1317-1321, 2008. Comunicação.

CONGER, B.V. Problems and potentials of cloning agronomic via *in vitro* techniques. In: HUGHES, K,W.; HENKE, R.; CONSTANTIN, M. (Ed.). **Propagation of higher plants through tissue culture**. Springfield: Tech. Info. Center, U.S. Dept. Commerce, 1978. Va. p.62-72.

CORDEIRO de SOUSA, J.; ROCHA, M.V.; ALVES, J.C.; CACAU, J.B.; CORREIA, D.; JÚNIOR, A.T.C. **Efeito das citocininas thidiazuron e benzilaminopurina na multiplicação de gemas *in vitro* de abacaxizeiro (*Ananas comosus* cv. Cayenne Champac)**. EMBRAPA AGROINDÚSTRIA TROPICAL, 2001. Disponível em: <http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001/posters/01/posterpdf/01-125/025.PDF>. Acesso em: 03 out. 2007.

COSTA NETO, P.Q. **Isolamento e identificação de fungos endofíticos da pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth.) e caracterização por marcadores moleculares**. 2002. 86p. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) – Universidade de São Carlos, São Carlos, 2002.

COSTA, N.M.S.; ALOUFA, M.A.I. Organogênese direta de *Phoenix dactylifera* L. via pecíolo cotiledonar. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v.36, n.3, p.195-198, 2006.

COUTO, L.; DANIEL, O.; ALMEIDA, A.; VERVLOT, F.B.; SOUZA, A.C.G. **A cultura da pupunha para produção de palmito**: sistema de produção e processamento industrial. Viçosa: SIF, 1999. 34p. (Documento sif n.020).

CHRISTIANSON, M.L.; WARNICK, D.A. Organogenesis *in vitro* as developmental process. **Hortscience**, St. Joseph, v.23, p.515-519, 1978.

CRONBERG, V.U. Manejo de Juçara em áreas de mata. In: : FURIA, L.R.R. (Ed.). **Encontro sobre produção de palmito**. Piracicaba: CALQ/Departamento de Agricultura, 1993. p.59-70.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981. 1652p.

CUZZUOL, G.R.F.; GALLO, L.A.; ALMEIDA, M.; CROCOMO, O.J. Controle da vitrificação do cravo (*Dianthus caryophyllus* L.) *in vitro*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.52, n.3, p.604-614, 1995.

DAMIÃO FILHO, C.F. **Micropropagação e semeadura de orquídeas (técnicas básicas)**. Jaboticabal: Funep, 2006. 82p.

DE PAIVA NETO, V.B.; MOTA, T.R.; OTONI, W.C. Direct organogenesis from hypocotyl-derived explants of annatto (*Bixa orellana* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.75, p.159-167, 2003.

DZAZIO, P.M.; BIASI, L.A.; ZANETTE, F. Micropropagação do porta-enxerto de videira '420-A'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24, n.3, p.759-764, 2002.

ENGELKE, A.L.; HAMZI, H.Q.; SKOOG, F. Cytokinin-gibberellin regulation of shoot development and leaf form in tobacco plantlets. **American Journal of Botany**, Palo Alto, v.60, n.6, p.491-495, 1973.

ESAU, K. Anatomical differentiation in shoot and root axes. In: LOOMIS, W.E. (Ed.). **Growth and differentiation in plants**. Ames: The Iowa State College Press, 1949. p.69-100.

ESHRAHGI, P.; ZARGHAMI, R.; MIRABDULBAGHI, M. Somatic embryogenesis in two iranian date palm cultivars. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.4, n.11, p.1309-1312, 2005.

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Photoautotrophic micropropagation and use of the natural light. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.4, p.961-965, 2005.

EEUWENS, C. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera*). **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.36, p.23-28, 1976.

FAO/WHO. - **Proposed draft standard for canned palmito (at step 2)**. Rome, 1978. 12p. (Codex Alimentarius Commission. CX/PFV 78/8).

FERREIRA; C.D.; PENA, R.S. Comportamento higroscópico da farinha de pupunha (*Bactris gasipaes*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.23. n.2, p.251-255, 2003.

FERREIRA, M. G. R.; CARVALHO, C. H. S.; CARNEIRO, A. A.; DAMIÃO FILHO, C. F. Indução de embriogênese somática em cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.27, n.3, p.500-503, 2005.

FERREIRA, S.A.N. A cultura da pupunheira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.9, p.23-28, 1987.

_____. Pupunha, *Bactris gasipaes* Kunth. In: FERRAZ, I.D.K.; CAMARGO, J.L.C. **Manual de sementes da Amazônia**. Manaus: INPA, 2005. v.5. 12p.

FERREIRA, S.A.N.; SANTOS, L.A. Viabilidade de sementes de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth). **Acta Amazônica**, Manaus, v.22, p.303-307, 1992.

FERREIRA SAN, CLEMENT, C.R.; RANZANI, G. Contribuição para o conhecimento do sistema radicular da pupunheira (*Bactris gasipaes* H.B.K.-*Guilielma gasipaes* (H.B.K.) Bailey). I. Solo Latossolo Amarelo, textura média. **Acta Amazônica**, Manaus, v.10, p.245-249, 1980.

FERREIRA, S.A.N.; CLEMENTE, C.R.; RANZANI, G.; COSTA, S.S. Contribuição ao conhecimento do sistema radicular da pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth, Palmae). II. Solo Latossolo Amarelo, textura argilosa. **Acta Botânica**, Manaus, v.25, n.3/4, p.161-170, 1995.

FERREIRA, V. L. P.; GRANER, M.; BOVI, M.L.A.; DRAETTA, I.S.; PASCHOALINO, J.E.; SHIROSE, I. Comparação entre os palmitos de *Guilielma gasipaes* Bailey (pupunha) e *Euterpe edulis* Mart. (juçara). I. Avaliações físicas, organolépticas e bioquímicas. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.12, n.1, p.255-272, 1982a.

FERREIRA, V.L.P.; GRANER, M.; BOVI, M.L.A.; FIGUEIREDO, I.B.; ANGELUCCI, E.; YOKOMIZO, Y. Comparação entre os palmitos de *Guilielma gasipaes* Bailey (pupunha) e *Euterpe edulis* Mart. (juçara). II. Avaliações físicas e químicas. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, vol.12, n.1, p.273-282, 1982b.

FIGUEIREDO, G.S.; SCHUCH, M.W.; DAMIANI, C.R.; CHISTÉ, E. **Estabelecimento *in vitro* de marmeleiro japonês (*Chaenomelis japonica*) cultivar andramig I**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 20., Vitória. Disponível em: < http://200.137.78.15/cdXXCBF/paginas/Biotecnologia/20080729_214509.pdf>. Acesso em: 26 nov. 2008.

FLORES, R.; NICOLOSO, F.T; MALDANER, J. Propagação rápida de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken utilizando thidiazuron. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.9, n.1, p.1-7, 2007.

FURTADO, C.M.; CARVALHO, J.M.F.C.; CASTRO, J.P.; SILVA, H. Comparação da frequência de regeneração *in vitro* do amendoim (*Arachis hipogaea*), utilizando diferentes citocininas. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, João Pessoa, v.7, n.1, 2007.

GABR, M.F.; TISSERAT, B. Propagating palms *in vitro* with special emphasis on the date palm (*Phoenix dactylifera* L.) **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.25, p.255-262, 1985.

GARCIA, T.B. **Efeito de ácido indol 3-butírico no enraizamento de diferentes tamanhos de perfilhos de pupunheira (*Bactris gasipaes* H.B.K.)**.1988. 36p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1988.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCT/EMBRAPA-CNPQ, 1990. p.99-169.

GOSUKONDA, R. M.; POROBODESSAI, A.; BLAY, E.; PRAKASH, C.S.; PETERSON, C.M. Thidiazuron-induced adventitious shoot regeneration of sweetpotato (*Ipomoea batatas*). **In Vitro Cellular and Developmental Biology**, New York, v.31, p.65-71, 1995.

GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. **Apostila de biotecnologia: introdução ao conceito de biotecnologia**. LFDGV/CCA – UFSC: D.A. Steinmacher, 2006. 41p. (Material de Apoio). Disponível em: <<http://www.cca.ufsc.br/lfdgv/Apostila%20Biotecnologia.pdf>>. Acesso em: 30 set. 2007.

GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S., BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CBAB, 1999. v.2, p.533-568.

GUERREIRO, L.F. **Estudo de mercado 01/02, mar.2002 – Palmito de pupunha**. Salvador: Desenbahia, 2002. 14p.

GUIDOLIN, A.F. **Regeneração de plantas de *Phaseolus vulgaris* L. a partir de calos e transformação genética via *Agrobacterium***. 2003. 100p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

HANDRO, W.; FLOH, E.I.S.; Aspectos básicos do controle da morfogênese *in vitro*. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCT/EMBRAPA-CNPQ, 1990. p.203-212.

HARLAN, J.R.; de WET, J.M.J. Toward a rational classification of cultivated plants. **Taxon**, Utrecht, v.20, p.509-517, 1971.

HARTLEY, C.W. **The oil palm**. London: Longman, 1977. (Tropical Agriculture Series).

HU, C. Y.; WANG, P.J. Techniques for propagation and breeding. In: EVANS, D.A., SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. (Ed.). **Handbook of plant cell culture**. New York: MacMillan, 1983. p.177-277.

HUERTE, V.F.; ARIAS, M.O. Propagación vegetativa del pejibaye. **Asbana**, San José, v.5, n.14, p.10-13. 1981

HUETTEMAN, C.A.; PREECE, J.E. Thidiazuron: a potent cytokinin for wood plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.33, n.2, p.105-119, 1993.

HUTCHINSON, M.J.; KRISHNARAJ, S.; SAXENA, P.K. Morphological and physiological changes during thidiazuron-induced somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium x hortorum* Bailey) hypocotyl cultures. **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v.157, n.4, p.440-446, 1996.

HUSSAIN, I., A. MUSHTAQ; A. QURAIISHI (1995). Effect of Explant source on *in vitro* regeneration of plants through tissue culture proliferation in (*Phoenix dactylifera* L.) c.v. Fusli. **Pakistan Journal of Botany**, Islamabad, v.27, n.1, p.101-104, 1995.

KANCHANAPOOM, K.; DOMYOAS, P. The origin and development of embryoids in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) embryo culture. **Science Asia**, Mahidol, v.25, p.195-202, 1999.

KALIL FILHO, A.N.; SANTOS, A.F.; NEVES, E.J.M.; KALIL, G.P.C.; SILVA, V.F.O. Presença/ausência de espinhos em progênies de pupunha (*Bactris gasipaes*) do projeto RECA como fonte de sementes. Colombo: Embrapa Florestas. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, v.44, p.127-132, 2002.

KARUN, A.; SIRIL, E.A.; RADHA, E.; PARTHASARATHY, V.A. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from leaf and inflorescence explants of arecanut (*Areca catechu* L.). **Current Science**, Bangalore, v.86, n.12, p.12-25, 2004.

KERBAUY, G.B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S., BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CBA 1999.v.2, p.519-530.

_____. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara, 2004. 452p.

KULCHETSCKI, L.; CHAIMSOHN, F.P.; GARDINO, J.R. **Palmito de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth). A espécie, cultura, manejo agrônômico, usos e processamentos**. Ponta Grossa: Editora UEPG, 2001. v.1, 148p.

LAWRENCE, R.H. *In vitro* plant cloning systems. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v.21, p.289-300, 1981.

LEDO, A.S.; GOMES, K.K.P.; BARBOZA, S.B.S.C.; VIEIRA, G.S.C.; TUPINAMBÁ, E.A.; ARAGÃO, W.M. Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos e aclimatização de plântulas de coqueiro-anão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.24, n.2, p.147-154, 2007.

LEDO, A.S.; LAMEIRA, O.A.; BENBADIS, A.K.; MENEZES, I.C.; LEDO, C.A.S.; OLIVEIRA, M.S.P. Cultura *in vitro* de embriões zigóticos de açazeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.3, p.468-472, 2001.

LEDO, A.S.; LAMEIRA, O.A.; BENBADIS, A.K.; MENEZES, I.C.; OLIVEIRA, M.S.P.; FILHO, S.M. Somatic embryogenesis from zygotic embryos of *Euterpe oleracea* Mart. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24, n.3, p.601-603, 2002.

LEEUWEN, J. van. 2006. O melhoramento participativo da pupunheira (*Bactris gasipaes*) para a produção de fruto, uma proposta preliminar. In: ProBio: **Pupunha: raças primitivas e parentes silvestres**. Manaus: INPA, 12p. Disponível em: <<http://www.inpa.gov.br/pupunha/probio/melhora-particip.pdf>>. Acesso em: 07 nov. 2008.

LEHNINGER, A.L. **Biochemistry**. New York: Worth Publishers, 1972.

LIMA, C.S.M.; BANDEIRA, J.M.; RUBIN, S.; RIBEIRO, M.V.; BENITEZ, L.; PETERS, J.A.; BRAGA, E.J.B. Influência de fitorreguladores no crescimento *in vitro* de partes aéreas de *Mentha viridis*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, supl.2, p.669-671, 2007.

LIMA, M.M.; GONÇALVES, A.N. Efeito do thidiazuron na multiplicação *in vitro* de gemas de um clone de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus tereticornis*. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n.53, p.49-56, 1998.

LOPES, S.C.; LAMEIRA, O.A.; FORTES, G.R.L.; NOGUEIRA, R.C.; PINTO, J.E.B.P. Enraizamento *in vitro* de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Cerne**, Lavras, v.7, n.1, p.124-128, 2001.

LORENZI, H.; SOUZA, H.M.; MEDEIROS-COSTA J.T.; CERQUEIRA, L.S.C.; FERREIRA, E. **Palmeiras Brasileiras e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: Plantarum, 2004. 432p.

LU, C. The use of thidiazuron in tissues cultures. **In vitro, Cellular and Developmental Biology Plant**, Oxon, v.29, n.2, p.92-96, 1993.

MATER, A.A. Effect of auxin-cytokinin interaction on micropropagation of date palm. **Agricultural Science**, Riyadh, v.2, p.211-223, 1990.

MELO, B.; PINTO, J.E.B.P.; LUZ, J.M.Q.; PEIXOTO, J.R.; JULIATTI, F.C. Efeitos de ANA e AIB *in vitro* no enraizamento e crescimento da parte aérea da plântula da guarirrobeira [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.]. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.17, n.1, p.49-59, 2001.

MOK, M.C.; MOK, D.W.S.; TURNER, J.E.; MUJER, C.V. Biological and biochemical effects of cytokinin-active phnrylurea derivatives in tissue culture systems. **Hortscience**, Alexandria, v.22, p.1194-1197, 1987.

- MOK, M.C.; MOK, D.W.S.; ARMSTRONG, D.J.; SHUDO, K.; ISOGAL, Y.; OKAMOTO, T. Cytokinin activity of N-phenyl-N²-1,2,3-thiadiazol-5-urea (thiadiazuron). **Phytochemistry**, Elmsford, v.21, n.7, p.1509-1511, 1982.
- MONCALEÁN, P.; ALONSO, P.; CENTENO, M.L.; CORTIZO, M.; RODRÍGUEZ, A.; FERNÁNDEZ, B.; ORDÁS, R.J. Organogenic response of *Pinus pinea* cotyledons to hormonal treatments: BA metabolism and cytokinin content. **Tree Physiology**, Victoria, v.5, p.1-9, 2005.
- MONTOVANI, N.C.; FRANCO, E.T.H.; GUERRA, M.P.; HOPPE, J.M. Micropropagação de caixeta, *Didymopanax morototoni* (Aubl.) Dcne. et Planch. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.9, n.1, p.47-61, 1999.
- MOORE, T.C. **Biochemistry and physiology of plants hormones**. Berlin: Springer-Verlag. 197p.
- MORA-URPÍ, J. Polinización em *Bactris gasipaes* H.B.K. (Palmae): nota adicional. **Revista de Biología Tropical**, San Jose, v.30. p.174-176, 1982.
- _____. El pejibaye (*Bactris gasipaes* H.B.K.): origen, biología floral y manejo agronómico. In: **Palmeras poco utilizadas de América Tropical**. FAO. Turrialba: CATIE, 1984. p.118-160.
- _____. Consideraciones sobre el futuro del mercado internacional. In: MORA URPI, J.; ECHEVERRÍA, J. G. (Ed.). **Palmito de pejibaye (*Bactris gasipaes* KUNTH.)**: su cultivo y industrialización. San Jose: Universidad de Costa Rica, 1999a. cap.9, p.212-215.
- _____. Origen y domesticación. In: MORA URPI, J.; ECHEVERRÍA, J. G. (Ed.). **Palmito de pejibaye (*Bactris gasipaes* KUNTH.)**: su cultivo y industrialización. San José: Universidad de Costa Rica, 1999b. cap.1, p.17-24.
- MORA-URPÍ, J.; WEBER, J.C.; CLEMENT, C.R. **Peach palm. *Bactris gasipaes* Kunth. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops.20**. Roma: International Plant Genetic Resources Institute. 1997. 83p.
- MORA-URPÍ, J.; VARGAS, E.; LOPEZ, C.A.; VILLAPLANA, M.; ALLON, G.; BLANCO, C. **The pejibaye palm (*Bactris gasipaes* H.B.K.)**. San Jose: FAO, 1984.
- MOURA, E.F. **Embriogênese somática em macaúba: indução, regeneração e caracterização anatômica**. 2007. 66p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.
- MURASHIGE, T. Plant propagation trough tissue cultures. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.25, p.135-166, 1974.

NIEUWKERK, J.P.V.; ZIMMERMAN, R.H. Thidiazuron stimulation of apple shoot proliferation *in vitro*. **Hortscience**, Alexandria, v.21. n.3, p.516-518, 1986.

NUNES, R.F.M.; QUEIRÓZ, M.A.; PEREIRA, F.M.; DAMIÃO FILHO, C.F.; MALHEIROS, E.B. Utilização da embriogênese somática no processo de melhoramento da tamareira. In: QUEIRÓZ, M.A.; GOEDERT, C.O.; RAMOS, S.R.R. (Org.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido/Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. p.840-851.

OLIVEIRA, M.A.J.; BOVI, M.L.A.; MACHADO, E.C.; RODRIGUES, J.D. Atividade da redutase de nitrato em mudas de pupunheira (*Bactris gasipaes*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, p.515-522, 2005.

OLIVEIRA, M.K.S. de; MARTINEZ-FLORES, H.E.; E.; ANDRADE, J.S. de; GARNICAROMO, M.G.; CHANG, Y.K. Use of pejibaye flour (*Bactris gasipaes* Kunth.) in the production of food pastas. **International Journal of Food Science & Technology**, New Jersey, v.41, n.8, p.933-937, 2006.

ORI, S.S. **Influência das auxinas no desenvolvimento e no teor de clorofilas solúveis, amido e proteína total solúvel em Phalaenopsis amabilis (Lineu) Blume (Orchidaceae) cultivada *in vitro***. 2006. 133p. Dissertação (Mestrado em Plantas Vasculares em Abálises Ambientais) – Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2006.

PADILHA, N.C.C.; OLIVEIRA, M.S.P.; MOTA, M.G.C. Correlações fenotípicas entre caracteres morfológicos e de produção de palmito em pupunheira. **Boletim de Pesquisas Florestais**, Colombo, v.43, p.3-18, 2001.

PANNETIER, C.; BUFFARD-MOREL. Coconut palm (*Cocos nucifera* L.). In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry: trees I**. Berlin: Springer Verlag, 1986. p.430-458.

PARROT, W.A.; MERLKE, S.A.; WILLIAMS, E.G. Somatic embryogenesis: potencial for use in propagation and gene transfer systems. In: MURRAY, D.R. **Advanced methods in plant breeding and biotechnology**. Melkham: Redwood, 1991. p.158-200.

PERES, L.E.P. Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n.25, p.44-48, 2002.

PERES, L.E.P.; MERCIER, H.; KERBAUY, G.B.; ZAFFARI, G.R. Níveis endógenos de AIA, citocininas e ABA em uma orquídea acaule e uma bromélia sem raiz, determinados por HPCL e ELISA. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Lavras, v.9, n.3, p.169-176, 1997.

PEREIRA, J.E.S.; MATTOS, M.L.T.; FORTES, G.L.R. Identificação e controle com antibióticos de bactérias endofíticas contaminantes em explantes de batata micropropagados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.38, p.827-834, 2003.

PEREIRA, F.D.; PINTO, J.E.B.P.; CARDOSO, M.G.; LAMEIRA, O.L. Propagação *in vitro* de chapéu-de-couro (*Echinodorus cf. scaber* Rataj), uma planta medicinal. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, p.74-80, 2000.

PICOLI, E.A.T.; OTONI, W.C. Morfogênese *in vitro* em berinjela influenciada por higromicina e períodos de exposição em ANA. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.25, n.6, p.1474-1481, 2001.

PINTO, J.E.B.P.; PASQUAL, M. **Introdução a cultura de tecidos**. Lavras: ESAL. 1990. 73p.

PIZZINATTO, M.A.; BOVI, M.L.A.; SPIERING, S.H.; BINOTTI, C.S. 2001. Patogenicidade de cinco espécies de *Fusarium* a plantas de pupunheira (*Bactris gasipaes*). **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.27, p.272-275.

PLENTZ, F.D. **Ciclo celular**. Porto Alegre: Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas, 2004. Disponível em: <<http://genetica.ffcmpa.tche.br/seminarios%20monitore>>. Acesso em: 16 jun. 2007.

PRAXEDES, S.C.; SILVA JÚNIOR, A.F.; FIGUEIREDO, F.L.B.; FIGUEIREDO, M.L.; CÂMARA, F.A.A.; OLIVEIRA, O.F. Estiolamento *in vitro* do abacaxizeiro pérola em presença de ANA e AIA. **Caatinga**, Mossoró, v.14, n. 1/2, p.13-15, 2001.

RAHMAN, S.M.; HOSSAIN, M.; RAFIUL ISLAM, A.K.M.; JOARDER, O.I. Effects of media composition and culture conditions on *in vitro* rooting of rose. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.52, p.163-169, 1992.

RAMOS, M.G.; HECK, T.C. **Cultivo da palmeira-real-da-austrália para produção de palmito**. Florianópolis: EPAGRI, 2003. 31p. (Boletim Didático n.40)

RAUPP, D.S.; CHAIMSOHN, F.P. O envase de palmito em vidro. In: KULCHETSCKI L.; CHAIMSOHN, F.P.; GARDINO, J.R.. (Ed.). **Palmito Pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth) – a espécie, cultura, manejo agrônômico, usos e processamentos**. Ponta Grossa: Editora da UEPG, 2001. cap.7, p.105-118.

RIBAS, L.L.F.; ZANETTE, F. Propagação de macieira cv gala através da cultura de meristemas. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Lavras, v.4, n.1, p.39-43, 1992.

RUBIN, S.; LIMA, C.S.M.; BANDEIRA, J.M.; RIBEIRO, M.V.; BENITZ, L.C.; PETERS, J.A.; BRAGA, E.J.B. Reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de *Thymus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, supl.2, p.480-482, 2007. Nota científica.

SALDANHA, C.W. Conservação *in vitro* de *Euterpe edulis* Martius através da embriogênese somática. 2007.108p. Dissertação (Mestrado em geomática) – Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2007.

SANÉ, D.; ABERLENC-BERTOSSI, F.; GASSAMA-DIA, Y.K.; SAGNA, M.; TROUSLOT, M.F.; DUVAL, Y.; BORGEL, A. Histocytological analysis of callogenesis and embryogenesis

from cell suspensions of date palm (*Phoenix dactylifera*). **Annals of Botany**, Oxford, v. 98, p.301-308, 2006.

SANTARÉM, E.R.; ASTARITA, L.V. Multiple shoot formation in *Hypericum perforatum* L. and hypericin production. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Pelotas, v.15, n.1, p.43-47, 2003.

SANTOS, A.F.; TESMANN, D.J.; NUNES, W.M.C.; FILHO, D.S.J. Doenças foliares da pupunheira (*Bactris gasipaes*) no Estado do Paraná. **Boletim de Pesquisa Florestais**, Colombo, v.42, p.141-145, 2001.

SANTOS, A.F.; LUZ, E.D.M.N.; FINATO, P.D.; TESSMANN, D.J.; VIDA, JB. Primeiro Relato da Podridão da Estipe da Pupunheira, Causada por *Phytophthora palmivora*, no Estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, Lavras, v.29, n.6, p.680-682, 2004.

SÃO PAULO (ESTADO). SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO; AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS. Instituto Agrônomo de Campinas. **Plano diretor**: centro de análise e pesquisa tecnológica do agronegócio da horticultura. 2003. 46p. Disponível em: <http://www.iac.sp.gov.br/Centros/horticultura/Trab_Pesquisadores/PlanoDiretorCentroHorticultura.pdf>. Acesso em: 24 fev. 2007.

SATTLER, Z.R. Propagación vegetativa del pejibaye (*Bactris gasipaes* H.B.K.) por hijuelos. In: **Reconocimiento de nuevas fuentes de aceite y grasa a partir de palmas oleaginosas nativas del trópico húmedo americano**. Turrialba: Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, 1986, p.3-9.

SENA COSTA, N.M.; ALOUFA, M.A.I. Organogênese direta de *Phoenix dactylifera* L. via pecíolo cotiledonar. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v.36, n.3, p.195-198, 2006.

SCHULTHEIS, J.R.; CHÉE, R.P.; CANTLIFFE, D.J. Embriões somáticos e sementes sintéticas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCT/EMBRAPA-CNPq, 1990. p.226-249.

SCHUCH, M.W.; PETERS, J.A. Regeneração de brotações de macieira (*Malus domestica*, Borkh.) cv. gala. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24, n.2, p.301-305, 2002.

SERAFINI, L.A.; BARROS, N.A.; AZEVEDO, J.L. **Biotecnología na agricultura e na agroindústria**. Guaíba: Ed. Agropecuária, 2001. 463p.

SILVA, V.S. **Regeneração in vitro de Cocos nucifera** L. 2002. 78p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

SILVA, P.P. MOREIRA da. **Utilização do palmito basal de pupunha em alternativa ao palmito foliar, visando aumentar o aproveitamento da palmeira *Bactris gasipaes***. 2008.123p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

SILVA, L.C.; SCHUCH, M.W.; SOUZA, J.A.; ERIG, A.C.; ANTUNES, L.E.C. Meio nutritivo, reguladores de crescimento e frio no estabelecimento *in vitro* de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) cv. Delite. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.12, n.4, p.405-408, 2006.

SILVA JÚNIOR, J.M. [*Etiligera elatior* (Jack) R. M. Smith]: propagação *in vitro*, anatomia e obtenção de protoplastos. 2007. 104p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

SINNOT, E.W. **Plant morphogenesis**. New York: Mc Graw-Hill Book Company, 1960. 550p.

SIQUEIRA, E.R.; INQUE, M.T. Propagação vegetativa do coqueiro através da cultura de tecidos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.27, n.4, p.639-647, 1992.

SKOOG, F.; MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. In: PORTER, K.H. (Ed.). The biological action of growth substances. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, Cambridge, v.11, p.118-131, 1957.

SOARES, F.P; PAIVA, R.; ALVARENGA, A.A.; NOGUEIRA, R.C.; EMRICH, E.B.; MARTINOTTO, C. Organogênese direta em explantes caulinares de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.31, n.4, p.1048-1053, 2007.

SOUZA, C. M. ; PINTO, J. E. B. P. ; RODRIGUES, B. M. ; FURTADO, D. F. ; MORAIS, A. R.; ARRIGONI-BLANK ; F, M. . Efeito do Thidiazuron na multiplicação de repolho *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.22, p.52-56, 1998.

SOUZA, A.V.; PINTO, J.E.B.P.; BERTOLUCCI,S.K.V.; CORRÊA, R.M.; CASTRO, E.M. Germinação de embriões e multiplicação *in vitro* de *Lychnophora pinaster* Mart. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, p.1532-1538, 2003. Edição Especial.

STEINMACHER, D.A. **Germinação *in vitro*, criopreservação e embriogênese somática em pupunha**. 2005. 107p. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2005.

STEINMACHER, D.A.; CLEMENT, C.R.; GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis from immature peach palm inflorescence explants: towards development of an efficient protocol. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, p.1-11. 2007.

STEINMACHER, D.A.; CAGAHUALA-INOCENTE; G.C.; CLEMENT, C.R.; GUERRA, M.P. Somatic embryogenesis from peach palm zygotic embryos. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, Berlin, v.43, n.2, p.124-132, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 719p.

TERMIGNONI, R.R. **Cultura de tecidos vegetais**. Porto Alegre: UFRGS, 2005. 182p.

THOMAZINI, M.J. Ocorrência de *Herminodes* sp. (Lepidoptera: Noctuidae) em pupunheira nos estados do Acre e Rondônia, Brasil. **Acta Botânica**, Manaus, v.24, n.3, p.505-506, 2004. Notas e Comunicações.

TISSERAT, B.; DeMASON, E.A. A histological study of development of adventive embryos in organ cultures of *Phoenix dactylifera* L. **Annals of Botany**, Oxford, v.46, p.465-472, 1980.

_____. Occurrence and histological structure of offshoots and inflorescences produced from *Phoenix dactylifera* L. plantlets *in vitro*. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, New York, v.112, n.1, p.35-42, 1985.

TOMLINSON, P.B. **Anatomy of the monocotyledons. II. Palmae**. London: Oxford University Press, 1961. 453p.

_____. Essays on the morphology of palms. VII. A digression about spines. **Príncipes**, Lawrence, v.6, p.44-52, 1962.

TORRES, A.C.; CALDAS, L. S.; FERREIRA, A.T. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: ABCT/EMBRAPA-CNPq, 1998, v.1, p.261-269.

THORPE, T.A. Organogenesis *in vitro*: structural, physiological, and biochemical aspects. In: VASIL, I.K. (Ed.). **Perspectives in plant cell and tissue culture**. New York: Academic Press, 1980, p.71-111.

THORPE, T.A.; MURASHIGE, T. Some histochemical changes underlying shoot initiation in tobacco callus. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.48, p.276-285, 1970.

UZZO, R.P.; BOVI, M.L.A.; SPIERING, S.H.; SAES, L.A. Correlações fenotípicas entre caracteres vegetativos e de produção do palmito da palmeira real australiana. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.59, n.3, 2002.

VALVERDE, R.; ARIAS, O. THORPE, T. Estudio histológico em callos de peyibaye. **Agronomia Costarricense**, San Jose, v.16, n.2, p.225-229, 1992.

VALVERDE, R.; GÓMES, L.; ARIAS, O.; THORPE, T. Respuesta morfogenética de los ápices de peyibaye (*Bactris gasipaes* H.B.K.) cultivados *in vitro* en condiciones de luz y oscuridad. **Agronomia Costarricense**, San Jose, v.11, n.1, p.97-102, 1987.

VARGAS, E. Principales enfermedades del peyibaye em Costa en Costa Rica. In: CONGRESO INTERNACIONAL SOBRE BIOLOGIA, AGRONOMIA E INDUSTRIALIZAÇÃO DEL PIJUAYO, 4., San Jose, 1993. p.335-360.

VIDAL, M.C.; VARGAS, T.E.; GARCÍA, E. Estudios anatómicos y morfológicos de la iniciación de embriones somáticos obtenidos a partir de ápices meristemáticos de *Musa* sp. **Acta Científica Venezolana**, Caracas, v.51, p.78-83, 2000.

VILLA, F.; ARAÚJO, A.G., PIO, L.A.S.; PASQUAL, M. Multiplicação *in vitro* da amoreira-prêta 'ébano' em diferentes concentrações de meio MS e BAP. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.29, n.3, p.582-589, 2005.

VÍLLACHICA, H. *Pijuayo. Bactris gasipaes* H.B.K. In: VÍLLACHICA, H. (Ed.). **Frutales y hortalizas promisorios de la Amazonia**. Lima: TCA, 1996a. p.215-226.

_____. **Cultivo de pejuayo (*Bactris gasipaes* Kunth.) para palmito em la Amazônica**. Lima: TCA, 1996b. 152p.

VILLALOBOS-AMADOR, E.; RODRÍGUES-HERNÁNDES, G.; PÉREZ-MOLPHE-BALCH, E. Organogenesis and Agrobacterium rhizogeneses-induced rooting in *Pinus maximartinezii* and *Pinus pinceana* Gordon. **Plant Cell Reports**, Victoria, v.20, p.779-785, 2002.

YUYAMA, L.K.O.; **Melhoramento de pupunheira para produção de palmito no INPA**. Manaus: INPA, 2005. 5p. (Relatório apresentado na Reunião Técnica do Projeto de ProBio/MMA Pupunha – Raças Primitivas e Parentes Silvestres).

YUYAMA, L.K.O.; AGUIAR, J.P.L.; YUYAMA, K.; CLEMENT, C.R.; MACEDO, S.H.M.; FÁVARO, D.I.T.; AFONSO, C.; VASCONCELLOS, M.B.A.; VANNUCCHI, H.; PIMENTEL, S.A.; BADOLATO, E.S.G. Chemical composition of the fruit mesocarpo f three peach palm (*Bactris gasipaes*) populations grown in Central Amazonia, Brazil. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, London, v.54, n.1, p.49-56, 2003.

YUYAMA, L.K.O.; YONEKURA, L.; AGUIAR, J.P.L.; SOUSA, R.F.S. Biodisponibilidade de vitamina A da pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth.) em ratos. **Acta Amazônica**, Manaus, v.29, n.3., p.497-500, 1999.

WAREING, P.G.; PHILIPS. I.D.J. **Growth & differentiation in plants**. Oxford: Program Press, 1981. 343p.

ZAER, J.B.; MAPES, M.O. In: BONGA, J.M., DURZAN, D.J. (Ed.). **Tissue culture in forestry**. The Hague Martinus Nijhoff / Dr.W. Junk Publishers, 1982. p.231-255.

ZAFFAI, G.; KERBAUY, G.B.; KRAUS, J.E.; ROMANO, E.C. Hormonal and histological studies related to *in vitro* banana bud formation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.63, p.187-192, 2000.

CAPÍTULO 2

ATUAÇÃO DE BIORREGULADORES NA MORFOGÊNESE DE MICROPLANTAS DE PUPUNHEIRAS

Resumo

Embora resultados satisfatórios tenham sido obtidos à propagação de pupunheiras com a aplicação da técnica *in vitro*, o protocolo para micropropagação necessita ser otimizado, principalmente por se tratar de uma espécie recalcitrante. Neste trabalho avaliou-se a organogênese e embriogênese somática de microplantas cultivadas em meio de cultura MS suplementado com ANA, BAP, TDZ ou 2iP isoladamente ou em combinação com ANA. O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado sendo as aferições realizadas a cada 28 dias, onde foram avaliados o número de gemas adventícias e de embriões somáticos, o desenvolvimento do sistema radicular, avaliando-se a porcentagem de enraizamento, o número e comprimento de raízes, bem como a presença de ramificações e tipo morfológico das raízes. O experimento foi finalizado aos 140 dias de cultivo e toda resposta organogênica e embriogênica somática foi direta. De acordo com os resultados pode-se verificar que embora pequenas, o maior número médio de gemas adventícias por explante ocorreu quando as microplantas foram submetidas ao tratamento com TDZ e o menor número ocorreu nos tratamentos contendo BAP ou 2iP isoladamente. O número médio de embriões somáticos observados para os tratamentos isento de biorreguladores, suplementado com ANA isoladamente ou com ANA associado ao BAP, TDZ ou 2iP foi consideravelmente reduzido, variando somente em função dos períodos e seguindo um comportamento exponencial, perfazendo uma média de 0,138 embriões somáticos por explante aos 140 dias de cultivo, enquanto os tratamentos suplementados com BAP, TDZ ou 2iP isoladamente não desenvolveram embriões somáticos. Embora o tratamento suplementado com a associação ANA/BAP tenha induzido maior número de raízes ao final do experimento, o tratamento sem biorreguladores promoveu a maior porcentagem de enraizamento e maior comprimento das raízes, sendo o único tratamento com ramificação evidenciada. No tratamento com TDZ não houve enraizamento, porém foram observadas estruturas rizomatosas em alguns explantes cultivados na presença desta citocinina.

Palavras-chave: Pejibaye; Micropropagação; Enraizamento, Gemas adventícias, Embriões somáticos

CHAPTER 2

ROLE OF BIOREGULATORS IN PEJIBAYE MICROPLANTS MORPHOGENESIS

Abstract

Although satisfactory results have been obtained for the propagation of pejibaye with the application of *in vitro* technique, the micropropagation protocol needs to be optimized, especially because it is a recalcitrant species. In this study the organogenesis and somatic embryogenesis were evaluated in microplants that were cultivated in MS culture medium supplemented with NAA, BAP, TDZ, or 2iP alone or in combination with NAA. The experimental design was completely randomized and the measurements, which were the number of adventitious buds and somatic embryos, the development of root system, evaluating the percentage of rooting, the number and length of roots, and the presence of branching and morphological types of roots, were taken every 28 days. The experiment was completed at 140 days of cultivation and all responses indicated direct somatic embryogenesis or organogenesis. According to the results, although considered low, the highest average number of adventitious buds per explant occurred in treatments where the microplants were treated with TDZ, and the lowest average number were in treatments with isolated BAP or 2iP. The average number of somatic embryos was significantly reduced in the bioregulator-free treatment and in the ones supplemented with isolated NAA or NAA combined with BAP, TDZ, or 2iP. The average varied only according to the cultivation period and followed an exponential behavior, ranging 0,138 somatic embryos per explant at 140 days of cultivation, while the other treatments supplemented with isolated BAP, TDZ, or 2iP did not promoted embryos development. Although the treatment supplemented with NAA/BAP association has induced the highest number of roots to the end of the experiment, the bioregulator-free treatment promoted the highest rate of rooting and greater length of roots, and became the only treatment that resulted on branching. In the TDZ treatment there was no root development, but in some explants cultured in the presence of this cytokinin, rhizomatous structures were observed.

Keywords: Pejibaye, Micropropagation, Rooting, Adventitious buds, Somatic embryos

2.1 Introdução

Embora a regeneração ‘*in vitro*’ de *Bactris gasipaes* Kunth via organogênese e (ou) embriogênese somática diretas tenha obtido resultados satisfatórios com as pesquisas realizadas por Almeida (1994), Almeida e Kerbauy (1996) e Almeida e Almeida (2006), o protocolo para a micropropagação requer otimização. Sabe-se que os vegetais tendem a responder diferentemente às formulações dos meios de cultivo *in vitro*, principalmente aos biorreguladores, por meio de alterações nos níveis endógenos de auxina/citocinina e promovendo alterações na sensibilidade de células responsivas (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999), controlando sobremaneira a morfogênese (SKOOG; MILLER, 1957). Desta forma, distintos eventos fisiológicos podem ser desencadeados, como a promoção ou inibição para a formação do sistema radicular e principalmente, um incremento na taxa de multiplicação *in vitro*, proporcionando uma produção maciça de microplantas em curtos períodos, além de otimizar a aclimatização dessas às condições *ex vitro*.

Não obstante, sabe-se que o balanço auxina/citocinina, além de promover a formação de raízes e partes aéreas (SCHULTHEIS; CHÉE; CANTLIFFE, 1990), favorece, por meio de várias combinações o desenvolvimento de embriões somáticos (HUTCHINSON; KRISHNARAJ; SAXENA, 1996; LEDO *et al.*, 2002; AYUB; GEBIELUCA, 2003; ALMEIDA; ALMEIDA, 2006; MOURA, 2007, STEINMACHER *et al.*, 2007).

Meios de cultura contendo níveis mais elevados de citocininas normalmente promovem a formação de brotações aéreas e concentrações mais altas de auxinas induzem a formação de raízes (SKOOG; MILLER, 1957; SILVA JÚNIOR, 2007), embora taxas elevadas na multiplicação de brotos com níveis mais elevados da auxina em relação à citocinina também tenham sido observados em palmáceas (ALMEIDA, 1994; ALMEIDA; KERBAUY, 1996), bem como favoráveis à indução direta de embriões somáticos (ALMEIDA; ALMEIDA, 2006; SALDANHA; 2007) e à rizogênese (LEDO *et al.*, 2001).

Concentrações mais elevadas de citocininas em relação à auxina também têm sido reportadas como favoráveis à brotação (SANTARÉM; ASTARITA, 2003) ou não satisfatórios (TISSERAT; DeMASON, 1985), favoráveis à rizogênese (LÉDO *et al.*, 2007), à indução de calos embriogênicos (MOURA, 2007), à indução da embriogênese somática direta (LEDO *et. al.*, 2002) e à conversão de plântulas obtidas a partir de calos embriogênicos (ESHRAHGI;

ZARGHAMI; MIRABDULBAGHI, 2005). Um balanço favorável à citocinina em relação à auxina pode favorecer, também, o desenvolvimento de brotos de origem organogênica a partir de calos friáveis de pupunheiras (VALVERDE *et al.*, 1987).

As auxinas são amplamente utilizadas em culturas de tecidos com o propósito de estimular a iniciação radicular, embora a mesma concentração que estimula o surgimento dos primórdios radiculares possa exercer atuação inibitória no posterior alongamento das raízes (KERBAUY, 2004; CASTRO; KLUGE; PERES, 2005).

O ácido naftalenoacético (ANA) parece ser a auxina mais eficaz ao enraizamento *in vitro* de inúmeras espécies vegetais (HU; WANG; 1983) e em algumas palmeiras como *Phoenix dactylifera* L. (SANÉ *et al.*, 2006) e *Syagrus oleracea* (Mart.) Becc. (MELO *et al.*, 2001), além de promover brotações em concentrações reduzidas (TISSERAT; DeMASON, 1985) e a proliferação de embriões a partir embriões somáticos originados em calos (MATER, 1990), também em *Phoenix dactylifera* L.

As citocininas constituem o grupo de reguladores vegetais imprescindíveis à quebra de dominância apical e indução de proliferação de gemas axilares, cujos tipos e concentrações são os que mais influenciam na multiplicação *in vitro* (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990), embora elevadas concentrações possam ser tóxicas (BLAKESLEY, 1991; LIMA; GONÇALVES, 1998; PEREIRA *et al.*, 2000; DZAZIO; BIASI; ZANETTE, 2002).

Em palmáceas, o uso de BAP (6-Benzilaminopurina) isoladamente na cultura *in vitro* favorece, em muitos casos, o desenvolvimento de embriões somáticos a partir de suspensões celulares de calos (KARUN *et al.*, 2004, SANÉ *et al.*, 2006), a embriogênese somática direta (ALMEIDA, 1994) e a rizogênese (KARUN *et al.*, 2004). Em *B. gasipaes*, a utilização do BAP isoladamente desfavoreceu a regeneração de gemas adventícias em explantes (ALMEIDA, 1994). Em espécies não palmáceas, a utilização isolada desta citocinina tem sido reportado como favorável à multiplicação de brotos, embora desfavorecendo o desenvolvimento de raízes em micro-estacas de microplantas assépticas de *Campomanesia xanthocarpa* BERG. (BRUNNER SCUTTI, 2000).

A indução da embriogênese somática a partir de calos tem sido observada com o uso do 2iP em associação com a auxina 2,4-D em *Phoenix dactylifera* L. (TISSERAT; De MASON, 1980), com o TDZ em associação com o 2,4-D ou picloram em *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Martius (MOURA, 2007) e com o 2iP em associação com o picloram em *B. gasipaes*

(STEINMACHER *et al.*, 2007). Para esta última espécie, o acréscimo isolado de 2iP não promoveu a regeneração de gemas adventícias na cultura de explantes de pupunheiras (ALMEIDA, 1994). Não há relatos na literatura sobre a promoção de embriogênese somática direta com a utilização das citocininas TDZ ou 2iP em palmáceas.

Pelo exposto, o trabalho teve por objetivo avaliar morfofisiologicamente o desenvolvimento de gemas adventícias, embriões somáticos e raízes *in vitro* desenvolvidos a partir de explantes excisados de microplantas de pupunheiras cultivados em diferentes tratamentos contendo os biorreguladores ANA, BAP, TDZ e 2iP visando otimizar a relação auxina/citocininas na micropropagação de pupunheiras.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Local de realização do experimento

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas, no Departamento de Ciências Biológicas, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), Piracicaba-SP.

2.2.2 Material vegetal

Foram utilizadas 80 microplantas de pupunheiras inermes (*Bactris gasipaes* Kunth.-Arecaceae) desenvolvidas a partir da germinação *in vitro* de embriões excisados de sementes provenientes de Yurimáguas, Amazônia Peruana em meio constituído por sais de Murashige e Skoog (1962), isento de biorreguladores.

Para a obtenção dos explantes, foram selecionadas microplantas em estágio de desenvolvimento padronizados, com a parte aérea medindo aproximadamente 8,0 cm, contendo duas ou três folhas com duas pinas expandidas, sem propágulos evidentes e sistema radicular presente. Em câmara de fluxo laminar, removeram-se as raízes e partes aéreas das microplantas, preservando apenas o meristema apical e a base caulinar, com tamanho variando entre 1,0 e 2,5 cm (Figura 1) e cultivados em tubos de ensaio (150 x 25 mm) contendo 5 ml dos meios de cultura específicos aos tratamentos empregados.

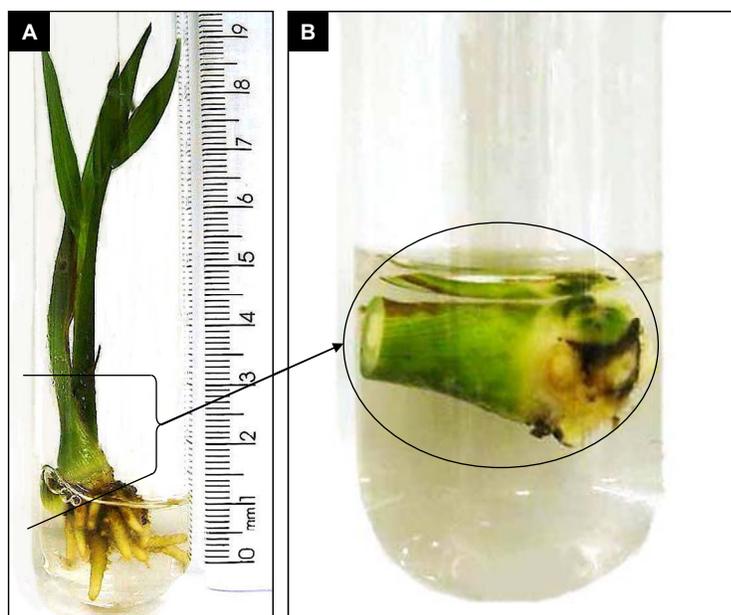


Figura 1 - A. Microplanta de *B. gasipaes* utilizada para obtenção do explante. As setas pretas contínuas delimitam a região de excisão das raízes e parte aérea, preservando apenas o meristema apical e base caulinar. B. Explante excisado da microplanta e cultivado no meio específico aos tratamentos utilizados

2.2.3 Meios de cultura e condições de cultivo

Os explantes caulinares excisados foram cultivados em meio de cultura pré-definido para o cultivo *in vitro* desta espécie (ALMEIDA, 1994) constituído por sais minerais de Murashige e Skoog (1962) acrescido de sacarose (30g.L^{-1}), mioinositol (100 mg.L^{-1}) e tiamina (5 ml.L^{-1}) (meio básico), com os tratamentos diferenciados pelo acréscimo de ANA, BAP, TDZ e 2iP isoladamente ou combinados ao ANA, constituindo oito tratamentos conforme descrito na Tabela 1

Tabela 1 – Concentrações e combinações de biorreguladores utilizados nos tratamentos

Biorreguladores	Tratamentos (μM)							
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
ANA	-----	12,9	-----	-----	-----	12,9	12,9	12,9
BAP	-----	----	3,55	-----	-----	3,55	-----	-----
TDZ	-----	----	-----	0,36	-----	-----	0,36	-----
2iP	-----	-----	-----	-----	0,4	-----	-----	0,4

A concentração de sais (MS) foi a mesma em todos os tratamentos, sendo que o pH dos meios de cultura foram ajustados para 5,8 antes da autoclavagem a 120° C e 1,2 atm durante 20 minutos.

Os explantes cultivados nos respectivos tratamentos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura e luminosidade controladas [$25 \pm 2^\circ$ C; irradiância de $42 \mu\text{mol.s.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de radiação fotossinteticamente ativa (PAR) e fotoperíodo de 16 horas]. Os meios de cultura foram renovados a cada 28 dias.

2.2.4 Coleta de dados

As coletas de dados foram executadas respeitando-se o período inicial, ou seja, período zero, contando-se que nesta fase, nenhuma estrutura referente às avaliações estavam presentes. Dessa forma, considera-se que os dados foram avaliados em 6 períodos: 0, 28, 56, 84, 112 e 140 dias.

2.2.4.1 Avaliações morfofisiológicas

2.2.4.1.1 Número de gemas adventícias

As brotações desenvolvidas em aglomerados, ou seja, agregadas sem evidência de espaçamento entre elas, foram contadas individualmente e os eventuais propágulos presentes, porém não visíveis, no momento de inoculação dos explantes nos respectivos tratamentos, foram desconsiderados. Os dados obtidos foram expressos em gemas adventícias por explante (GA.explante^{-1}).

2.2.4.1.2 Número de embriões somáticos

Da mesma forma que para as gemas adventícias, os embriões somáticos observados nos explantes nos oito tratamentos foram expressos em embriões por explante (ES.explante^{-1}).

2.2.4.1.3 Porcentagem de enraizamento

Nos respectivos períodos de avaliação foram aferidos os resultados da porcentagem de enraizamento para os oito tratamentos por explantes.

2.2.4.1.4 Número de raízes

Foram aferidos, para os oito tratamentos, o número de raízes formadas nos explantes. Para tanto, foram analisados segundo os critérios: explantes apresentando uma a duas raízes, três a cinco raízes, seis a oito raízes e dez ou mais raízes, devido à elevada heterogeneidade dos resultados observados.

2.2.4.1.5 Tipo morfológico de raiz e ramificação

O tipo morfológico das raízes presentes nos explantes foi avaliado de acordo com o desenvolvimento de raízes finas ou grossas e a presença ou não de ramificação.

2.2.4.1.6 Comprimento radicular

O comprimento das raízes desenvolvidas nos explantes, nos 8 tratamentos foram avaliados segundo os critérios: explantes cujas raízes apresentaram comprimentos entre 0,1 e 0,4 cm; 0,5 e 0,9 cm; 1,0 a 1,9 cm e 2 a 3,5 cm, devido à elevada heterogeneidade dos resultados observados.

2.2.5 Delineamento estatístico

Todos os experimentos foram realizados no delineamento inteiramente casualizado com parcelas subdivididas no tempo em arranjo bifatorial (8 x 6), ou seja, oito tratamentos e seis períodos de coleta de dados. Cada tratamento consistiu de dez repetições, com um explante em cada tubo de ensaio, perfazendo 80 explantes no total do experimento.

Os dados qualitativos (porcentagem de enraizamento, número de raízes, tipo morfológico das raízes, presença ou ausência de ramificação e comprimentos radiculares) foram apresentados em porcentagens e médias gerais, e os dados quantitativos (número de gemas adventícias e embriões somáticos) foram submetidos à análise de variância (ANOVA) ($p < 0,01$ e $p < 0,05$), seguido pela regressão polinomial ou exponencial, utilizando o pacote estatístico SOC (EMBRAPA, 1990).

2.3 Resultados

2.3.1 Avaliações morfofisiológicas

Houve interação significativa do número de gemas adventícias observadas para a atuação dos biorreguladores em relação ao período de cultivo, no entanto, para os embriões somáticos observados, não houve interação entre os biorreguladores e o período de cultivo *in vitro*, sendo significativo apenas em função dos períodos (Tabela 2).

Tabela 2 – Análise de variância para as variáveis número de gemas adventícias (NGA) e número de embriões somáticos (NES) em função dos biorreguladores (REG) e períodos de análise (PER) nos explantes de microplantas de *B. gasipaes* cultivados *in vitro*

Causas da Variação	GL	Quadrado Médio	
		NGA ⁽¹⁾ (expl. ⁻¹)	NES ⁽¹⁾ (expl. ⁻¹)
REG	7	0,01032 ^{ns}	0,00044 ^{ns}
Subparcela	72	0,00541 *	0,00051 *
PER	5	0,04423 *	0,00075 *
REG x PER	35	0,00166 *	0,00011 ^{ns}
Resíduo	360	0,0008	0,0001
Média	-	0,67	0,06
CV (%)	-	29,05	13,90

^{ns} não significativo em nível de 5% de probabilidade de erro, pelo teste F.

* significativo em nível de 1% de probabilidade de erro, pelo teste F.

⁽¹⁾ dados transformados por $[(n+0,5)/100]^{0,5}$ pelo teste de Lilliefors a 5% de probabilidade de erro. *n* = dado amostrado.

GL = graus de liberdade, CV = coeficiente de variação, expl. = explante.

2.3.1.1 Número de gemas adventícias

Aos 28 dias do estabelecimento dos explantes nos meios de cultura diferenciados pelo acréscimo de biorreguladores, os tratamentos T2, T4, T7 e T8 evidenciaram o desenvolvimento inicial de gemas adventícias (Tabela 3). Aos 56 dias de cultivo, todos os tratamentos, incluindo o T1, apresentaram estas estruturas (Tabela 3).

Ao final do experimento, ou seja, aos 140 dias de cultivo, o tratamento que apresentou maior número médio de gemas adventícias por explante (GA.explante⁻¹) foi o tratamento T4 (TDZ), com 2,9 GA.explante⁻¹, enquanto o tratamento com menor número médio de

GA.explante⁻¹ foi o T5 (2iP) com 0,2 GA.explante⁻¹. Os demais tratamentos desenvolveram, em ordem decrescente, os seguintes números médios de gemas adventícias por explante: T7 2,0 GA.explante⁻¹; T1 e T6 com 1,9 GA.explante⁻¹; T2 com 1,5 GA.explante⁻¹; T8 com 1,3 GA.explante⁻¹ e T3 com 0,5 GA.explante⁻¹ (Tabela 3).

A análise de regressão polinomial (Figura 2) evidenciou que ambos os tratamentos, T1 e T7 apresentaram tendência semelhante ao desenvolvimento de gemas adventícias por explante, embora o tratamento suplementado com BAP (T6) tenha apresentado o mesmo número médio de gemas adventícias por explante que o tratamento isento de biorreguladores (T1) (Tabela 3).

Tabela 3 – Médias reais do número de gemas adventícias (GA) desenvolvidas por explante de microplantas de *B. gasipaes* cultivados *in vitro* em cada um dos tratamentos nos períodos de avaliação

Período (dias)	Tratamentos							
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
28	0,00	0,30	0,00	0,20	0,00	0,00	0,20	0,10
56	0,20	0,80	0,10	1,10	0,10	0,10	0,40	0,30
84	1,50	1,00	0,40	1,30	0,10	0,70	1,20	0,70
112	1,60	1,20	0,50	2,00	0,10	1,50	1,60	0,80
140	1,90	1,50	0,50	2,90	0,20	1,90	2,00	1,30

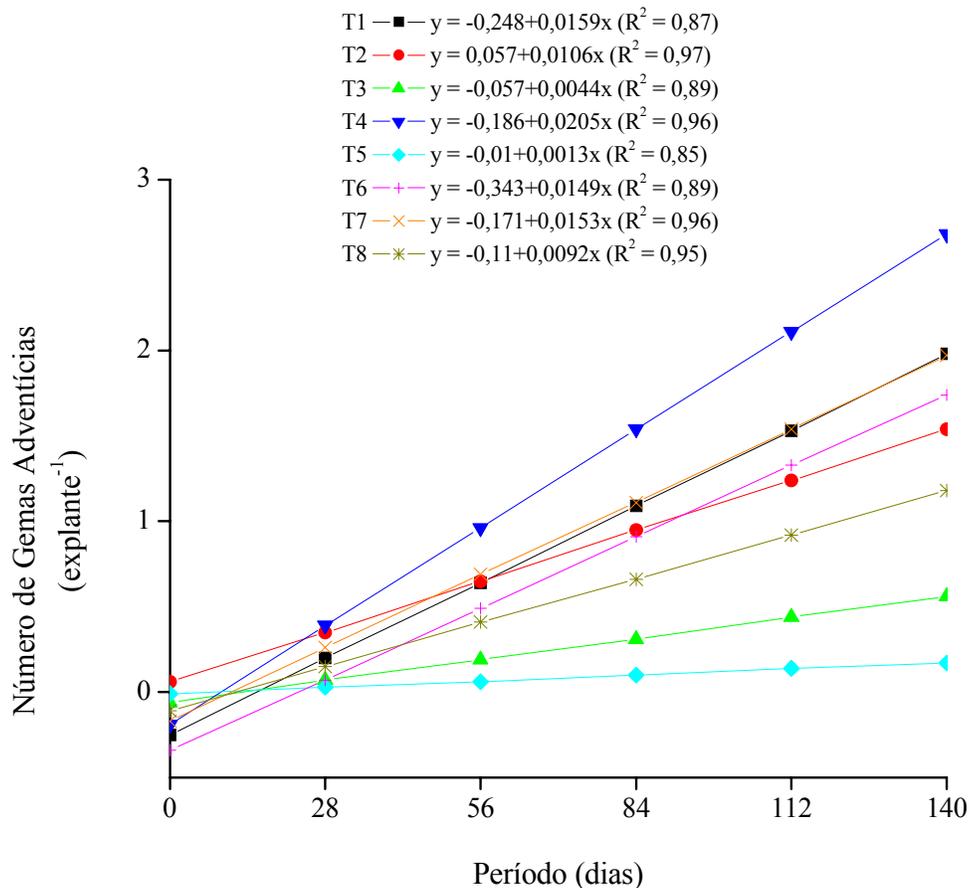


Figura 2 – Número médio de gemas adventícias (GA) por explante de microplantas de *B. gasipaes* cultivados *in vitro* em cada um dos tratamentos nos períodos de avaliação

Em todos os tratamentos nos períodos analisados, as gemas adventícias originaram-se na base dos explantes, sem a precedência de calos, ou seja, as gemas se formaram via organogênese direta.

Com exceção dos tratamentos contendo a citocinina TDZ (T4 e T7), as gemas adventícias desenvolvidas apresentaram aspecto morfologicamente normais e a maioria delas originadas nos tratamentos contendo a presença isolada de TDZ (T4) ou em associação com ANA (T7) apresentaram-se, em todos os períodos, curtas, intumescidas, e em algumas observou-se a formação de acúleos e coloração avermelhada na base dos primórdios foliares (bainha) (Figuras 5 A e B).

2.3.1.2 Número de embriões somáticos

A análise de regressão evidenciou que, independentemente dos tratamentos testados, o número médio de embriões somáticos observados, variou somente em função dos períodos de análise, seguindo um comportamento exponencial (Figura 3). Os tratamentos suplementados com BAP, TDZ ou 2iP isoladamente, não desenvolveram embriões somáticos em quaisquer período avaliado (ANEXOS F a J).

Para os tratamentos que desenvolveram embriões somáticos, a média geral por explante foi de 0,013 ao 56º dia de cultivo *in vitro*. Ao 84º, 112º e 140º dias de cultivo, o número médio de embriões por explante (ES.explante⁻¹) observados foram, respectivamente, 0,075; 0,125 e 0,138 (Tabela 4). Aos 140 dias de cultivo, observou-se que um embrião somático por explante foi originado nos tratamentos contendo T6, T7 e T8 já o tratamento T2 originou um ou dois embriões somáticos por explante e o tratamento T1, isento de biorreguladores originou dois embriões (ANEXO J).

A maior porcentagem de explantes com embriões somáticos foi checada aos 140 dias de cultivo no tratamento T7 com 30%, seguido pelos tratamentos T2 ou em T6, com 20%. No tratamento T1 e no tratamento T8 observou-se que 10% de explantes desenvolveram embriões somáticos (ANEXO J).

Os embriões somáticos originaram-se diretamente da base dos explantes, sem a precedência de calos (embriogênese somática direta).

Tabela 4 – Médias reais do número de embriões somáticos (NES) por explante de microplantas de *B. gasipaes* cultivados *in vitro* nos períodos de avaliação, independentemente dos tratamentos testados

Período (dias)	NES
0	0,000
28	0,000
56	0,013
84	0,075
112	0,125
140	0,138

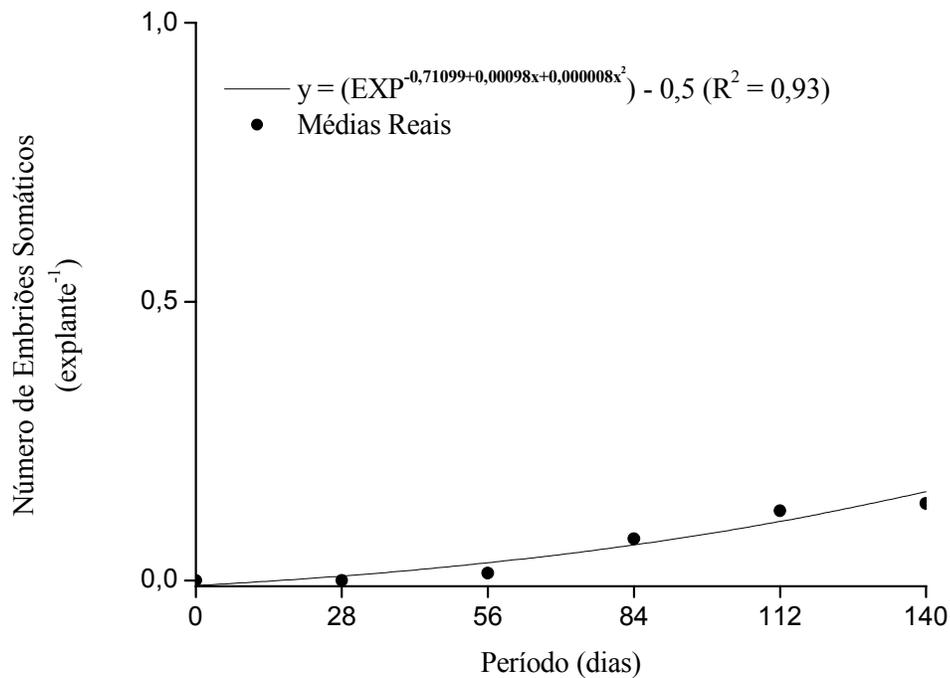


Figura 3 – Estimativa do número médio de embriões somáticos desenvolvidos por explante de microplantas de *B. gasipaes* cultivados *in vitro* nos períodos de avaliação

2.3.1.3 Avaliações morfofisiológicas

Devido aos dados avaliados serem qualitativos e, portanto, não passíveis de análise estatística, os resultados referentes ao sistema radicular foram apresentados em porcentagens e médias gerais. O período inicial (zero) e correspondente ao momento de inoculação, não foi considerado.

2.3.1.4 Porcentagem de enraizamento

As análises efetuadas e contidas na Tabela 5 e nas Figuras 4; 5 A e B, evidenciaram que os tratamentos T4 e T7 não desenvolveram raízes em quaisquer período de estabelecimento *in vitro*, porém, alguns explantes cultivados em ambos os tratamentos desenvolveram estruturas semelhantes a rizomas (Figura 5 A). Explantes que apresentaram desenvolvimento da parte aérea e do sistema radicular desenvolveram-se em microplantas, conforme pode ser observado na Figura 5 C e D.

Conforme descrito na Tabela 5, aos 28º e 56º dias do estabelecimento inicial dos explantes nos respectivos tratamentos, nenhuma raiz foi observada em qualquer um dos tratamentos. Já no 84º dia de cultivo *in vitro*, observou-se o enraizamento em 60% dos explantes

cultivados em T1, em 50% no T2 (ANA), em 30% em T6 e em 10% no T3 e no T8. O único tratamento que não desenvolveu raízes neste período foi aquele contendo a presença isolada de 2iP (T5), cujo início ocorreu somente aos 120 dias de cultivo, perfazendo uma média de 30% de enraizamento, valor este que não se alterou no último período de avaliação (140 dias), caracterizando a menor porcentagem de explantes enraizados, com exceção dos tratamentos contendo a presença de TDZ (T4 e T7), os quais, conforme mencionado, não desenvolveram raízes.

A maior porcentagem de enraizamento ocorreu para o tratamento T1, com 100% dos explantes enraizados e a pior resposta, dentre os explantes enraizados, foi observada para o tratamento T5 aos 140 dias de cultivo (Tabela 5 e Figura 4).

Tabela 5 – Porcentagem de enraizamento nos explantes de microplantas de *B. gasipaes* cultivados em cada um dos tratamentos nos períodos de avaliação

Enraizamento (%)								
Tratamentos								
Período (dias)	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
28	0	0	0	0	0	0	0	0
56	0	0	0	0	0	0	0	0
84	60	50	10	0	0	30	0	10
112	90	60	30	0	30	70	0	40
140	100	80	50	0	30	80	0	50
Média Geral	41,67	31,67	15,00	0,00	10,00	30,00	0,00	16,66

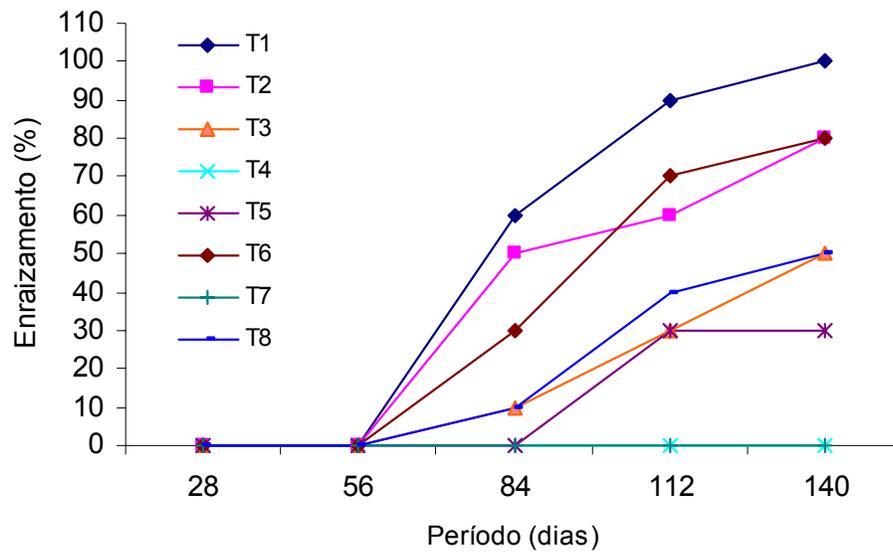


Figura 4 – Dados representativos da atuação dos biorreguladores na porcentagem de enraizamento dos explantes de microplantas de *B. gasipaes* cultivados *in vitro* em cada um dos tratamentos nos períodos de avaliação

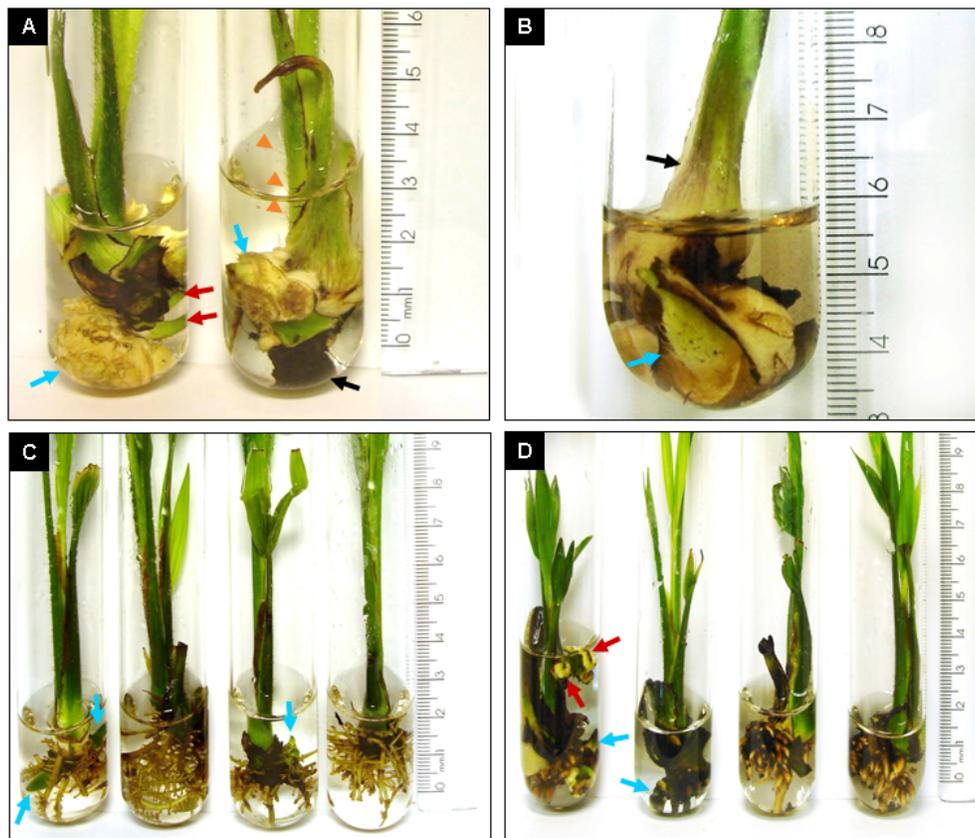


Figura 5 – Desenvolvimento de propágulos e raízes em explantes e microplantas de *B. gasipaes* aos 140 dias de cultivo *in vitro*. A. Gemas adventícias originadas nos explantes cultivados em T4. Observam-se agregados de brotos curtos (setas

azuis) e propágulos isolados (setas vermelhas), acúleos nas bainhas foliares (pontas de setas laranjas), estrutura semelhante a um rizoma (seta preta) e ausência de raízes. B. Explantes cultivados em T7 (ANA/TDZ), evidenciando o desenvolvimento de gema adventícia curta e intumescida (seta azul), a coloração avermelhada na base dos primórdios foliares (bainhas) (seta preta), a presença de acúleos (seta azul) e a ausência de raízes. C. Microplantas desenvolvidas em T1, com brotações na base morfologicamente normais (setas azuis) e raízes finas, alongadas e ramificadas. D. Microplantas em T6 (ANA/BAP), evidenciando brotações morfologicamente normais (setas azuis) e raízes grossas não ramificadas. Observar os embriões somáticos desprendidos do explante (seta vermelha)

2.3.1.5 Número de raízes

Todos os tratamentos contendo explantes enraizados apresentaram elevada heterogeneidade quanto ao número de raízes desenvolvidas em todos os períodos analisados, principalmente ao 112º e 140º dias do estabelecimento *in vitro* (Figuras 6 a 8; Talela 6).

Conforme observado no item 2.3.2.1.1 o início do enraizamento foi observado ao 84º dia de cultivo *in vitro* para os tratamentos T1, T2, T6 e T8. Neste período, ambos os tratamentos T1 e T8 apresentaram 10% dos explantes de pupunheiras com dez ou mais raízes, sendo que para este último, esta porcentagem coincide com o total de explantes enraizados (10%) (Figura e Tabela 6). Os tratamentos contendo a presença do TDZ (T4 e T7) e 2iP isoladamente (T5) não enraizaram neste período (Figura e Tabela 6).

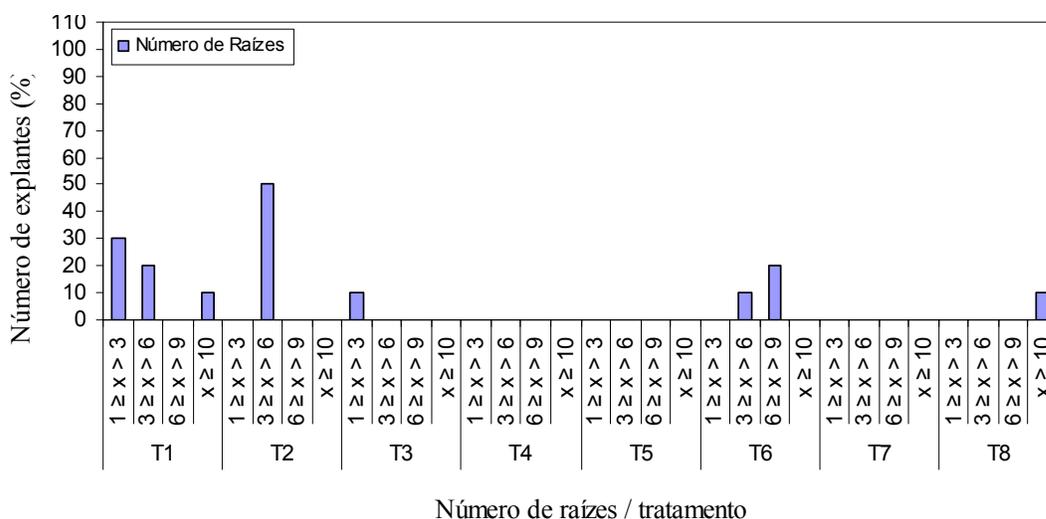


Figura 6 – Dados representativos da atuação dos biorreguladores no número de raízes desenvolvidas em explantes de microplantas de *B. gasipaes* aos 84 dias de cultivo *in vitro*

Aos 112 dias de cultivo *in vitro* o tratamento T6 apresentou a maior porcentagem de explantes (40%) com dez ou mais raízes (Figura 7 e Tabela 6). A resposta mais desfavorável dentre os tratamentos que evidenciaram enraizamento, foi observada para o tratamento T5 com 30% dos explantes evidenciando apenas uma a três raízes. Conforme já mencionado, os tratamentos T4 e T7 não desenvolveram raízes (Figura 7 e Tabela 6).

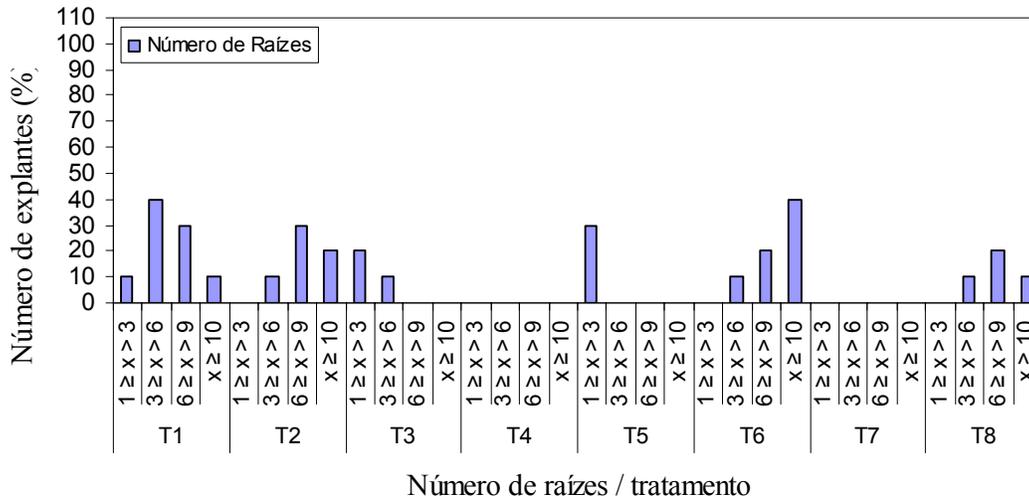


Figura 7 – Dados representativos da atuação dos biorreguladores no número de raízes desenvolvidas em explantes de microplantas de *B. gasipaes* aos 112 dias de cultivo *in vitro*

Ao final do experimento (140 dias), maior porcentagem de explantes (80%) com dez raízes ou mais foi novamente observada para o tratamento T6, caracterizando a melhor resposta para este evento fisiológico no período avaliado (Figura 8 e Tabela 6). A resposta mais desfavorável dentre os tratamentos que evidenciaram enraizamento, foi observada para o tratamento T5, cuja porcentagem total de explantes enraizadas (30%) desenvolveu apenas uma a três raízes. Conforme já mencionado, os tratamentos T4 e T7 não desenvolveram raízes (Figura 8 e Tabela 6).

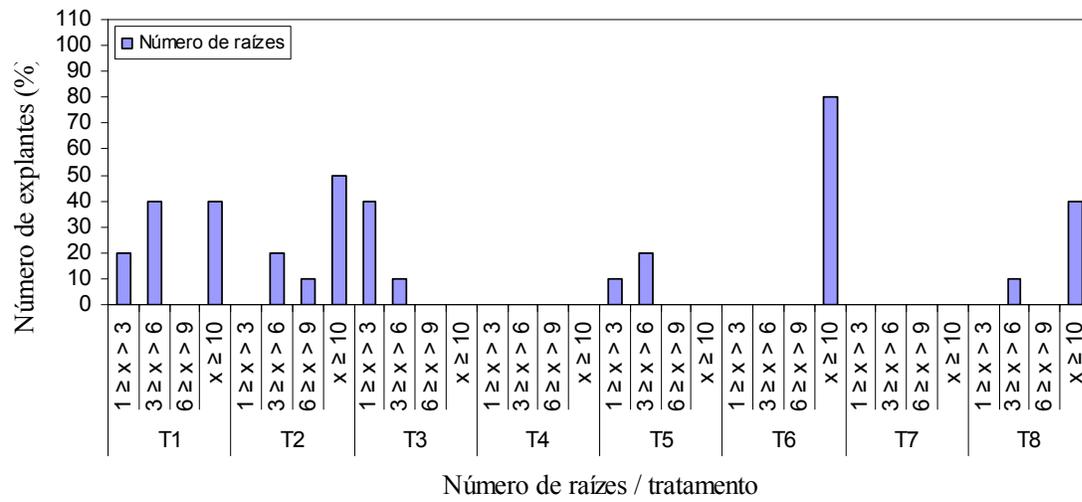


Figura 8 – Dados representativos da atuação dos biorreguladores no número de raízes desenvolvidas em explantes de microplantas de *B. gasipaes* aos 140 dias de cultivo *in vitro*

Tabela 6 – Dados representativos da atuação dos biorreguladores no número de raízes desenvolvidas em explantes de microplantas de *B. gasipaes* nos períodos de avaliação

Número de raízes (%)					Número de raízes (%)				
T1					T5				
Período (dias)	$1 \geq x > 3$	$3 \geq x > 6$	$6 \geq x > 9$	$x \geq 10$	Período (dias)	$1 \geq x > 3$	$3 \geq x > 6$	$6 \geq x > 9$	$x \geq 10$
28	0	0	0	0	28	0	0	0	0
56	0	0	0	0	56	0	0	0	0
84	30	20	0	10	84	0	0	0	0
112	10	40	30	10	112	30	0	0	0
140	20	40	0	40	140	10	20	0	0
Média Geral	12	20	6	12	Média Geral	8	4	0	0

Número de raízes (%)					Número de raízes (%)				
T2					T6				
Período (dias)	$1 \geq x > 3$	$3 \geq x > 6$	$6 \geq x > 9$	$x \geq 10$	Período (dias)	$1 \geq x > 3$	$3 \geq x > 6$	$6 \geq x > 9$	$x \geq 10$
28	0	0	0	0	28	0	0	0	0
56	0	0	0	0	56	0	0	0	0
84	0	50	0	0	84	0	10	20	0
112	0	10	30	20	112	0	10	20	40
140	0	20	10	50	140	0	0	0	80
Média Geral	0	16	8	14	Média Geral	0	4	8	24

Número de raízes (%)					Número de raízes (%)				
T3					T7				
Período (dias)	$1 \geq x > 3$	$3 \geq x > 6$	$6 \geq x > 9$	$x \geq 10$	Período (dias)	$1 \geq x > 3$	$3 \geq x > 6$	$6 \geq x > 9$	$x \geq 10$
28	0	0	0	0	28	0	0	0	0
56	0	0	0	0	56	0	0	0	0
84	10	0	0	0	84	0	0	0	0
112	20	10	0	0	112	0	0	0	0
140	40	10	0	0	140	0	0	0	0
Média Geral	14	4	0	0	Média Geral	0	0	0	0

Número de raízes (%)					Número de raízes (%)				
T4					T8				
Período (dias)	$1 \geq x > 3$	$3 \geq x > 6$	$6 \geq x > 9$	$x \geq 10$	Período (dias)	$1 \geq x > 3$	$3 \geq x > 6$	$6 \geq x > 9$	$x \geq 10$
28	0	0	0	0	28	0	0	0	0
56	0	0	0	0	56	0	0	0	0
84	0	0	0	0	84	0	0	0	10
112	0	0	0	0	112	0	10	20	10
140	0	0	0	0	140	0	10	0	40
Média Geral	0	0	0	0	Média Geral	0	4	4	12

2.3.1.6 Tipo morfológico e ramificação

As análises evidenciaram que os tratamentos T1 (Figura 5 C), T3 ou T5 desenvolveram raízes finas em todos os períodos analisados, mas somente no tratamento isento de biorreguladores (T1) foi evidenciada a presença de ramificação (Figura 5 C). Os demais tratamentos desenvolveram raízes grossas e não ramificadas (Figuras 5 D e 9).

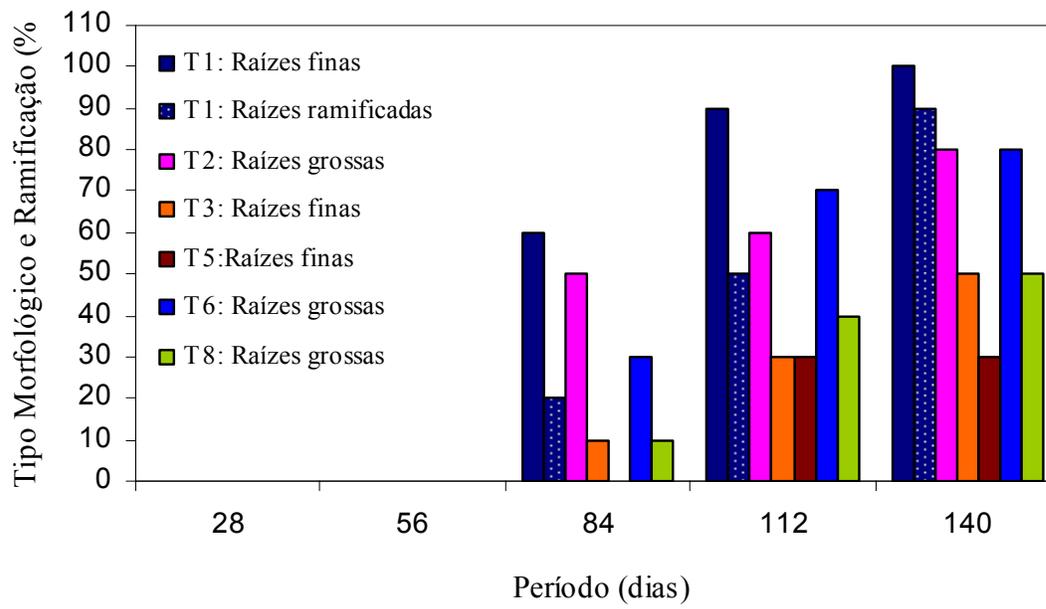


Figura 9 – Dados representativos da atuação dos biorreguladores no tipo morfológico das raízes desenvolvidas em explantes de microplantas de *B. gasipaes* cultivados *in vitro*

Tabela 7 – Dados representativos da atuação dos biorreguladores no tipo morfológico e ramificação das raízes desenvolvidas em explantes de microplantas de *B. gasipaes* nos períodos de avaliação

Tipo Morfológico das Raízes e Ramificação (%)				Tipo Morfológico das Raízes e Ramificação (%)			
T1				T5			
Período (dias)	Grossa	Fina	Ramificação	Período (dias)	Grossa	Fina	Ramificação
28	0	0	0	28	0	0	0
56	0	0	0	56	0	0	0
84	0	60	20	84	0	0	0
112	0	90	50	112	0	30	0
140	0	100	90	140	0	30	0
Média Geral	0	50	32	Média Geral	0	12	0

Tipo Morfológico das Raízes e Ramificação (%)				Tipo Morfológico das Raízes e Ramificação (%)			
T2				T6			
Período (dias)	Grossa	Fina	Ramificação	Período (dias)	Grossa	Fina	Ramificação
28	0	0	0	28	0	0	0
56	0	0	0	56	0	0	0
84	50	0	0	84	30	0	0
112	60	0	0	112	70	0	0
140	80	0	0	140	80	0	0
Média Geral	38	0	0	Média Geral	36	0	0

Tipo Morfológico das Raízes e Ramificação (%)				Tipo Morfológico das Raízes e Ramificação (%)			
T3				T7			
Período (dias)	Grossa	Fina	Ramificação	Período (dias)	Grossa	Fina	Ramificação
28	0	0	0	28	0	0	0
56	0	0	0	56	0	0	0
84	0	10	0	84	0	0	0
112	0	30	0	112	0	0	0
140	0	50	0	140	0	0	0
Média Geral	0	18	0	Média Geral	0	0	0

Tipo Morfológico das Raízes e Ramificação (%)				Tipo Morfológico das Raízes e Ramificação (%)			
T4				T8			
Período (dias)	Grossa	Fina	Ramificação	Período (dias)	Grossa	Fina	Ramificação
28	0	0	0	28	0	0	0
56	0	0	0	56	0	0	0
84	0	0	0	84	10	0	0
112	0	0	0	112	40	0	0
140	0	0	0	140	50	0	0
Média Geral	0	0	0	Média Geral	20	0	0

2.3.1.7 Comprimento radicular

Todos os tratamentos contendo explantes enraizados evidenciaram elevada heterogeneidade para o comprimento radicular, em todos os períodos analisados.

Conforme observado no ítem 2.3.1.4, o início do enraizamento dos explantes submetidos aos tratamentos T1, T2, T3, T6 e T8 ocorreu ao 84º dia de cultivo *in vitro*, sendo que os tratamentos T4, T5 e T7 não desenvolveram raízes.

Neste período, dentre os tratamentos que evidenciaram enraizamento a resposta mais favorável ao comprimento radicular ocorreu para o tratamento T1, que evidenciou maior porcentagem de explantes com raízes medindo de 2,0 a 3,5 cm de comprimento, sendo que pior resposta para este evento fisiológico foi observada para o tratamento T8, com raízes medindo entre 0,1 e 0,4 cm. (Figura 10 e Tabela 8).

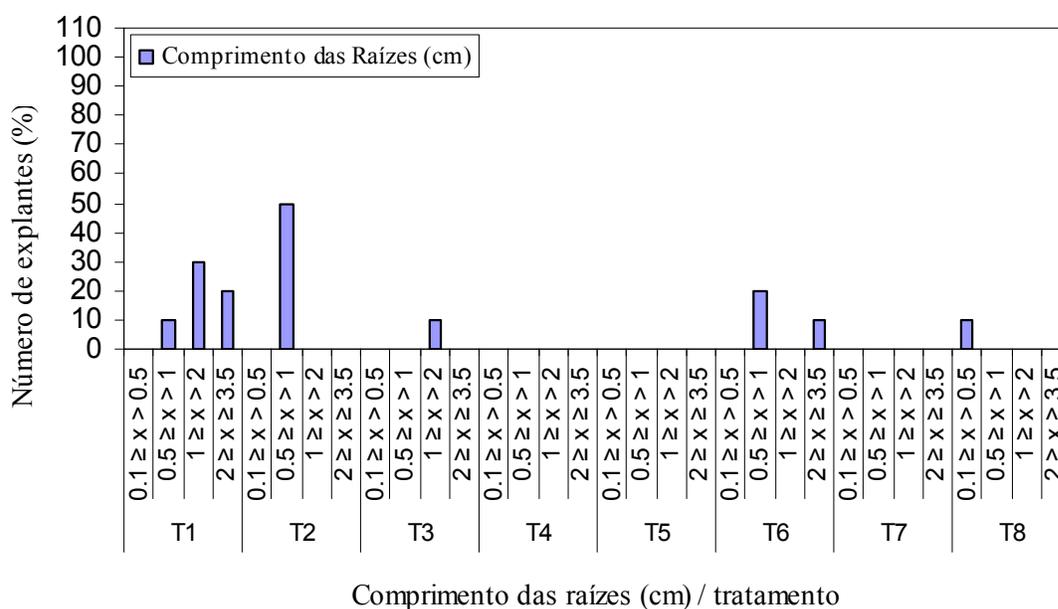


Figura 10 – Dados representativos da atuação dos biorreguladores no número de raízes desenvolvidas em explantes de microplantas de *B. gasipaes* aos 84 dias de cultivo *in vitro*

Ao 112º dia de cultivo *in vitro*, o tratamento T1 manteve 20 % dos explantes com raízes medindo entre 2,0 e 3,5 cm e 60% com raízes medindo entre 1,0 e 1,9 cm, caracterizando a melhor resposta para este período. Considerando os tratamentos que desenvolveram raízes, o tratamento T8 permaneceu desfavorável para este evento fisiológico, com elevado número de explantes (30%) apresentando raízes entre 0,1 e 0,4 cm de comprimento (Figura 11 e Tabela 8).

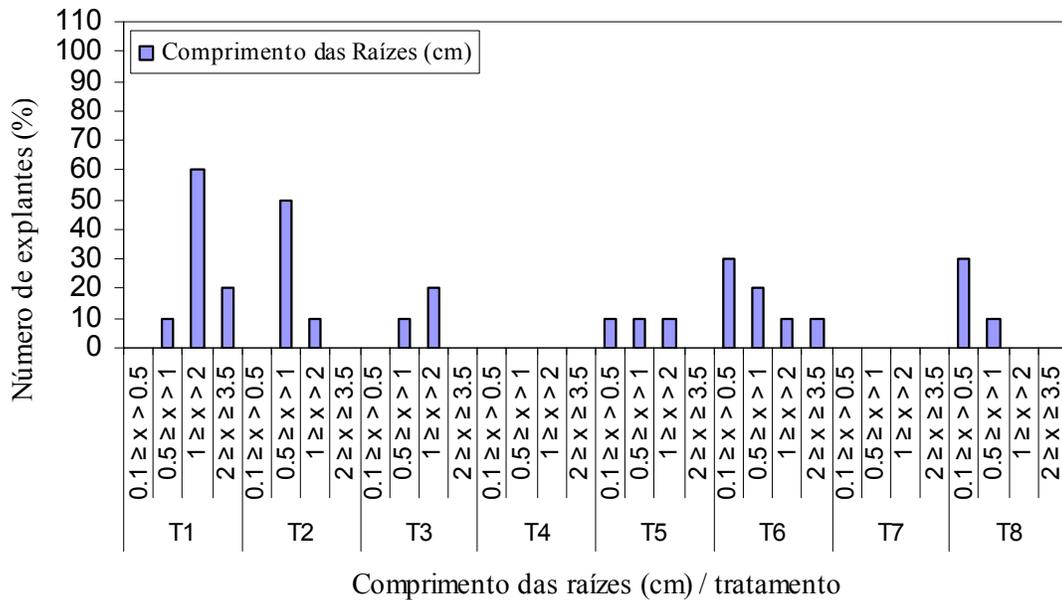


Figura 11 – Dados representativos da atuação de biorreguladores no número de raízes desenvolvidas em explantes de microplantas de *B. gasipaes* aos 112 dias de cultivo *in vitro*

Ao 140º dia de cultivo *in vitro* e considerando os tratamentos que evidenciaram enraizamento, o tratamento isento de biorreguladores (T1) apresentou a maior porcentagem de explantes com raízes alongadas sendo que o tratamento com menor porcentagem de explantes com raízes alongadas permaneceu para o tratamento suplementado com ANA em associação com 2iP (T8) (Figura 12 e Tabela 8).

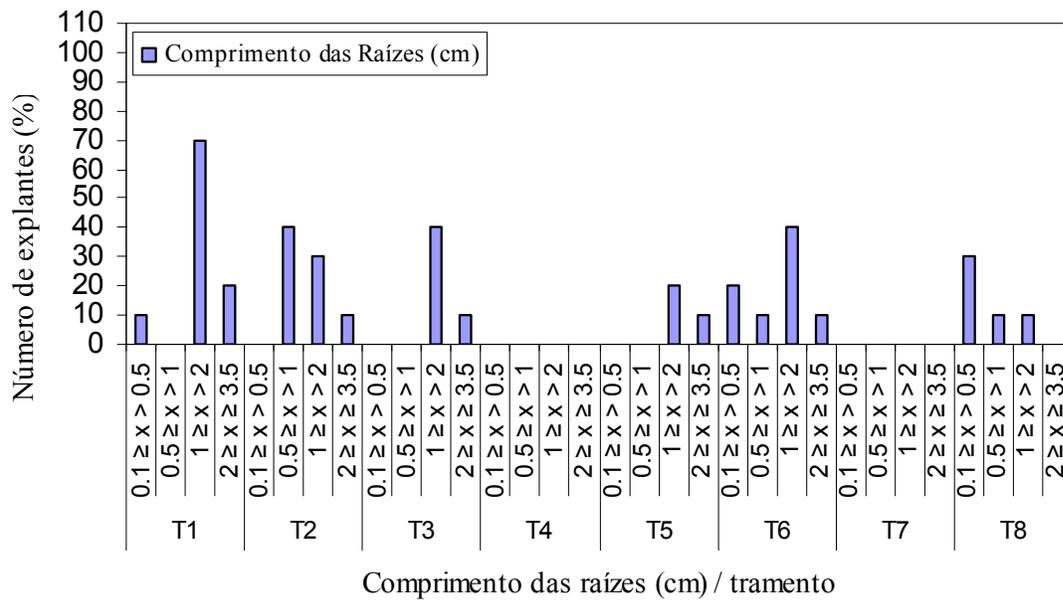


Figura 12 – Dados representativos da atuação de biorreguladores no número de raízes desenvolvidas em explantes de microplantas de *B. gasipaes* aos 140 dias de cultivo *in vitro*

Tabela 8 – Dados representativos da atuação dos biorreguladores no comprimento radicular em explantes de microplantas de *B. gasipaes* nos períodos de avaliação

Comprimento das Raízes (%)					Comprimento das Raízes (%)				
T1					T5				
Período (dias)	$0.1 \geq x > 0.5$	$0.5 \geq x > 1$	$1 \geq x > 2$	$2 \geq x \geq 3.5$	Período (dias)	$0.1 \geq x > 0.5$	$0.5 \geq x > 1$	$1 \geq x > 2$	$2 \geq x \geq 3.5$
28	0	0	0	0	28	0	0	0	0
56	0	0	0	0	56	0	0	0	0
84	0	10	30	20	84	0	0	0	0
112	0	10	60	20	112	10	10	10	0
140	10	0	70	20	140	0	0	20	10
Média Geral	2	4	32	12	Média Geral	2	2	6	2

Comprimento das Raízes (%)					Comprimento das Raízes (%)				
T2					T6				
Período (dias)	$0.1 \geq x > 0.5$	$0.5 \geq x > 1$	$1 \geq x > 2$	$2 \geq x \geq 3.5$	Período (dias)	$0.1 \geq x > 0.5$	$0.5 \geq x > 1$	$1 \geq x > 2$	$2 \geq x \geq 3.5$
28	0	0	0	0	28	0	0	0	0
56	0	0	0	0	56	0	0	0	0
84	0	50	0	0	84	0	20	0	10
112	0	50	10	0	112	30	20	10	10
140	0	40	30	10	140	20	10	40	10
Média Geral	0	28	8	2	Média Geral	10	10	10	6

Comprimento das Raízes (%)					Comprimento das Raízes (%)				
T3					T7				
Período (dias)	$0.1 \geq x > 0.5$	$0.5 \geq x > 1$	$1 \geq x > 2$	$2 \geq x \geq 3.5$	Período (dias)	$0.1 \geq x > 0.5$	$0.5 \geq x > 1$	$1 \geq x > 2$	$2 \geq x \geq 3.5$
28	0	0	0	0	28	0	0	0	0
56	0	0	0	0	56	0	0	0	0
84	0	0	10	0	84	0	0	0	0
112	0	10	20	0	112	0	0	0	0
140	0	0	40	10	140	0	0	0	0
Média Geral	0	2	14	2	Média Geral	0	0	0	0

Comprimento das Raízes (%)					Comprimento das Raízes (%)				
T4					T8				
Período (dias)	$0.1 \geq x > 0.5$	$0.5 \geq x > 1$	$1 \geq x > 2$	$2 \geq x \geq 3.5$	Período (dias)	$0.1 \geq x > 0.5$	$0.5 \geq x > 1$	$1 \geq x > 2$	$2 \geq x \geq 3.5$
28	0	0	0	0	28	0	0	0	0
56	0	0	0	0	56	0	0	0	0
84	0	0	0	0	84	10	0	0	0
112	0	0	0	0	112	30	10	0	0
140	0	0	0	0	140	30	10	10	0
Média Geral	0	0	0	0	Média Geral	14	4	2	0

2.4 Discussão

Os resultados observados para o número de gemas adventícias em todos os tratamentos (Tabela 3; Figura 2; ANEXOS A a E) evidenciaram que os períodos de subcultivo são fundamentais para a adaptação dos explantes às condições estabelecidas, ou seja, ao reconhecimento do biorreguladores adicionado, seguido pela resposta ao estímulo, corroborando com o observado por Silva Júnior (2007) ao observar os resultados em função do tempo de

exposição de brotações obtidas a partir de microplantas *in vitro* de bastão-do-imperador [*Etiligera elatior* (Jack) R.M.Smith] submetidas a concentrações crescentes de BAP e avaliados aos 30, 60 e 90 dias de subcultivo.

Não há relatos em palmáceas, que corroborem com o desenvolvimento de gemas adventícias desenvolvidas em meio cultura MS isento de biorreguladores, conforme observou-se no presente trabalho (Tabela 3; Figura 2; ANEXOS A a E), entretanto, Soares *et al.* (2007) observaram que segmentos nodais de microplantas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) cultivados em meio isento de biorreguladores, desenvolveram pelo menos uma brotação por explante aos 30 dias de cultivo. Já, Furtado *et al.* (2007) observaram em explantes cotiledonares de amendoim BR1 (*Arachis hipogaea*), até 1,8 brotos por explante quando cultivados em meio MS desprovido de biorreguladores.

No presente trabalho, a primeira evidência de gemas adventícias no meio isento de biorreguladores ocorreu aos 56 dias de cultivo e evidenciando 1,9 GA.explante⁻¹ ao final do experimento (140 dias) (Tabela 3; Figura 2; ANEXO B), sugerindo que explantes de pupunheiras cultivados nessas condições apresentaram níveis hormonais endógenos ótimos ao desenvolvimento de gemas adventícias em função da permanência neste meio, particularmente em estágio de desenvolvimento mais avançado, cujo desenvolvimento radicular parece favorecer o desenvolvimento dos propágulos e vice-versa. Isto pode ser evidenciado pelo incremento no número médio de propágulos aos 84 dias de cultivo, cujos explantes apresentaram 60% de enraizamento e nenhuma evidência de raízes nos períodos anteriores (Tabelas 3 e 5; Figuras 2 e 4; ANEXO C).

De acordo com Peres *et al.* (1997), um intenso crescimento do sistema radicular implica em uma elevada produção/transporte de citocininas, estimulando, assim, o desenvolvimento inicial de gemas, as quais, por sua vez, garantiriam o suprimento de auxina necessária à iniciação de mais raízes. Não obstante, muitos tecidos são capazes de sintetizar auxinas e citocininas (KERBAUY *et al.* 1986, 1988 apud HANDRO; FLOH, 1990; GUERRA; NODARI, 2006) e alguns explantes podem não apresentar uma elevada atividade da enzima citocinina oxidase, favorecendo o balanço auxina/citocinina endógeno indutor da formação de gemas, assim como o inverso é verdadeiro (PERES, 2002).

Neste tratamento (T1), observou-se também a maior porcentagem final de explantes enraizados (100%) (Tabela 5 e Figura 4) e embora somente 40% dos explantes tenham

apresentado dez ou mais raízes (Figura 8 e Tabela 6), todas apresentaram-se finas e ramificadas (Figura 5 C), com maior porcentagem de raízes alongadas (20% com raízes entre 2,0 e 3,5 cm.) (Figura 12 e Tabela 8), características estas que facilitam sobremaneira a sobrevivência durante o processo de aclimatização das microplantas (SOMMER; CALDAS, 1981; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990), embora Sané *et al.* (2006) tenham observado que a presença de raízes finas e ramificadas obtidas em meio MS isento de reguladores de crescimento tenham incapacitado a sobrevivência em viveiro de embriões somático originados a partir de suspensões celulares de calos obtidos desenvolvidos em folhas e explantes de microplantas de tamareira (*Phoenix dactylifera* L.). Os autores, no entanto, não mencionaram a metodologia empregada na etapa de aclimatização destas microplantas, como o substrato utilizado e as condições ambientais, assim como o estágio de desenvolvimento destas no momento da transferência ao ambiente *ex-vitro*.

De acordo com Calvete, 1998 apud Batagin (2008), o substrato utilizado na preparação de mudas é de extrema importância, pois pode favorecer ou impedir o crescimento das raízes de acordo com suas propriedades físico-químicas, o espaço de areação e a capacidade de retenção de água. Não obstante, no momento da aclimatização, os autores relataram que os explantes constavam de 14 meses de cultivo *in vitro*, o que pode ter promovido um elevado desenvolvimento das raízes, dificultando sobremaneira o pegamento das microplantas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990).

Almeida e Kerbauy (1996) observaram que a ausência de reguladores de crescimento favoreceu a rizogênese em gemas vegetativas obtidas por meio da reversão de explantes florais de pupunheiras, assim como evidenciaram Centellas *et al.* (1999), cujas brotações de macieira micropropagadas, apresentaram 5% de enraizamento aos 30 dias de cultivo nessas mesmas condições. Existem relatos, também aos 30 dias de cultivo, com brotações axilares de bastão-do-imperador (*Etiligera elatior*) originadas de plântulas germinadas *in vitro*, onde foi observado o desenvolvimento do sistema radicular em meio desprovido de biorreguladores e aos 60 dias, o autor verificou a produção de elevado número e comprimento médio das raízes (SILVA JÚNIOR, 2007). Neste trabalho, o desenvolvimento de raízes foi observado somente ao 84º dia de cultivo *in vitro* para os tratamentos T1, T2, T3, T6 e T8, refletindo o caráter recalcitrante característico das palmeiras (Tabela 5 e Figura 4).

Saldanha (2007), avaliando as concentrações de sais do meio MS e a concentração de sacarose na germinação *in vitro* de embriões zigóticos imaturos excisados de sementes de

palmeiteiro (*Euterpe edulis* Mart.), observou que com o acréscimo de 30 g.L⁻¹ de sacarose e ausência de biorreguladores os resultados indicaram maior número médio de raízes por explante (1,0 raiz.explante⁻¹) aos 120 dias de cultivo, em relação ao tratamento com as concentrações de sais reduzidas pela metade. Neste trabalho observou-se um número de raízes superior ao reportado pelo autor supracitado aos 112 dias de cultivo *in vitro*, em meio isento de biorreguladores, onde 40% dos explantes apresentaram três a seis raízes, 30%, seis a oito raízes e 10%, dez ou mais raízes. Somente 10% dos explantes apresentaram uma a duas raízes (Figura 7 e Tabela 6).

O tratamento T2 desenvolveu, aos 140 dias de cultivo, média de 1,5 GA.explante⁻¹, valor este intermediário em relação aos demais tratamentos analisados. (Tabela 3; Figura 2; Anexo E).

Tisserat e DeMason (1985) observaram, aos 56 dias de cultivo, que explantes de tamareira (*Phoenix Dactylifera* L.) obtidos a partir de microplantas, apresentaram duas a três brotações em apenas 20% dos explantes quando cultivados em baixas concentrações de ANA (0,54 µM) acrescidas ao meio MS. Neste trabalho, no mesmo período analisado, os explantes cultivados em meio suplementado com ANA (12,9 µM) desenvolveram uma média elevada de 0,8 GA.explante⁻¹, valor este apenas inferior ao meio contendo TDZ (T4) (Tabela 3; Figura 2; ANEXO E). O desenvolvimento de gemas adventícias ocorreu em 60% dos explantes, porcentagem superior ao observado nos explantes da tamareira, embora o número de propágulos por explante tenha sido ligeiramente inferior (um a dois) (ANEXO B). Rubin *et al.* (2007) também observaram que segmentos nodais da medicinal *Thymus vulgaris* L. em meio MS suplementado com reduzidas concentrações de ANA (1,34 µM) aos 45 dias de cultivo *in vitro*, desenvolveram elevado número de brotações por explante (21, 42 brotações.explante⁻¹), evidenciando, novamente, a recalcitrância que normalmente as palmeiras apresentam, particularmente, a *B. gasipaes*.

O tratamento T2 foi também, o segundo a desenvolver, junto ao tratamento contendo T6 aos 140 dias de cultivo, maior porcentagem de enraizamento (Tabela 5 e Figura 4) e foi o segundo tratamento para o maior número de raízes por explante desenvolvido em microplantas (Figura 8 e Tabela 6), embora estas se tenham se apresentado morfológicamente curtas e grossas (Figura 8 e Tabela 6). Isto corrobora com os resultados observados quando auxinas são utilizadas com o propósito de estimular a iniciação do enraizamento *in vitro*, pois, embora as auxinas estimulem a rizogênese (SANÉ *et al.*, 2006), podem inibir o posterior alongamento (MELO *et al.*, 2001) ou promover o engrossamento das raízes (CENTELLAS *et al.*, 1999; GUIDOLIN, 2003).

Almeida (1994) observou que explantes de pupunheiras crescidas previamente em meio MS contendo $8,0 \mu\text{M}$ de BA não favoreceu o desenvolvimento de gemas quando cultivados em meio MS apenas com ANA a $10,7 \mu\text{M}$, embora tenha favorecido o desenvolvimento de elevado número e comprimento de raízes por planta após 30 dias de cultivo. De forma semelhante, quando os explantes provenientes de pupunheiras desenvolvidas em meio isento de biorreguladores e transferidos para meio suplementado com ANA ($17,2 \mu\text{M}$), não se observou a regeneração de gemas, porém favoreceu consideravelmente a formação de raízes. Estes resultados discordam em parte com aqueles observados no presente trabalho, cuja atuação do ANA ($12,9 \mu\text{M}$) isoladamente, aos 28 dias, resultou no desenvolvimento de $0,3 \text{ GA.explante}^{-1}$, sendo a maior média entre todos os tratamentos para o período correspondente (Tabela 3; Figura 2; ANEXO A). Além disso, não foram evidenciadas raízes aos 28 dias de cultivo embora este tratamento tenha propiciado o desenvolvimento de elevado número de raízes, porém curtas e grossas, no último período de análise (140 dias), (Figuras 8, 9 e 12 e Tabelas 6, 7 e 8). Almeida (1994) relatou ainda, que meios de cultura contendo elevadas concentrações isoladas de ANA (superiores a $10,7 \mu\text{M}$) favoreceram em pupunheiras, o crescimento e a rizogênese, em detrimento à formação de gemas. Muito provavelmente o balanço auxina/citocinina endógeno presente nestes explantes cultivados em T2 foi favorável ao desenvolvimento de gemas adventícias e raízes, mesmo com a aplicação isolada de auxinas.

Explantes cultivados no tratamento T3 não favoreceu o desenvolvimento de gemas adventícias, atingindo uma média por explante de $0,5 \text{ GA.explante}^{-1}$ aos 140 dias de cultivo, sendo superior apenas ao tratamento contendo a presença isolada de 2iP ($0,2 \text{ GA.explante}^{-1}$) (Tabela 3; Figura 2; ANEXO E). Estes dados corroboram com o observado por Almeida (1994), cujos explantes desta mesma espécie e provenientes de microplantas desenvolvidas em meio desprovido de reguladores de crescimento, não desenvolveram gemas adventícias quando inoculadas em meio contendo a presença isolada de BAP ($8,0 \mu\text{M}$), porém, quando os explantes eram provenientes de microplantas desenvolvidas em meio contendo BAP ($8,0 \mu\text{M}$) e posteriormente cultivados em meio com este mesmo regulador a concentração mais reduzida ($5,33 \mu\text{M}$), o autor observou, aos 30 dias de cultivo, sensível estímulo à formação de gemas e pronunciada inibição do enraizamento. Neste trabalho, o enraizamento também foi desfavorecido em explantes cultivados no tratamento T3, com apenas 10% dos explantes enraizados aos 84 dias de cultivo e 50% aos 140 dias (Tabela 5 e Figura 4), sendo também, o pior tratamento quanto ao

número de raízes originadas (Figuras 6 a 8; Tabela 6), embora morfologicamente finas (Figura 9 e Tabela 7) e alongadas (Figuras 10 a 12; Tabela 8).

Rubin *et al.* (2007) também observaram respostas negativas ao número médio de brotações desenvolvidas em segmentos nodais da medicinal *Thymus vulgaris* L. obtidos a partir de microplantas cultivadas previamente em meio MS desprovido de reguladores de crescimento, quando cultivados em meio suplementado com BAP a 5,33 ou 9,77 μM aos 40 dias de cultivo. Da mesma forma que o observado no presente trabalho, os autores verificaram que o número de brotações desenvolvidas em meio contendo a presença isolada do BAP foi desfavorável em relação àquelas originadas em explantes cultivados em meio isento de biorreguladores.

O enraizamento também foi desfavorecido com o acréscimo isolado de BAP em concentrações crescentes (4,44; 8,88 e 17,76 μM) em meio MS por um período de 30 dias em segmentos nodais de chapéu-de-couro (*Echinodorus cf. scaber* Rataj) obtidos a partir de plantas estabelecidas *in vitro* sem reguladores de crescimento (PEREIRA *et al.*, 2000). Os autores observaram ainda, que, quando cultivados em meio contendo BAP a 4,44 μM , elevado número de raízes foram originadas (5 a 37 raízes.explante⁻¹) e em meio isento de reguladores de crescimento, 6 a 30 raízes por explante se desenvolveram, porém estes valores foram reduzindo à medida que as concentrações de BAP foram elevadas, embora o caráter crescimento das raízes tenha sido favorecido, tanto no tratamento isento de reguladores de crescimento, como no tratamento contendo BAP à menor concentração testada.

Ao que pode ser observado nas Tabelas 3 e 5; nas Figuras 2 e 4 e no ANEXO E, o reduzido desenvolvimento de gemas adventícias nos explantes cultivados no tratamento T3, é concomitante ao também reduzido desenvolvimento de raízes, sugerindo desta forma e conforme observado no tratamento T1, que o desenvolvimento de gemas adventícias é diretamente proporcional ao desenvolvimento de raízes e vice-versa, através do estímulo mútuo decorrente da produção de auxinas pelas gemas e de citocininas pelas raízes desenvolvidos. Neste caso, o enraizamento foi desfavorecido pelo reduzido desenvolvimento de gemas adventícias e estas desfavorecidas pela reduzida formação de raízes, demonstrado que a aplicação isolada do BAP na concentração utilizada (3,55 μM) exerceu respostas inibitórias em explantes de pupunheiras para estes eventos fisiológicos.

Tanto o tratamento que utilizou TDZ (0,36 μM) isoladamente (T4), como o tratamento contendo ANA (12,9 μM) associada ao TDZ (0,36 μM) (T7), evidenciaram respostas

morfofisiológicas muito semelhantes, diferindo apenas quanto ao número de gemas adventícias desenvolvidas. Ambos os tratamentos desenvolveram as maiores médias para o número de gemas adventícias desenvolvidas por explante em relação aos demais tratamentos, onde o tratamento T4 desenvolveu em média $2,9 \text{ GA.explante}^{-1}$ e o tratamento T7, resultou um valor médio de $2,0 \text{ GA.explante}^{-1}$ ao final do experimento (140 dias) (Tabela 3; Figura 2; ANEXO E). Embora o desenvolvimento de gemas adventícias tenha sido favorecido, o desenvolvimento de raízes foi completamente inibido em ambos os tratamentos (Figuras 5 A e B). As estruturas semelhantes a rizomas evidenciadas em alguns dos explantes cultivados em meio contendo apenas TDZ (T4) (Figura 5 A) ou combinado com ANA (T7) corroboram com o observado por Almeida (1994) na base de explantes desta mesma espécie, porém, cultivados em meio contendo a presença de ANA/BAP nas mesmas concentrações testadas no presente trabalho ($12,9$ e $3,55 \mu\text{M}$, respectivamente), a partir de plântulas crescidas previamente em meio contendo a presença isolada de BAP a $8,0 \mu\text{M}$. O autor constatou por meio de análises histológicas, que a partir destas estruturas com crescimento aparentemente indefinido, muitas gemas adventícias foram regeneradas em um processo semelhante à descrição realizada por Tomlinson (1961) para esta espécie no processo regenerativo *in vivo*. Todavia, não há relatos na literatura sobre a atuação do thidiazuron na organogênese e/ou rizogênese em palmáceas.

Flores, Nicoloso e Maldaner (2007) observaram os mesmo eventos fisiológicos em segmentos nodais do ginseng brasileiro [*Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken] obtidos a partir do cultivo *in vitro* de segmentos caulinares em meio de cultura desprovido de reguladores de crescimento. Aos 30 dias de cultivo, os autores verificaram que o TDZ favoreceu a organogênese direta, originando elevado número médio de brotos em todas as concentrações testadas, embora o maior valor tenha ocorrido a $1,00 \mu\text{M}$. Brotações curtas se desenvolveram, principalmente com o aumento das concentrações desta citocinina, além de inibir a rizogênese, assim como observado no presente trabalho, na concentração fixa de $0,36 \mu\text{M}$ (Figuras 5 A e B).

Furtado *et al.* (2007) analisaram a atuação do BAP, CIN e TDZ a concentrações crescentes em meio MS à indução do super brotamento do amendoim BR-1. Para tanto, utilizou como fonte de explantes gemas cotiledonares e hipocótilos obtidos a partir de sementes germinadas *in vitro* em meio MS. A avaliação realizada aos 60 dias de cultivo evidenciaram que no hipocótilo houve apenas a formação de calos e nos explantes cotiledonares, apesar dos

tratamentos contendo BAP ou TDZ não diferirem entre si, houve uma tendência maior para formação de brotos à concentração mais elevada testada (88,8 μM de BAP e 90,8 μM de TDZ)

Santarém e Astarita (2003) propuseram um sistema otimizado à micropropagação de *Hypericum perforatum*, para tanto, segmentos nodais desta planta foram cultivados em meio MS sem reguladores de crescimento (controle) ou suplementados com 4,5 μM das citocininas BA, TDZ ou KIN individualmente ou associadas com 0,05 μM de ANA. Após 60 dias, os autores evidenciaram que a presença do ANA e do TDZ nos tratamentos exerceram efeitos inibitórios à organogênese, particularmente para o tratamento contendo a presença isolada de ANA, porém quando os segmentos nodais foram transferidos posteriormente para meio de cultura MS contendo a presença isolada do BAP a 4,5 μM , as resposta inibitórias desenvolvidas por estes reguladores de crescimento foram revertidas.

De acordo com Mok *et al.* (1987), a atuação do TDZ no alongamento de brotos e inibição do enraizamento deve-se ao fato desta citocinina alterar o metabolismo das citocininas endógenas naturais, promovendo um aumento no teor endógeno. Taiz e Zaiger (2006) relatam que, embora as citocininas sejam evidentemente necessárias à proliferação normal das células, a aplicação exógena inibe o processo de alongamento de caules e de raízes e, além disso, o thidiazuron é um composto altamente estável e resistente às oxidases (MOK *et al.*, 1987; PERES, 2002; SRIVASTAVA, 2002; KERBAUY, 2004). Por estes motivos, acredita-se que o acréscimo de TDZ neste trabalho tenha elevado os níveis endógenos de citocininas naturais e potencializado sua atuação em devido à elevada estabilidade, promovendo, assim, o aumento no número de gemas adventícias e inibição do enraizamento. Cabe salientar que a presença de citocininas induz a divisão celular, aumentando assim, o número de brotações, mas com conseqüente redução no tamanho, conforme observaram Pereira *et al.* (2000) ao avaliar o efeito da citocinina BAP em distintas concentrações no alongamento de brotações de chapéu-de-couro a partir de segmentos nodais desta espécie.

Lima e Gonçalves (1998) analisaram a atuação do thidiazuron na multiplicação *in vitro* de eucalipto em cinco concentrações e observaram que a 0,45 e 4,5 μM ocorreu ação inibitória à multiplicação de gemas, potencializando a calogênese, hiperhidria e desenvolvimento de caule espesso e avermelhado. Além disso, nestas concentrações e a 0,045 μM foi observado o desenvolvimento de gemas curtas.

Neste trabalho, os explantes cultivados nos tratamentos T4 e T7 também apresentaram espessamento caulinar, e as bainhas dos primórdios foliares apresentaram, por vezes, coloração avermelhada e a maioria desenvolveu acúleos (Figuras 5A e 5B). Esses resultados permitiram inferir que o TDZ atuou como promotor da síntese de antocianina e possivelmente ativou gene (s) específico (s) à expressão de acúleos. De acordo com Clement, 1986 apud Clement e Manshardt (2000), devido à elevada variação dos espinhos presentes em estipes de pupunheiras, provavelmente há mais de um gene envolvido na expressão destes.

Estas estruturas, em pupunheiras, apresentam origem epidérmica e ausência total de vascularização (TOMLINSON,1962), motivo pelo qual são designadas como acúleos no presente trabalho, corroborando com as descrições realizadas por Alquini *et al.* (2006), quanto a sua origem.

Não foram encontrados trabalhos na literatura vigente que corroborem com o estímulo à síntese de antocianinas e (ou) acúleos promovidos pela utilização do TDZ em culturas de tecidos.

O tratamento T5, contendo a presença isolada de 2iP apresentou severa inibição do desenvolvimento de gemas adventícias nos explantes, cuja média por explante aos 140 dias de cultivo dos explantes, foi de apenas 0,2 GA.explante⁻¹, o pior desempenho em relação aos demais tratamentos (Tabela 3; Figura 2; ANEXO E). Estes dados corroboram com o observado por Almeida (1994), cujos explantes provenientes de microplantas de pupunheiras desenvolvidas em meio desprovido de reguladores de crescimento, não desenvolveram propágulos, quando inoculadas em meio contendo 2iP isoladamente, porém, a concentrações bem mais elevadas (9,8 µM). Em ápices meristemáticos de caquizeiro ‘Fuyu’ obtidos a partir de estacas lenhosas, os resultados também evidenciaram o insucesso no desenvolvimento e proliferação de gemas quando cultivados *in vitro* em meio contendo a metade da concentração dos sais do nitrato (MS ½ NO₃) suplementado com 2iP (CARVALHO; BIASI; TELLES, 2004).

Já, em segmentos nodais de acácia-negra (*Acácia mearnsii* De Wild.) provenientes de sementes germinadas *in vitro* em meio desprovido de biorreguladores, quando cultivados em meio básico B5 suplementado apenas com 2iP a 4,9 µM, 9,8 µM ou 14,8 µM, foi constatado que a utilização dessa citocinina promoveu o desenvolvimento de gemas, sendo que as duas últimas concentrações evidenciaram a maior média de gemas por explante em relação a concentração mais baixa (4,9 µM) e ao tratamento desprovido de reguladores de crescimento (BORGES JUNIOR; SOBORSA; MARTINS-CODER, 2004).

De acordo com Hu e Wang (1983) o 2iP e a cinetina são duas citocininas que permitem o desenvolvimento normal de propágulos, porém, não favorecem a formação de brotações múltiplas.

Aos 140 dias de cultivo *in vitro*, observou-se que o tratamento T5 no presente trabalho não favoreceu o enraizamento dos explantes, visto que apenas 30% destes desenvolveram raízes (Tabela 5 e Figura 4), além do número médio de raízes por explante ter sido muito reduzido (Figura 8 e Tabela 6), embora morfológicamente finas, mas não ramificadas (Figura 9 e Tabela 7). Quanto ao comprimento médio das raízes, esta citocinina mostrou-se favorável aos poucos explantes enraizados, os quais desenvolveram raízes alongadas ao 140º dia de cultivo *in vitro* (Figura 12 e Tabela 8). Estes resultados discordam com o observado por Almeida (1994), o qual evidenciou que explantes de pupunheiras provenientes de microplantas desenvolvidas em meio desprovido de reguladores de crescimento, quando cultivados na presença isolada de 2iP formaram plantas completas, muito provavelmente em devido à concentração mais elevada desta citocinina (9,8 μM).

Assim como observado no tratamento T3, o reduzido desenvolvimento de gemas adventícias é concomitante ao também reduzido desenvolvimento de raízes (Tabelas 3 e 5; Figuras 2 e 4), sugerindo desta forma, que o desenvolvimento destas é diretamente proporcional ao desenvolvimento de raízes e vice-versa, conforme observado no tratamento T1 (Tabelas 3 e 5; Figuras 2 e 4) através do estímulo mútuo decorrente da produção de auxinas pelas gemas adventícias e de citocininas pelas raízes desenvolvidas. Isto evidencia que o uso isolado do 2iP a 0,4 μM exerceu respostas inibitórias em explantes de pupunheiras para ambos os eventos fisiológicos.

O tratamento contendo T6 desenvolveu, ao final do experimento (140 dias), número médio considerável de gemas adventícias por explantes (1,9 GA.explante⁻¹), valor este igual ao observado para o tratamento isento de biorreguladores (T1) (Tabela 3; Figura 2; ANEXO E). Além disso, à semelhança do tratamento T1, observou-se elevada porcentagem de enraizamento (80%) ao final do experimento (140 dias) (Tabela 5 e Figura 4), embora tenham sido observados o maior número médio de raízes por explantes em relação ao tratamento isento de biorreguladores e aos demais tratamentos (Figura 8 e Tabela 6) e raízes morfológicamente grossas e sem ramificações evidentes (Figura 9 e Tabela 7). Quanto ao comprimento das raízes desenvolvidas e para o mesmo período, observou-se que os explantes apresentaram um

comportamento consideravelmente heterogêneo, sendo que o maior número de explantes (40%) apresentou raízes mesuradas entre 1,0 e 2,0 cm (Figura 12 e Tabela 8).

Almeida (1994) observou que explantes de pupunheiras provenientes de microplantas desenvolvidas em meio desprovido de reguladores de crescimento, não desenvolveram gemas adventícias quando cultivados em meio contendo ANA (17,2 μM) associado ao BAP (8,0 μM) em concentrações consideravelmente maiores que a empregada no presente tratamento, embora tenham formado plantas completas. Provavelmente, as concentrações menores utilizadas para estes reguladores de crescimento no presente trabalho e o tempo de permanência neste meio favoreceram o desenvolvimento do elevado número de propágulos em relação aos demais tratamentos. Quando os explantes foram provenientes de microplantas cultivadas previamente em meio suplementado com BAP (8,0 μM) e cultivados em concentrações menores de ANA (12,9 μM) e BAP (3,55 μM), o autor verificou elevada capacidade organogênica, com a formação de até 15 gemas por explante aos 28 dias de cultivo, cuja freqüência pode ser mantida prolongadamente *in vitro* quando estas gemas foram separadas e transferidas para o mesmo meio utilizado. No período correspondente (28 dias), o tratamento com as mesmas concentrações utilizadas por Almeida (1994) não desenvolveu gemas adventícias neste trabalho (Tabela 3; Figura 2; ANEXO A). O autor sugeriu que o cultivo prévio em meio contendo BAP sensibilizou consideravelmente aos explantes à organogênese direta. De fato, Grattapaglia e Machado (1990) já preconizavam que o efeito das citocininas não se limita a uma subcultura, constatando-se um efeito residual de uma cultura para outra, sendo negativo quando causa dificuldades no alongamento, podendo ser limitante na fase de enraizamento, ou ainda ser favorável quando se trata de rejuvenescimento *in vitro* de espécies lenhosas.

Almeida e Kerbauy, (1996) verificaram, em pupunheiras, após 10 meses de cultivo, que a utilização do ANA e do BAP nas mesmas concentrações utilizadas neste trabalho, favoreceu tanto a reversão de gemas florais em gemas vegetativas quando precedidos pelo cultivo em meio contendo a presença isolada de BAP (7,1 μM) durante três meses, como a regeneração direta de brotos na região basal destas gemas, perfazendo uma média de 13 brotos por explante.

A utilização de ANA associado à BAP, ambos em distintas concentrações, proporcionaram o desenvolvimento do maior número de raízes em relação à testemunha (isento de reguladores de crescimento), independentemente das concentrações de ANA em embriões zigóticos maduros excisados de sementes de açazeiros (*Euterpe oleracea* Mart.) (LEDO *et al.*,

2001) aos 48 dias de cultivo *in vitro*, os quais desenvolveram uma média de 2,85 raízes por microplanta. No presente trabalho, o tratamento contendo ANA/BAP (T6), assim como os demais, não desenvolveram raízes neste período, porém, a permanência destes nos subseqüentes subcultivos favoreceu consideravelmente o desenvolvimento destas e, aos 140º dia de cultivo, este tratamento apresentou 100% dos explantes enraizados com raízes com 10 cm ou mais, sendo o melhor resultado observado em relação aos demais tratamentos (Figuras 4 e 12; Tabelas 5 e 8).

Tisserat e DeMason (1985) observaram que embriões zigóticos excisados de sementes e explantes de tamareiras (*P. Dactylifera* L.) cultivados em meios acrescidos de ANA a baixas concentrações (0,54 μ M) e associada às citocininas BAP, KIN ou 2iP em concentrações mais elevadas não aumentaram significativamente o brotamento, mas promoveu a reversão de gemas vegetativas em gemas florais em 5% dos explantes.

No presente trabalho, o tratamento T8 apresentou número médio de gemas adventícias consideravelmente superior ao observado no tratamento contendo T5 aos 140 dias de cultivo (1,3 e 0,2, GA.explante⁻¹, respectivamente (Tabela 3; Figura 2; ANEXO E) e embora apenas 50% dos explantes cultivados em meio contendo ANA/2iP (T8) tenham enraizado aos 140 dias de cultivo, este valor foi muito superior ao tratamento empregando 2iP isoladamente (30%) (T5) (Tabela 5 e Figura 4). As respostas promovidas pela aplicação do ANA ou de outra auxina em associação com 2iP são escassas na literatura para palmáceas, sendo que seu emprego e atuação são comumente relacionados à indução de embriogênese somática a partir de calos (TISSERAT; DeMASON, 1980) ou à conversão destes em plântulas (TISSERAT; DeMASON, 1980; ESHRAGHI; ZARGHAMI; MIRABDULBAGHI, 2005; STEINMACHER *et al.*, 2007), conforme descritos posteriormente.

Tisserat e DeMason (1980) observaram que explantes de plântulas de tamareira (*Phoenix dactylifera* L.) com 3 mm de comprimento, quando cultivados em meio MS suplementado com ANA (0,54 μ M) em associação com 2iP (14,8 μ M) desenvolveram um ou dois brotos axilares numa freqüência relativamente baixa (5 a 10%) entre 56 e 168 dias de cultivo. Após este período, foi observada a produção de uma a três gemas por transferência, além da ocorrência de brotação em algumas destas gemas, quando isoladas e subcultivadas. Além disso, quando comparado aos explantes de diferentes espécies e cultivares e mantidos sob as mesmas condições de cultivo, a tamareira foi a única a apresentar o desenvolvimento de brotos. Estes resultados são inferiores ao observado em pupunheiras no presente trabalho, visto que, já aos 28 dias de cultivo, os explantes

cultivados no tratamento T8 evidenciaram o desenvolvimento de uma gema adventícia em 10% destes explantes e aos 56, 84, 112 e 140 dias de cultivo, a porcentagem de explantes com gemas adventícias foi, respectivamente 30, 40, 60 e 80%. O número de gemas adventícias por explante foi, em sua maioria, 1 a 2, com somente um explante apresentando três propágulos aos 140 dias de cultivo (ANEXOS A a E).

Os resultados observados por Almeida (1994), evidenciaram que o desenvolvimento de gemas não foi favorecido em explantes de pupunheiras cultivados em meio MS contendo ANA (17,2 μM) em associação com 2iP (9,8 μM), sendo este último, aplicado em concentração muito superior aquela do presente trabalho (0,4 μM).

Conforme mencionado anteriormente, o tratamento contendo a presença isolada do T5 desfavoreceu tanto o desenvolvimento de gemas adventícias, como o de raízes (Tabelas 3 e 5; Figuras 2 e 4; ANEXOS A a E), porém, quando associado ao ANA (T8), houve um elevado incremento no número médio de gemas adventícias por explante observados durante todos os períodos analisados (Tabela 3; Figura 2; ANEXOS A a E). A porcentagem de explantes enraizados (Tabela 5 e Figura 4), bem como o número médio de raízes por explante (Figura 6 a 8 e Tabela 6) também foram superiores ao observado no tratamento que utilizou 2iP isoladamente. O tratamento T8 favoreceu, portanto, o enraizamento, cujas raízes parecem ter promovido o desenvolvimento de propágulos muito provavelmente pela produção de citocininas, contribuindo, dessa maneira, a um balanço endógeno ótimo de auxina/citocinina.

Os tratamentos T3, T4 e T5 não evidenciaram embriões somáticos durante todo o experimento, conforme esperado (ANEXOS F a J), visto que, o balanço auxina/citocinina é normalmente requerido ao desenvolvimento de embriões somáticos (SCHULTHEIS; CHÉE; CANTLIFFE, 1990), além disso, não há relatos na literatura sobre a promoção de embriogênese somática direta com a utilização isolada das citocininas TDZ ou 2iP em palmáceas. Pela via indireta, ou seja, com a precedência de calos, este evento fisiológico é mais comumente observável. Tanto o tratamento T3, como o tratamento T5 não favoreceram o desenvolvimento de gemas adventícias (Tabela 3; Figura 2; ANEXOS A a E) e a embriogênese somática (ANEXOS F a J), porém, o tratamento com a presença isolada do TDZ (T4) mostrou-se o mais eficiente para o desenvolvimento de gemas adventícias (Tabela 3 e Figura 2; ANEXOS A a E) em detrimento ao desenvolvimento de embriões somáticos (ANEXOS F a J). O número de embriões somáticos para

os tratamentos que evidenciaram esta resposta morfogenética foi de um (T6, T7 e T8) a dois (T1) ou um e dois (T2) embriões somáticos por explante aos 140 dias de cultivo (ANEXO J).

Almeida (1994) observou, entretanto o desenvolvimento de embriões somáticos diretamente de gemas isoladas de rizomas originados em explantes de pupunheiras cultivadas *in vitro*. Para tanto, as gemas permaneceram em meio MS suplementado com BAP isoladamente e em concentração superior à utilizada neste trabalho (8,0 μM), cuja resposta morfogênica pôde ser observada após 25 dias de cultivo.

Karun *et al.* (2004) obtiveram excelentes resultados do BAP (20 μM) sobre germinação de embriões somáticos após indução de calos em folhas jovens da palmeira *Areca catechu* L. utilizando picloram em concentrações sucessivamente reduzidas, seguida pela transferência em meio isento de biorreguladores, sobre o qual a embriogênese somática foi evidenciada.

De forma semelhante, o BAP a 2,22 μM , favoreceu o desenvolvimento de embriões somáticos a partir de suspensões celulares de calos secundários obtidos em folhas ou explantes de tamareira germinadas *in vitro*. (*Phoenix dactylifera* L.) (SANÉ *et al.*, 2006). Para a obtenção dos calos primários e secundários, os explantes foram cultivados em meio MS geleificado, acrescido de 2,4-D (9,05 μM). Já, a proliferação de suspensões celulares e indução de embriogênese somática ocorreu em meio MS líquido com as mesmas concentrações de 2,4-D.

Ayub e Gebieluca (2003) evidenciaram embriogênese somática direta a partir de explantes foliares em dois genótipos de café (*Coffea arabica*) com aproximadamente 0,5cm² cultivados em meio MS suplementado com distintas concentrações isoladas de BAP ou TDZ por um período de 55 dias. Os autores observaram maior produção de embriões somáticos para o BAP na menor concentração inicial testada (5,0 μM) nos explantes foliares da cv. IAPAR 59 e para o TDZ a 13,62 μM nos explantes foliares do híbrido Sachimor. O número médio de embriões somáticos desenvolvidos foram 26 e 21, respectivamente e após este período, as concentrações destas citocininas foram reduzidas em 10% e acrescido ANA em diferentes concentrações, proporcionando significativo aumento no número de embriões somáticos.

Hutchinson, Krishnaraj e Saxena (1996) observaram, entretanto, que a utilização do TDZ isoladamente e na mesma concentração utilizada no presente trabalho (0,36 μM), induziu o maior número médio de embriões somáticos (20,8) em hipocótilos de gerânio (*Pelargonium x hortorum*) após 21 dias de cultivo sem a precedência de calos, seguido pelo tratamento suplementado com AIA a 1,0 μM e BAP a 8,0 μM (12,0). Avaliações periódicas dos níveis

endógenos hormonais foram também realizadas, evidenciando que em ambos os tratamentos, os níveis endógenos de auxinas foram elevados, como provável consequência do estímulo da síntese ou pela ação inibitória da conjugação do AIA, além de elevar os níveis de citocininas endógenos.

A análise de regressão para o número médio de embriões somáticos desenvolvidos neste experimento evidenciou uma tendência exponencial para o desenvolvimento destes nos períodos analisados para os oito tratamentos (Figura 3 e Tabela 4).

O tratamento (T1) foi o único a evidenciar embriogênese somática aos 56 dias de cultivo *in vitro*, embora tenha ocorrido em apenas 10% dos explantes, cuja porcentagem manteve-se constante até o término do experimento (140 dias) com dois embriões somáticos observados no único explante que os desenvolveram (ANEXOS F a J). A ocorrência de embriogênese somática em explantes de palmáceas cultivados em meio isento de biorreguladores não foi encontrada na literatura vigente. Conforme mencionado anteriormente, este tratamento também desenvolveu número representativo de gemas adventícias (Tabela 3; Figura 2; ANEXOS A a E), reforçando a probabilidade de que explantes de pupunheiras apresentam níveis endógenos ótimos de citocininas e auxinas requeridas à organogênese direta, porém, em detrimento à embriogênese somática direta.

O tratamento contendo T2 evidenciou embriogênese somática em 10% dos explantes aos 84 dias de cultivo e 20% nos períodos posteriores, valor este bem mais representativo que o observado para o tratamento isento de biorreguladores e apresentou um a dois embriões somáticos por explante (ANEXOS H, I e J). Assim como ocorreu com o tratamento T1, o desenvolvimento de embriões somáticos no tratamento T2 foi desfavorecido em relação ao número médio de gemas adventícias desenvolvidas ao final do experimento (140 dias) (Tabela 3 e Figura 2; ANEXO E).

Embora Guerra, Torres e Teixeira (1999) relatem que o efeito das auxinas no desenvolvimento de embriões somáticos é primariamente inibitório, cuja manifestação pode ser observada nos estádios subseqüentes ao globular, o tratamento contendo a presença isolada de ANA (T2), neste trabalho, evidenciou o desenvolvimento de embriões somáticos completos.

Ayub e Gebieluca (2003) constataram que as auxinas ANA, AIB, AIA e 2,4-D inibiram a embriogênese somática direta em explantes foliares em dois genótipos de café (*Coffea arabica*), cv. IAPAR 59 e híbrido Sachimor. Já Mater (1990) observou a proliferação de embriões somáticos a partir de embriões somáticos originados em calos desenvolvidos em explantes (um

quarto deste explante) de *Phoenix dactylifera* L. Para tanto, o autor induziu a calogênese sobre estes explantes usando concentrações elevadas de 2,4-D (45,24 μM) em ambiente isento de luminosidade, iniciando a embriogênese somática em subculturas destes calos em meio contendo baixa concentração de ANA (0,54 μM) na presença de luz. Avaliando o efeito da proliferação de embriões somáticos a partir daqueles obtidos de calos, o autor verificou que o ANA na mais reduzida concentração testada (0,054 μM) proporcionou o maior número de embriões/embriões somáticos originais (13,00) após três meses (aproximadamente 84 dias) de cultivo. Para o mesmo período, o número de embriões desenvolvidos no presente trabalho foi muito inferior ao observado pelo autor supracitado (2 embriões somáticos, ANEXO H).

Ainda para a tamareira (*P. dactylifera* L.), Asemota, Eke e Odewale (2007) observaram que o ANA a 80,55 μM foi a concentração ótima à obtenção de calos em explantes foliares unipenados da região meristemática apical de plântulas e cultivados em meio pré-estabelecido à espécie.

Aos 140 dias de cultivo, tanto o tratamento T2 como o tratamento T6 evidenciaram apenas 20% dos explantes com embriões somáticos desenvolvidos (ANEXO J). Já, Almeida e Almeida (2006) evidenciaram embriogênese somática direta a partir de células parenquimatosas do mesofilo foliar de explantes de pupunheiras estabelecidas em meio MS acrescido de ANA e BAP nas mesmas concentrações usadas neste trabalho (12,9 μM e 3,55 μM , respectivamente) da 13^a à 16^a semanas (91^o ao 117^o dia) de cultivo. Para tanto, os explantes foram cultivados previamente em meio MS com a presença isolada de BAP a 7,1 μM por dez semanas (70 dias), o qual promoveu a formação de centros meristemáticos ou complexos pré-embriogênicos. Após cultivados em meio MS acrescido de ANA em associação com BAP, os autores observaram a indução de embriões somáticos em 82% dos explantes a partir da polarização dos centros meristemáticos.

Ayub e Gebieluca (2003) evidenciaram maior número médio de embriões somáticos (214) diretamente de explantes foliares de café (*Coffea arabica*) com a utilização de ANA a 0,07 μM e BAP a 0,7 μM após 74 semanas de cultivo (518 dias) quando precedidas pelo cultivo inicial por 55 semanas em meio MS contendo apenas BAP a 7,0 μM em relação às demais concentrações testadas para estes reguladores de crescimento. Novamente pode-se constatar a recalcitrância para palmáceas, particularmente em *B. gasipaes* em seu estabelecimento *in vitro*, visto que, aos 140

dias de cultivo, o valor médio de embriões somáticos para os tratamentos que apresentaram esta resposta morfogênética foi muito reduzido (Tabela 4 e Figura 3).

Hutchinson, Krishnaraj e Saxena (1996) também obtiveram elevado número de embriões somáticos diretamente em explantes cotiledonares de gerânio (*Pelargonium x hortorum* Bailey) cultivados em meio MS suplementado com AIA (1,0 μM) e BAP (8,0 μM). Aos 21 dias de cultivo os autores observaram que 97,5% dos explantes produziram embriões somáticos e número médio de 12 embriões por explante. Avaliações periódicas dos níveis endógenos hormonais foram também realizadas, evidenciando que este tratamento elevou os níveis endógenos de auxinas como provável consequência do estímulo da síntese ou pela ação inibitória da conjugação do AIA, inativando, além de elevar os níveis de citocininas endógenos.

Conforme mencionado, tanto o tratamento T6, como o tratamento T1, responderam favoravelmente ao desenvolvimento de gemas adventícias (Tabela 3; Figura 2; ANEXO E), ficando aquém apenas para os tratamentos T4 e T7 aos 140 dias de cultivo *in vitro*. Pode-se observar que, embora os tratamentos T1 e T6 tenham desenvolvido no último período avaliado o mesmo número médio de gemas adventícias por explante (Tabela 3; Figura 2; ANEXO E), o tratamento contendo ANA em associação com BAP (T6) foi mais eficaz à porcentagem de explantes que desenvolveram embriões somáticos, embora o número destes por explante observados tenha sido inferior ao tratamento isento de biorreguladores (T1) (ANEXO J).

O tratamento T7, em cujo meio de cultura MS foi acrescido o ANA em associação com TDZ, foi o mais favorável à porcentagem de explantes com embriões somáticos (30%) em relação aos demais tratamentos que apresentaram esta resposta morfogênética, embora apenas um embrião somático por explante tenha sido observado. Já a aplicação isolada do TDZ (T4) parece ter inibido o desenvolvimento destas estruturas (ANEXO J), corroborando com os resultados observados por Ayub e Gebieluca (2003). Os autores evidenciaram embriogênese somática direta a partir de explantes foliares de um híbrido de café (*Coffea arábica*) com aproximadamente 0,5cm² cultivados em meio MS suplementado com distintas concentrações de ANA em associação com TDZ após 74 semanas de cultivo e precedida pela manutenção por um período de 55 dias em meio MS contendo a presença isolada de TDZ, também em diferentes concentrações. A melhor resposta final para o desenvolvimento de embriões somáticos foi o tratamento contendo ANA a 0,091 μM em associação com TDZ a 0,908 μM quando cultivados previamente por 55

semanas em meio contendo TDZ isoladamente a 9,08 μM , com o desenvolvimento médio de 139 embriões somáticos neste tratamento.

Moura (2007) observou que o TDZ (1,0 μM) em associação com 2,4-D (9,0 μM) foi favorável ao desenvolvimento de calos contendo áreas meristemáticas, elementos traqueais e alguns pró-embriões em embriões zigóticos excisados de sementes de macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Martius, embora a associação com picloram (9,0 μM) tenha originado muitas estruturas que se assemelham a embriões somáticos. Na fase de regeneração das massas embriogênicas em embriões somáticos, a presença de carvão ativado (3g.L^{-1}) e a ausência do TDZ (1,0 μM) favoreceram consideravelmente o desenvolvimento de estruturas globulares que se assemelham à embriões somáticos (EGSE).

Conforme avaliado anteriormente, o tratamento T7 foi o mais favorável tanto ao número médio de gemas adventícias por explante desenvolvidos ($2,0 \text{ GA.explante}^{-1}$) aos 140 dias de cultivo (Tabela 3; Figura 2; ANEXO E), como à porcentagem de explantes com embriões somáticos evidenciados (30%) (ANEXO J), sugerindo que a introdução exógena desta associação de biorreguladores em explantes de pupunheiras favoreceu o balanço auxina/citocinina endógenos ótimos à estes eventos morfogênicos em relação aos demais tratamentos, principalmente em relação aos níveis auxínicos. De fato, Murthy, Murch e Saxena, 1995 apud Murthy, Murch e Saxena, (1998) relataram que o TDZ promoveu a síntese ‘de novo’ de auxinas em plântulas de amendoim, evento este verificado pelo incremento de IAA citosólico bem como de triptamina. Isto sugere que níveis endógenos ótimos de ANA requeridos à embriogênese somática em explantes de pupunheiras são obtidos com a aplicação exógena do TDZ associado com o ANA (T7).

O tratamento T8, assim como o tratamento T1, não favoreceram a porcentagem de explantes com evidência de embriões somáticos (10%) aos 140 dias de cultivo. O número médio de embriões somáticos por explante em T8 foi, entretanto, inferior ao tratamento (T1) para este mesmo período (ANEXO J). Estes resultados caracterizaram o pior resultado para este evento morfogênico com o emprego de ANA em associação com 2iP (T8) em relação aos demais tratamentos, embora relatos de sucesso à embriogênese somática pela via direta ou indireta seja comumente evidenciada com a utilização do 2iP em associação com ANA, 2,4-D ou picloram.

Ledo *et al.* (2002) obtiveram êxito no desenvolvimento de embriões somáticos diretamente em embriões zigóticos maduros de açazeiro (*Euterpe oleracea*) quando cultivados em meio MS contendo ANA (0,537 μM) em associação com 2iP (12,30 μM) (meio secundário) e precedido

pelo cultivo em meio MS suplementado com 2,4-D a 339,36 μM (meio primário). Após 60 dias de cultivo em meio MS acrescido de 2,4-D (meio primário), os autores verificaram o desenvolvimento de embriões somáticos no estágio globular e, aos 35 dias de cultivo no meio suplementado com ANA e 2iP, observou-se frequência embriogênica média de 86,7 % e média de 16,3 embriões somáticos apresentando progressão para o estágio bipolar aos 150 dias de cultivo. A conversão dos embriões somáticos em microplantas (14,8) ocorreu em um terceiro meio, desprovido de reguladores de crescimento e com as concentrações de sais e sacarose reduzidas pela metade.

Embriões somáticos em distintos estádios de desenvolvimento (embriogênese assincrônica) foram originados diretamente de nós cotiledonares de embriões zigóticos imaturos de palmitreiro (*Euterpe edulis*) quando o meio MS foi acrescido de 2iP (14,8 μM) em associação com 2,4-D (452,4 μM e não suplementados com cálcio aos 140 dias de cultivo (SALDANHA, 2007). Aos 150 dias após a inoculação, o autor verificou para este tratamento, o desenvolvimento de 35 a 65 embriões somáticos.

Steinmacher *et al.* (2007) observaram que a indução de calos embriogênicos em embriões zigóticos maduros de pupunheiras foi favorável na presença do 2iP (5,0 μM) em associação a baixas concentrações de picloram (10 μM) a partir de calos primários induzidos em meio MS suplementado com picloram a 10, 20 ou 40 μM isoladamente ou na presença de 2iP (5 μM). Os autores observaram que o uso do picloram (10 μM) isoladamente também favoreceu a indução de calos embriogênicos.

A conversão de plântulas obtidas a partir de calos embriogênicos desenvolvidos em explantes de plântulas em dois cultivares de tamareiras iranianas (*Phoenix dactylifera* L. cv. Khanizi e Mordarsing) foi favorecida com a utilização de ANA e 2iP em elevadas concentrações (54 μM e 148 μM , respectivamente) (ESHLAGHI; ZARGHAMI; MIRABDULBAGHI, 2005).

Tratamentos contendo a presença isolada das citocininas BAP (T3), TDZ (T4) ou 2iP (T5) não desenvolveram embriões somáticos conforme mencionado, porém, o acréscimo do ANA à esses tratamentos foi essencial ao desenvolvimento destas estruturas (ANEXOS F a J), corroborando com o já conhecido preceito de que, em geral, a embriogênese somática é induzida por auxinas (GUERRA; TORRES; TEIXERA, 1999).

2.5 Considerações finais

- A região basal de microplantas de pupunheiras apresenta elevado potencial à organogênese em detrimento à embriogênese somática.
- O número de gemas adventícias desenvolvidas variou significativamente em função do tratamento e do período de cultivo, enquanto o número de embriões somáticos variou apenas em relação ao período de cultivo, caracterizando um comportamento exponencial para o desenvolvimento destes.
- Uma relação direta para o desenvolvimento de raízes e gemas adventícias foi observada em todos os tratamentos, a exceção daqueles suplementados com TDZ (T4 e T7), nos quais o desenvolvimento radicular foi severamente inibido, evidenciando a necessidade de estudos posteriores aos níveis endógenos do balanço auxina/citocinina em relação à aplicação exógena de biorreguladores.
- O estabelecimento *in vitro* de explantes de pupunheira em meio isento de biorreguladores evidenciou que estes explantes provavelmente apresentam níveis endógenos hormonais ótimos ao balanço auxina/citocinina requeridos à organogênese e embriogênese somática, além de favorecer a porcentagem de explantes com raízes evidentes, alongadas, finas e ramificadas.
- O desenvolvimento de gemas adventícias foi favorecido consideravelmente nos tratamentos com MS básico acrescido de TDZ isoladamente ou associado ao ANA, embora os mesmos tenham inibido o alongamento destas e o desenvolvimento de raízes, e promovido o desenvolvimento de estruturas semelhantes a rizomas na base de alguns explantes. Estes resultados abrem perspectivas a novos estudos envolvendo a remoção posterior do TDZ em favor ao desenvolvimento de raízes e alongamento dos propágulos. Já a embriogênese somática não foi morfológicamente observada com o uso isolado do TDZ, embora o acréscimo do ANA tenha originado a maior porcentagem de explantes com embriões somáticos em relação aos demais tratamentos analisados, sugerindo que níveis

ótimos endógenos de ANA requeridos à embriogênese somática são obtidas com a utilização de ANA em associação com TDZ, na qual este último por si só parece promover um incremento nos níveis endógenos de auxinas.

- A presença isolada das citocininas BAP e 2iP no meio básico não favoreceu o desenvolvimento de gemas adventícias, inibiu a embriogênese somática, exibiu baixa porcentagem de enraizamento dos explantes e reduzido número de raízes, embora alongadas e finas.
- Quando BAP foi associado ao ANA, a porcentagem de explantes com raízes foi consideravelmente elevada, embora pouco favorecimento para esta variável tenha sido observado com o 2iP em associação a esta auxina. Ambos os tratamentos apresentaram bom número de raízes, heterogeneidade quanto ao comprimento, sendo que o tratamento suplementado com ANA e 2iP apresentou comprimento reduzido em relação ao tratamento contendo ANA em associação com BAP e aos demais tratamentos e morfologicamente grossas. Maior número de gemas adventícias e embriões somáticos também foram observados no tratamento contendo ANA em associação com BAP em relação ao tratamento com esta auxina associada à 2iP.
- A utilização de ANA isoladamente favoreceu o enraizamento (porcentagem de explantes enraizados e número de raízes), embora morfologicamente curtas e grossas e a porcentagem de explantes com embriogênese somática direta evidenciada. A média de gemas adventícias por explante apresentou valor intermediário em relação aos demais tratamentos.
- Novos estudos podem ser conduzidos a partir deste em relação à variação dos níveis endógenos do balanço auxina/citocinina quando biorreguladores exógenos são acrescidos aos tratamentos utilizados neste trabalho, bem como a utilização da técnica do ‘pulse’ ou ‘indução de estresse’ a fim de verificar se os padrões morfogenéticos de organogênese e embriogênese somática tornar-se-ão repetitivos ou alterados.

2.6 Conclusões

- Embriões somáticos e gemas adventícias se desenvolveram diretamente nos explantes.
- As citocininas BAP, TDZ e 2iP inibem o desenvolvimento de embriões somáticos de pupunheiras *in vitro*.
- O Meio de cultura MS isento de biorreguladores favorece o enraizamento de pupunheiras *in vitro*, enquanto que a adição de TDZ inibe o seu desenvolvimento.
- O meio de cultura MS com TDZ isolado ou associado à ANA favorece o desenvolvimento de gemas adventícias e a formação de rizomas.
- A adição isolada das citocininas BAP e 2iP ao meio de cultura MS proporciona a formação de poucas raízes, longas e finas nas microplantas.
- A associação ANA/BAP promove o desenvolvimento de elevado número de raízes morfológicamente grossas.
- A adição isolada de ANA ao meio MS proporciona o desenvolvimento de raízes curtas e grossas em microplantas de pupunheiras. Quando com 2iP associado à esse meio de cultura, observa-se a diminuição do número de raízes com as mesmas características morfológicas.

Referências

- ALMEIDA, M. **Emprego da Cultura “in vitro” para multiplicação vegetativa em pupunha (*Bactris gasipaes* H.B.K.)** Palmae. 1994. 121p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biocências – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1994.
- ALMEIDA, M., ALMEIDA, C.V. Somatic embryogenesis and *in vitro* plant regeneration from pejibaye adult plant leaf primordial. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.9, p.1449-1452, 2006.
- ALMEIDA, M.; KERBAUY, G.B. Micropropagation of *Bactris gasipaes* H.B.K. (Palmae) through flowers bud culture. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Lavras, v.8, p.215-217, 1996.
- ALQUINI, Y.; BONA, C.; BOERGER, M.R.T., COSTA, C.G.; BARROS, C.F. Epiderme. In: APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S.M. (Ed.) **Anatomia vegetal**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2006. 438p.
- ASEMOTA, O.; EKE, C.R.; ODEWALE, J.O. Date palm (*Phoenix dactilifera* L.) *in vitro* morphogenesis in response to growth regulators, sucrose and nitrogen. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.6, n.20, p.2353-2357, 2007.
- AYUB, R.A.; GEBIELUCA, A.N. Embriogênese somática em genótipos de café (*Coffea arabica*) é citocinina dependente. **Exact Soil Science, Agricultural Science Engineering**, Ponta Grossa, v.9, n.2, p.25-30, 2003.
- BATAGIN, K.D. **Análise anátomo-fisiológicas de folhas de pupunheiras cultivadas *in vitro*, *ex vitro* e *in vivo* visando otimizar o protocolo de aclimatização**. 2008. 107p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.
- BLAKESLEY, D. Update and metabolismo of 6-benzyladenine in shoots cultures of *Musa* and *Rhododendron*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.25, n.1, p.69-74, 1991.
- BORGES JÚNIOR, N.; SOBORSA, R.C.; MARTINS-CODER, M.P. *In vitro* multiplication of black wattle (*Acacia mearnsii* De Wild.) axillary buds. **Revista Árvore**, Viçosa, v.28, n.4, p.493-498, 2004.
- BOVI, M.L.A. Palmito pupunha-informações básicas para o cultivo. In: FURIA, L.R.R. (Ed.). **Encontro sobre produção de palmito**, Piracicaba, CALQ/Departamento de Agricultura, 1993. p.12-23.
- BOVI, M.L.A.; MARTINS, C.C.; SPIERING, S.H. Desidratação de sementes de quatro lotes de pupunheira: efeito sobre a germinação e vigor. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, n.1, 109-112, 2004.

BRUNNER SCUTI, M. Propagação vegetativa da guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* BERG.) *in vitro* e por estaquia. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.1, n.1-2, p.75-82, 2000.

CENTELLAS, A.Q.; FORTES, G.R.L.; MÜLLER, N.T.G.; ZANOL, G.C.; FLORES, R.; GOTTINARI, R.A. Efeito das auxinas sintéticas no enraizamento *in vitro* da macieira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n.2, p.181-186, 1999.

CARVALHO, D.C.; BIASI, L.A.; TELLES, C.A. Organogênese do caquizeiro ‘Fuyu’ a partir de ápices meristemáticos. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.10, n.3, p.303-307, 2004.

CASTRO, P.R.C.; KLUGE, R.A.; PERES, L.E.P. **Manual de fisiologia vegetal: teoria e prática**. Piracicaba: Editora Agronômica Ceres, 2005. 650p.

CLEMENT, C.R.; MANSCHARDT, R.M. A review of the importance of spines for pejobaye heart-of-palm production. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.83, p.11-23, 2000.

DZAZIO, P.M.; BIASI, L.A.; ZANETTE, F. Micropropagação do porta-enxerto de videira ‘420-A’. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24, n.3, p.759-764, 2002.

ESHRAGHI, P.; ZARGHAMI, R.; MIRABDULBAGHI, M. Somatic embryogenesis in two iranian date palm cultivars. **African Journal of Biotechnology**, Nairóbi, v.4, n.11, p.1309-1312, 2005.

EMBRAPA. Núcleo Tecnológico para Informática. **SOC – Software Científico**. Campinas, 1990.

FERREIRA, S.A.N.; SANTOS, L.A. Viabilidade de sementes de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth). **Acta Amazônica**, Manaus, v.22, p.303-307, 1992.

FERREIRA, V. L. P.; GRANER, M.; BOVI, M.L.A.; DRAETTA, I.S.; PASCHOALINO, J.E.; SHIROSE, I. Comparação entre os palmitos de *Guilielma gasipaes* Bailey (pupunha) e *Euterpe edulis* Mart. (juçara). I. Avaliações físicas, organoçépticas e bioquímicas. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.12, n.1, p.255-272, 1982.

FLORES, R.; NICOLOSO, F.T.; MALDANER, J. Propagação rápida de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken utilizando thidiazuron. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.9, n.1, p.1-7, 2007.

FURTADO, C.M.; CARVALHO, J.M.F.C.; CASTRO, J.P.; SILVA, H. Comparação da frequência de regeneração *in vitro* do amendoim (*Arachis hipogaea*), utilizando diferntes citocininas. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, João Pessoa, v.7, n.1, 2007.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCT/EMBRAPA-CNPq, 1990. p.99-169.

GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. **Apostila de biotecnologia**: Introdução ao conceito de biotecnologia. LFDGV/CCA – UFSC: D.A. Steinmacher, 2006. 41p. (Material de Apoio). Disponível em: <<http://www.cca.ufsc.br/ldfvgv/Apostila%20Biotecnologia.pdf>>. Acesso em: 30 set. 2007.

GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S., BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CBAB, 1999. v.2, p.533-568, 1999. 862p.

GUIDOLIN, A.F. **Regeneração de plantas de *Phaseolus vulgaris* L. a partir de calos e transformação genética via *Agrobacterium***. 2003. 100p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

HANDRO, W.; FLOH, E.I.S.; Aspectos básicos do controle da morfogênese *in vitro*. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCT/EMBRAPA-CNPq, 1990. p.203-212.

HU, C. Y.; WANG, P.J. Techniques for propagation and breeding. In: EVANS, D.A., SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. (Ed.). **Handbook of plant cell culture**. New York: MacMillan, 1983. p.177-277.

HUTCHINSON, M.J.; KRISHNARAJ, S.; SAXENA, P.K. Morphological and physiological changes during thidiazuron-induced somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium x hortorum* Bailey) hypocotyl cultures. **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v.157, n.4, p.440-446, 1996.

KARUN, A.; SIRIL, E.A.; RADHA, E.; PARTHASARATHY, V.A. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from leaf and inflorescence explants of arecanut (*Areca catechu* L.). **Current Science**, Bangalore, v.86, n.12, p.12-25, 2004.

KERBAUY, G.B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara, 2004. 452p.

LEDO, A.S.; GOMES, K.K.P.; BARBOZA, S.B.S.C.; VIEIRA, G.S.C.; TUPINAMBÁ, E.A.; ARAGÃO, W.M. Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos e aclimatização de plântulas de coqueiro-anão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.24, n.2, p.147-154, 2007.

LEDO, A.S.; LAMEIRA, O.A.; BENBADIS, A.K.; MENEZES, I.C.; LEDO, C.A.S.; OLIVEIRA, M.S.P. Cultura *in vitro* de embriões zigóticos de açaizeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.3, p.468-472, 2001.

LEDO, A.S.; LAMEIRA, O.A.; BENBADIS, A.K.; MENEZES, I.C.; OLIVEIRA, M.S.P.; FILHO, S.M. Somatic embryogenesis from zygotic embryos of *Euterpe oleracea* Mart. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24, n.3, p.601-603, 2002.

LIMA, M.M.; GONÇALVES, A.N. Efeito do thidiazuron na multiplicação *in vitro* de gemas de um clone de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus tereticornis*. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n.53, p.49-56, 1998.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings International Plant Propagators Society**, Seattle, v.30, p.421-427, 1980.

LORENZI, H.; SOUZA, H.M.; MEDEIROS-COSTA J.T.; CERQUEIRA, L.S.C.; FERREIRA, E. **Palmeiras Brasileiras e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: Plantarum, 2004. 432p.

MATER, A.A. Effect of auxin-cytokinin interaction on micropropagation of date palm. **Agricultural Science**, Ponta Grossa, v.2, p.211-223, 1990.

MELO, B.; PINTO, J.E.B.P; LUZ, J.M.Q.; PEIXOTO, J.R.; JULIATTI, F.C. Efeitos de ANA e AIB *in vitro* no enraizamento e crescimento da parte aérea da plântula da guarirobeira [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.]. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.17, n.1, p.49-59, 2001.

MOK, M.C.; MOK, D.W.S.; TURNER, J.E.; MUJER, C.V. Biological and biochemical effects of cytokinin-active phenylurea derivatives in tissue culture systems. **Hortscience**, Alexandria, v.22, p.1194-1197, 1987.

MORA URPI, J. Consideraciones sobre el futuro del mercado internacional. In: MORA URPI, J.; ECHEVERRÍA, J. G. (Ed.). **Palmito de pejibaye (*Bactris gasipaes* KUNTH.)**: su cultivo y industrialización. San José: Universidad de Costa Rica, cap.9, p.212-215, 1999.

MORA-URPI, J.; WEBER, J.C.; CLEMENT, C.R. **Peach palm. *Bactris gasipaes* Kunth. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops.20**. Roma: International Plant Genetic Resources Institute. 1997. 83p.

MOURA, E.F. **Embriogênese somática em macaúba: indução, regeneração e caracterização anatômica**. 2007. 66p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

MURASHIGE, T., SKOOG, F.: A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Plant Physiology**, Rockville, v.15, p.473-497, 1962.

MURTHY, B.N.S.; MURCH, S.J.; SAXENA, P.K. Thidiazuron: a potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Berlin, v.34, p.267-275, 1998.

PERES, L.E.P. Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. **Biociência e Desenvolvimento**, Brasília, n.25, p.44-48, 2002.

PERES, L.E.P.; MERCIER, H.; KERBAUY, G.B.; ZAFFARI, G.R. Níveis endógenos de AIA, citocininas e ABA em uma orquídea acaule e uma bromélia sem raiz, determinados por HPCL e ELISA. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Lavras, v.9, n.3, p.169-176, 1997.

PEREIRA, F.D.; PINTO, J.E.B.P.; CARDOSO, M.G.; LAMEIRA, O.L. Propagação *in vitro* de chapéu-de-couro (*Echinodorus cf. scaber* Rataj), uma planta medicinal. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, p.74-80, 2000.

RUBIN, S.; LIMA, C.S.M.; BANDEIRA, J.M.; RIBEIRO, M.V.; BENITZ, L.C.; PETERS, J.A.; BRAGA, E.J.B. Reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de *Thymus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, supl.2, p.480-482, 2007.

SALDANHA, C.W. Conservação *in vitro* de *Euterpe edulis* Martius através da embriogênese somática. 2007.108p. Dissertação (Mestrado em geomática) – Universidade Federal de Santa Catarina, Rio Grande do Sul, 2007.

SANÉ, D.; ABERLENC-BERTOSI, F.; GASSAMA-DIA, Y.K.; SAGNA, M.; TROUSLOT, M.F.; DUVAL, Y.; BORGEL, A. Histocytological analysis of callogenesis and embryogenesis from cell suspensions of date palm (*Phoenix dactylifera*). **Annals of Botany**, Oxford, vol. 98, p.301-308, 2006.

SANTARÉM, E.R.; ASTARITA, L.V. Multiple shoot formation in *Hypericum perforatum* L. and hypericin production. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Pelotas, v.15, n.1, p.43-47, 2003.

SCHULTHEIS, J.R.; CHÉE, R.P.; CANTLIFFE, D.J. Embriões somáticos e sementes sintéticas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCT/EMBRAPA-CNPQ, 1990. p.226-249.

SILVA JÚNIOR, J.M. [*Etiligera elatior* (Jack) R. M. Smith]: propagação *in vitro*, anatomia e obtenção de protoplastos. 2007. 104p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

SKOOG, F.; MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. In: PORTER, K.H. (Ed.). The biological action of growth substances. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, Cambridge, v.11, p.118-131, 1957.

SOARES, F.P.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A.A.; NOGUEIRA, R.C.; EMRICH, E.B.; MARTINOTTO, C. Organogênese direta em explantes caulinares de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.31, n.4, p.1048-1053, 2007.

SOMMER, H.E.; CALDAS, L.S., *In vitro* methods applied to forest trees. In: THORPE, T.A. (Ed.). **Plant tissue culture: methods and applications in agriculture**. New York: Academic Press, p.349-358.

SRIVASTAVA, L. **Plant growth and development – hormones and environment**. SanDiego: Academic Press, 2002. 772p.

STEINMACHER, D.A.; CAGAHUALA-INOCENTE; G.C.; CLEMENT, C.R.; GUERRA, M.P. Somatic embryogenesis from peach palm zygotic embryos. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Berlin, v.43, n.2, p.124-132, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 719p.

TISSERAT, B.; DeMASON, E.A. A histological study of development of adventive embryos in organ cultures of *Phoenix dactylifera* L. **Annals of Botany**, Oxford, v.46, p.465-472, 1980.

TISSERAT, B.; DeMASON, E.A. Occurrence and histological structure of offshoots and inflorescences produced from *Phoenix dactylifera* L. plantlets *in vitro*. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, New York, v.112, n.1, p35-42, 1985.

TOMLINSON, P.B. **Anatomy of the monocotyledons. II. Palmae**. London: Oxford University Press, 1961. 453p.

_____. Essays on the morphology of palms. VII. A digression about spines. **Principes**, Lawrence, v.6, p.44-52, 1962.

VALVERDE, R.; GÓMES, L.; ARIAS, O.; THORPE, T. Respuesta morfogenética de los ápices de pejibaye (*Bactris gasipaes* H.B.K.) cultivados *in Vitro* en condiciones de luz y oscuridad. **Agronomía Costarricense**, San Jose, v.11, n.1, p.97-102, 1987.

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DA PARTE AÉREA DE MICROPLANTAS DE PUPUNHEIRAS SUBMETIDAS À DISTINTOS BIORREGULADORES.

Resumo

Resultados satisfatórios têm sido obtidos à propagação de pupunheiras com o emprego da técnica *in vitro*, porém, o protocolo para multiplicação maciça necessita ser otimizado, pois trata-se de uma espécie recalcitrante que responde de maneira distinta aos biorreguladores. Neste contexto, explantes de microplantas foram cultivadas em meio de cultura previamente estabelecido à espécie (meio básico), sendo que os tratamentos se diferenciaram pelo acréscimo de distintas fontes de biorreguladores em concentrações fixas. Os tratamentos consistiram em: meio básico (MS) isento de biorreguladores (controle); meio básico acrescido de auxina (ANA) e citocininas: BAP, TDZ e 2iP isoladamente e meio básico suplementado com ANA em associação com as citocininas. A cada 28 dias, num período de 140 dias, foram aferidos: o comprimento e a taxa de crescimento da parte aérea, o número de folhas desenvolvidas e a ocorrência de oxidação nos explantes. Todos os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado. Os dados qualitativos foram apresentados como porcentagens e médias gerais e os dados quantitativos foram submetidos à análise de regressão polinomial e exponencial. O melhor desenvolvimento de microplantas e explantes de pupunheiras ocorreu em meios de cultura isentos de biorreguladores ou em meio constituído pela associação ANA/TDZ aos 140 dias de cultivo, sendo que o acréscimo isolado das citocininas BAP, TDZ e 2iP no meio de cultura MS promoveu tardiamente a taxa máxima de crescimento. A adição isolada do 2iP no meio de cultura promoveu intensa oxidação nas primeiras folhas desenvolvidas das microplantas e explantes de pupunheiras e a aplicação isolada do TDZ ou associado à ANA promoveu anomalias como dobramento foliar e desenvolvimento de acúleos.

Palavras-chave: Pejibaye; Reguladores de crescimento; Micropropagação

CHAPTER 3

MORPHOPHYSIOLOGICAL EVALUATION OF AERIAL PART OF PEJIBAYE MICROPLANTS TREATED WITH DIFFERENT BIOREGULATORS

Abstract

Satisfactory results have been obtained for the propagation of pejibaye using the *in vitro* technique; however, for mass multiplication the protocol needs to be optimized, because it is a recalcitrant species and responds differently to bioregulators. In this context, the microplant explants were cultured in medium that was previously established to this species (basic medium), and the treatments were differentiated by the addition of different sources of bioregulators in stated concentrations. The treatments consisted of basic medium (MS) bioregulator-free (control); basic medium plus auxin (NAA) and cytokinins, isolated BAP, TDZ and 2iP; and basic medium supplemented with NAA in combination with cytokinins. Every 28 days, on a total period of 140 days, were measured: the shoot length and rate of growth, the number of developed leaves and the occurrence of oxidation in explants. All experiments were conducted in a randomized design. Qualitative data were presented as percentages and general averages, and quantitative data were submitted to polynomial and exponential regression analysis. The best development of pejibaye microplants and explants occurred in bioregulator-free medium or in medium with NAA/TDZ association, at 140 days of cultivation, also the addition of isolated cytokinin BAP, 2iP and TDZ in the MS culture medium later promoted the highest rate of growth. The addition of isolated 2iP in culture medium promoted intense oxidation of the pejibaye microplants and explants first developed leaves and the application of isolated TDZ or in association with NAA promoted anomalies such as leaf folding and thorn development.

Keywords: Pejibaye, Plant growth regulators, Micropropagation

3.1 Introdução

Numerosas pesquisas vêm sendo realizadas com a espécie *Bactris gasipaes* Kunth. abrangendo fisiologia (OLIVEIRA *et al.*, 2005), fitopatologia (PIZZINATTO *et al.*, 2001; SANTOS *et al.*, 2004), trato cultural (ALVES JR. *et al.*, 2005) e propagação vegetativa *in vitro* (ALMEIDA, 1994; ALMEIDA; KERBAUY, 1996; ALMEIDA; ALMEIDA, 2006; STEINMACHER; CLEMENT; GUERRA, 2007). Não obstante, sob o ponto de vista da propagação maciça *in vitro* da pupunheira, novas pesquisas são necessárias visando otimizar o protocolo de micropropagação desta espécie, visto que as palmeiras, em geral, são recalcitrantes (FERREIRA; SANTOS, 1992; BOVI, 1993; BOVI; MARTINS; SPIERING, 2004) e tendem a responder diferentemente às formulações dos meios de cultura, principalmente aos reguladores de crescimento. A qualidade da parte aérea é fator determinante ao sucesso do enraizamento (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990), onde o reduzido desenvolvimento desta é acompanhado por um crescimento lento das raízes e o crescimento rápido é fonte de intensa produção de auxinas e demais fatores de enraizamento, os quais estimulam a rizogênese pelo translocamento para a base (SANTANA; TEIXEIRA; GOMES, 2003).

Distintos eventos fisiológicos podem ser desencadeados com o acréscimo de biorreguladores, como a promoção ou inibição do crescimento da parte aérea e desenvolvimento de folhas, afetando sobremaneira, a aclimatização desta espécie. De acordo com Schultheis, Chée e Cantliffe (1990), o balanço auxina/citocinina, além de promover a formação de raízes, favorece o desenvolvimento de parte aérea.

Em palmáceas, tem sido observado que níveis mais elevados da auxina ANA (ácido naftalenoacético) em relação à citocinina BAP (6-benzilaminopurina) favorecem consideravelmente o comprimento médio da parte aérea de ápices caulinares de pupunheiras (ALMEIDA, 1994), de embriões zigóticos maduros de açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) (LEDO *et al.*, 2001) e de embriões zigóticos de coqueiro-anão (*Cocos nucifera* L.) cultivados em meio de enraizamento Y3 (EEUWENS, 1976) (LÉDO *et al.*, 2007).

Eventualmente, em algumas espécies, o acréscimo isolado de ANA em baixas concentrações favorece o alongamento da parte aérea e o desenvolvimento de elevado número de folhas (PRAXEDES *et al.*, 2001; RUBIN *et al.*, 2007). Não foram encontrados registros na literatura abordando a utilização do ANA isolado sobre o número de folhas desenvolvidas em explantes de palmáceas cultivadas *in vitro*.

Almeida (1994) observou que ápices caulinares de pupunheiras cultivados em meio MS suplementados com ANA isoladamente e em concentrações superiores a 10,74 μM após cultivo prévio em meio suplementado com BAP (8,0 μM), desfavoreceu o desenvolvimento de gemas em favor à formação de raízes e ao crescimento da parte aérea. Quando ápices caulinares foram isolados de microplantas cultivadas em meio isento de reguladores de crescimento o comprimento da parte aérea foi severamente comprometido após cultivados na presença isolada desta auxina. O autor evidenciou, ainda, que a presença isolada do ANA não favoreceu o crescimento da parte aérea em embriões zigóticos excisados da semente desta espécie e cultivados no respectivo meio. Santana e Teixeira (2004) também verificaram elevado crescimento da parte aérea de embriões zigóticos de coqueiro (*Cocos nucifera* L.) cultivados em meio Y3 de Eeuwens (1976) na presença isolada de ANA.

Saldanha (2007) analisando diferentes concentrações de sacarose e de sais de MS na germinação *in vitro* de embriões zigóticos imaturos de palmitreiro (*Euterpe edulis* Mart.) sem a presença de reguladores de crescimento, observou que utilizando 100% dos sais de MS e 30g.L⁻¹ de sacarose favoreceu a altura média destes, embora resultados mais satisfatórios tenham sido observados com 40 g.L⁻¹ de sacarose.

Em *B. gasipaes* Kunth., o desenvolvimento da parte aérea foi favorecido em ápices caulinares quando cultivados em meio isento de reguladores de crescimento em relação aos demais tratamentos, sendo inferior apenas ao tratamento contendo ANA em associação ao BAP (ALMEIDA, 1994).

Avaliações da atuação do BAP no desenvolvimento de folhas em espécies cultivadas *in vitro* têm sido reportadas freqüentemente em relação às concentrações empregadas, cujo incremento nestas promove respostas desfavoráveis (DZAZIO; BIASI; ZANETTE, 2002; VILLA *et al.*, 2005) além de promover tamanhos e formas atípicos (PEREIRA *et al.*, 2000). A aplicação isolada do BAP favoreceu o desenvolvimento de maior número de folhas por explante em relação ao emprego de ANA, porém, o alongamento de brotos ou explantes também podem ser fortemente inibidos na presença isolada desta citocinina (RUBIN *et al.*, 2007). Elevadas concentrações do BAP, entretanto, já foram reportadas como promotora do desenvolvimento de maior número médio de folhas em segmentos nodais de chapéu-de-couro (*Echinodorus cf. scaber* Rataj) em detrimento a utilização de concentrações mais reduzidas (PEREIRA *et al.*, 2000).

A presença isolada do BAP em cultura de ápices caulinares de pupunheira após cultivo prévio em meio desprovido de reguladores de crescimento, promoveu bom crescimento médio da parte aérea, seguido pelo 2iP, ANA e GA₃, embora as melhores respostas ao estímulo do crescimento tenha ocorrido com a associação BAP/ANA, num balanço favorável à auxina, conforme supracitado (ALMEIDA, 1994). De forma semelhante, o autor verificou bom crescimento da parte aérea de embriões zigóticos quando na presença isolada deste regulador de crescimento.

O TDZ (thidiazuron; N-fenil-N'-1,2,3-tiadiazol-5,1-uréia) é um composto pertencente à classe das tiadiazolurêias (MOK *et al.*, 1982) que apresenta atividade citocínica, promotora do rápido crescimento em campo devido à sua atuação nas divisões celulares (ANTUNES; RASEIRA, 2006), embora o seu emprego *in vitro* tenha desfavorecido o alongamento de brotos (LIMA; GONÇALVEZ, 1998; CORDEIRO DE SOUSA *et al.*, 2000; FLORES; NICOLOSO; MALDANER, 2007) e promovido o crescimento anormal de folhas em brotações de macieira na presença isolada desta citocinina (NIEUWKERK; ZIMMERMAN, 1986).

O uso isolado da citocinina 2iP promoveu um desenvolvimento reduzido no número de folhas em segmentos nodais de marmeleiro japonês (*Chaenomelis japonica*) cv. Andramig (FIGUEIREDO *et al.*, 2008) e a oxidação de segmentos nodais de brotações novas de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) cv. Delite (SILVA *et al.*, 2006), embora tenha promovido o crescimento da parte aérea de embriões zigóticos e ápices caulinares de pupunheiras cultivados na presença isolada deste regulador de crescimento, sendo que este último explante foi previamente cultivado em meio desprovido de reguladores de crescimento (ALMEIDA, 1994).

Não há registros na literatura vigente abordando a atuação do ANA em associação com TDZ ou 2iP sobre o crescimento da parte aérea e desenvolvimento foliar em palmáceas, bem como avaliações do efeito dos biorreguladores sobre a taxa de crescimento médio da parte aérea. Da mesma forma, não foram encontrados relatos sobre a atuação do TDZ isoladamente para o número de folhas desenvolvidas.

Neste contexto, o trabalho tem por objetivo avaliar por meio de análises morfofisiológicas, o desenvolvimento da parte aérea de microplantas submetidas a tratamentos com biorreguladores.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Local de realização do experimento

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas, no Departamento de Ciências Biológicas, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), Piracicaba-SP.

3.2.2 Material vegetal

Foram utilizadas 80 microplantas de pupunheiras inermes (*Bactris gasipaes* Kunth.-Arecaceae) desenvolvidas a partir da germinação *in vitro* de embriões excisados de sementes provenientes de Yurimáguas, Amazônia Peruana em meio constituído por sais de Murashige e Skoog (1962), isento de biorreguladores.

Para a obtenção dos explantes, foram selecionadas microplantas em estágio de desenvolvimento padronizados, com a parte aérea medindo aproximadamente 8,0 cm, contendo duas ou três folhas com duas pinas expandidas, sem propágulos evidentes e sistema radicular presente. Em câmara de fluxo laminar, removeram-se as raízes e partes aéreas das microplantas, preservando apenas o meristema apical e a base caulinar, com tamanho variando entre 1,0 e 2,5 cm (Figura 1) e cultivados em tubos de ensaio (150 x 25 mm) contendo 5 ml dos meios de cultura específicos aos tratamentos empregados.

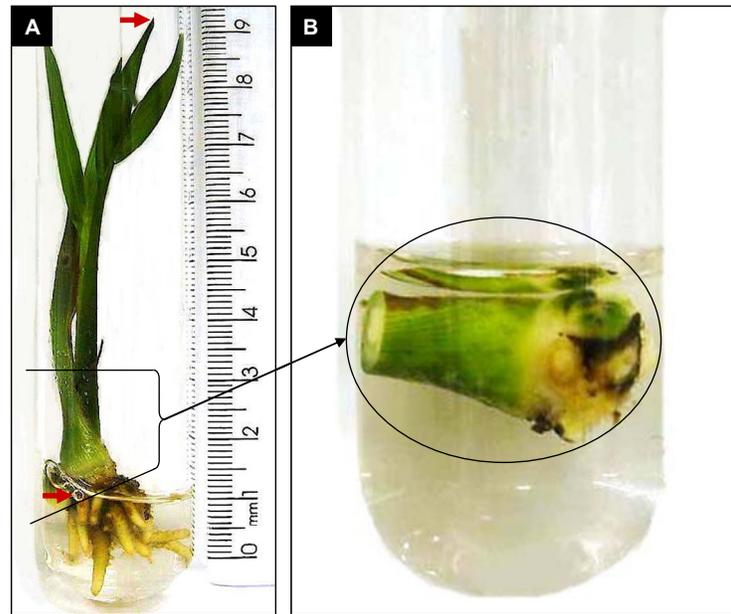


Figura 1 - A. Microplanta de *B. gasipaes* utilizada para obtenção do explante. As setas pretas contínuas delimitam a região de excisão das raízes e parte aérea, preservando apenas o meristema apical e base caulinar. Setas vermelhas = extremos utilizados à mensuração do comprimento da parte aérea. B. Explante excisado da microplanta e cultivado no meio específico aos tratamentos utilizados

3.2.3 Meios de cultura e condições de cultivo

Os explantes caulinares excisados foram cultivados em meio de cultura pré-definido para o cultivo *in vitro* desta espécie (ALMEIDA, 1994) constituído por sais minerais de Murashige e Skoog (1962) acrescido de sacarose (30g.L^{-1}), mioinositol (100 mg.L^{-1}) e tiamina (5 ml.L^{-1}) (meio básico), com os tratamentos diferenciados pelo acréscimo de ANA, BAP, TDZ e 2iP isoladamente ou combinados ao ANA, constituindo oito tratamentos conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1- Concentrações e combinações de biorreguladores utilizados nos tratamentos

Biorreguladores	Tratamentos (μM)							
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
ANA	-----	12,9	-----	-----	-----	12,9	12,9	12,9
BAP	-----	----	3,55	-----	-----	3,55	-----	-----
TDZ	-----	----	-----	0,36	-----	-----	0,36	-----
2iP	-----	-----	-----	-----	0,4	-----	-----	0,4

A concentração de sais (MS) foi a mesma em todos os tratamentos, sendo que o pH dos meios de cultura foram ajustados para 5,8 antes da autoclavagem a 120° C e 1,2 atm durante 20 minutos.

Os explantes foram cultivados nos respectivos tratamentos e mantidos em sala de crescimento com temperatura e luminosidade controladas [$25 \pm 2^\circ \text{C}$; irradiância de $42 \mu\text{mol.s.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de radiação fotossinteticamente ativa (PAR), respectivamente] em fotoperíodo de 16 horas. Os meios de cultura foram renovados a cada 28 dias.

3.2.4 Coleta de dados

3.2.4.1 Avaliações morfofisiológicas

As coletas de dados foram executadas respeitando-se o período inicial, ou seja, período zero, pois nesta fase, nenhuma estrutura referente às avaliações estavam presentes. Dessa forma, considera-se que os dados foram avaliados em 6 períodos: 0, 28, 56, 84, 112 e 140 dias.

3.2.4.1.1 Comprimento da parte aérea

A avaliação do comprimento da parte aérea dos explantes submetidos aos tratamentos foi efetuada com régua milimetrada aos 0, 28, 56, 84, 112 e 140 dias de cultivo. A medida compreendeu a região proximal da base caulinar até o ápice da folha com duas pinas expandidas e com maior comprimento (Figura 1), cujos dados foram expressos em cm.explante^{-1} .

3.2.4.1.2 Taxa de crescimento da parte aérea

A taxa de crescimento absoluto em altura da parte aérea nos tratamentos foi avaliada aos 0, 28, 56, 84, 112 e 140 dias de cultivo e expressas em $\% \text{cm.dia}^{-1}.\text{explante}^{-1}$

3.2.4.2 Avaliações morfofisiológicas foliares

3.2.4.2.1 Número de folhas

As folhas desenvolvidas nos explantes submetidos aos tratamentos supracitados (item 3.2.3) foram contadas aos 0, 28, 56, 84, 112 e 140 dias de cultivo.

3.2.4.2.2 Oxidação

A oxidação dos explantes submetidos aos tratamentos (item 3.2.3) foi analisada aos 0, 28, 56, 84, 112 e 140 dias de cultivo e quantificado segundo o grau de oxidação observado, classificado em: baixo, moderado ou elevado.

3.2.5 Delineamento estatístico

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com parcelas subdivididas no tempo em arranjo bifatorial (8 x 6), ou seja, oito dosagens de biorreguladores e seis períodos de coleta de dados. Cada tratamento consistiu de dez repetições, com um explante em cada tubo de ensaio, perfazendo 80 explantes no total do experimento.

Os dados qualitativos (presença/ausência de oxidação) foram apresentados em porcentagens e médias gerais, e os dados quantitativos (comprimento da parte aérea, taxa de crescimento e número de folhas) foram submetidos à análise de variância (ANOVA) ($p < 0,01$ e $p < 0,05$), seguido pela regressão polinomial ou exponencial, utilizando o pacote estatístico SOC (EMBRAPA, 1990). A taxa de crescimento da parte aérea (TCPA) foi efetuada segundo a equação 1 onde CP_2 representa o comprimento final (cm), CP_1 o comprimento inicial (cm), P_2 o período final e P_1 o período inicial para cada explante por tratamento em cada período analisado.

$$TCPA = \frac{CP_2 - CP_1}{P_2 - P_1} \times 100 \quad (1)$$

Posteriormente calculou-se uma média final da taxa de crescimento para os oito tratamentos aos 28, 56, 84, 112 e 140 dias de cultivo e efetuou-se regressão exponencial para estes dados.

3.3 Resultados

3.3.1 Avaliações morfofisiológicas

A análise de variância evidenciou que houve interação significativa referente tanto ao comprimento como à taxa de crescimento da parte aérea e número de folhas, quando submetidas aos tratamentos com reguladores de crescimento em relação aos períodos de cultivo (Tabela 2).

Tabela 2 – Análise de variância para as variáveis CPA, TCPA e NF em função dos tratamentos (REG) e período de análise (PER) nos explantes de microplantas de *B. gasipaes* cultivados *in vitro*

Causas da Variação	GL	Quadrado Médio		
		CPA ⁽¹⁾	TCPA ⁽²⁾	NF ⁽³⁾
		(cm expl. ⁻¹)	(% cm dia ⁻¹ expl. ⁻¹)	(expl. ⁻¹)
REG	7	0,02808 **	0,52051 **	0,00437 *
Subparcela	72	0,00592 **	0,16028 ^{ns}	0,00150 **
PER	5	0,38257 **	7,66395 **	0,11680 **
REG X PER	35	0,00242 **	0,43817 **	0,00090 **
Resíduo	360	0,00086	0,15743	0,00045
Média	–	5,27	4,64	0,89
CV (%)	–	13,62	32,76	19,53

^{ns} valor de F não significativo em nível de 5% de probabilidade de erro.

* e ** valor de F significativo em nível de 5% e 1% de probabilidade de erro, respectivamente.

⁽¹⁾ dados transformados por $(n/100)^{0,5}$, ⁽²⁾ dados transformados por $(n^2/100)^{0,5}$ e ⁽³⁾ dados transformados por $[(n+0,5)/100]^{0,5}$ pelo teste de Lilliefors a 5% de probabilidade de erro. *n* = dado amostrado.

GL = graus de liberdade, CV = coeficiente de variação, expl. = explante.

3.3.1.1 Comprimento da parte aérea

Em relação à variável comprimento da parte aérea, observou-se que, aos 140 dias de cultivo, os tratamentos que apresentaram os maiores resultados por explante foram T1 e T4 (0 e TDZ, respectivamente), seguido pelo T3 (BAP) e T7 (ANA/TDZ) (Tabela 3). A análise de regressão polinomial evidenciou o mesmo comportamento, porém, com uma discreta tendência para a redução do comprimento médio da parte aérea por explante para o tratamento T3 (BAP), colocando-o numa posição abaixo do tratamento T7 (ANA/TDZ) (Figura 2).

As piores respostas para este evento fisiológico aos 140 dias foram observadas para o tratamento T2 (ANA), com média 7,8 cm por explante e para o tratamento T8 (ANA/2iP), cuja média atingiu 6,74 cm por explante. Os demais tratamentos evidenciaram crescimento médio de 8,66 e 8,34 cm por explante quando submetidos ao tratamento T2 (ANA/BAP) e T5 (2iP), respectivamente (Tabela 3 e Figura 2).

Assim como foi observada a presença de acúleos nos propágulos desenvolvidos em alguns explantes cultivados nos tratamentos T4 (TDZ) e T7 (TDZ/ANA) (Capítulo 2; 2.3.1.1.), evidenciou-se que nestes explantes, os acúleos se distribuíram da bainha foliar ao longo de todo o pecíolo das folhas desenvolvidas e, por vezes, nas lâminas foliares (Figura 3).

Tabela 3 – Médias reais para o comprimento da parte aérea (cm.explante⁻¹) em explantes de microplantas de *B. gasipaes* cultivados *in vitro* em função dos tratamentos nos períodos de avaliação

Período (dias)	Tratamentos							
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
0	2,08	1,45	1,41	1,34	1,25	1,90	2,00	1,47
28	2,56	1,88	1,73	2,21	1,67	2,72	3,44	1,72
56	5,51	4,53	3,16	4,75	2,85	5,36	6,39	3,50
84	7,58	5,97	5,72	7,32	5,45	7,05	7,98	5,00
112	9,81	6,94	7,86	9,70	7,46	7,94	8,55	5,23
140	11,64	7,80	10,22	11,43	8,34	8,66	9,70	6,74

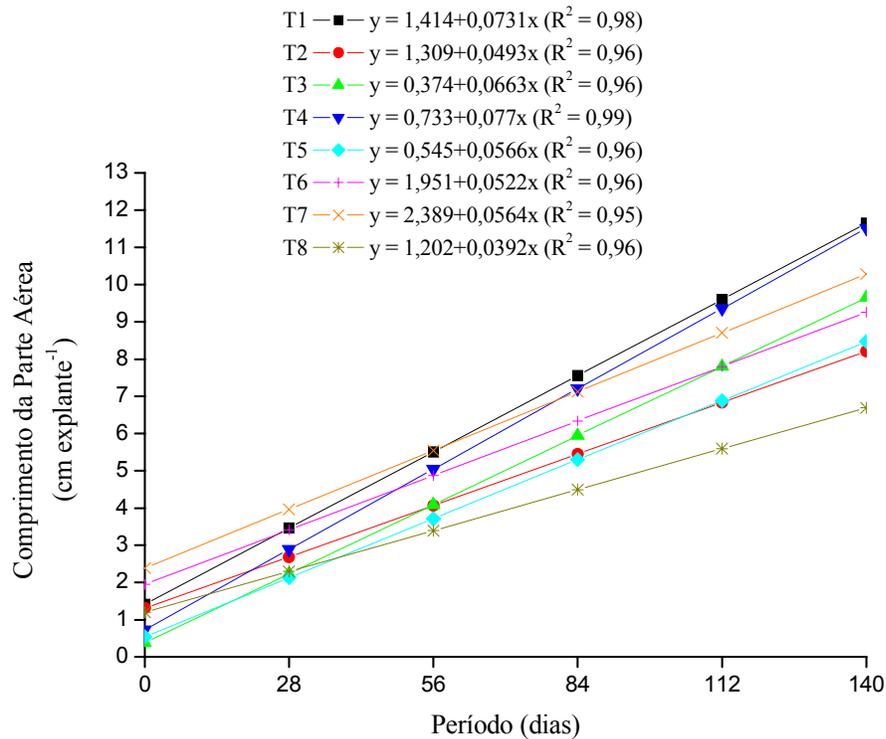


Figura 2 – Médias estimadas para o comprimento da parte aérea em explantes de microplantas de *B. gasipaes* cultivados *in vitro*, em função dos tratamentos nos períodos de avaliação

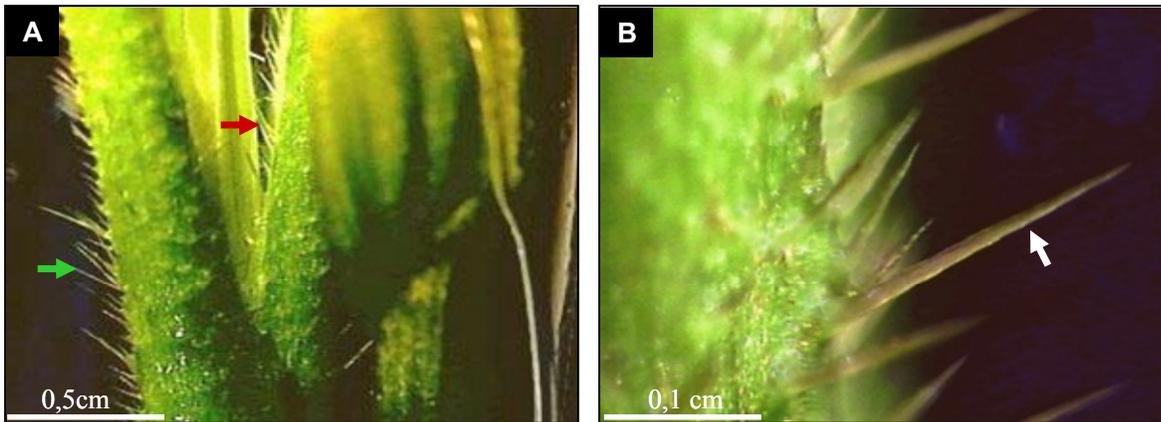


Figura 3 – Explantes de microplantas de *B. gasipaes* cultivados *in vitro* sob os tratamentos T4 (TDZ) e T7 (ANA/TDZ). (A) evidencia a presença de acúleos nos pecíolos (seta verde) e nas folhas (seta vermelha) e (B) evidencia os acúleos em detalhes (seta branca)

3.3.1.2 Taxa de crescimento da parte aérea

A análise para a taxa média de crescimento da parte aérea atingiu o valor máximo aos 56 dias de cultivo, exceto para os tratamentos contendo a presença isolada das citocininas (T3, T4 e T5), cuja taxa média máxima de crescimento da parte aérea (TCPA) ocorreu aos 84 dias de cultivo e a partir desse período, observou-se que as TCPAs sofreram considerável redução até o último período de avaliação (140 dias) (Tabela 4).

A análise de regressão exponencial para os oito tratamentos permitiu evidenciar que a tendência para maior TCPA ocorreu aos 84 dias de cultivo para os tratamentos T1 (0), T2, T4, T5, T6 e T7. Já os tratamentos T3 e T8, apresentaram maior TCPA aos 112 dias de cultivo (Tabela 5, Figura 4).

Maior TCPA foi observada no tratamento T4 (TDZ) com média estimada em $12,13 \text{ \%cm.dia}^{-1}.\text{explante}^{-1}$ seguido no tratamento T1(0) ($10,27 \text{ \%cm.dia}^{-1}.\text{explante}^{-1}$). Os tratamentos com as menores TCPAs foram evidenciados para os meios contendo a presença isolada de ANA (T2) ($6,91 \text{ \%cm.dia}^{-1}.\text{explante}^{-1}$) ou em associação ao 2iP (T8) ($6,64 \text{ \%cm.dia}^{-1}.\text{explante}^{-1}$) (Tabela 5, Figura 4).

Tabela 4 – Médias reais da taxa de crescimento da parte aérea (TCPA) (%cm.dia⁻¹.explante⁻¹) dos explantes de microplantas de *B. gasipaes* cultivados *in vitro* em função dos tratamentos nos períodos de avaliação

Período (dias)	Tratamentos							
	T1	T2	T3	T4	T5	6	7	8
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
28	1,71	1,54	1,14	3,11	1,50	2,93	5,14	0,89
56	10,54	9,46	5,11	9,07	4,21	9,43	10,54	6,36
84	7,39	5,14	9,14	9,18	9,29	6,04	5,68	5,36
112	7,96	3,46	7,64	8,50	7,18	3,18	5,12	5,00
140	6,54	3,04	8,43	6,18	3,14	2,57	4,04	5,39

Tabela 5 – Médias estimadas da taxa de crescimento da parte aérea (TCPA) (%cm.dia⁻¹.explante⁻¹) dos explantes de microplantas de *B. gasipaes* cultivados *in vitro* em função dos tratamentos nos períodos de avaliação

Período (dias)	Tratamentos							
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
0	0,03	0,05	-0,02	0,10	-0,03	0,13	0,24	-0,01
28	1,94	1,76	1,39	2,36	1,61	2,25	2,70	1,27
56	6,13	4,89	4,45	7,41	5,03	6,00	7,22	3,74
84	10,27	6,92	8,30	12,13	8,01	7,84	9,91	6,25
112	9,92	5,39	10,05	11,14	7,18	5,31	7,36	6,65
140	5,51	2,21	8,05	5,70	3,57	1,69	2,83	4,53
R ²	0,94	0,87	0,98	0,96	0,99	0,87	0,81	0,93

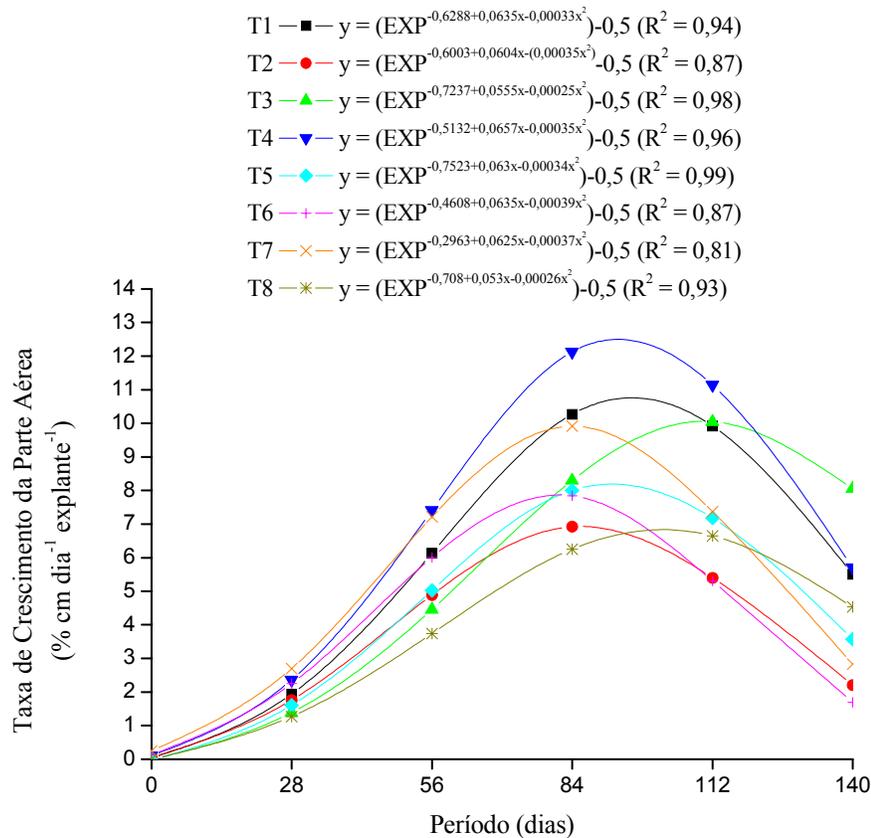


Figura 4 – Médias estimadas para as TCPAs (%cm.dia⁻¹.explante⁻¹) em explantes de microplantas de *B. gasipaes* cultivados *in vitro*, em função dos tratamentos nos seis períodos de avaliação

3.3.2 Avaliações morfofisiológicas foliares

No período zero (0), momento inicial de cultivo dos explantes nos respectivos tratamentos, não foi registrada a presença de folhas, uma vez que um dos objetivos era exatamente evidenciar a tendência para o desenvolvimento destas ao longo dos períodos de cultivo nos respectivos tratamentos.

3.3.2.1 Número de folhas

Nenhuma folha foi observada nos explantes em função dos oito tratamentos aos 28 dias de cultivo, já no 56º dia, somente o tratamento T2 não evidenciou o desenvolvimento de folhas. A partir do 84º dia de cultivo todos os tratamentos continham explantes apresentando folhas (Tabela 6).

Aos 140 dias de cultivo, o tratamento que apresentou maior número médio de folhas foi o tratamento T1, com média de 2,8 folhas por explante, seguido pelo tratamento T6, com média de

2,5 folhas por explante. Os resultados mais baixos para o desenvolvimento de folhas neste mesmo período ocorreu para o tratamento T3 e para o tratamento T8, ambos, com média de 1,9 folhas por explante (Tabela 6).

A análise de regressão polinomial (Figura 5) evidenciou o mesmo comportamento, porém, uma tendência menor ao desenvolvimento médio de folhas por explante para o tratamento T2 e um incremento para o tratamento T3 em relação à avaliação das médias reais obtidas (Tabela 6).

Tabela 6 – Médias reais para o número de folhas desenvolvidas por explante em explantes de microplantas de *B. gasipaes* cultivados *in vitro* em função dos tratamentos nos períodos de avaliação

Período (dias)	Tratamentos							
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
28	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
56	0,70	0,00	0,30	0,50	0,70	0,30	0,80	0,20
84	1,70	0,40	0,80	1,00	1,10	1,40	1,00	0,40
112	2,20	1,30	1,70	1,70	1,50	2,20	1,80	1,20
140	2,80	2,10	1,90	2,20	2,10	2,50	2,20	1,90

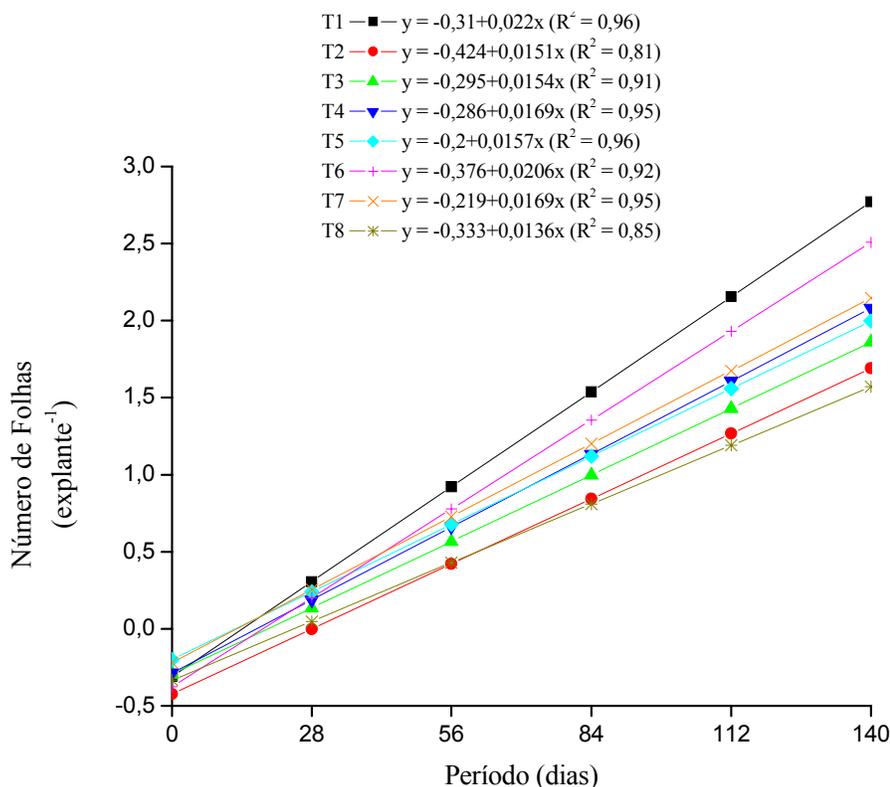


Figura 5 – Médias estimadas para o número de folhas desenvolvidas por explante em explantes de microplantas de *B. gasipaes* cultivados *in vitro* em função dos tratamentos nos seis períodos de avaliação

Com exceção dos tratamentos T4 e T7 (Figura 6 B e C), as folhas desenvolvidas nos explantes dos demais tratamentos apresentaram-se morfologicamente normais, a exemplo das folhas dos explantes que se desenvolveram em microplantas cultivadas no tratamento T1 evidenciadas na Figura 6 A. Explantes cultivados no tratamento T8 evidenciaram elevado grau de oxidação nas primeiras folhas desenvolvidas (Figura 7).

Os explantes cultivados nos tratamentos T4 e T7 desenvolveram folhas com grandes dimensões, cloróticas e, em alguns casos, menores, não expandidas, com coloração verde-escura e deformações nas nervuras, conferindo um aspecto enrugado (Figura 6). Cabe salientar que, tais anomalias, independente do período em que foram detectadas e do tempo de permanência nos respectivos meios, apresentaram-se morfologicamente irreversíveis.

Explantes que apresentaram desenvolvimento da parte aérea e do sistema radicular desenvolveram-se em microplantas como pode ser observado na figura 6 A.

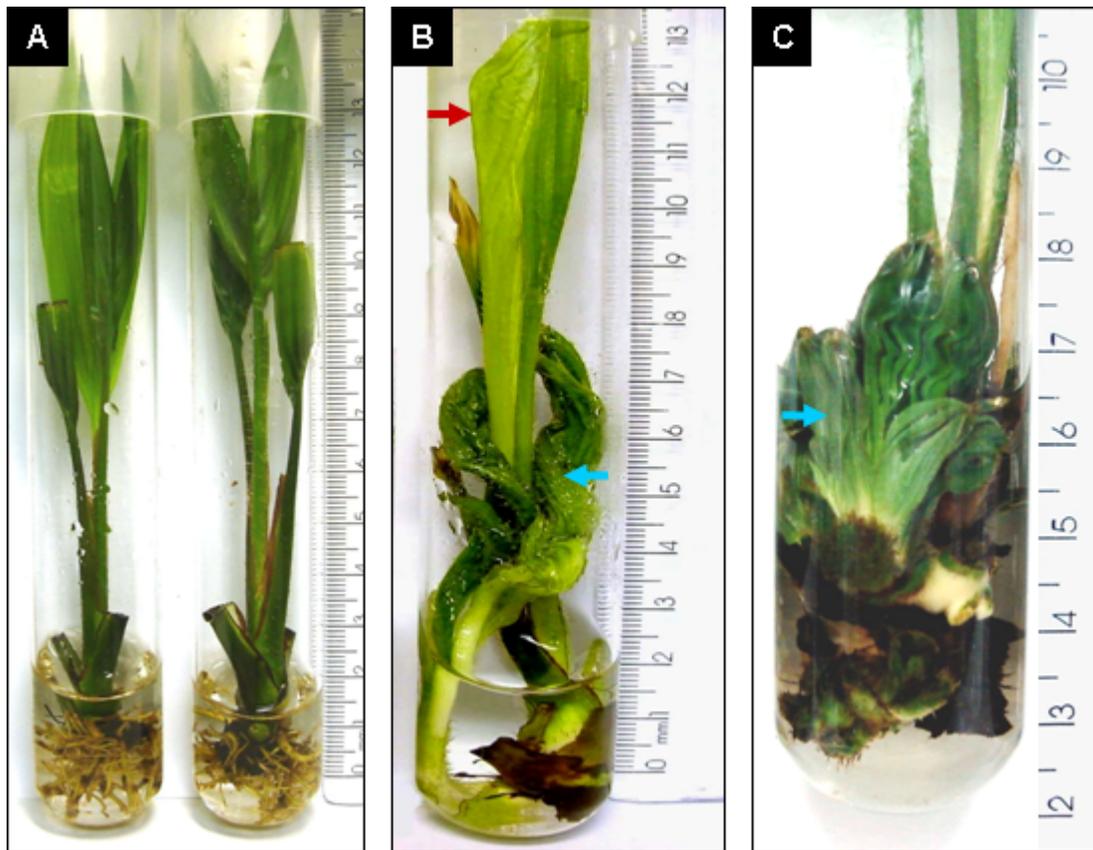


Figura 6 – Microplantas e explantes de *B. gasipaes* aos 140 dias de cultivo. A: Microplanta desenvolvida no tratamento T1 (0). Observar o desenvolvimento de folhas morfológicamente normais. B: Explante cultivado no tratamento T4 (TDZ). Observar o aspecto clorótico e a elevada dimensão da lâmina foliar (seta vermelha) desenvolvida, assim como a presença de folhas consideravelmente pequenas, com coloração verde-escura e com deformações nas nervuras, conferindo um aspecto enrugado (seta azul). C: Explante cultivado no tratamento T7 (ANA/TDZ) evidenciando as mesmas deformações nas nervuras (seta azul) observadas em B

3.3.2.2 Oxidação

As análises realizadas aos 28, 56, 84, 112 e 140 dias evidenciaram a presença de oxidação moderada somente nas primeiras folhas de 80% das microplantas e explantes desenvolvidos no tratamento T5 ao 84º dia de cultivo. Já aos 112º e 140º dias de cultivo a porcentagem de microplantas e explantes apresentando oxidação nas primeiras folhas desenvolvidas permaneceu estável (80%), cuja alteração ocorreu apenas no grau de oxidação, (elevada) (Tabela e Figura 7).

Cabe salientar que, assim como nos demais tratamentos testados, observou-se oxidação nas bainhas foliares mais externas, seccionadas em ocasião da obtenção do explante (Figura 7).

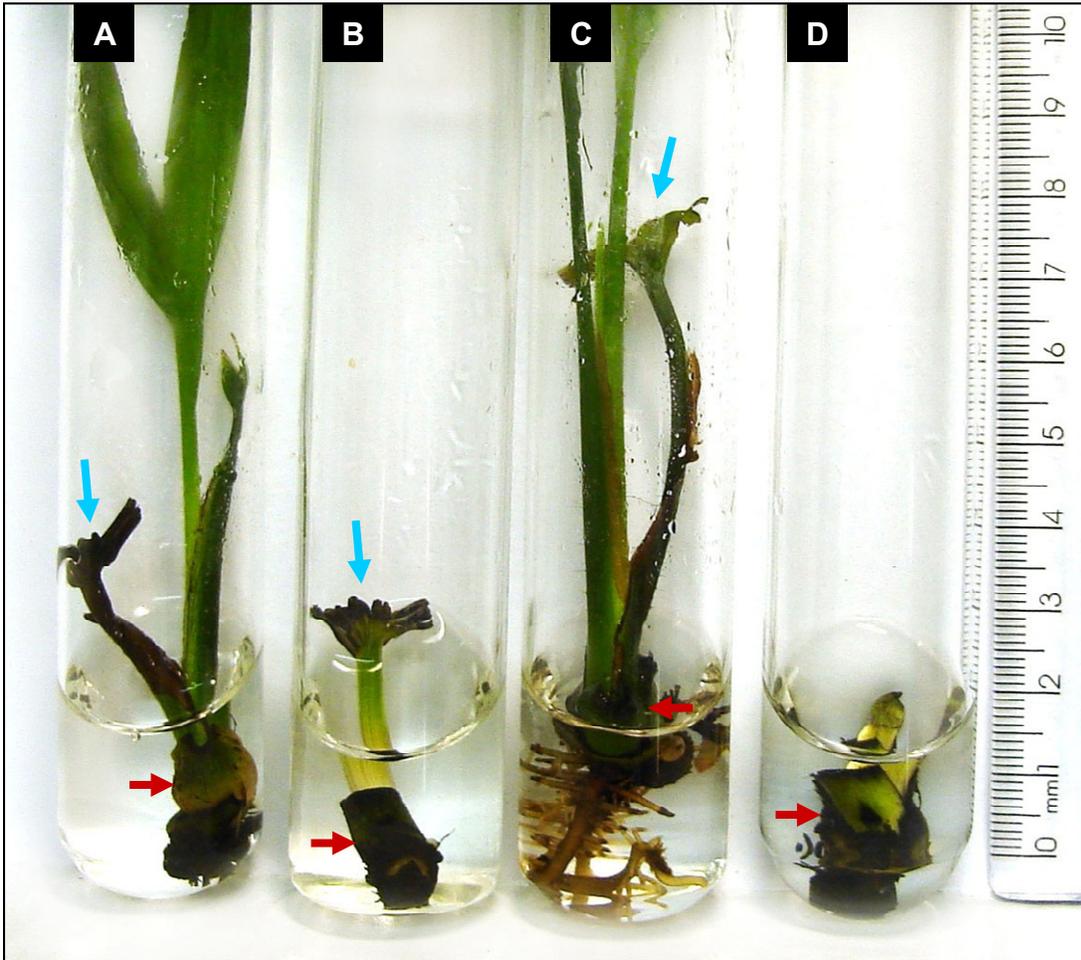


Figura 7 – Explantes e microplanta de *B. gasipaes* aos 140 dias de cultivo no tratamento T5 (2iP). Observar a presença de elevada oxidação nas primeiras folhas desenvolvidas (setas azuis) e bainhas foliares mais externas, seccionados em ocasião da obtenção do explante (setas vermelhas), sendo nesta última estrutura, evento comum a todos os tratamentos testados. Alguns explantes não se desenvolveram em microplantas (A, C e D)

Tabela 7 – Porcentagem de oxidação nas primeiras folhas desenvolvidas e grau de oxidação em função dos períodos avaliados nos explantes de microplantas de *B. gasipaes* cultivados no tratamento T5 (2iP)

		2iP		
Período (dias)	Oxidação na Primeira Folha (%)	Grau de Oxidação (%)		
		Baixo	Moderado	Elevado
28	0	0	0	0
56	0	0	0	0
84	80	0	80	0
112	80	0	0	80
140	80	0	0	80
Média Geral	40	0	13,33	26,67

3.4 Discussão

De acordo com os resultados obtidos considera-se que o maior comprimento médio da parte aérea foi observado para o tratamento T1, onde não foi acrescentado biorreguladores, sendo a média obtida 11,43 cm aos 140 dias de inoculação, o que se confere na Tabela 3. De forma semelhante, Almeida (1994) também observou em seu experimento que, ápices caulinares de pupunheiras oriundos de microplantas derivadas de embriões zigóticos excisados de sementes germinados nesse mesmo meio (MS isento de reguladores de crescimento), apresentaram expressivo resultado no que tange ao comprimento da parte aérea, quando comparado aos demais tratamentos com biorreguladores.

Da mesma forma Saldanha (2007) observou que em embriões zigóticos imaturos excisados de sementes de palmitreiro (*Euterpe edulis* Mart.) desenvolvidos em meio MS completo com 30g.L⁻¹ de sacarose e isento de reguladores de crescimento, tiveram a altura média por explante favorecida aos 120 dias de inoculação (0,85 cm.explante⁻¹) em relação ao mesmo meio contendo 20g.L⁻¹ de sacarose (8,1 cm.explante⁻¹). O autor verificou que, no mesmo período, embora não tenham diferido estatisticamente entre si, o maior comprimento da parte aérea ocorreu quando acrescentado ao meio 40g.L⁻¹ de sacarose (1,17 cm.explante⁻¹).

Observações semelhantes foram feitas por Pereira *et al.*(2000) com brotações formadas em segmentos nodais de microplantas de chapéu-de-couro (*Echinodorus cf. scaber* Rataj.), atingiram maior comprimento médio por explante (aproximadamente 0,9 cm.explante⁻¹) quando estabelecidos em meio MS isento de biorreguladores em relação às crescentes concentrações de BAP testadas aos 30 dias de cultivo.

Experimentos realizados com segmentos nodais de microplantas de hortelã verde (*Mentha viridis* L.) cultivadas em meio MS isento de reguladores de crescimento, evidenciaram que quando estes foram cultivados tanto em meio contendo a presença isolada de BAP (4,44 μM) como em meio contendo BAP (8,88 μM) combinado com ANA (2,7 μM) não diferiram estatisticamente quanto à altura média dos explantes daqueles cultivados em meio isento de reguladores de crescimento aos 40 dias de cultivo (LIMA *et al.*, 2007). Resultados semelhantes foram observados quando cultivados segmentos nodais de microplantas de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) em meio MS também sem biorreguladores, onde se observou expressiva redução na altura média quando acrescentado ao meio 4,44 μM ou a 8,88 μM de BAP (RUBIN *et al.*, 2007).

De acordo com Taiz e Zaiger (2006), embora as citocininas sejam evidentemente necessárias à proliferação normal das células, a aplicação exógena inibe o processo de alongamento de caules e de raízes. Para Kerbauy (2004), o acréscimo exógeno e isolado tanto de citocininas como de auxinas induzem a produção de etileno pela enzima sintase do ACC (ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano), sendo este o causador de boa parte do efeito inibitório no crescimento dos órgãos vegetais. No presente trabalho, estas postulações corroboram com os resultados observados nos tratamentos T2 e T5 (ANA e 2iP, respectivamente), cujos crescimentos médios das partes aéreas foram consideravelmente inferiores em relação ao tratamento T3 (BAP) e ao tratamento T4 (TDZ) (Tabela 3). Entretanto, os explantes cultivados na presença isolada de BAP (T3) apresentaram o terceiro maior crescimento médio da parte aérea por explante aos 140 dias de cultivo (10,22 cm.explante⁻¹), resultado inferior apenas àqueles cultivados em meio contendo a presença isolada de TDZ (T4) com média de 11,43 cm.explante⁻¹ e do tratamento isento de biorreguladores (T1) com média de 11,64 cm explante⁻¹, conforme já mencionado.

Resultados similares ao bom desenvolvimento da parte aérea de ápices caulinares de pupunheiras e provenientes de embriões zigóticos excisados de sementes e germinados em meio de cultura MS isento de reguladores de crescimento foi observado por Almeida (1994) após empregar BAP (8,0 μM). Aos 28 dias de cultivo o autor verificou que o comprimento médio por explante da parte aérea mensurada foi de aproximadamente 5,0 cm, valor este muito superior ao observado no presente trabalho no mesmo período de cultivo, cujo comprimento médio atingiu 1,73 cm.explante⁻¹ quando cultivados em meio contendo BAP. Conforme observado na Tabela 3 e na Figura 2, o tempo de permanência neste meio foi fundamental para o crescimento da parte

aérea, embora somente aos 84 dias de cultivo os explantes tenham atingido comprimento similar ao observado pelo autor aos 28 dias de cultivo sob as mesmas condições de cultivo. O tamanho médio dos explantes empregados no período inicial de cultivo (Período 0) aparentemente não favoreceu o crescimento da parte aérea dos ápices caulinares observados pelo autor em relação ao presente trabalho, visto que o tamanho médio dos explantes foi de 1,41 cm (Tabela 3), praticamente o dobro do comprimento dos ápices caulinares utilizados por Almeida (1994), os quais apresentaram em média 0,7 cm por explante. Isto sugere que a concentração deste biorregulador empregada pelo autor (8,0 μM) favoreceu consideravelmente o crescimento da parte aérea em detrimento ao observado no presente trabalho, cuja concentração de BAP utilizada foi de 3,55 μM .

Desta forma, favorável crescimento da parte aérea de explantes de pupunheiras cultivadas *in vitro* na presença isolada de BAP parece estar dependente do emprego deste biorregulador em concentrações mais elevadas, conforme evidenciam os resultados observados por Almeida (1994) ou por meio do acréscimo desta citocinina em concentrações inferiores, conforme utilizado no presente trabalho, embora demande um tempo consideravelmente maior de cultivo a fim dos explantes atingirem o mesmo comprimento das partes aéreas observado por Almeida (1994).

Para os explantes cultivados na presença de biorreguladores, o resultado mais favorável ao comprimento médio da parte aérea por explante foi observado aos 140 dias para o tratamento T4 (TDZ) com média de 11,43 cm.explante⁻¹, conforme mencionado (Tabela 3 e Figura 2). Resultados negativos ao crescimento da parte aérea com o emprego do thidiazuron (TDZ) têm sido comumente reportados às brotações, conforme observado no Capítulo 2 (2.3.1.1). Embora esta citocinina tenha desfavorecido o desenvolvimento normal dos propágulos, favoreceu consideravelmente o comprimento médio da parte aérea dos explantes cultivados no tratamento T4 (TDZ).

Lima e Gonçalves (1998) analisaram a multiplicação *in vitro* de tufos de gemas de um clone do híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus tereticornis* cultivadas em meio de cultura modificado e suplementado com TDZ em cinco concentrações (0,0; 0,0045; 0,045; 0,45 e 4,5 μM), e relataram que as três últimas promoveram a formação de gemas curtas. De acordo com Antunes e Raseira (2006), o TDZ apresenta atividade citocínica, promovendo o crescimento rápido em campo devido ao seu efeito nas divisões celulares. Já, Mok *et al.* (1987) relataram que o efeito do TDZ no alongamento de brotos deve-se ao fato deste composto alterar o metabolismo

das citocininas endógenas naturais, promovendo um aumento no teor endógeno, além de ser um composto altamente estável e resistente às oxidases (MOK *et al.*, 1987; PERES, 2002; SRIVASTAVA, 2002a; KERBAUY, 2004). Outros autores como, Murthy, Murch e Saxena, 1995 apud Murthy, Murch e Saxena (1998) observaram ainda, que o TDZ promoveu a síntese ‘de novo’ de auxinas em plântulas de amendoim, evento este verificado pelo incremento de IAA citosólico bem como de triptamina.

É importante salientar que o modo de ação do TDZ às respostas morfogênicas ainda não está claramente elucidado, porém tudo indica que este modula diretamente os reguladores de crescimento endógenos, como um resultado da indução de estresse, modificando as membranas celulares, os níveis energéticos ou a assimilação de nutrientes (MURTHY; MURCH; SAXENA, 1998).

Nesse experimento observou-se que o tratamento T7 (ANA/TDZ) promoveu uma redução média de 1,73 cm.explante⁻¹ no comprimento médio da parte aérea (9,7 cm.explante⁻¹) em relação aos explantes cultivados no tratamento T4 (TDZ) (11,43 cm.explante⁻¹) aos 140 dias de cultivo. Pode-se considerar que este resultado era esperado, visto que o tratamento T2, contendo a presença isolada de ANA foi consideravelmente desfavorável ao comprimento médio da parte aérea (7,8 cm.explante⁻¹), sendo superior apenas ao tratamento T5 (2iP) (6,74 cm explante⁻¹) aos 140 dias de cultivo (Tabela 3). Cabe ressaltar que, normalmente, o acréscimo de ANA ao meio tende a reduzir o crescimento normal da parte aérea (TORRES; CALDAS; BUSO, 1998).

Sabe-se que embora o emprego exógeno de citocininas e auxinas normalmente promovam ação inibitória ao crescimento dos órgãos vegetais devido à produção de etileno pela sintase do ACC (ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano), o crescimento de caules, pecíolos e pedúnculos de frutos pode ser fortemente estimulado pelas alterações nos níveis endógenos de ABA e GA, evento este muito comum em plantas de hábito aquático (KERBAUY, 2004). Neste contexto, não pode ser descartada a hipótese de que os explantes cultivados na presença isolada de BAP (T3) ou TDZ (T4) tenham alterado os níveis endógenos hormonais, favorecendo sobremaneira o crescimento da parte aérea. Além disso, ápices caulinares, folhas e gemas novas, frutos jovens e sementes imaturas apresentam, de acordo com Srivastava (2002b), muito provavelmente, elevados níveis de AIA endógenos, sugerindo que o emprego exógeno de ANA (T2) isoladamente tenha potencializado os níveis endógenos de AIA nos explantes de pupunheiras e

exacerbando a atuação inibitória promovida por esta auxina ao comprimento médio da parte aérea por explante.

Genkov e Ivanova (1995) avaliando os efeitos do ANA (0,5 μM) isoladamente ou em associação com as citocininas BAP, 4-PU-30 [N1-(2-cloro-4-piridil)-N2-feniluréia] e TDZ em distintas concentrações no comprimento da parte aérea de gemas axilares de *Dianthus caryophyllus* cv. White Sim verificaram que o ANA em associação com TDZ, em concentração similar a empregada no presente trabalho (0,4 μM), desfavoreceu o comprimento da parte aérea aos 30 dias de cultivo. Quando concentrações decrescentes de TDZ foram empregadas (0,04 e 0,004 μM), os autores observaram considerável incremento no comprimento da parte aérea mas um decréscimo no número de brotações. Além disso, o emprego isolado de ANA (0,5 μM) desfavoreceu o alongamento dos explantes. Cabe salientar que, os resultados observados pelos autores foram similares ao observado nesse trabalho para o tratamento T2 (ANA) ao longo de todos os períodos analisados, caracterizando aos 140 dias de cultivo a segunda pior resposta para este caráter (Tabela 3 e Figura 2). O tratamento T7, acrescido de ANA e TDZ promoveu, entretanto, maior comprimento médio da parte aérea por explante em todos os períodos analisados em relação ao tratamento contendo a presença isolada de ANA (T2) (Tabela 3 e Figura 2), corroborando com os dados observados pelos autores ao comparar tratamentos contendo a presença isolada de ANA, com tratamentos contendo ANA combinado com TDZ.

Almeida (1994) observou que ápices caulinares isolados de microplantas derivadas de embriões zigóticos excisados de sementes e germinados em meio MS isento de reguladores de crescimento, quando transferidos para meio MS contendo a apenas ANA (17,2 μM), o comprimento médio da parte aérea por explante aos 48 dias de cultivo foi consideravelmente desfavorecido (aproximadamente 5,0 cm.explante⁻¹), superando apenas o tratamento contendo GA₃ (10,98 μM), (aproximadamente 4,0 cm.explante⁻¹). Estes resultados corroboram com as observações desse trabalho para o comprimento médio da parte aérea por explante observada para os explantes cultivados apenas com ANA (T2), porém, à concentração inferior à empregada pelo autor (12,9 μM) (Tabela 3). Aos 56 dias, observou-se que os explantes atingiram comprimento médio de 4,53 cm por explante, evidenciando que tanto o emprego de ANA (12,9 μM e 17,2 μM) utilizada pelo autor, exerceu a mesma ação inibitória ao crescimento da parte aérea em explantes de pupunheiras cultivados na presença isolada desta auxina.

Resultados igualmente não favoráveis ao crescimento médio da parte aérea foram observados ainda por Almeida (1994) aos 48 dias de cultivo, quando embriões zigóticos excisados de sementes foram cultivados em meio MS contendo apenas ANA (15,03 μM), em relação aos demais tratamentos testados e em concentrações inferiores àquela empregada para o ANA no experimento com ápices caulinares. Maiores comprimentos médios das partes aéreas foram observados, em ordem crescente, para o tratamento isento de reguladores de crescimento e para os tratamentos contendo apenas 2iP, BA e picloram, isoladamente. A presença isolada do GA_3 novamente proporcionou o menor crescimento médio da parte aérea de embriões zigóticos excisados de sementes de pupunheira no mesmo período avaliado pelo autor.

Algumas espécies eventualmente apresentam respostas favoráveis ao crescimento da parte aérea com o acréscimo isolado do ANA em reduzidas concentrações, como o observado por Rubin *et al.* (2007), que relataram que o maior comprimento médio da parte aérea ocorreu quando segmentos nodais de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) obtidos a partir de microplantas pré-estabelecidas em meio MS isento de reguladores de crescimento, foram cultivados apenas com ANA (1,34 μM). Ainda de acordo com os autores, o acréscimo de BAP provocou um déficit do alongamento da parte aérea. Resultados similares foram observados por Praxedes *et al.* (2001) ao avaliarem o efeito do ANA e do AIA em distintas concentrações (5,0; 10,0 e 15,0 μM) no estiolamento *in vitro* do abacaxizeiro cv. Pérola obtidos a partir de microplantas previamente estabelecidas *in vitro*, cujas folhas foram previamente excisadas. Aos 30 dias de cultivo, os autores evidenciaram que as maiores médias de ganho em altura ocorreram quando os explantes foram estabelecidos em meio MS contendo ANA na mais baixa concentração testada (5,0 μM), cujo aumento nas concentrações proporcionou considerável redução para este caráter analisado.

Santana e Teixeira (2004) verificaram elevado crescimento da parte aérea de embriões zigóticos excisados de sementes de coqueiro (*Cocos nucifera* L.) com 11 meses de idade cultivados em meio Y3 de Eeuwens (1976) na presença isolada de ANA em diferentes concentrações (5,0; 10,0 e 15,0 μM) aos 90 dias de cultivo. De acordo com os autores, a concentração desta auxina mais favorável ao comprimento médio da parte aérea ocorreu em 10,0 μM , enquanto as demais concentrações (5,0 e 15,0 μM) não diferiram estatisticamente entre si, promovendo um crescimento cerca de 3,0 cm inferior a parte aérea em relação à concentração intermediária (10,0 μM).

Entretanto, concentrações de ANA superiores a 10,74 μM favoreceram o crescimento da parte aérea e raízes em detrimento à formação de gemas em ápices caulinares de pupunheiras após cultivo prévio em meio suplementado com BAP (8,0 μM) (ALMEIDA, 1994).

Nesse trabalho, o tratamento T6 onde o ANA encontra-se associado ao BAP, verificou-se uma redução da atuação inibitória promovida pelo acréscimo do ANA isoladamente (T2) em relação ao comprimento médio da parte aérea. Não obstante, explantes cultivados no tratamento T6 apresentaram 1,04 cm em média a menos que os explantes cultivados no tratamento T7 onde o ANA encontra-se associado ao TDZ aos 140 dias de cultivo (Tabela 3), constatando-se que o TDZ, dentre os biorreguladores testados, além de promover o maior crescimento médio da parte aérea dos explantes cultivados em meio contendo sua presença isolada (T4), é capaz de estimular também maior crescimento da parte aérea quando encontra-se associado com ANA (T7) em relação ao BAP e 2iP associados com esta auxina (T6 e T8, respectivamente) (Tabela 3)

Os resultados observados aos 140 dias evidenciaram que o tratamento T6 (ANA/BAP) na cultura de explantes de pupunheira não favoreceu o comprimento médio da parte aérea por explante (8,66 cm), sendo superior apenas ao tratamento T5, o qual apresentou comprimento médio da parte aérea de 8,34 cm.explante⁻¹, ao tratamento T2, que apresentou comprimento médio da parte aérea de 7,8 cm.explante⁻¹ e ao tratamento T8, com comprimento médio da parte aérea de 6,74.cm explante⁻¹ (Tabela 3). Estas observações discordam de Almeida (1994), pois o autor obteve maior comprimento médio da parte aérea por explante em os ápices caulinares cultivados em meio MS contendo ANA (15,04 μM) associada a BAP (7,1 μM) dos 14 aos 35 dias de cultivo. Embora aos 28 dias de cultivo os explantes cultivados neste tratamento tenham obtido o segundo maior comprimento médio da parte aérea por explante (2,72 cm.explante⁻¹) (Tabela 3), este valor foi muito inferior ao observado pelo autor no período correspondente, cujo comprimento médio da parte aérea por explante foi de aproximadamente 10,5 cm, inferindo que maiores concentrações destes biorreguladores exerçam atuações consideravelmente mais favoráveis ao comprimento da parte aérea.

Ledo *et al.* (2001), também observaram que um balanço ANA/BAP favorável à auxina proporcionou resultados satisfatórios ao crescimento da parte aérea em microplantas de açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) germinadas *in vitro* em meio MS modificado pela ausência de vitaminas e aminoácidos a partir de embriões zigóticos maduros excisados de sementes aos 48 dias. Segundo os autores, o maior comprimento médio da parte aérea foi induzido pela presença

de ANA (2,68 μM) combinada a concentrações mais baixas de BAP (1,11; 1,55 e 2,22 μM) e observando os seguintes comprimentos médios da parte aérea: 3,33; 3,69 e 3,8 cm.explante^{-1} , respectivamente. Os autores observaram, também, que a presença destes reguladores de crescimento foi essencial à conversão dos embriões zigóticos em plântulas completas e normais.

Destaca-se ainda que microplantas de coqueiro-anão (*Cocos nucifera* L.) obtidas a partir de embriões zigóticos excisados de frutos maduros com 11 a 12 meses após a fertilização e germinadas em meio suplementado com distintas concentrações de sacarose e de sulfato de ferro (II), apresentaram um incremento no comprimento médio da parte aérea quando cultivados posteriormente em meio de enraizamento Y3 (EEUWENS, 1976) gelificado contendo ANA em associação com BAP (5,4 μM e 2,22 μM , respectivamente), aos 60 dias de cultivo (LÉDO *et al.*, 2007).

Os resultados obtidos por Genkov e Ivanova (1995) utilizando ANA (0,5 μM) isoladamente ou combinado com BAP, 4-PU-30 e TDZ em distintas concentrações no comprimento da parte aérea de gemas axilares de plantas de *Dianthus caryophyllus* cv. White Sim permitiram verificar que o ANA a 0,5 μM somado ao BAP a 0,4 μM proporcionou maior crescimento da parte aérea em relação ao tratamento contendo ANA/TDZ nas mesmas concentrações supracitadas aos 30 dias de cultivo. Neste trabalho, porém, observou-se que aos 28 dias de cultivo o tratamento T7, contendo ANA/TDZ (12,9 μM e 0,36 μM , respectivamente) promoveu o maior crescimento médio da parte aérea dos explantes em relação aos demais tratamentos.

Com relação aos resultados obtidos nesse experimento referentes à aplicação de 2iP, observou-se que a presença isolada deste biorregulador afetou negativamente o comprimento médio da parte aérea por explante aos 140 dias de cultivo (Tabela 3), sendo que os explantes apresentaram-se pouco espessos. De acordo com Taiz; Zaiger (2006) a aplicação exógena de citocininas inibe o alongamento caulinar, além da produção de etileno pela enzima sintase do ACC (ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano) que segundo Kerbauy (2004), promove um retardamento (ou inibição) da divisão celular, devido a uma maior permanência da fase G1, G2 ou S. Embora o autor relate que o etileno promova uma redução no alongamento e espessamento caulinar devido à reorganização dos microtúbulos e das microfibrilas de celulose, de uma posição normalmente transversal para a longitudinal, nesse trabalho não apresentaram-se espessos, pois, provavelmente, se houve síntese de etileno, deve ter ocorrido em proporções reduzidas. É

importante salientar que estudos mais específicos com microplantas de pupunheiras são necessários a fim de corroborar com as hipóteses apresentadas.

Resultados similares ao comprimento da parte aérea foram observados por Chuenboonngarm, Charoonsote e Bhamarapavati (2001) após avaliar o efeito do 2iP e do BAP em distintas concentrações na multiplicação *in vitro* de *Gardênia jasminoides* Ellis, a partir de ápices caulinares, cujas brotações oriundas dos explantes cultivados na presença isolada de 2iP (12,3; 24,6; 36,9 e 49,2 μM), independente da concentração empregada, apresentaram-se curtas e com elevada taxa de mortalidade durante a aclimatização em relação aqueles desenvolvidos em meio contendo a presença isolada de BAP (11,1; 22,2; 33,3 e 44,4 μM). De acordo com os autores, a baixa taxa de sobrevivência foi decorrente da variação somaclonal ocasionada pelo emprego deste regulador de crescimento, cujas folhas apresentaram-se variegadas e com reduzido número de cloroplastos por células parenquimatosas, caracterizando o primeiro relato de variação somaclonal ocorrida com a utilização de 2iP em cultura de tecidos.

Almeida (1994) observou que ápices caulinares de pupunheiras cultivados *in vitro* em meio MS contendo apenas 2iP (9,84 μM) como regulador de crescimento, resultou no melhor desenvolvimento da parte aérea (4,0 cm), quando comparado aos demais biorreguladores testados. aos 28 dias de cultivo, resultado este, sensivelmente maior que o observado no presente trabalho (1,67 cm) (Tabela 3), sugerindo que concentrações mais elevadas, como a empregada pelo autor, promovem maior crescimento.

Conforme observado anteriormente, as respostas desfavoráveis ao comprimento da parte aérea promovidos pelo tratamento T2, contendo ANA isoladamente, foi reduzido nos tratamentos T6 e T7, os quais são acrescidas as citocininas BAP e TDZ, respectivamente, porém, o tratamento T8, no qual ANA encontra-se associada com 2iP (T8), o comprimento médio da parte aérea foi inferior ao tratamento T2, contendo ANA isoladamente, caracterizando a pior resposta para este evento fisiológico aos 140 dias de cultivo (Tabela 3). Não obstante, os tratamentos T3, T4 e T5, acrescidos das citocininas BAP, TDZ e 2iP isoladamente promoveram maior comprimento médio da parte aérea por explante do que o tratamento T6, T7 e T8, contendo as citocininas supracitadas em associação com ANA (Tabela 3).

Embora não tenham sido encontradas na literatura vigente trabalhos abordando a atuação do ANA em associação com 2iP em relação ao comprimento da parte aérea, o resultado desfavorável a este parâmetro proporcionado pelo tratamento (T8) era esperado, visto que, tanto o

tratamento T2 (ANA) como o tratamento T5 (2iP) também desfavoreceram consideravelmente o desenvolvimento da parte aérea conforme discorrido anteriormente (Tabela 3), sugerindo que o acréscimo do ANA potencializou a atuação inibitória promovida por esta citocinina isoladamente.

As análises efetuadas para as médias das taxas de crescimento da parte aérea (TCPAs) por explante durante todo o período de cultivo proporcionaram o estabelecimento do período máximo de crescimento (pico de crescimento) para os explantes cultivados nos distintos tratamentos, período este no qual a frequência de mitoses restringem-se a determinadas zonas de crescimento ativo, correspondendo a um volume bem menor de células passíveis de sofrerem divisões mitóticas (TERMIGNONI, 2005). Por meio destas análises, evidenciou-se também, quais biorreguladores (ou associação destes), proporcionaram a maior taxa de crescimento, independente dos períodos avaliados.

Conforme confere-se na Tabela 4, os tratamentos que evidenciaram maior TCPA foram o T1 (0) e o T7 (ANA/TDZ) aos 56 dias de cultivo, ambos apresentando $10,54 \text{ \%cm.dia}^{-1}.\text{explante}^{-1}$ e somente os tratamentos T3, T4 e T5, contendo a presença isolada das citocininas BAP, TDZ e 2iP, respectivamente, apresentaram a taxa máxima de crescimento da parte aérea ao 84º dia de cultivo, sugerindo que os explantes cultivados nestes tratamentos cessaram a frequência de mitoses mais tardiamente do que quando em associação com ANA ou na ausência de biorreguladores (Tabela 4), embora a análise de regressão exponencial tenha evidenciado uma tendência mais tardia para a taxa média de crescimento máximo da parte aérea para os explantes cultivados no tratamento T8 (Figura 4).

Posteriormente ao ponto máximo da TCPA, os explantes apresentaram decréscimo contínuo até os 140 dias de cultivo (Tabela e Figura 4), correspondendo ao período onde sugere-se que ocorra um acréscimo cada vez menor de células novas, responsável pelo aumento em volume do sistema, conforme decrito por Termignoni (2005) ao exemplificar a taxa de crescimento de uma dicotiledônea herbácea dos cinco aos 75 dias de germinação *in vivo*, visando a compreensão da cinética do crescimento vegetal.

Assim como foi demonstrado anteriormente, a aplicação de auxinas e citocininas exerceu atuação inibitória em maior ou menor grau sobre o comprimento médio da parte aérea dos explantes de pupunheiras em relação ao tratamento T1(0) (Figura 2), cuja análise da regressão exponencial para a taxa de crescimento médio da parte aérea apresentou comportamento

consideravelmente similar, mostrando que as tendências para os valores máximos permaneceram abaixo do tratamento isento de biorreguladores a exceção do tratamento T4, o qual apresentou uma tendência superior ao tratamento T1 para a taxa máxima de crescimento da parte aérea (Figura 4).

Na literatura vigente não foram encontradas pesquisas que avaliaram a taxa de crescimento *in vitro* para pupunheiras sob a influência de reguladores de crescimento, bem como para demais palmáceas, tornando os resultados obtidos no presente trabalho uma importante ferramenta às próximas pesquisas sob esse assunto.

Assim como várias técnicas de cultura em meio líquido tem sido desenvolvidas visando reduzir os custos laboratoriais, estimular as taxas de crescimento, as taxas de multiplicação dos explantes e aumentar a absorção uniforme de gradientes nutricionais (ETIENE *et al.*, 1997), o conhecimento da taxa de crescimento de espécies propagadas *in vitro* possibilitaria a restrição no uso ou mesmo a retirada dos biorreguladores, minimizando dessa forma, as possíveis atuações tóxicas e (ou) inibitórias que a presença destes possa promover, pois de acordo com as observações de Lima *et al.* (2007), os reguladores de crescimento poderiam ser removidos do meio de cultivo de hortelã verde (*Mentha viridis* L.) obtidos a partir de microplantas cultivadas em meio MS isento de reguladores de crescimento, visto que segmentos nodais, quando cultivados tanto em meio contendo apenas BAP (4,44 μ M) como em meio contendo BAP (8,88 μ M) em associação com ANA (2,7 μ M) não diferiram estatisticamente quanto à altura média dos explantes daqueles cultivados em meio isento de biorreguladores aos 40 dias de cultivo.

Além disso, a remoção dos biorreguladores possibilita a avaliação do efeito ‘pulse’ sobre a morfogênese *in vitro*, ou seja, se os eventos morfogenéticos como a organogênese e embriogênese somática tornar-se-ão repetitivos nos períodos subseqüentes. De acordo com Pullman *et al.* (2003) e Andrade, Almeida e Gonçalves (2006), a utilização do ‘pulse’ pode ser uma importante ferramenta à otimização da cultura de tecidos pela redução do tempo necessário à produção de mudas micropropagadas e conseqüente ganho em produtividade.

A presença de acúleos observada ao longo das bainhas, pecíolos e por vezes nas lâminas foliares em alguns explantes cultivados somente no tratamento T4 e no tratamento T7, sugere que o TDZ promoveu a ativação de um ou mais genes específicos à expressão de acúleos que encontravam-se silenciados. Devido à variação dos acúleos presentes em estipes de pupunheiras, sugere-se a presença de mais de um gene envolvido na expressão destes (CLEMENT, 1986 apud

CLEMENT; MANSCHARDT, 2000), sendo que análises realizadas para a presença/ausência de acúleos nas folhas e pecíolos para populações do Yurimaguas crescidas em Manaus, Região Amazônica, sugerem que variâncias genéticas adicionais foram silenciadas devido ao longo período de seleção desta espécie pelos Ameríndios, particularmente para a população analisada (CHAVES; FLORES; CLEMENT, 1990 apud CLEMENT; MANSCHARDT, 2000). Em pupunheiras, estas estruturas apresentam origem epidérmica e ausência total de vascularização (TOMLINSON, 1962), motivo pelo qual são designadas como acúleos no presente trabalho, corroborando com as descrições realizadas por Alquini *et al.* (2006), quanto a sua origem.

As análises efetuadas nos oito tratamentos para o número médio de folhas desenvolvidas evidenciaram que o tratamento T1 favoreceu o desenvolvimento de maior número médio de folhas por explante (2,8 folhas.explante⁻¹) aos 140 dias de cultivo (Tabela 6 e Figura 5), conforme observaram também Praxedes *et al.* (2001) ao avaliarem o efeito do ANA e do AIA em distintas concentrações no estiolamento *in vitro* do abacaxizeiro cv. Pérola obtidos a partir de microplantas previamente estabelecidas *in vitro*, cujas folhas foram previamente excisadas. Maior número médio de folhas foi observado pelos autores aos 30 dias de cultivo para os explantes cultivados em meio MS na ausência destas auxinas.

Cabe salientar que análises realizadas para o número de folhas desenvolvidas para palmáceas cultivadas *in vitro* são escassas e, quando efetuadas para demais espécies, o parâmetro empregado freqüentemente envolve a atuação de distintas concentrações de determinado biorregulador sobre este caráter em detrimento a comparação entre diferentes tipos de reguladores de crescimento. Desta forma, dificulta sobremaneira a correlação de resultados, embora forneça importantes resultados a futuras pesquisas com esta espécie e demais palmáceas.

Explantes cultivados em meio MS acrescido de biorreguladores evidenciaram maior número médio de folhas no tratamento T6, com média de 2,5 folhas por explante aos 140 dias de cultivo (Tabela 6 e Figura 5)

Rubin *et al.* (2007), porém, observaram que a combinação BAP/ANA ao meio MS provocou um decréscimo no número médio de folhas desenvolvidas por explantes em segmentos nodais de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) obtidos a partir de microplantas cultivadas em meio MS isento de reguladores de crescimento aos 40 dias de cultivo. De acordo com os autores, a presença isolada de ANA foi consideravelmente mais efetiva. Para os explantes cultivados no tratamento T4 ou no tratamento T7, o número médio de folhas por explante foi inferior (2,2

folhas.explante⁻¹) ao tratamento T6 (2,5 folhas.explante⁻¹) aos 140 dias de cultivo (Tabela 6 e Figura 5).

Não foram encontrados relatos na literatura sobre ação do TDZ isoladamente ou em associação com ANA para a variável número de folhas desenvolvidas, porém, as alterações morfológicas nestas estruturas são freqüentemente relatadas quando esta citocinina é utilizada. De fato, os explantes cultivados nos tratamentos acrescidos de TDZ (T4 e T7) apresentaram folhas com grandes dimensões, cloróticas e, em alguns casos, pequenas, não expandidas, com coloração verde-escura e com deformações nas nervuras, conferindo a estas um aspecto enrugado, como pode ser observado na Figura 6. Conforme relatado anteriormente, ambos os tratamentos promoveram também, o desenvolvimento de acúleos nas lâminas foliares de alguns explantes.

Nieuwkerk e Zimmerman (1986) avaliando o efeito do thidiazuron na brotação *in vitro* de macieira sob altas concentrações evidenciaram necrose dos tecidos, vitrificação e crescimento anormal das folhas. Tem sido relatado também, o desenvolvimento de plântulas atrofiadas e com folhas apresentando coloração escura a partir de sementes de diversas espécies, inclusive leguminosas e aboboreiras quando cultivadas na presença do TDZ (MALIK; SAXENA, 1992; MURTHY; MURCH; SAXENA, 1995; BURKHANOVA *et al.*, 1984 apud MURTHY; MURCH; SAXENA, 1998), embora casos de clorose em folhas de explantes cultivados na presença do TDZ não tenham sido relatados.

Rubin *et al.* (2007) avaliando o efeito do ANA e do BAP isoladamente ou associados e em distintas concentrações na multiplicação *in vitro* de segmentos nodais de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) obtidos a partir de microplantas cultivadas em meio MS isento de reguladores de crescimento, também evidenciaram que a presença do ANA isoladamente promoveu maior número médio de folhas por explante do que quando na presença isolada de BAP, Estes resultados corroboram com o observado no presente trabalho, cuja média para o número de folhas desenvolvidas por explante cultivados no tratamento T3 o qual foi acrescido de BAP isoladamente, foi inferior aquela observada para o tratamento T2 contendo a presença isolada de ANA (Tabela 6), embora a análise de regressão polinomial tenha evidenciado uma pequena tendência para maior desenvolvimento de folhas no tratamento T6 em relação ao tratamento T2 (Figura 5).

Com maior frequência, os trabalhos encontrados na atual literatura abordam a atuação de distintas concentrações do BAP sobre o número de folhas desenvolvidas, conforme o descrito por Pereira *et al.* (2000), os quais evidenciaram maior número médio de folhas por explante quando segmentos nodais de chapéu-couro (*Echinodorus cf. scaber* Rataj) obtidos a partir de plantas estabelecida *in vitro* sem reguladores de crescimento, foram cultivados na presença de concentrações elevadas de BAP aos 30 dias de cultivo, entretanto, acarretando modificações no formato das folhas, tornando-as mais estreitas, pequenas e amarelecidas em relação aquelas desenvolvidas em meio contendo concentrações mais reduzidas desta citocinina. A redução na concentração promoveu, porém, considerável redução para o número médio de folhas desenvolvidas por explante.

Dzazio, Biasi e Zanette (2002) observaram que maior número médio de folhas por explantes desenvolvidas na brotação principal das gemas axilares desenvolvidas em segmentos nodais de estacas lenhosas do porta-enxerto de videira inoculadas em meio MS com a metade das concentrações de sais e na presença de distintas concentrações de BAP ocorreu para a mais baixa concentração testada (2,11 folhas.explante⁻¹), seguido pelo tratamento controle (isento de reguladores de crescimento). No presente trabalho, porém, o tratamento T1 (0) proporcionou maior número médio de folhas por explante em relação ao tratamento T3 (BAP) (2,8 e 1,9 folhas.explante⁻¹, respectivamente) ao final do experimento (140 dias) (Tabela 6 e Figura 5).

Villa *et al.* (2005) também observaram que segmentos nodais de amoreira-preta cultivar 'Ébano' oriundas de plântulas preestabelecidas *in vitro*, apresentaram maior número médio de folhas quando cultivados em meio MS 150% acrescido de BAP a 2,0 µM aos 60 dias de cultivo, verificando ainda, que as concentrações mais altas testadas (3,0 e 4,0 µM) promoveram um decréscimo para este caráter avaliado.

Tanto o tratamento T5 como o tratamento T2 promoveram, conforme mencionado, o desenvolvimento médio de 2,1 folhas por explante, resultado este superior apenas ao tratamento T3 e ao tratamento T8 cujas médias foram para ambos, de 1,9 folhas por explante (Tabela 6 e Figura 5).

Figueiredo *et al.* (2008) analisaram o efeito dos agentes desinfestantes, hipoclorito de sódio e de cálcio a 2,5% , e das citocininas 2iP, BAP e Zea a 5 µM no estabelecimento *in vitro* de marmeleiro japonês (*Chanomelis japônica* cv. Andramig), empregando segmentos nodais de plantas matrizes mantidas em casa de vegetação como fonte de explante. Aos 45 dias de cultivo

os autores verificaram que para os explantes desinfestados em hipoclorito de sódio e cultivados em meio MS contendo a presença isolada de 2iP ou Zea apresentaram as menores médias de folhas por explante (3,8 e 2,75 folhas.explante⁻¹, respectivamente) em relação aos segmentos nodais cultivados na presença isolada de BAP (38,6 folhas.explante⁻¹). Para os explantes desinfestados em hipoclorito de cálcio, as médias não diferiram estatisticamente entre si. No presente trabalho, embora não tenha sido utilizado os agentes desinfestantes hipoclorito de sódio e de cálcio, observou-se que o tratamento T5 (2iP) proporcionou o desenvolvimento de maior número médio de folhas por explante (2,1) em relação ao tratamento T3 (BAP), cuja média observada foi de 1,9 folhas por explante ao final do experimento (140º dia de cultivo) (Tabela 6 e Figura 5).

A análise de regressão polinomial (Figura 5) evidenciou ainda, que os tratamentos T6 e T7, contendo a associação das citocininas BAP e TDZ com ANA apresentam uma tendência ao desenvolvimento de maior número médio de folhas por explante em relação ao tratamento T2, contendo a aplicação isolada do ANA (T2), corroborando com os relatos de Torres; Caldas e Buso (1998), cuja utilização de citocininas estimula, além da maior produção da parte aérea através do aumento da massa fresca, o desenvolvimento de número de folhas e gemas.

Para o tratamento T8 (ANA/2iP) entretanto, observou-se um decréscimo para o número médio de folhas por explante em relação ao tratamento T2 e T5, nos quais foram acrescidos isoladamente o ANA e o 2iP, respectivamente (Figura 5).

Embora o tratamento T5 (2iP) tenha promovido maior desenvolvimento médio de folhas por explante em relação ao tratamento T8 (ANA/2iP) (Figura 5), observou-se intensa oxidação nas primeiras folhas originadas com conseqüente inibição ao seu desenvolvimento (Figura 7), sugerindo que o emprego isolado desta citocinina exerceu atuação tóxica aos explantes de pupunheira. Não obstante, Almeida (1994), empregando concentração consideravelmente superior de 2iP à utilizada no presente trabalho em ápices caulinares de pupunheiras, observou o desenvolvimento de plantas completas e com aspecto normal aos 35 dias de cultivo. Neste contexto, é provável que a sintomatologia tenha sido observada devido ao tempo de exposição dos explantes ao 2iP, visto que esta somente pode ser observada no 84º dia de cultivo e acometendo em grau moderado 80% dos explantes e intensificando aos 112 e 140 dias (Tabela 7). Cabe salientar novamente que pesquisas desenvolvidas com a utilização do ‘pulse’ muito provavelmente possibilitariam, além otimizar a cultura de tecidos pela redução do tempo

necessário à obtenção de mudas micropropagadas (PULLMAN *et al.*, 2003; ANDRADE; ALMEIDA; GONÇALVES, 2006), reduzir ou eliminar a atuação tóxica observada para o tratamento T5 (2iP).

Conforme observado, o processo oxidativo comprometeu apenas as primeiras folhas pinatisectas expandidas, sendo que as demais mostraram-se morfológicamente normais (Figura 7), embora seja provável que o reduzido comprimento médio da parte aérea observado aos 140 dias, seja decorrente da liberação de compostos fenólicos por estas folhas oxidadas, os quais, de acordo com Monaco *et al.* (1977), em contato com o oxigênio formam quinonas reduzindo o crescimento e causando mortalidade dos explantes.

De acordo com Pandura e Jarana (não publicado) apud Almeida (1994), a oxidação de explantes de pupunha pode ser influenciada pelo genótipo, tipo de explante, tempo de inoculação e transferência, estado físico do meio de cultura e pela ação de antioxidantes agregados ao meio. Almeida (1994) observou que nas culturas de pupunha, a aplicação de antioxidantes é desnecessária em devido a relativa baixa de oxidação observada, sendo prática mais vantajosa a realização de subculturas sucessivas.

Intensa oxidação foi observada por Silva *et al.* (2006) em segmentos nodais de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) obtidos a partir de brotações novas de mudas mantidas em casa de vegetação quando inoculadas em meio MS ou WPM (1980) contendo a presença isolada de 2iP (15,38%) em relação à utilização da zeatina (0%). Quando os segmentos nodais foram mantidos em geladeira a 5° C por um período de 15 dias antes do estabelecimento *in vitro*, os autores observaram que os efeitos oxidativos presentes nos explantes cultivados na presença de 2iP foram consideravelmente reduzidos (1,33%). Assim como ocorreu para os explantes provenientes da casa de vegetação (temperatura ambiente) e cultivados na presença isolada de zeatina, nenhum destes apresentou oxidação quando submetidos previamente a baixas temperaturas.

Não obstante, Carvalho, Biasi e Telles (2004) evidenciaram que ápices meristemáticos de caquizeiro cv. 'Fuyu', com aproximadamente 2 mm retirados de gemas apicais, medianas e basais de estacas lenhosas de plantas adultas em pomar, apresentaram redução na taxa de oxidação quando cultivados em meio MS contendo metade da concentração dos sais de nitrato (MS ½ N O₃) em concentrações mais elevadas de 2iP (20,0 µM) em relação a taxa de oxidação observada na testemunha (meio MS^{1/2} NO₃ isento de reguladores de crescimento), embora esta concentração do 2iP (20,0 µM) tenha estimulado o desenvolvimento de calos. Segundo os

autores, efeitos análogos já foram reportados para outros cultivares e variedades de caquizeiros, cujo incremento na concentração do 2iP promoveu o desenvolvimento de calos e (ou) uma redução na taxa oxidativa.

Neste trabalho, observou-se que o processo oxidativo ocorrido nas primeiras folhas dos explantes cultivados no tratamento T5 (2iP) foi inibido quando utilizou-se o tratamento T8, contendo 2iP em associação com ANA, visto que nenhum ápice caulinar sofreu oxidação nestas estruturas. A presença de oxidação foliar também não foi evidenciada para os demais tratamentos, porém, oxidação nas bainhas foliares mais externas, seccionadas em ocasião da obtenção do explante (Figura 7), ocorreu em todos os tratamentos sem comprometer o desenvolvimento normal dos explantes.

Convém salientar que nem todo processo oxidativo é desfavorável à micropropagação de pupunheiras, visto que Almeida e Almeida (2006) observaram células metabolicamente ativas e em processo de divisão, e a presença de centros meristemáticos no mesofilo em primórdios foliares de ápices caulinares mantidos em meio MS acrescido de BAP (7,1 μM), os quais apresentaram elevado grau de oxidação externamente e restritas exclusivamente ao tecido epidérmico. Além disso, quando os explantes foram transferidos para meio MS com ANA/BAP (12,9 e 3,55 μM , respectivamente), os autores evidenciaram a polarização dos centros meristemáticos e conseqüente desenvolvimento de embriões somáticos, caracterizando o padrão direto para a embriogênese somática.

3.5 Considerações finais

- Explantes cultivados em meio MS básico isento de biorreguladores proporcionaram o maior comprimento médio da parte aérea, taxa máxima de crescimento e número médio de folhas por explante em relação aos demais tratamentos contendo a presença de biorreguladores aos 140 dias de cultivo.
- A presença isolada de TDZ aos 140 dias de cultivo resultou em elevada taxa média de crescimento da parte aérea por explante, além de induzir a presença de acúleos ao longo da bainha, pecíolo e lâminas foliares. Elevado número médio de folhas por explante também foram observadas para este tratamento, embora apresentando severas anomalias quanto às dimensões e colorações (lâminas foliares grandes e cloróticas e (ou) folhas

reduzidas, enrugadas e com coloração escura), independentes do tempo de exposição a esta citocinina.

- O tratamento contendo a presença de ANA em associação com BAP aos 140 dias de cultivo evidenciou boa taxa média de crescimento por explante e desenvolveu o maior número médio de folhas por explantes em relação aos demais tratamentos contendo a presença de biorreguladores e morfológicamente normais no último período analisado.
- A presença isolada do BAP proporcionou moderado crescimento médio da parte aérea dos explantes aos 140 dias de cultivo desfavoreceu o número médio de folhas por explante desenvolvidas em relação aos demais tratamentos contendo a presença de biorreguladores. Todas as folhas apresentaram-se morfológicamente normais.
- Explantes cultivados na presença isolada de ANA tiveram consideravelmente desfavorecidos o comprimento e a taxa de crescimento máximo da parte aérea por explante, e o desenvolvimento de folhas.
- O tratamento contendo a presença de ANA em associação com TDZ promoveu bom comprimento médio da parte aérea por explante e obteve elevada taxa média de crescimento da parte aérea por explante em relação aos demais tratamentos com biorreguladores. Elevado número médio de folhas por explante foi também observado, embora evidenciando a mesma sintomatologia daquelas desenvolvidas no tratamento contendo a presença isolada de TDZ para alguns explantes (acúleos, lâminas foliares com grandes dimensões e cloróticas ou folhas pequenas, enrugadas e com coloração escura) e acúleos ao longo dos pecíolos e bainhas foliares.
- Explantes cultivados na presença isolada de 2iP tiveram desfavorecido o comprimento médio da parte aérea por explante em relação aos demais tratamentos aos 140 dias de cultivo, moderado número médio de folhas desenvolvidas por explante e elevado grau de oxidação nas primeiras folhas desenvolvidas em 80% dos explantes aos 140 dias de cultivo. Como a presença de oxidação foi detectada a partir do 84º dia de cultivo, a

retirada desta citocinina anterior a este período torna-se uma excelente alternativa à redução destas respostas tóxicas.

- O comprimento e a taxa máxima de crescimento da parte aérea foram desfavorecidos aos explantes cultivados em meio contendo a presença de ANA em associação com 2iP e obtiveram reduzido número médio de folhas desenvolvidas em relação aos demais tratamentos.
- As análises efetuadas para as médias reais e para as médias estimadas (regressão polinomial) evidenciaram que associação a de ANA com BAP, TDZ ou 2iP promoveu menor comprimento médio da parte aérea por explante em relação à utilização isolada destas citocininas.
- Para o número médio de folhas desenvolvidas por explante observou-se por meio das médias reais obtidas que ANA em associação com BAP foi mais favorável para este parâmetro em relação à aplicação isolada desta citocinina, enquanto o ANA em associação com TDZ promoveu o desenvolvimento de igual número médio de folhas por explante quando este último foi empregado isoladamente. Para o emprego do ANA em associação com 2iP, esta relação inverteu-se, proporcionando ao tratamento contendo a presença isolada de 2iP, maior desenvolvimento médio de folhas por explante.
- A análise de regressão exponencial evidenciou que os tratamentos contendo a presença de ANA em associação com BAP, TDZ ou 2iP promoveram menores taxas de crescimento médio da parte aérea por explante em relação aos tratamentos contendo a presença isolada destas citocininas, embora as análises efetuadas para as médias reais tenha se mostrado inversa para esta relação.
- A análise para a taxa média de crescimento máximo da parte aérea permitiu, ainda, estabelecer um período ótimo à retirada dos biorreguladores para cada tratamento, o que possibilitaria a redução de gastos com insumos laboratoriais e eliminar possíveis atuações

tóxicas decorrentes do tempo de exposição dos explantes aos reguladores de crescimento sem comprometer o íntegro desenvolvimento do vegetal.

- De acordo com as médias obtidas, os explantes cultivados na presença isolada das citocininas BAP, TDZ e 2iP apresentaram taxa média de crescimento máximo da parte aérea por explante posterior aqueles cultivados em associação com ANA ou na presença isolada deste último, embora a análise de regressão exponencial tenha evidenciado também, uma tendência mais tardia para a ocorrência da taxa média de crescimento da parte aérea por explante no tratamento contendo a presença de ANA em associação com 2iP.

3.6 Conclusões

- O melhor desenvolvimento das microplantas de pupunheiras ocorre em meio de cultura MS isento de biorreguladores ou acrescido de ANA e TDZ.
- O acréscimo isolado das citocininas BAP, TDZ e 2iP no meio de cultura MS promove tardiamente a taxa máxima de crescimento de microplantas de pupunheiras.
- A presença isolada do 2iP no meio de cultura MS promove intensa oxidação nas primeiras folhas desenvolvidas das microplantas de pupunheiras.
- A adição isolada de TDZ ou associado à ANA promove anomalias nos explantes de pupunheiras como dobramento foliar e desenvolvimento de acúleos.

Referências

- ALMEIDA, M. **Emprego da Cultura “in vitro” para multiplicação vegetativa em pupunha (*Bactris gasipaes* H.B.K.)** Palmae. 1994. 121p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biocências – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1994.
- ALMEIDA, M., ALMEIDA, C.V. Somatic embryogenesis and *in vitro* plant regeneration from pejibaye adult plant leaf primordial. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.9, p.1449-1452, 2006.
- ALMEIDA, M.; KERBAUY, G.B. Micropropagation of *Bactris gasipaes* H.B.K. (Palmae) through flowers bud culture. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Lavras, v.8, p.215-217, 1996.
- ANDRADE, W.F.; ALMEIDA, M.; GONÇALVES, A.N. Multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* sob estímulo com benzilaminopurina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.12, p.1715-1719, 2006.
- ANTUNES, L.E.C.; RASEIRA, M. do C.B. (Ed.).In: SIMPÓSIO NACIONAL DO MORANGO; 3.; ENCONTRO DE PEQUENAS FRUTAS NATIVAS DO MERCOSUL, 2006. Piracicaba. **Palestras...** Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2006. 145p. (Documento, n.171).
- ALQUINI, Y.; BONA, C.;BOERGER, M.R.T., COSTA, C.G.; BARROS, C.F. Epiderme. In:APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S.M. (Ed.) **Anatomia vegetal**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2006. 438p.
- ALVES JÚNIOR, J.; LOPES, A.S.; HERNANDEZ, F.B.T.; DOS SANTOS, R.A.; Bergamaschine, A.F. Produção de matéria verde em pupunheira irrigada. **Irriga**, Botucatu, v.10, n.4, p.349-356, 2005.
- BOVI, M.L.A. Palmito pupunha-informações básicas para o cultivo. In: FURIA, L.R.R. (Ed.). **Encontro sobre produção de palmito**, Piracicaba, CALQ/Departamento de Agricultura, 1993. p.12-23.
- BOVI, M.L.A.; MARTINS, C.C.; SPIERING, S.H. Desidratação de sementes de quatro lotes de pupunheira: efeito sobre a germinação e vigor. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, n.1, 109-112, 2004.
- CARVALHO, D.C.; BIASI, L.A.; TELLES, C.A. Organogênese do caquizeiro ‘Fuyu’ a partir de ápices meristemáticos. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.10, n.3, p.303-307, 2004.
- CHUENBOONNGARM, N.; CHAROONSOTE, S.; BHAMARAPRAVATI, S. Effect of BA and 2iP on shoot proliferation and somaclonal variation of *Gardênia jasminoides* Ellis *in vitro* culture. **ScienceAsia**, Thailand, v.27, p.137-141, 2001
- CLEMENT, C.R.; MANSARDT. A review of the importance of spines for pejibaye heart-of-palm production. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.83, p.11-23, 2000.

- CORDEIRO de SOUSA, J.; ROCHA, M.V.; ALVES, J.C.; CACAU, J.B.; CORREIA, D.; JÚNIOR, A.T.C. **Efeito das citocininas thidiazuron e benzilaminopurina na multiplicação de gemas *in vitro* de abacaxizeiro (*Ananas comosus* cv. Cayenne Champac).** EMBRAPA AGROINDÚSTRIA TROPICAL, 2001. Disponível em: <http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001/posters/01/posterpdf/01-025/025.PDF>. Acesso em: 03 out. 2007.
- DZAZIO, P.M.; BIASI, L.A.; ZANETTE, F. Micropropagação do porta-enxerto de videira '420-A'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24. n.3. p.759-764, 2002.
- EMBRAPA. Núcleo Tecnológico para Informática. **SOC – Software Científico**. Campinas, 1990.
- ETIENE, H.; LARTAUT, M.; MICHAUX-FERRIÈRE, N.; CARRON, M.P.; BERTHOULY, M.; TEISSON, C. Improvement of somatic embryogenesis in *hevea brasiliensis* (Mull. Arg.) using the temporary immersion technique. **In vitro Cell Development Plant Biology**, Gaithersburg, v.33. p.81-87, 1997.
- EEUWENS, C. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera*). **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 36, p.23-28, 1976.
- FERREIRA, S.A.N.; SANTOS, L.A. Viabilidade de sementes de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth). **Acta Amazônica**, Manaus, v.22, p.303-307, 1992.
- FIGUEIREDO, G.S.; SCHUCH, M.W.; DAMIANI, C.R.; CHISTÉ, E. **Estabelecimento *in vitro* de marmeleiro japonês (*Chaenomelis japonica*) cultivar Andramig I.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 20., Vitória. Disponível em: <http://200.137.78.15/cd_XXCBF/paginas/Biotecnologia/20080729_214509.pdf>. Acesso em: 26 nov. 2008.
- FLORES, R.; NICOLOSO, F.T; MALDANER, J. Propagação rápida de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken utilizando thidiazuron. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.9, n.1, p.1-7, 2007).
- GENKOV, T.; IVANOVA, I. Effect of cytokinin-active phenylurea derivatives on shoot multiplication, peroxidase and superoxide dismutase activities of *in vitro* cultured carnation. **Bulgarian Journal of Plant Physiology**, Sofia, v.21, n.1, p.73-83. 1995.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCT/EMBRAPA-CNPH, 1990. p.99-169.
- KERBAUY, G.B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara, 2004. 452p.

LEDO, A.S.; GOMES, K.K.P.; BARBOZA, S.B.S.C.; VIEIRA, G.S.C.; TUPINAMBÁ, E.A.; ARAGÃO, W.M. Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos e aclimatização de plântulas de coqueiro-anão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.24, n.2, p.147-154, 2007.

LEDO, A.S.; LAMEIRA, O.A.; BENBADIS, A.K.; MENEZES, I.C.; LEDO, C.A.S.; OLIVEIRA, M.S.P. Cultura *in vitro* de embriões zigóticos de açaizeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.3, p.468-472, 2001.

LIMA, C.S.M.; BANDEIRA, J.M.; RUBIN, S.; RIBEIRO, M.V.; BENITEZ, L.; PETERS, J.A.; BRAGA, E.J.B. Influência de fitorreguladores no crescimento *in vitro* de partes aéreas de *Mentha viridis*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, supl.2, p.669-671, 2007.

LIMA, M.M.; GONÇALVEZ, A.N. Efeito do thidiazuron na multiplicação *in vitro* de gemas de um clone de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus tereticornis*. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n.53, p.49-56, 1998.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings International Plant Propagators Society**, Seattle, v.30, p.421-427, 1980.

MOK, M.C.; MOK, D.W.S.; TURNER, J.E.; MUJER, C.V. Biological and biochemical effects of cytokinin-active phenylurea derivatives in tissue culture systems. **Hortscience**, Alexandria, v.22, p.1194-1197, 1987.

MOK, M.C.; MOK, D.W.S.; ARMSTRONG, D.J.; SHUDO, K.; ISOGAL, Y.; OKAMOTO, T. Cytokinin activity of N-phenyl-N⁷-1,2,3-thiadiazol-5-urea (thidiazuron). **Phytochemistry**, Elmsford, v.21, n.7, p.1509-1511, 1982.

MONACO, L.C.; SÖNDAHL, M.R.; CARVALHO, A.; CROCOMO, O.J.; SHARP, W.R. Applications of tissue culture in the improvement of coffee. IN: REINERT, J.; BAJAJ, Y.P.S. (Ed.). **Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture**. Berlin: Springer-Verlag, 1977, p.109-129.

MURASHIGE, T., SKOOG, F.: A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Plant Physiology**, Rockville, v.15, p.473-497, 1962.

MURTHY, B.N.S.; MURCH, S.J.; SAXENA, P.K. Thidiazuron: a potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis. **In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant**, Berlin, v.34, p.267-275, 1998.

NIEUWKERK, J.P.V.; ZIMMERMAN, R.H. Thidiazuron stimulation of apple shoot proliferation *in vitro*. **Hortscience**, Alexandria, v.21, n.3, p.516-518, 1986.

OLIVEIRA, M.A.J.; BOVI, M.L.A.; MACHADO, E.C.; RODRIGUES, J.D. Atividade da redutase de nitrato em mudas de pupunheira (*Bactris gasipaes*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, p.515-522, 2005.

PERES, L.E.P. Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n.25, 2002.

PEREIRA, F.D.; PINTO, J.E.B.P.; CARDOSO, M.G.; LAMEIRA, O.L. Propagação *in vitro* de chapéu-de-couro (*Echinodorus cf. scaber* Rataj), uma planta medicinal. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, p.74-80, 2000.

PIZZINATTO, M.A.; BOVI, M.L.A.; SPIERING, S.H.; BINOTTI, C.S. Patogenicidade de cinco espécies de *Fusarium* a plantas de pupunheira (*Bactris gasipaes*). **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.27, p.272-275, 2001

PRAXEDES, S.C.; SILVA JÚNIOR, A.F.; FIGUEIREDO, F.L.B.; FIGUEIREDO, M.L.; CÂMARA, F.A.A.; OLIVEIRA, O.F. Estiolamento *in vitro* do abacaxizeiro pérola em presença de ANA e AIA. **Caatinga**, Mossoró, v.14, ns. 1/2, p.13-15, 2001.

PULLMAN, G.S.; MONTELLO, P.; CAIRNEY, J.; XU, N.; FENG, X. Loblolly pine (*Pinus taeda* L.) somatic embryogenesis: maturation improvements by metal analyses of zygotic and somatic embryos. **Plant Science**, Atlanta, v.164, p.955-969, 2003.

RUBIN, S.; LIMA, C.S.M.; BANDEIRA, J.M.; RIBEIRO, M.V.; BENITZ, L.C.; PETERS, J.A.; BRAGA, E.J.B. Reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de *Thymus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, supl.2, p.480-482, 2007.

SALDANHA, C.W. Conservação *in vitro* de *Euterpe edulis* Martius através da embriogênese somática. 2007.108p. Dissertação (Mestrado em geomática) – Universidade Federal de Santa Catarina, Rio Grande do Sul, 2007.

SANTANA, M.C.; TEIXEIRA, S.L. Influência do ácido naftalenoacético no crescimento e enraizamento *in vitro* de plântulas de coqueiro (*Cocos nucifera* L.). **Biologia Geral e Experimental**, São Cristóvão, v.5, n.1, p.30-33, 2004.

SANTANA, M.C.; TEIXEIRA, S.L.; GOMES, J.E. Efeito da temperatura sobre a germinação *in vitro* de embriões zigóticos de *Cocos nucifera* L. (Arecaceae). **Biologia Geral e Experimental**, São Cristóvão, v.3, n.2, p.41-46, 2003.

SANTOS, A.F.DOS; LUZ, E.D.M.N.; FINATO, P.D.; TESSMANN, D.J.; VIDA, JB. Primeiro Relato da Podridão da Estipe da Pupunheira, Causada por *Phytophthora palmivora*, no Estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, Lavras, v.29, n.6, p.680-682, 2004

SCHULTHEIS, J.R.; CHÉE, R.P.; CANTLIFFE, D.J. Embriões somáticos e sementes sintéticas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCT/EMBRAPA-CNPq, 1990. p.226-249.

SILVA, L.C.; SCHUCH, M.W.; SOUZA, J.A.; ERIG, A.C.; ANTUNES, L.E.C. Meio nutritivo, reguladores de crescimento e frio no estabelecimento *in vitro* de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) cv. Delite. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.12, n.4, p.405-408, 2006.

SRIVASTAVA, L.M. Cytokinins. In: _____. **Plant growth and development – hormones and environment**. London: Academic Press, 2002a. chap.8, p.191-204.

_____. Auxins. In: _____. **Plant growth and development – hormones and environment**. London: Academic Press, 2002b. chap. 6, p.155-169.

STEINMACHER, D.A.; CLEMENT, C.R.; GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis from immature peach palm inflorescence explants: towards development of an efficient protocol. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.89, n.1 p.1-11. 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 719p.

TERMIGNONI, R.R. **Cultura de tecidos vegetais**. Porto Alegre: UFRGS, 2005. 182p.

TOMLINSON, P.B. Essays on the morphology of palms. VII. A digression about spines. **Príncipes**, Lawrence, v.6, p.44-52, 1962.

TORRES, A.C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J.A.. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: ABCT/EMBRAPA-CNPQ, 1998a. v.1, 509p.

VILLA, F.; ARAÚJO, A.G., PIO, L.A.S.; PASQUAL, M. Multiplicação *in vitro* da amoreira-prêta ‘ébano’ em diferentes concentrações de meio MS e BAP. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.29, n.3, p.582-589, 2005.

CAPÍTULO 4

ROTAS E PADRÕES MORFOGÊNICOS EM MICROPLANTAS DE PUPUNHEIRAS SUBMETIDAS A TRATAMENTOS COM BIORREGULADORES

Resumo

O monitoramento das rotas e padrões morfogênicos via análise histológica em cultura de tecidos são escassos, dificultando sobremaneira o pleno conhecimento da atuação dos biorreguladores sobre estes. Neste contexto, foram aferidas as rotas e padrões de respostas morfogênicas dos tecidos e células presentes em explantes de microplantas de pupunheiras cultivadas em meio de cultura previamente estabelecido à espécie (meio básico) suplementado ou não com ANA, BAP, TDZ e 2iP isoladamente ou combinados com ANA, visando ainda fornecer subsídios à compreensão do processo de micropropagação da espécie. A cada 28 dias, foram aferidos: o número de centros meristemáticos na região basal e nas bainhas dos explantes, o número de complexos celulares pró-embriogênicos e as rotas e padrões morfogênicos dos propágulos nas regiões inicial, mediana e final do explante, perfazendo 140 dias de cultivo. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com os resultados avaliados em microscopia de luz e submetidos ao ANOVA, teste de Tuckey ou expressos em médias contendo o desvio padrão segundo o parâmetro analisado. O tratamento contendo a associação ANA/TDZ induziu elevado número de centros meristemáticos a partir da desdiferenciação dos tecidos parenquimáticos na base dos explantes, sendo a região mediana a mais responsiva para este evento morfogênico. Tanto nos primórdios foliares dos propágulos, como nas bainhas dos explantes, os tratamentos contendo a associação ANA/BAP ou ANA/TDZ evidenciaram elevado número destas estruturas. Pró-embriões com origem unicelular foram induzidos na presença isolada de ANA a partir da desdiferenciação dos tecidos subepidérmico e cortical radicular, do tecido parenquimático da extremidade proximal da base do explante na presença isolada de ANA, do tecido epidérmico dos primórdios foliares de gemas adventícias na presença isolada de TDZ e pela aquisição de competência embriogênica de células em centros meristemáticos desenvolvidos na região mediana da base dos explantes em meio isento de biorreguladores, com TDZ ou na associação ANA/BAP ou ANA/TDZ. Pró-embriões com origem multicelular ocorreram no tratamento contendo a presença isolada do TDZ, a partir da atividade do meristema apical caulinar e a partir da polarização de elevado número de centros meristemáticos presentes na extremidade distal da base destes explantes. Embriões somáticos com origem multicelular foram induzidos na ausência ou na presença de ANA e TDZ, isolados ou em associação, a partir da (bi) polarização de centros meristemáticos originados da atividade meristemática do tecido parenquimático na região central da base dos explantes. Gemas adventícias foram induzidas com maior frequência em explantes na ausência de biorreguladores ou na presença de ANA/TDZ diretamente da extremidade proximal da base dos explantes, a partir da (uni) polarização de centros meristemáticos desenvolvidos pela atividade meristemática do tecido parenquimático ou por meio da (uni) polarização de traços procambiais do tecido materno, sendo que maior frequência ocorreu na ausência de biorreguladores e na associação ANA/TDZ. Entre os primórdios foliares dos explantes, estas estruturas foram frequentemente induzidas em tratamento contendo a presença isolada de ANA a partir da atividade meristemática proveniente da desdiferenciação epidérmica e subepidérmica nesta região.

Palavras-chave: Pejibaye; Reguladores de crescimento; Pró-embriões, Embriões somáticos; Gemas adventícias

CHAPTER 4

MORPHOGENIC ROUTES AND PATTERNS IN PEJIBAYE MICROPLANTS TREATED WITH BIOREGULATORS

Abstract

The monitoring of morphogenic routes and patterns by histological analysis in tissue culture is scarce, particularly hindering the full knowledge of the bioregulators performance on these. In this context, the routes and patterns of morphogenetic responses were measured in the tissues and cells presented in pejibaye microplant explants cultured in medium that was previously established to this species (basic medium), supplemented or not, with isolated NAA, BAP, TDZ and 2iP or combined with NAA, to also provide subsidies to the understanding of the micropropagation process of this species. Every 28 days, were measured the number of meristematic centers in the basal region and in the sheaths of explants, the number of pro-embryogenic cellular complex and the morphogenic routes and patterns of propagules in initial, middle and end regions of the explant, comprising 140 days of cultivation. The experiment was conducted in a completely randomized design; the results were evaluated by light microscopy and submitted to ANOVA, Tuckey test or cast in averages with the standard deviation on the analyzed parameter. The TDZ/NAA treatment induced a high number of meristematic centers from the dedifferentiation of parenchymatic tissues at the explants base; also the middle region was the most responsive to this morphogenetic event. For the both, the leaf primordia of propagules and the explant sheaths, the treatments with NAA/BAP or NAA/TDZ showed a high number of these meristematic centers. Pro-embryos from unicellular origin were induced, in the isolated presence of NAA, by the dedifferentiation of subepidermal and cortical root tissues, from parenchymatous tissue of the proximal extremity of the explant base. Moreover, pro-embryos were induced in the isolated presence of TDZ, from the epidermal tissue of adventitious buds leaf primordia, and in the isolated presence of TDZ, in NAA/BAP and in NAA/TDZ associations, and in bioregulator-free medium, by the acquisition of embryogenic competence of cells in meristematic centers that were developed in the middle of the explants base. Pro-embryos from multicellular origin occurred on TDZ treatment, by the activity of shoot apical meristem and the polarization of a high number of meristematic centers in the distal extremity of the explants base. Somatic embryos from multicellular origin were induced in the absence or in the isolated presence of NAA and TDZ, or in its association, by the (bi) polarization of meristematic centers originated from meristematic activity of the parenchymatous tissue in the central region of the explants base. Adventitious buds were more frequently induced in the absence of bioregulators or in the presence of NAA/TDZ, from the proximal extremity of the explants base, by the (uni) polarization of meristematic centers that were developed by meristematic activity of the parenchymatous tissue, or by the (uni) polarization of procambium trace of the maternal tissue. The higher frequency of adventitious buds induction occurred on bioregulator-free and NAA/TDZ association. Considering the explants leaf primordia, adventitious buds were often induced by the isolated ANA treatment, by the meristematic activity from the epidermal and subepidermal dedifferentiation at that region.

Keywords: Pejibaye; Growth regulators, Pro-embryos, Somatic embryos, Adventitious buds

4.1 Introdução

O desenvolvimento de métodos para a propagação vegetativa de *Bactris gasipaes* Kunth. é essencial, tanto por técnicas convencionais como *in vitro*, pois embora sejam bastante simples, precisam ser aperfeiçoados, pois inúmeros são os entraves no cultivo desta espécie, como a ocorrência de partenocarpia (HUERTE; ARIAS, 1981; ALMEIDA, 1994), e a polinização deficiente, colaborando para a formação de cachos com poucos frutos e sementes viáveis (ALMEIDA, 1994). Embora a regeneração *in vitro* direta de pupunheiras via organogênese e (ou) embriogênese somática tenha obtido resultados satisfatórios com as pesquisas realizadas por Almeida (1994), Almeida e Kerbauy (1996) e Almeida e Almeida (2006), o processo para micropropagação de pupunheiras necessita ser melhor compreendido, pois as palmeiras, em geral, são recalcitrantes (FERREIRA; SANTOS, 1992; BOVI, 1993; BOVI; MARTINS; SPIERING, 2004) e as plantas tendem a responder diferentemente às formulações dos meios de cultivo *in vitro*, principalmente aos biorreguladores, por meio de alterações nos níveis endógenos de auxina/citocinina e promovendo alterações na sensibilidade das células responsivas (GUERRA, TORRES, TEIXEIRA; 1999).

Em cultura de tecidos, os principais fatores que controlam a morfogênese são os reguladores vegetais, particularmente o balanço auxina/citocinina no meio de cultura (SKOOG; MILLER, 1957), cujas principais respostas ocorrem em nível organogênico (desenvolvimento de gemas vegetativas ou florais e raízes) ou por meio da embriogênese somática, com ou sem a precedência de calos.

Centros meristemáticos são comumente evidenciados em cultura de tecidos mediante o emprego de biorreguladores, conforme observaram Almeida e Almeida (2006), ao regenerarem plantas inteiras mediante a dupla polarização de centros meristemáticos originados no mesofilo de primórdios foliares de *B. gasipaes*, caracterizando a regeneração direta de plantas via embriogênese somática.

Os centros meristemáticos, ou meristemóides surgem na forma de nódulos, com disposição celular concêntrica em calos, onde serão gerados traqueídeos e elementos de tubo crivado, também em disposição concêntrica (TERMIGNONI, 2005). Os centros meristemáticos são constituídos ainda, por grupos de células pequenas e com citoplasma denso, os quais originam órgãos adventícios em tecidos de calos, (THORPE; MURASHIGE, 1970; THORPE, 1980) bem como nos explantes primários (HANDRO; FLOH, 1990).

Há uma grande variabilidade na resposta morfogênética *in vitro* entre as espécies e entre os genótipos da mesma espécie (GRATTAPLAGLIA; MACHADO, 1990), assim como ocorre nas células do calo, um dos padrões morfogênicos mais comuns em tecidos cultivados *in vitro* e que apresentam respostas distintas em suas camadas no novo ambiente segundo o grau de homogeneidade do explante (HANDRO; FLOH, 1990).

Em palmeiras, a utilização de ápices caulinares na cultura *in vitro* foi observado para *Syagrus oleracea* (Mart.) Becc. (MELO *et al.*, 2001); *Phoenix dactylifera* L. (GABR; TISSERAT, 1985; TISSERAT; DeMASON, 1985; ESHRAGHI; MIRABDULBAGHI, 2005); *Erythea edulis* S.; Wats., *Metroxyon* sp.; *Phoenix canariensis*; *Phoenix dactylifera* ‘Khalasa’, ‘Thoory’ e ‘Zahidi’; *Washingtonia filifera* Wendl. e *W. robusta* Wendl. (GABR; TISSERAT, B., 1985); *B. gasipaes*. (VALVERDE *et al.*, 1987; VALVERDE; ARIAS; THORPE, 1992; SALAZAR, 1986 apud ALMEIDA, 1994; ALMEIDA, 1994; ALMEIDA; ALMEIDA, 2006), embora poucos contenham a descrição anatômica dos eventos morfogênicos.

Apesar do conhecimento da necessidade do estudo anatômico na morfogênese *in vitro*, diversos trabalhos com cultura de tecidos mencionam as regenerações das plantas através da embriogênese ou organogênese, sem que haja uma constatação via análise histológica (ALMEIDA, 2002). O autor verificou que, para caracterizar a rota morfogênica (organogênese ou embriogênese), é fundamental um estudo anatômico da morfogênese *in vitro*. Além disso, estudos anatômicos e ultra-estruturais na regeneração de brotos *in vitro*, permitem a caracterização das estruturas e determinação das áreas meristemáticas envolvidas no processo, detectar o desenvolvimento anormal de estruturas e monitorar o acúmulo de substâncias durante esses processos (APPEZZATO-DA-GLÓRIA *et al.*, 2005). De acordo com Matsumoto *et al.*, 1996 apud ALMEIDA (2002), os estudos anatômicos permitem, ainda, determinar quais tipos celulares estão envolvidos na origem dos embriões somáticos ou das gemas adventícias.

Apesar do elevado potencial regenerativo dos centros meristemáticos residuais, não há pesquisas na literatura vigente abordando a atuação dos biorreguladores sobre o número destas estruturas desenvolvidas, bem como possíveis respostas morfogênicas em nível da polarização, passíveis de originar tanto gemas adventícias, como embriões somáticos.

Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo identificar por meio de análises histológicas as rotas e padrões de respostas morfogênicas dos tecidos e células presentes nos explantes de microplantas de pupunheiras submetidos aos diferentes tratamentos contendo ou não

os biorreguladores ANA, BAP, TDZ e 2iP isoladamente ou em combinação com ANA, visando ainda fornecer subsídios à compreensão do processo de micropropagação da espécie.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Local de realização do experimento

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas, no Departamento de Ciências Biológicas, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), Piracicaba-SP.

4.2.2 Material vegetal

Foram utilizadas 40 microplantas de pupunheiras inermes (*Bactris gasipaes* Kunth.-Arecaceae) desenvolvidas a partir da germinação *in vitro* de embriões excisados de sementes provenientes de Yurimáguas, Amazônia Peruana em meio constituído por sais de Murashige e Skoog (1962), isento de biorreguladores.

Para a obtenção dos explantes, foram selecionadas microplantas em estágio de desenvolvimento padronizados, com a parte aérea medindo aproximadamente 8,0 cm, contendo duas ou três folhas com duas pinas expandidas, sem propágulos evidentes e sistema radicular presente. Em câmara de fluxo laminar, removeram-se as raízes e partes aéreas das microplantas, preservando apenas o meristema apical e a base caulinar, com tamanho variando entre 1,0 e 2,5 cm (Figura 1) e cultivados em tubos de ensaio (150 x 25 mm) contendo 5 ml dos meios de cultura específicos aos tratamentos empregados.

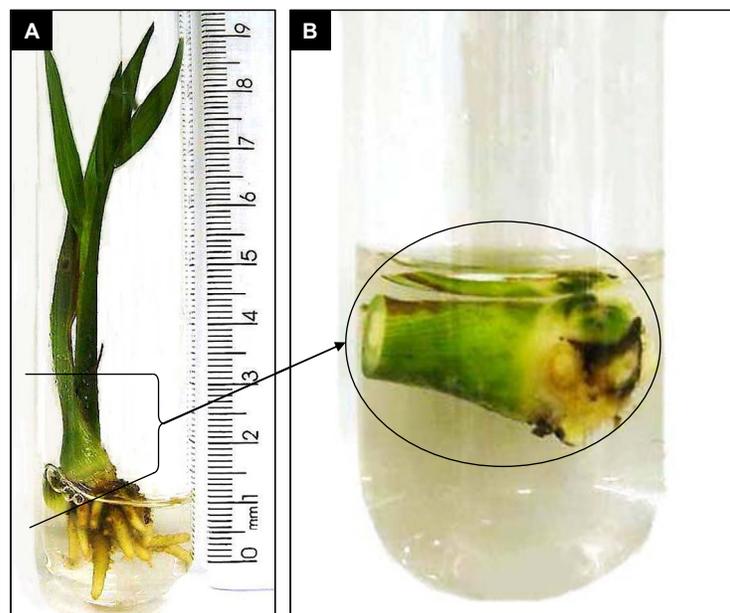


Figura 1 – A. Microplanta de *B. gasipaes* utilizada para obtenção do explante. As setas pretas contínuas delimitam a região de excisão das raízes e parte aérea, preservando apenas o meristema apical e base caulinar. B. Explante excisado da microplanta e cultivado no meio específico aos tratamentos utilizados

4.2.3 Meios de cultura e condições de cultivo

Os explantes caulinares excisados foram cultivados em meio de cultura pré-definido para o cultivo *in vitro* desta espécie (ALMEIDA, 1994) constituído por sais minerais de Murashige e Skoog (1962) acrescido de sacarose (30g.L^{-1}), mioinositol (100 mg.L^{-1}) e tiamina (5 ml.L^{-1}) (meio básico), com os tratamentos diferenciados pelo acréscimo de ANA, BAP, TDZ e 2iP isoladamente ou combinados ao ANA, constituindo oito tratamentos conforme descrito na Tabela 1.

Tabela1 – Concentrações e combinações de biorreguladores utilizados nos tratamentos

Biorreguladores	Tratamentos (μM)							
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
ANA	-----	12,9	-----	-----	-----	12,9	12,9	12,9
BAP	-----	----	3,55	-----	-----	3,55	-----	-----
TDZ	-----	----	-----	0,36	-----	-----	0,36	-----
2iP	-----	-----	-----	-----	0,4	-----	-----	0,4

A concentração de sais (MS) foi a mesma em todos os tratamentos, sendo que o pH dos meios de cultura foram ajustados para 5,8 antes da autoclavagem a 120° C e 1,2 atm durante 20 minutos.

Os explantes cultivados nos respectivos tratamentos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura e luminosidade controladas [$25 \pm 2^\circ \text{C}$; irradiância de $42 \mu\text{mol.s.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de radiação fotossinteticamente ativa (PAR), respectivamente] em fotoperíodo de 16 horas. Os meios de cultura foram renovados a cada 28 dias.

4.2.4 Coleta de dados

Aos 28, 56, 84, 112 e 140 dias foram coletados por sorteio um explante de microplanta de pupunheira de cada tratamento, os quais tiveram suas partes aéreas e sistemas radiculares excisados, preservando o meristema apical e base caulinar contendo ou não propágulos evidentes.

4.2.4.1 Análise histológica

As amostras foram fixadas em solução Karnovsky (1965), seguida de desidratação alcoólica-etílica em concentrações crescentes [10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100% (v/v)]. Em seguida as amostras foram inclusas em resina de hidroxietil metacrilato (Historesin, Leica, Heidelberg, Germany) de acordo com as recomendações do fabricante. Os blocos contendo as amostras foram seccionados longitudinalmente a 0,5 μm de espessura empregando navalhas de aço do tipo C acopladas a micrótomo rotativo manual. Os cortes obtidos foram corados com azul de toluidina (0,05%) em tampão fosfato e ácido cítrico (SAKAI, 1973) e montados em lâminas histológicas com resina sintética (Entellan®). As lâminas histológicas foram analisadas e fotomicrografadas em microscópio de luz (ZEISS-JENEMED2) e em estereomicroscópio Micronal, sendo as imagens capturadas na mesma escala com câmera SAMSUNG (SDC-313) e avaliadas para obtenção do número de centros meristemáticos presentes na região basal do explante, bainhas dos explantes e/ou primórdios foliares dos propágulos, número de complexos celulares pró-embriogênicos (centros meristemáticos polarizados).

As lâminas histológicas obtidas foram igualmente utilizadas para a análise das rotas e padrões morfogênicos.

4.2.4.2 Avaliação do número de centros meristemáticos na região basal

Por meio da microscopia de luz foram contados todos os centros meristemáticos distribuídos por toda a região basal, independente da origem ou dimensões, incluindo aqueles observados nos propágulos desenvolvidos, na região inicial, mediana e final do material emblocado (Figura 2) sendo que para efeito didático, a região basal foi subdividida em extremidade distal (Ed), central (Ce) e extremidade proximal (Ep) (Figura 3). Não foram computados os centros meristemáticos em evidente processo de diferenciação em feixes vasculares.

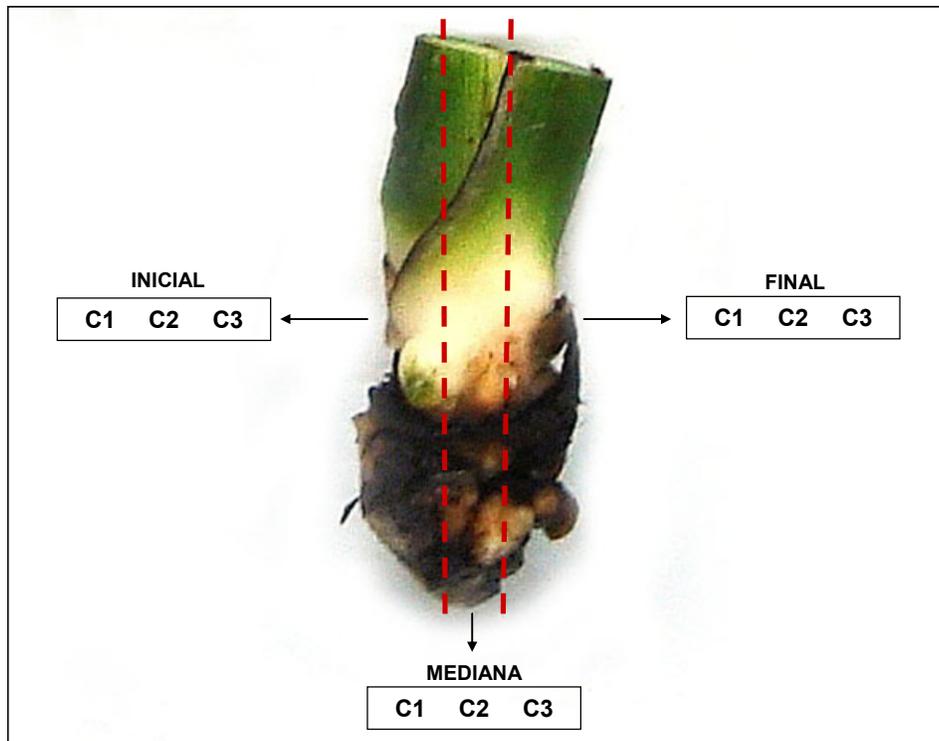


Figura 2 – Fotografia ilustrativa da metodologia empregada para as análises histológicas de explantes de microplantas de *B. gasipaes*. O material emblocado dividido em três regiões (inicial, mediana e final) (linhas tracejadas vermelhas). Cada região constou ainda de três cortes histológicos (C1, C2, C3) montados em lâminas histológicas

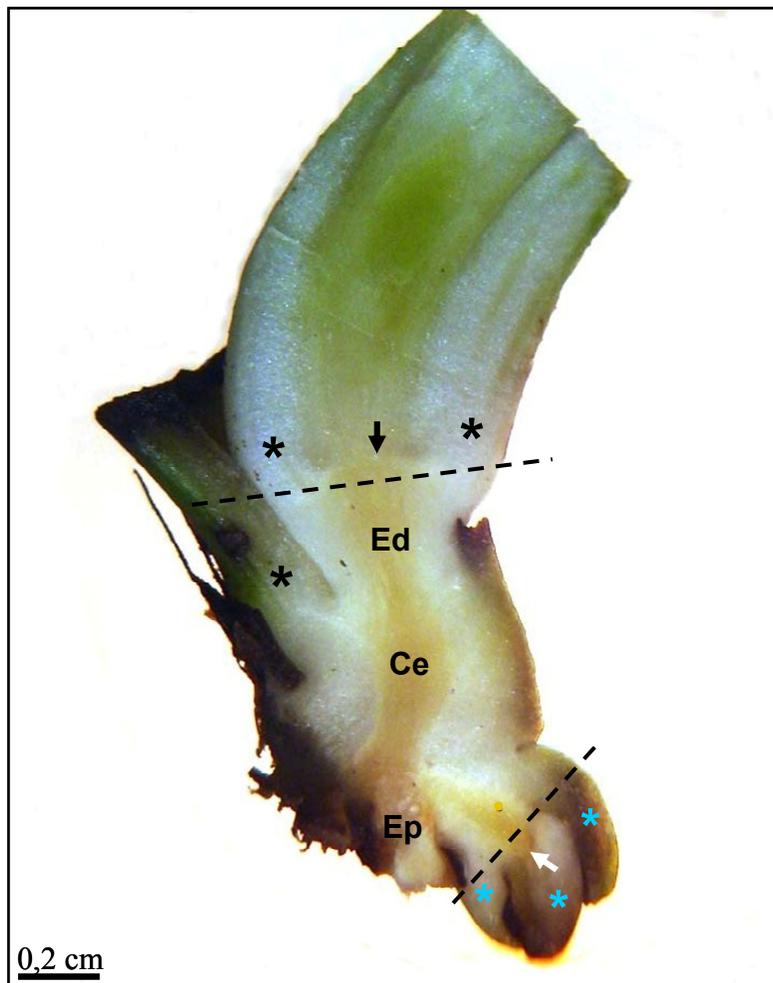


Figura 3 – Corte longitudinal do explante de microplanta de *B. gasipaes* ilustrando as regiões e subdivisões para avaliação histológica: Asteriscos pretos (bainhas do explante), asteriscos azuis (primórdios foliares dos propágulos), seta preta (meristema caulinar do explante) e branca (meristema caulinar do propágulo), espaço compreendido entre as linhas tracejadas (região basal). Ed = Extremidade distal da região basal; Ce = Centro da região basal; Ep = Extremidade proximal da região basal

4.2.4.3 Avaliação do número de centros meristemáticos nos primórdios foliares

Por meio da microscopia de luz foram contados todos os centros meristemáticos observados na região das bainhas foliares dos explantes e nos primórdios foliares dos propágulos desenvolvidos na região inicial, mediana e final na base dos materiais emblocados (Figuras 2 e 3). Não foram computados os centros meristemáticos em evidente processo de diferenciação, com elementos traqueais presentes. As avaliações foram efetuadas com um exemplar de cada tratamento aos 28, 56, 84, 112 e 140 dias de cultivo.

4.2.4.4 Avaliação do número de complexos celulares pró-embriogênicos

Por meio da microscopia de luz foram contados todos os complexos celulares pró-embriogênicos (centros meristemáticos polarizados) observados tanto na região basal como nas bainhas dos explantes emblocados e nos primórdios foliares dos propágulos desenvolvidos, na região inicial, mediana e final do material emblocado.

4.2.4.5 Avaliação das rotas e padrões morfogênicos

O monitoramento das rotas e padrões morfogênicos dos oito tratamentos foi efetuado por meio de microscopia de luz sobre os mesmos materiais empregados à análise do número de centros meristemáticos e complexos celulares pró-embriogênicos.

4.2.5 Delineamento estatístico

Todos os experimentos foram realizados no delineamento inteiramente casualizado com parcelas subdivididas no tempo em arranjo bifatorial (8 x 5), ou seja, oito dosagens de biorreguladores e cinco períodos de coleta de dados. Cada tratamento consistiu de uma repetição (unidade experimental), perfazendo 40 explantes no total do experimento. Cada unidade experimental constituiu em três parcelas subdivididas (inicial, mediana e final) e três repetições por parcela (três cortes/região) (Figura 2).

Foram mensurados integralmente os centros meristemáticos e complexos celulares pró-embriogênicos presentes na base e bainha dos explantes e/ou primórdios foliares dos propágulos, e efetuadas as médias dos valores obtidos nos três cortes (repetições) para cada região analisada (inicial, mediana e final) do material emblocado e calculados o desvio padrão.

Os dados referentes ao número de centros meristemáticos localizados na região basal do explante em todos os períodos analisados foram submetidos inicialmente à análise de variância (ANOVA) pelo Teste F a 1% de probabilidade de erro, seguida pelo Teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro para cada período individualmente.

Os valores obtidos para o número médio de centros meristemáticos foram expressos em $CM.explante^{-1}$ e os valores obtidos para o número médio de complexos celulares pró-embriogênicos foram expressos em $CCPE.explante^{-1}$.

4.3 Resultados

A atuação dos tratamentos ao longo do tempo não pode ser comparado estatisticamente devido à elevada variação dos dados obtidos, possivelmente devido às unidades experimentais (material seccionado) não serem homogêneas, ou seja, devido a apenas um explante representar cada tratamento em cada período analisado. Neste contexto, a atuação dos tratamentos ao longo do tempo para o número médio de centros meristemáticos observados foi representativo e realizado por meio da comparação entre as médias e (ou) frequência de eventos observados.

Os dados referentes ao número de centros meristemáticos observados nas bainhas e primórdios foliares e ao número de complexos celulares pró-embriogênicos (centros meristemáticos polarizados) não foram passíveis de análise estatística em devido ao número elevado de resultados nulos (zeros) observados nos explantes seccionados. Neste contexto, a atuação dos tratamentos sobre estes dados em função da região seccionada, entre tratamentos e o período analisado foi representativo e realizado por meio da comparação entre as médias e (ou) frequência de eventos.

4.3.1 Avaliação do número de centros meristemáticos na região basal

A análise da ANOVA permitiu inferir que os valores para o número médio de centros meristemáticos na região basal do explante foram significativos para o tipo de biorregulador empregado, para a região seccionada independente do período analisado. Da mesma forma observou-se que, independente do biorregulador utilizado, o número médio de centros meristemáticos evidenciado nas três regiões seccionadas foi significativo em função da região seccionada no material (inicial, mediana e final) (Tabela 2).

As análises permitiram evidenciar quais os tratamentos que apresentaram o maior e o menor número médio de centros meristemáticos localizados na região mediana do material seccionado dentro de um período ou entre estes e se apresentam distribuição homogênea e/ou heterogênea na periferia (inicial e final) ou em todo o explante (inicial, mediana e final).

Cabe salientar que o termo ‘periferia’ corresponde à região inicial e final do explante, comparadas entre si ou em relação à região mediana do explante.

Tabela 2 – Resumo da análise de variância para o número de centros meristemáticos aos 28 (NCM28), 56 (NCM 56), 84 (NCM 84), 112 (NCM 112) e 140 (NCM 140) dias de cultivo de explantes de microplantas de *B. gasipaes* em função do regulador de crescimento (REG) e da região analisada (RA)

Causas da Variação	GL	Quadrados Médios				
		NCM28	NCM 56	NCM 84	NCM 112	NCM 140
		----- (explante ⁻¹) -----				
REG	7	1.724,29 **	6.132,98 **	10.468,53 **	9.333,39 **	2.968,76 **
RA	2	1.447,54 **	655,60 **	679,04 **	2.910,93 **	1.217,56 **
REG * RA	14	1.261,83 **	1.341,42 **	2.094,07 **	1.989,55 **	935,49 **
Resíduo	48	4,07	34,06	53,85	62,92	12,11
Média	–	22,50	22,93	24,92	25,60	17,18
CV _{exp.} (%)	–	8,97	25,45	29,45	30,99	20,26

** valor significativo em nível de 1% de probabilidade de erro, pelo teste F.

GL = graus de liberdade, CV_{exp.} = coeficiente de variação experimental.

As análises histológicas efetuadas aos 28 dias de cultivo na região basal do explante evidenciaram maior número de centros meristemáticos na região mediana do explante no tratamento T5, com média de 74,33 CM.explante⁻¹, seguido pelo tratamento T6, com média de 53,67 CM.explante⁻¹. Os tratamentos T7, T8 e T3 não diferiram estatisticamente e apresentaram os menores números de centros meristemáticos por explante nesta região seccionada, cujos valores médios foram, respectivamente 2,67; 0,00 e 0,00 CM.explante⁻¹. Em relação às regiões inicial e final do explante, observou-se que apenas os tratamentos T1, T2, T3 T4, T7 e T8 diferiram estatisticamente, caracterizando uma distribuição heterogênea de centros meristemáticos na periferia do explante. Em nenhum tratamento foi observada uma distribuição homogênea de centros meristemáticos para as três regiões consideradas (inicial, mediana e final), sendo que apenas os tratamentos T6 e T8 diferiram estatisticamente para as três regiões seccionadas (Tabela 3 e Figura 4).

Tabela 3 – Número médio de centros meristemáticos por explante de microplantas de *B. gasipaes* na região inicial, mediana e final na base dos explantes aos 28 dias de cultivo

Tratamentos	Regiões Analisadas					
	Inicial		Mediana		Final	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
T1	29,67 Ad	± 2,08	18,00 Bd	± 2,64	3,33 Cde	± 0,58
T2	40,00 Ac	± 3,00	12,67 Bd	± 0,58	9,00 Bcd	± 0,00
T3	47,33 Ab	± 1,15	0,00 Ce	± 0,00	11,33 Bc	± 1,53
T4	62,33 Aa	± 2,3	25,67 Bc	± 3,51	7,33 Ccde	± 1,15
T5	39,67 Bc	± 0,58	74,33 Aa	± 1,15	40,33 Ba	± 6,11
T6	0,00 Bf	± 0,00	53,67 Ab	± 2,08	1,00 Be	± 0,00
T7	18,67 Be	± 2,08	2,67 Ce	± 1,53	29,67 Ab	± 0,58
T8	0,67 Bf	± 1,15	0,00 Be	± 0,00	12,67 Ac	± 1,53

Médias seguidas por mesma letra maiúscula entre as colunas e letras minúsculas na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tuckey em nível de 5% de probabilidade e erro. DP = Desvio Padrão.

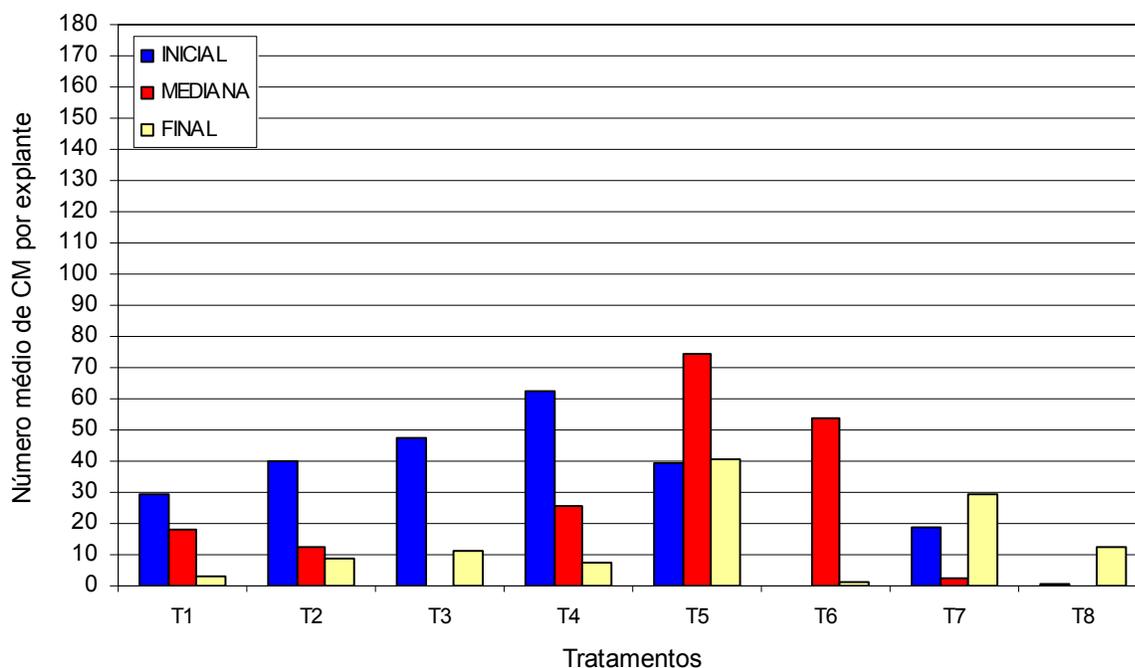


Figura 4 – Número médio de centros meristemáticos por explante de microplantas de *B. gasipaes* na região inicial, mediana e final da base dos explantes aos 28 dias de cultivo

Aos 56 dias de cultivo observou-se que o maior número de centros meristemáticos na região mediana do explante ocorreu para o tratamento T7, com média de 80,33 CM.explante⁻¹, seguido pelo tratamento T2 com média de 57,33 CM.explante⁻¹. No tratamento T8 não foi observado nenhum centro meristemático nesta região. Em relação às regiões periféricas (inicial e

final) do explante, os tratamentos T5, T6 e T7 evidenciaram heterogeneidade quanto ao número médio de centros meristemáticos observados. Já os tratamentos T1, T4 e T8 não diferiram estatisticamente em relação às três regiões seccionadas, caracterizando uma distribuição homogênea de centros meristemáticos na região basal dos explantes. Os únicos tratamentos que apresentaram uma distribuição heterogênea de centros meristemáticos nas três regiões seccionadas foram o T6 e T7 (Tabela 4 e Figura 5).

Tabela 4 – Número médio de centros meristemáticos por explante de microplantas de *B. gasipaes* nas regiões inicial, mediana e final da base dos explantes aos 56 dias de cultivo

Tratamentos	Regiões Analisadas					
	Inicial		Mediana		Final	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
T1	12,33 Ab	± 1,53	10,33 Acde	± 3,05	0,00 Ac	± 0,00
T2	13,67 Bb	± 4,72	57,33 Ab	± 10,70	27,33 Bb	± 3,21
T3	0,00 Bb	± 0,00	28,00 Ac	± 2,64	4,00 Bc	± 3,60
T4	5,33 Ab	± 4,04	4,00 Ade	± 1,73	13,33 Abc	± 2,31
T5	55,00 Aa	± 7,55	12,00 Bcde	± 7,94	4,00 Bc	± 2,64
T6	6,00 Bb	± 1,00	19,00 ABcd	± 1,00	28,33 Ab	± 3,78
T7	42,67 Ca	± 6,66	80,33 Ba	± 7,64	124,33 Aa	± 19,14
T8	0,33 Ab	± 0,58	0,00 Ae	± 0,00	2,67 Ac	± 1,15

Médias seguidas por mesma letra maiúscula entre as colunas e letras minúsculas na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tuckey em nível de 5% de probabilidade e erro. DP = Desvio Padrão.

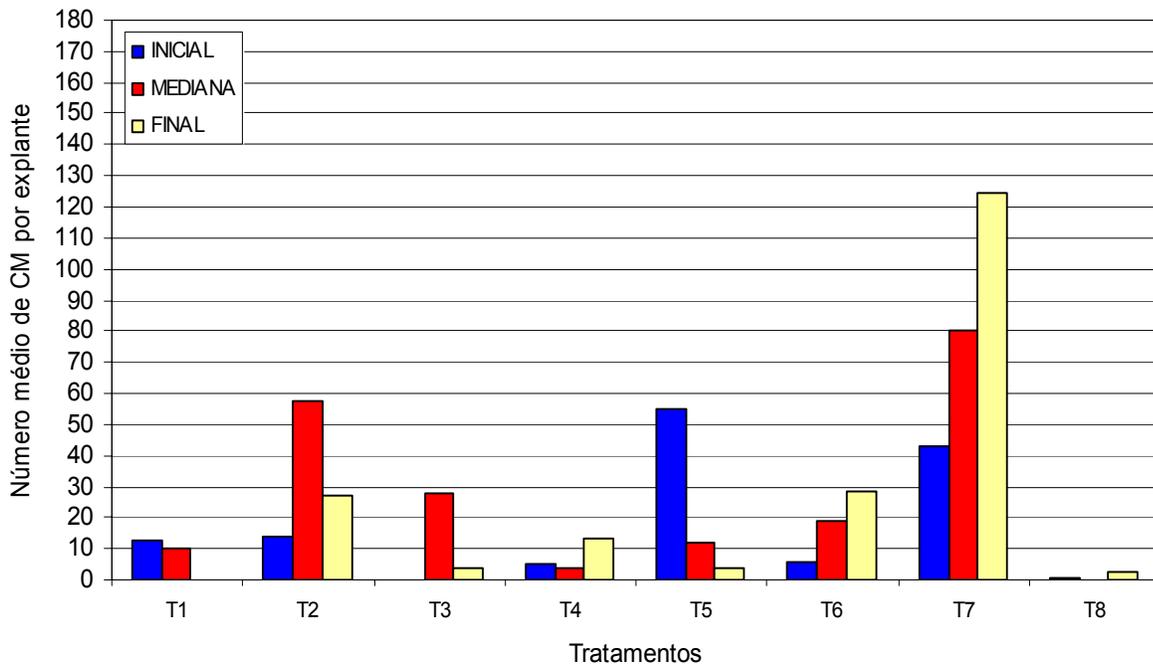


Figura 5 – Número médio de centros meristemáticos por explante de microplantas de *B. gasipaes* nas regiões inicial, mediana e final da base dos explantes aos 56 dias de cultivo

O tratamento T7 evidenciou maior número de centros meristemáticos na região mediana do explante aos 84 dias de cultivo em relação aos demais tratamentos, com $62,67 \text{ CM.explante}^{-1}$. Os tratamentos que apresentaram menor número médio de centros meristemáticos nesta região foram: T8 com $3,67 \text{ CM.explante}^{-1}$ e T3 com $1,33 \text{ CM.explante}^{-1}$, os quais não diferiram estatisticamente entre si. Os demais tratamentos apresentaram número de centros meristemáticos intermediários aos supracitados e não diferenciaram estatisticamente entre si. Ao comparar o número médio de centros meristemáticos nas secções iniciais em relação às finais dos explantes, observou-se elevada heterogeneidade para os tratamentos T2, T6, T7 e T8. Quando avaliados os números médios de centros meristemáticos nas três regiões seccionadas dos explantes, evidenciou-se que os tratamentos T1, T3, T4 e T5 não diferiram entre si tanto na região inicial como em relação à final (periféricas), como para as três regiões, caracterizando uma distribuição homogênea de centros meristemáticos nos explantes submetidos à estes tratamentos. O único tratamento que apresentou uma distribuição heterogênea de centros meristemáticos nas três regiões seccionadas foi o T7 (Tabela 5 e Figura 6).

Tabela 5 – Número médio de centros meristemáticos por explante de microplantas de *B. gasipaes* nas regiões inicial, mediana e final da base dos explantes aos 84 dias de cultivo

Tratamentos	Regiões Analisadas					
	Inicial		Mediana		Final	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
T1	5,00 Ac	± 0,00	21,33 Abc	± 6,51	0,00 Ac	± 0,00
T2	17,00 Bc	± 5,57	15,33 Bbc	± 4,93	51,67 Ab	± 4,04
T3	14,67 Ac	± 0,58	1,33 Ac	± 1,53	1,67 Ac	± 2,08
T4	2,00 Ac	± 3,46	21,00 Abc	± 1,00	8,00 Ac	± 1,00
T5	7,33 Ac	± 5,13	7,33 Abc	± 0,58	4,00 Ac	± 1,00
T6	2,33 Bc	± 0,58	29,33 Bb	± 2,52	6,00 ABc	± 3,60
T7	87,00 Ba	± 13,53	62,67 Ca	± 20,74	172,00 Aa	± 21,93
T8	55,00 Ab	± 1,73	3,67 Bc	± 3,21	2,33 Bc	± 1,53

Médias seguidas por mesma letra maiúscula entre as colunas e letras minúsculas na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tuckey em nível de 5% de probabilidade e erro. DP = Desvio Padrão.

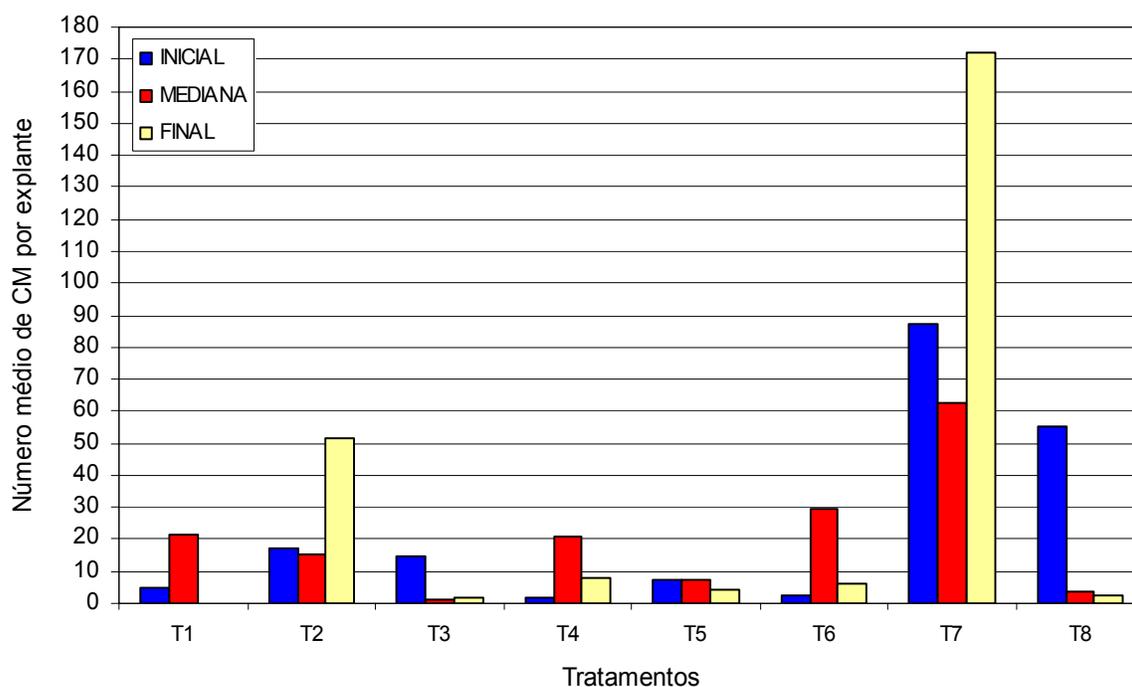


Figura 6 – Número médio de centros meristemáticos por explante de microplantas de *B. gasipaes* nas regiões inicial, mediana e final da base dos explantes aos 84 dias de cultivo

Aos 112 dias de cultivo, o tratamento T7 evidenciou o maior número de centros meristemáticos na região mediana do explante, com média de 104,00 CM.explante⁻¹. As respostas mais desfavoráveis ocorreram para o tratamento T8, com média de 21,33 CM.explante⁻¹, seguido

por T5, com 3,67 CM.explante⁻¹ e T1, com media de 2,00 CM.explante⁻¹. Os resultados observados para as regiões inicial e final dos materiais emblocados evidenciaram que os tratamentos T3, T6 e T7 diferiram estatisticamente, caracterizando uma distribuição heterogênea dos centros meristemáticos na periferia dos explantes. Os demais tratamentos (T1, T4 e T5 e T8) não diferiram estatisticamente, apresentando uma distribuição homogênea de centros meristemáticos nas três regiões seccionadas. O único tratamento que apresentou uma distribuição heterogênea de centros meristemáticos nas três regiões seccionadas (início, meio e fim) foi o tratamento T7 (Tabela 6 e Figura 7).

Tabela 6 – Número médio de centros meristemáticos por explante de microplantas de *B. gasipaes* nas regiões inicial, mediana e final da base dos explantes aos 112 dias de cultivo

Tratamentos	Regiões Analisadas					
	Inicial		Mediana		Final	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
T1	0,00 Ac	± 0,00	2,00 Ad	± 1,73	4,67 Ab	± 1,55
*T2	0,00 Ac	± 0,00	0,00 Ad	± 0,00	0,00 Ab	± 0,00
T3	31,67 ABb	± 5,51	49,00 Ac	± 2,00	10,67 Bab	± 2,52
T4	0,00 Ac	± 0,00	24,00 Acd	± 6,08	21,00 Aab	± 6,08
T5	3,33 Ac	± 1,55	3,67 Ad	± 1,53	0,67 Ab	± 1,55
T6	22,67 Bbc	± 0,58	76,33 Ab	± 8,08	20,00 Aab	± 4,58
T7	157,00 Aa	± 31,24	104,00 Ba	± 16,09	30,67 Ca	± 1,53
T8	11,33 Abc	± 6,03	21,33 Ad	± 4,62	20,33 Aab	± 2,08

Médias seguidas por mesma letra maiúscula entre as colunas e letras minúsculas na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tuckey em nível de 5% de probabilidade e erro. DP = Desvio Padrão.

* Material não analisado por ausência de infiltração da historesina.

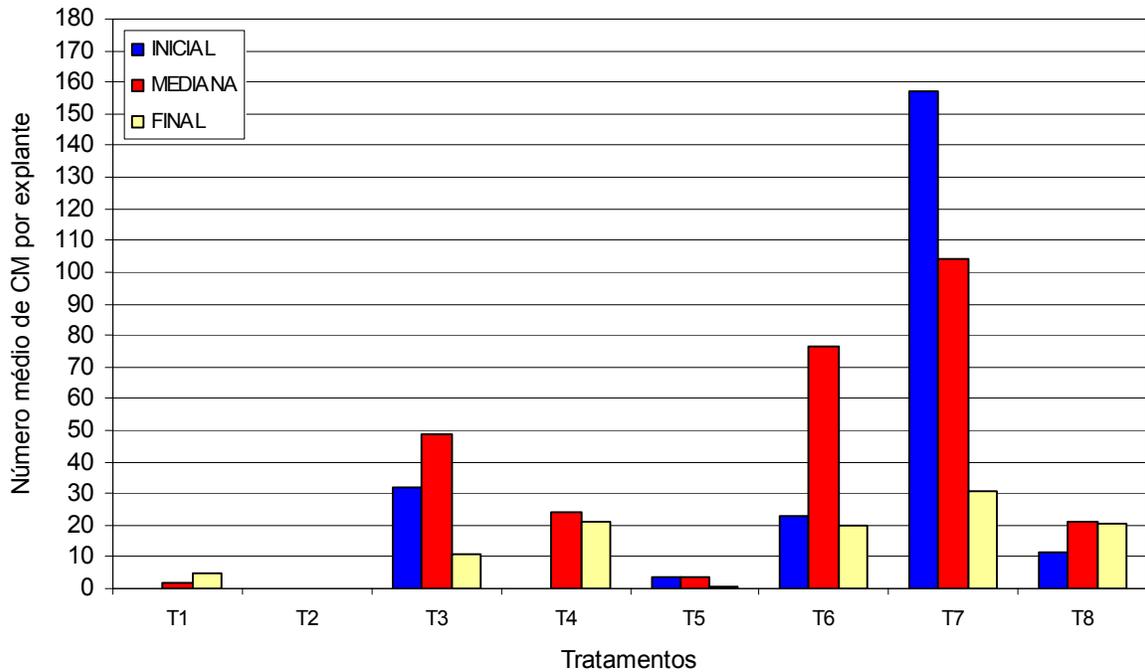


Figura 7 – Número médio de centros meristemáticos por explante de microplantas de *B. gasipaes* nas regiões inicial, mediana e final da base dos explantes aos 112 dias de cultivo

Aos 140 dias de cultivo, o tratamento T7 evidenciou o maior número de centros meristemáticos na região mediana do explante, com valor médio de $96,00 \text{ CM.explante}^{-1}$. Os menores números médios de centros meristemáticos para esta região foram verificados nos tratamentos T1 ($3,33 \text{ CM.explante}^{-1}$) e T3 ($0,67 \text{ CM.explante}^{-1}$), que não diferiram estatisticamente. Quando comparados os números médios de centros meristemáticos observados nas regiões inicial e final dos materiais seccionados, evidenciou-se que os tratamentos T2, T4, T6, e T8 diferiram estatisticamente, conferindo uma distribuição heterogênea de centros meristemáticos na periferia dos explantes. Os tratamentos T1 e T3 não diferiram estatisticamente para o número médio de centros meristemáticos nas três regiões seccionadas, enquanto os tratamentos T2, T6 e T7 evidenciaram uma distribuição heterogênea de centros meristemáticos nos explantes analisados (Tabela 7 e Figura 8).

Tabela 7 – Número médio de centros meristemáticos por explante de microplantas de *B. gasipaes* nas regiões inicial, mediana e final da base dos explantes aos 140 dias de cultivo

Tratamentos	Posição					
	Inicial		Mediana		Final	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
T1	4,33 Abcd	± 1,55	3,33 Ad	± 0,58	7,33 Ad	± 1,16
T2	10,33 Bbcd	± 1,55	11,00 Bcd	± 3,60	27,67 Abc	± 0,58
T3	1,33 Acd	± 0,58	0,67 Ad	± 1,55	3,00 Ada	± 0,00
T4	23,33 Ba	± 3,05	31,33 Bb	± 1,53	66,33 Aa	± 1,55
*T5	0,00 Ad	± 0,00	0,00 Ad	± 0,00	0,00 Ad	± 0,00
T6	12,33 ABabc	± 0,58	21,00 Abc	± 6,56	4,33 Bd	± 2,31
T7	13,67 Cab	± 1,52	96,00 Aa	± 13,75	38,67 Bb	± 3,05
T8	6,33 Bbcd	± 0,58	5,67 Bd	± 0,58	24,33 Ac	± 2,08

Médias seguidas por mesma letra maiúscula entre as colunas e letras minúsculas na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tuckey em nível de 5% de probabilidade e erro. DP = Desvio Padrão.

* Material não analisado por ausência de infiltração da historessina.

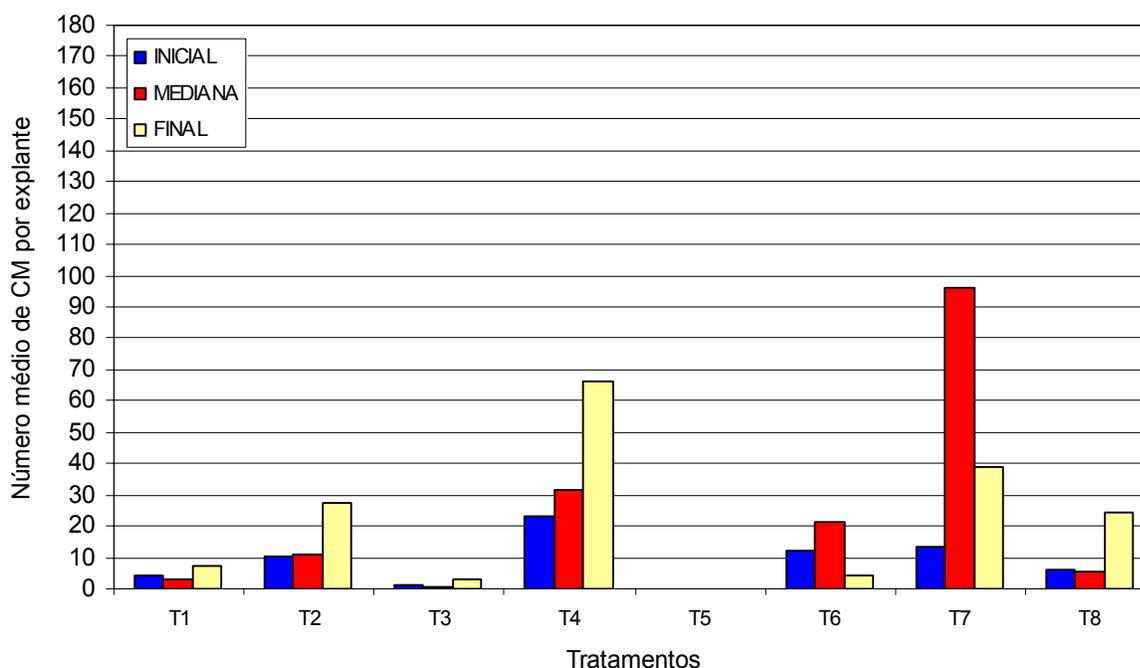


Figura 8 – Número médio de centros meristemáticos por explante de microplantas de *B. gasipaes* nas regiões inicial, mediana e final da base dos explantes aos 140 dias de cultivo

Cabe salientar que os tratamentos T5 e T6, aos 28 dias de cultivo (Tabela 3 e Figura 4) e o tratamento T3 aos 56 dias de cultivo (Tabela 4 e Figura 5) evidenciaram homogeneidade para o número médio de centros meristemáticos na periferia do explante (região inicial e final do explante), estando estes consideravelmente em menor número em relação à região mediana do

explante. Os demais tratamentos apresentaram heterogeneidade para o número médio de centros meristemáticos na periferia do explante e distribuição homogênea ou heterogênea nas três regiões analisadas (inicial, mediana e final).

Embora a atuação dos tratamentos sobre o número de centros meristemáticos desenvolvidos em função do período analisado não seja passível de análise estatística, observou-se por meio das frequências observadas, determinado comportamento repetitivo envolvendo alguns tratamentos em relação ao número médio de centros meristemáticos na região mediana dos explantes, bem como sua distribuição nas três regiões analisadas (inicial, mediana e final).

As análises histológicas evidenciaram que o tratamento T7 apresentou o maior número médio de centros meristemáticos na região mediana do explante em relação aos demais tratamentos aos 56, 84, 112 e 140 dias de cultivo, mostrando-se reduzido apenas no primeiro período de análise (28 dias). Já o tratamento T8 apresentou o menor número médio de centros meristemáticos na região mediana do explante, em relação aos demais tratamentos aos 28, 56, 84 e 112 dias de cultivo. Embora aos 140 dias de cultivo, o tratamento T8 não tenha evidenciado o menor número médio de centros meristemáticos nesta região, manteve este valor em um nível muito reduzido (Tabelas 3 a 7; Figura 4 a 8).

Dos tratamentos que evidenciaram elevada heterogeneidade para o número médio de centros meristemáticos na periferia do explante, o tratamento contendo ANA em associação com TDZ (T7) apresentou maior frequência e em todos os períodos analisados, seguido pelo tratamento contendo ANA em associação com BAP (T6) aos 56, 84, 112 e 140 dias de cultivo (Tabelas 3 a 7; Figuras 4 a 8).

Quando as regiões inicial, mediana e final dos materiais foram comparadas, observou-se que o tratamento T7 esteve presente em todos os períodos analisados com elevada heterogeneidade à distribuição de centros meristemáticos. O tratamento que evidenciou distribuição homogênea de centros meristemáticos nas três regiões analisadas e com maior frequência nos períodos analisados foi o tratamento T1, aos 56, 84, 112 e 140 dias de cultivo, seguido pelo tratamento T4 aos 56, 84 e 112 dias de cultivo (Tabelas 3 a 7; Figuras 4 a 8).

4.3.2 Avaliação do número de centros meristemáticos nas bainhas dos explantes e primórdios foliares dos propágulos

As análises efetuadas aos 28 dias de cultivo evidenciaram que os tratamentos T3, T4, T5, T6, T7 e T8 apresentaram centros meristemáticos nas bainhas e primórdios foliares, sendo que no tratamento T7 ocorreu o maior número médio de centros meristemáticos em relação aos demais tratamentos, com média de 1,00 CM.explante⁻¹ na região inicial, 2,67 CM.explante⁻¹ na mediana e 5,67 CM.explante⁻¹ na final do explante, enquanto que, em T6 verificou-se o menor número médio de centros meristemáticos: 0,00 CM.explante⁻¹ (inicial), 0,33 CM.explante⁻¹ (mediana) e 1,33 CM.explante⁻¹ (final) do explante. (Tabela 8 e Figura 9).

Na região mediana do explante, o maior número médio de centros meristemáticos ocorreu para o tratamento T4, com média de 4,33 CM.explante⁻¹ e o menor resultado foi verificado para o tratamento T6. Nos demais tratamentos (T1 e T2) não foram evidenciados centros meristemáticos (Tabela 8 e Figura 9).

Tabela 8 – Tabela representativa do número médio de centros meristemáticos por explante de microplantas de *B. gasipaes* nas bainhas, primórdios foliares e nas regiões inicial, mediana e final da base dos explantes aos 28 dias de cultivo

Tratamentos	Regiões Analisadas					
	Inicial		Mediana		Final	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
T1	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00
T2	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00
T3	1,00	± 0,00	2,00	± 1,00	0,00	± 0,00
T4	1,00	± 0,00	4,33	± 2,52	0,00	± 0,00
T5	1,00	± 0,00	0,00	± 0,00	1,33	± 0,58
T6	0,00	± 0,00	0,33	± 0,58	1,33	± 0,58
T7	1,00	± 0,00	2,67	± 2,08	5,67	± 4,16
T8	0,00	± 0,00	1,00	± 0,00	3,00	± 0,00

DP = Desvio Padrão.

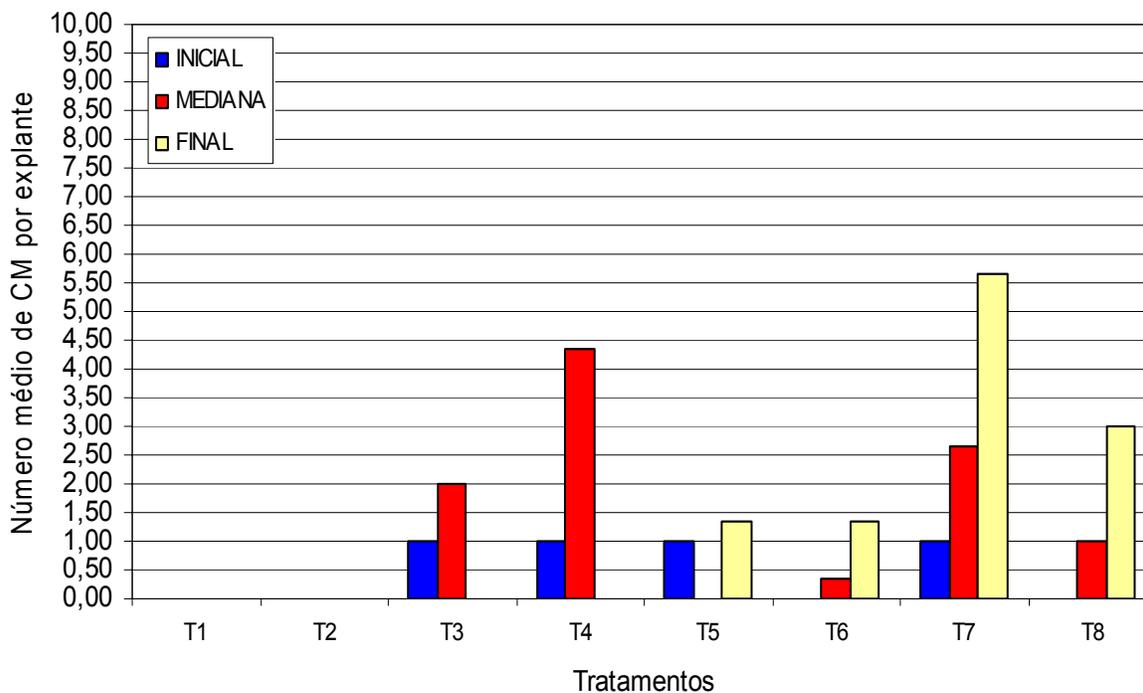


Figura 9 – Gráfico representativo do número médio de centros meristemáticos por explante de microplantas de *B. gasipaes* nas bainhas, primórdios foliares e nas regiões inicial, mediana e final da base dos explantes aos 28 dias de cultivo

Já aos 56 dias de cultivo, os únicos tratamentos em que foram observados centros meristemáticos foram os tratamentos T2 e T6, com maior número médio de centros meristemáticos em T2 com $0,00 \text{ CM.explante}^{-1}$ na região inicial, $2,33 \text{ CM.explante}^{-1}$ na mediana e $4,00 \text{ CM.explante}^{-1}$ na final do explante (Tabela 9 e Figura 10).

Tabela 9 – Tabela representativa do número médio de centros meristemáticos por explante de microplantas de *B. gasipaes* nas bainhas, primórdios foliares e nas regiões inicial, mediana e final da base dos explantes aos 56 dias de cultivo

Tratamentos	Regiões Analisadas					
	Inicial		Mediana		Final	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
T1	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00
T2	0,00	± 0,00	2,33	± 1,15	4,00	± 1,73
T3	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00
T4	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00
T5	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00
T6	0,00	± 0,00	1,00	± 1,00	1,33	± 1,15
T7	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00
T8	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00

DP = Desvio Padrão

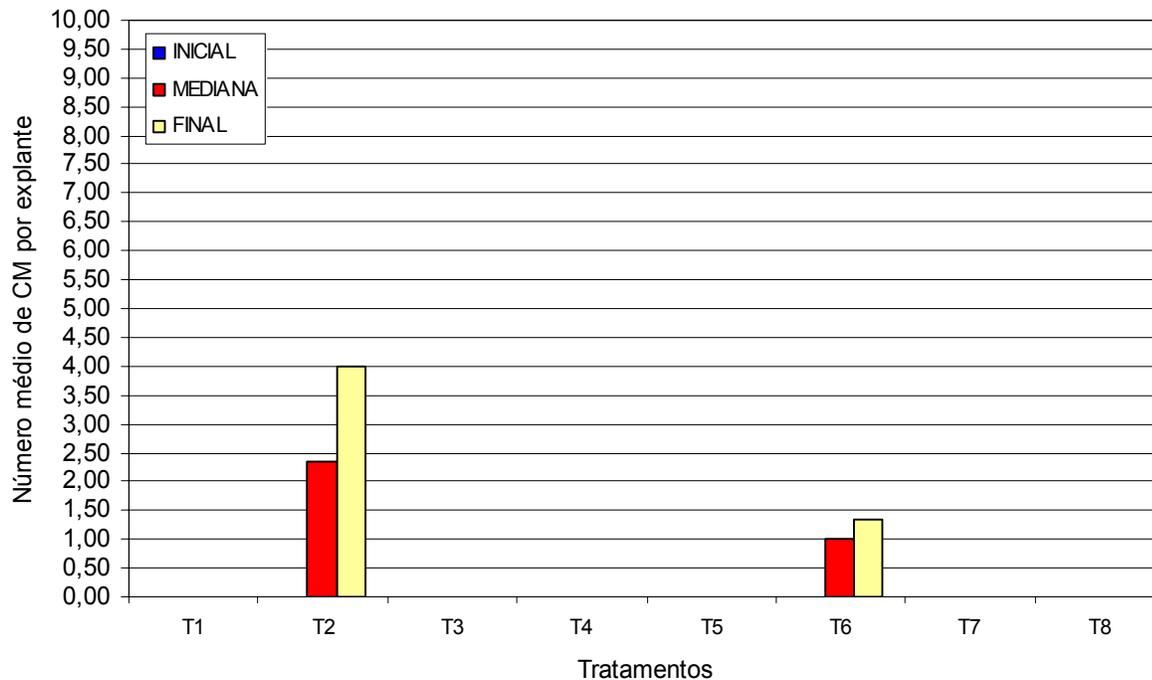


Figura 10 - Gráfico representativo do número médio de centros meristemáticos por explante de microplantas de *B. gasipaes* nas bainhas, primórdios foliares e nas regiões inicial, mediana e final da base dos explantes aos 56 dias de cultivo

Aos 84 dias de cultivo, a maioria dos tratamentos apresentou centros meristemáticos em suas bainhas e/ou primórdios foliares, a exceção dos tratamentos T4 e T5 (Tabela 10 e Figura 11), sendo que o maior número médio de centros meristemáticos ocorreu no tratamentos T6, com 0,00 CM.explante⁻¹ na inicial, 5,67 CM.explante⁻¹ na mediana e 10,00 CM.explante⁻¹ na final do explante e no tratamento T7, com 4,00 CM.explante⁻¹ na inicial, 5,67 CM.explante⁻¹ na mediana e 1,33 CM.explante⁻¹ na final do explante. A menor resposta dentre os tratamentos que evidenciaram estas estruturas ocorreu para o tratamento T1, com média de 0,33 CM.explante⁻¹ na região mediana do explante (Tabela 10 e Figura 11).

Tabela 10 – Tabela representativa do número médio de centros meristemáticos por explante de microplantas de *B. gasipaes* nas bainhas, primórdios foliares e nas regiões inicial, mediana e final da base dos explantes aos 84 dias de cultivo

Tratamentos	Regiões Analisadas					
	Inicial		Mediana		Final	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
T1	0,00	± 0,00	0,33	± 0,58	0,00	± 0,00
T2	0,00	± 0,00	1,00	± 0,00	0,00	± 0,00
T3	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	1,00	± 0,00
T4	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00
T5	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00
T6	0,00	± 0,00	5,67	± 3,21	10,00	± 7,21
T7	4,00	± 1,00	5,67	± 1,15	1,33	± 2,31
T8	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	2,00	± 0,00

DP = Desvio Padrão.

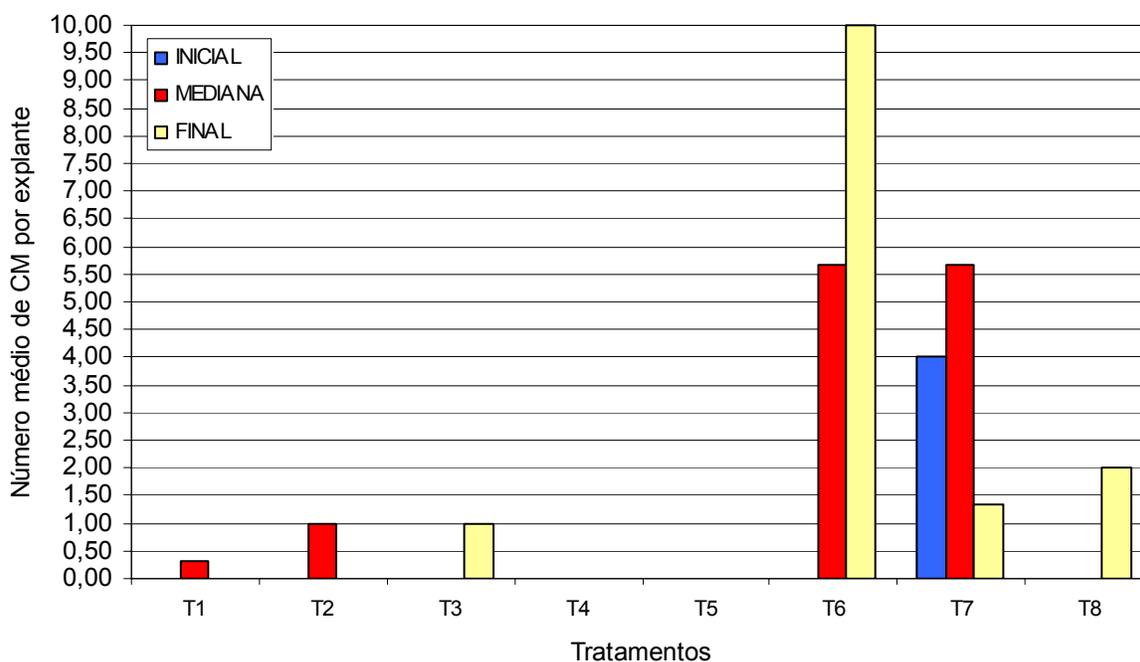


Figura 11 – Gráfico representativo do número médio de centros meristemáticos por explante de microplantas de *B. gasipaes* nas bainhas, primórdios foliares e nas regiões inicial, mediana e final da base dos explantes aos 84 dias de cultivo

A exceção dos tratamentos T1 e T6, nenhum outro tratamento evidenciou centros meristemáticos em suas bainhas e/ou primórdios foliares aos 112 dias de cultivo (Tabela 11 e Figura 12). O tratamento T1 apresentou o número médio de centros meristemáticos (2,00 CM.explante⁻¹ na região inicial do explante) maior que o T6 (1,00 CM.explante⁻¹ na região final

do explante), não sendo evidenciadas estas estruturas na região mediana dos explantes (Tabela 11 e Figura 12).

Tabela 11 – Tabela representativa do número médio de centros meristemáticos por explante de microplantas de *B. gasipaes* nas bainhas, primórdios foliares e nas regiões inicial, mediana e final da base dos explantes aos 112 dias de cultivo

Tratamentos	Regiões Analisadas					
	Inicial		Mediana		Final	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
T1	2,00	± 1,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00
*T2	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00
T3	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00
T4	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00
T5	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00
T6	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	1,00	± 0,00
T7	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00
T8	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00

DP = Desvio Padrão.

* Material não analisado por ausência de infiltração da historessina.

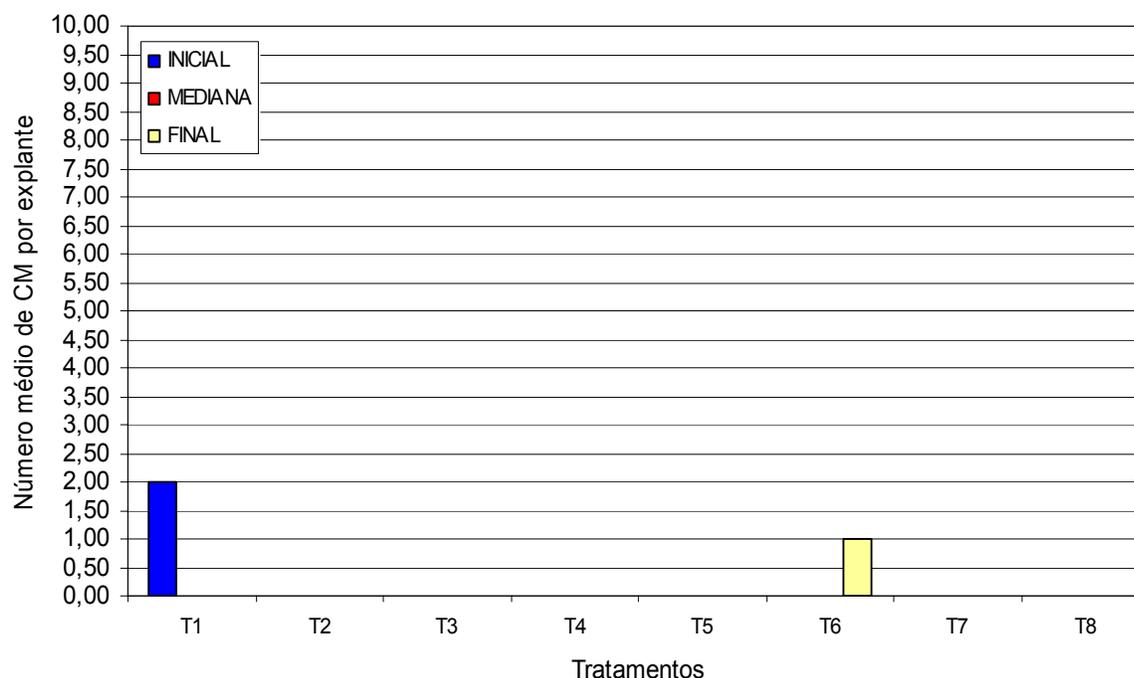


Figura 12 – Gráfico representativo do número médio de centros meristemáticos por explante de microplantas de *B. gasipaes* nas bainhas, primórdios foliares e nas regiões inicial, mediana e final da base dos explantes aos 112 dias de cultivo

Aos 140 dias de cultivo, os únicos tratamentos que evidenciaram centros meristemáticos em suas bainhas e/ou primórdios foliares foram os tratamentos T2 e T6. Ambos apresentaram média de 1,00 CM.explante⁻¹ localizados na região final (T2) e mediana (T6) dos explantes (Tabela 12 e Figura 13).

Tabela 12 – Tabela representativa do número médio de centros meristemáticos por explante de microplantas de *B. gasipaes* nas bainhas, primórdios foliares e nas regiões inicial, mediana e final da base dos explantes aos 140 dias de cultivo

Tratamentos	Regiões Analisadas					
	Inicial		Mediana		Final	
	Média	PD	Média	PD	Média	DP
T1	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00
T2	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	1,00	± 0,00
T3	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00
T4	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00
*T5	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00
T6	0,00	± 0,00	1,00	± 0,00	0,00	± 0,00
T7	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00
T8	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00

DP = Desvio Padrão.

* Material não analisado por ausência de infiltração da historesina.

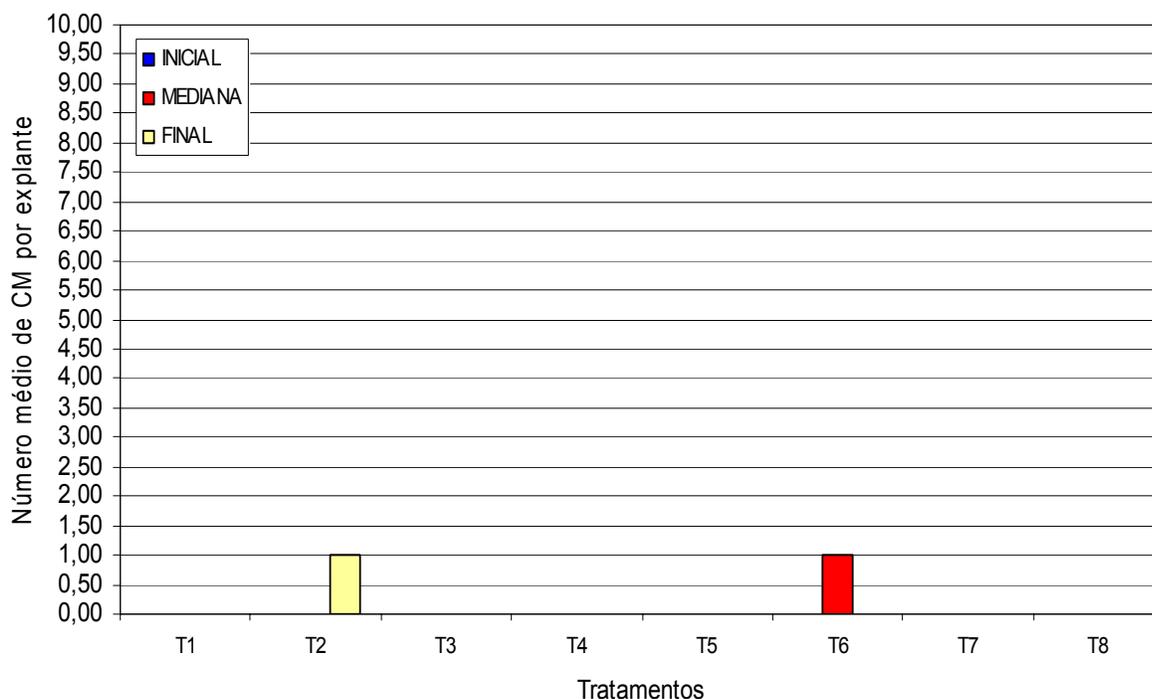


Figura 13 – Gráfico representativo do número médio de centros meristemáticos por explante de microplantas de *B. gasipaes* nas bainhas, primórdios foliares e nas regiões inicial, mediana e final da base dos explantes aos 140 dias de cultivo

Quando observada a atuação dos tratamentos sobre o número de centros meristemáticos em suas bainhas e/ou primórdios foliares em função do período de cultivo, verificou-se que estas estruturas apresentaram-se quantitativamente reduzidas em todos os tratamentos e períodos analisados, cuja distribuição nas três regiões analisadas apresentou considerável heterogeneidade. Observou-se ainda, que nos períodos de 28 e 84 dias de cultivo, ocorreu o maior número de tratamentos com a formação de centros meristemáticos em relação aos demais períodos. O tratamento T6 evidenciou centros meristemáticos em todos os períodos analisados, seguido pelo tratamento T2, o qual apresentou estas estruturas aos 56, 84 e 140 dias. Os tratamentos que apresentaram centros meristemáticos em suas bainhas e/ou primórdios foliares em apenas um período foram o T4 e T5, aos 28 dias de cultivo. Os demais tratamentos apresentaram esta resposta aos 28 e 84 dias de cultivo, a exceção do tratamento T1, com centros meristemáticos nas bainhas e/ou primórdios foliares evidenciados aos 84 e 112 dias de cultivo (Tabelas 8 a 12 e Figuras 9 a 13).

Com relação ao número de centros meristemáticos observados em função dos períodos analisados, o tratamento T6 evidenciou um incremento para o número médio de centros

meristemáticos até o 84º dia de cultivo, com considerável queda nos períodos subsequentes. Comparando os períodos com ocorrência destas estruturas no tratamento T7 e considerando as três regiões analisadas (inicial, mediana e final) observou-se um aumento no número de centros meristemáticos aos 84 dias de cultivo em relação ao período anterior (28 dias) (Tabelas 8 a 12 e Figuras 9 a 13).

4.3.3 Avaliação do número de complexos celulares pró-embriogênicos

As análises realizadas aos 28, 56, 84, 112 e 140 dias evidenciaram que todos os tratamentos proporcionaram o desenvolvimento de complexos celulares pró-embriogênicos (CCPE) na região basal dos explantes, embora nenhuma destas estruturas tenha sido observada em suas bainhas ou primórdios foliares (Tabelas 13 a 17 e Figuras 14 a 18).

Aos 28 dias de cultivo, CCPEs foram evidenciados nos tratamentos T1, T3, T4, T5 e T7, apresentando este último maior número médio de CCPEs neste período (2,00 CCPE.explante⁻¹), localizados na região inicial da base do explante (Tabela 13 e Figura 14). Os tratamentos T1 e T4 apresentaram média de 2,00 CCPE.explante⁻¹, sendo que no primeiro tratamento foi observado na região inicial e no segundo, tanto na inicial, como na mediana da região basal do explante. Os tratamentos T3 e T5 evidenciaram média de 1,00 CCPE.explante⁻¹, localizados na região inicial e mediana da base dos explantes, respectivamente (Tabela 13 e Figura 14).

Tabela 13 – Tabela representativa do número médio de complexos celulares pró-embriogênicos (CCPE) por explante de microplantas de *B. gasipaes* nas regiões inicial, mediana e final da base dos explantes aos 28 dias de cultivo

Tratamentos	Regiões Analisadas					
	Inicial		Mediana		Final	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
T1	2,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00
T2	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00
T3	0,00	± 0,00	1,00	± 0,00	0,00	± 0,00
T4	1,00	± 0,00	1,00	± 0,00	0,00	± 0,00
T5	1,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00
T6	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00
T7	0,00	± 0,00	3,00	± 0,00	0,00	± 0,00
T8	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00

DP = Desvio Padrão.

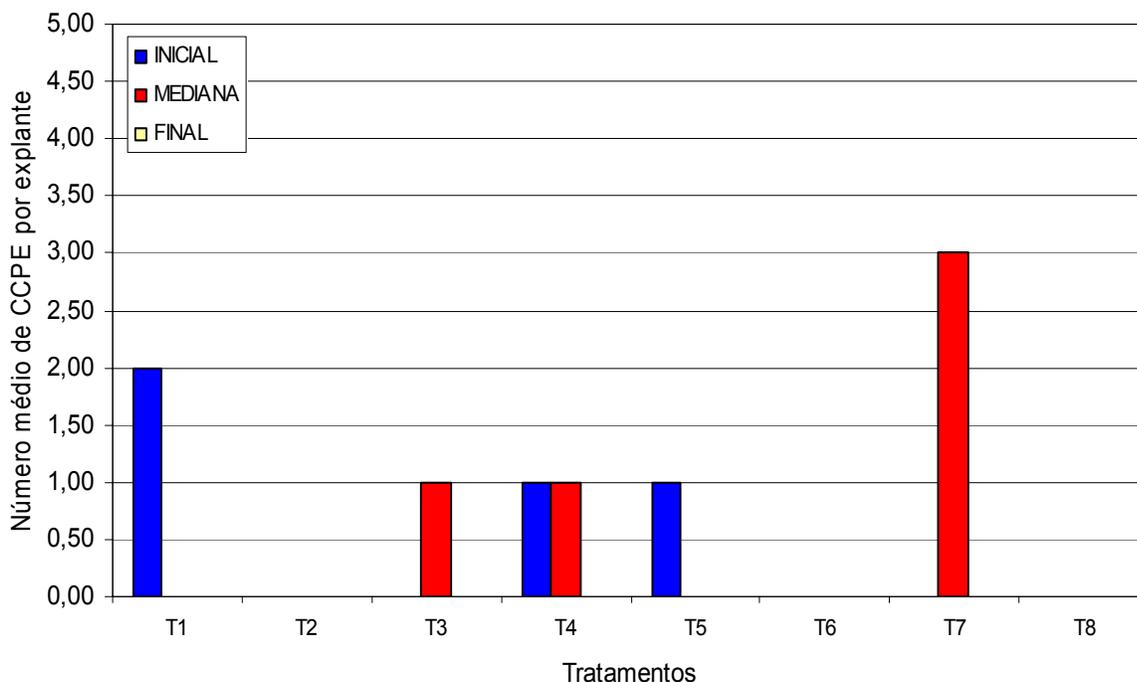


Figura 14 – Gráfico representativo do número médio de complexos celulares pró-embriogênicos (CCPE) por explante de microplantas de *B. gasipaes* nas regiões inicial, mediana e final da base dos explantes aos 28 dias de cultivo

Aos 56 dias de cultivo, somente o tratamento T6 evidenciou a presença CCPEs, com média de 1,00 CCPE.explante⁻¹ nas regiões mediana e final da base do explante (Tabela 14 e Figura 15).

Tabela 14 – Tabela representativa do número médio de complexos celulares pró-embriogênicos (CCPE) por explante de microplantas de *B. gasipaes* nas regiões inicial, mediana e final da base dos explantes aos 56 dias de cultivo

Tratamentos	Regiões Analisadas					
	Inicial		Mediana		Final	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
T1	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00
T2	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00
T3	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00
T4	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00
T5	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00
T6	0,00	± 0,00	1,00	± 0,00	1,00	± 0,00
T7	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00
T8	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00

DP = Desvio Padrão.

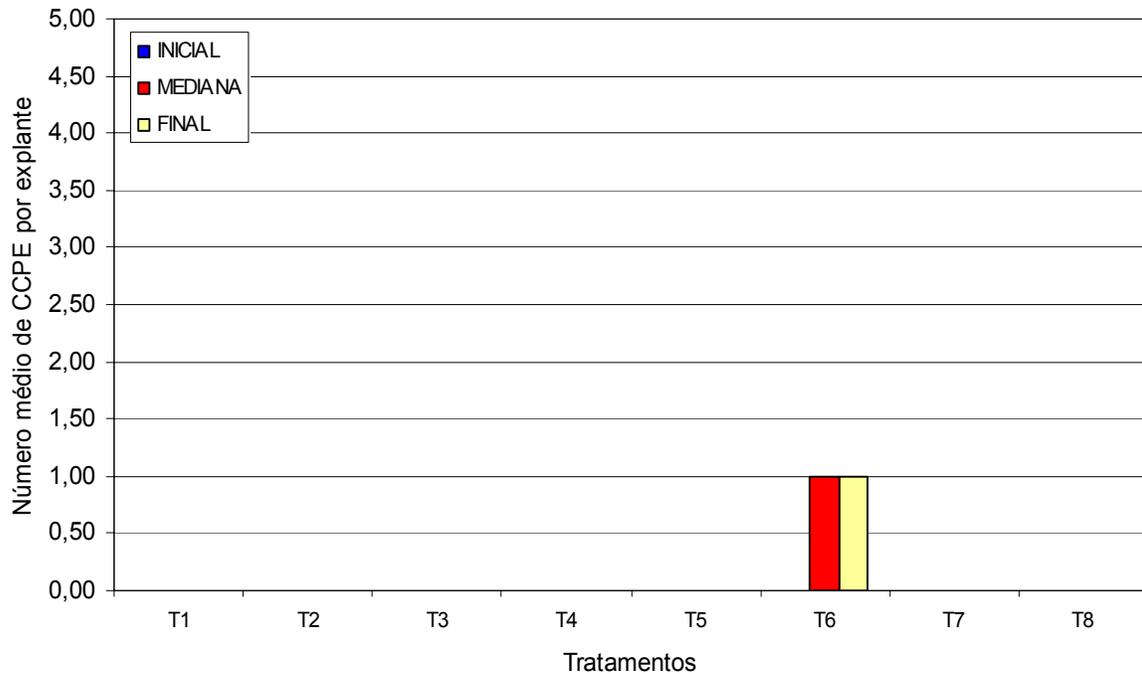


Figura 15 – Gráfico representativo do número médio de complexos celulares pró-embriogênicos (CCPE) por explante de microplantas de *B. gasipaes* nas regiões inicial, mediana e final da base dos explantes aos 56 dias de cultivo

Os tratamentos T1 e T7 foram os únicos a evidenciarem CCPEs no 84º dia de cultivo. O maior número de CCPEs ocorreu para o tratamento T7, com média de 3,00 CCPE.explante⁻¹ na região mediana e 1,00 CCPE.explante⁻¹ na inicial e final da base do explante. O tratamento T1 evidenciou média de 1,00 CCPE.explante⁻¹ na região inicial da base do explante (Tabela 15 e Figura 16).

Tabela 15 – Tabela representativa do número médio de complexos celulares pró-embriogênicos (CCPE) por explante de microplantas de *B. gasipaes* nas regiões inicial, mediana e final da base dos explantes aos 84 dias de cultivo

Tratamentos	Regiões Analisadas					
	Inicial		Mediana		Final	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
T1	1,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00
T2	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00
T3	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00
T4	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00
T5	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00
T6	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00
T7	1,00	± 0,00	3,00	± 0,00	1,00	± 0,00
T8	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00

DP = Desvio Padrão.

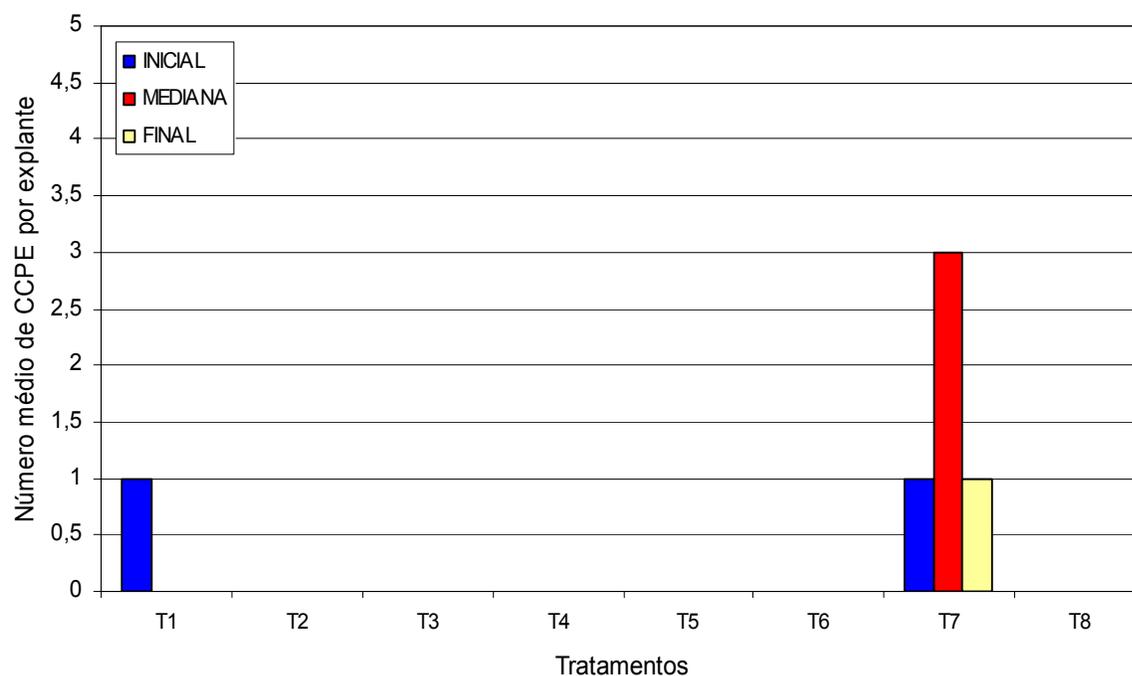


Figura 16 – Gráfico representativo do número médio de complexos celulares pró-embriogênicos (CCPE) por explante de microplantas de *B. gasipaes* nas regiões inicial, mediana e final da base dos explantes aos 84 dias de cultivo

Aos 112 dias de cultivo evidenciou-se CCPEs apenas nos tratamentos T4 e T8, apresentando este último, maior número de CCPE.explante⁻¹ neste período (2,00 CCPE.explante⁻¹), na região inicial da base do explante. O tratamento T4 evidenciou média de 1,00 CCPE.explante⁻¹ na região final da base do explante (Tabela 16 e Figura 17).

Tabela 16 – Tabela representativa do número médio de complexos celulares pró-embriogênicos (CCPE) por explante de microplantas de *B. gasipaes* nas regiões inicial, mediana e final da base dos explantes aos 112 dias de cultivo

Tratamentos	Regiões Analisadas					
	Inicial		Mediana		Final	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
T1	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00
*T2	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00
T3	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00
T4	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	1,00	± 0,00
T5	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00
T6	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00
T7	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00
T8	2,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00

DP = Desvio Padrão.

* Material não analisado por ausência de infiltração da histoiresina.

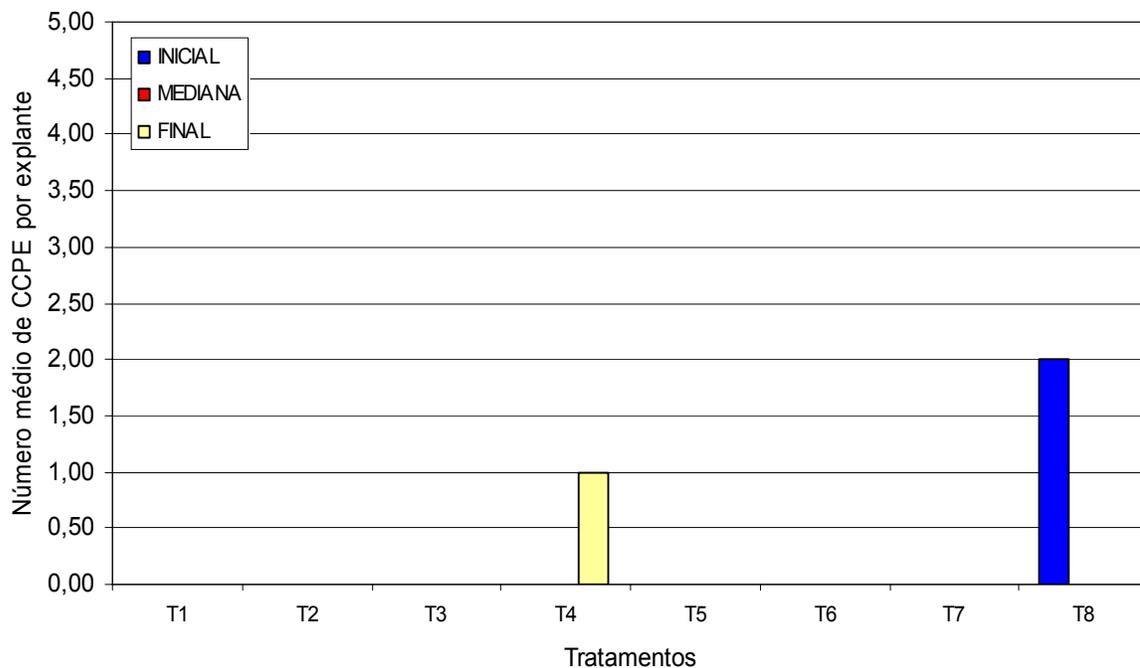


Figura 17 – Gráfico representativo do número médio de complexos celulares pró-embriogênicos (CCPE) por explante de microplantas de *B. gasipaes* nas regiões inicial, mediana e final da base dos explantes aos 112 dias de cultivo

No último período de análise (140 dias), foram observados CCPEs nos tratamentos T2, T3, T4, T6 e T7, com maior número de CCPEs ocorrendo para o tratamento T6, que apresentou média de 3,00 CCPE.explante⁻¹ na região inicial, 1,00 CCPE.explante⁻¹ na mediana e 1,00 CCPE.explante⁻¹ na final da base do explante (Tabela 17 e Figura 18). Os tratamentos T2 e T4

evidenciaram média de 2,00 CCPE.explante⁻¹ nas regiões mediana e final da base dos explantes. Os resultados mais desfavoráveis dentre os tratamentos que desenvolveram estas estruturas ocorreram para os tratamentos T3 e T7, ambos com média de 1,00 CCPE.explante⁻¹ na região inicial da base do explante. Não foi observado CCPE nos tratamentos T1 e T8 para este período (Tabela 17 e Figura 18).

Tabela 17 – Tabela representativa do número médio de complexos celulares pró-embriogênicos (CCPE) por explante de microplantas de *B. gasipaes* nas regiões inicial, mediana e final da base dos explantes aos 140 dias de cultivo

Tratamentos	Regiões Analisadas					
	Inicial		Mediana		Final	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
T1	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00
T2	0,00	± 0,00	2,00	± 0,00	2,00	± 0,00
T3	1,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00
T4	0,00	± 0,00	2,00	± 0,00	2,00	± 2,31
*T5	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00
T6	3,00	± 0,00	1,00	± 0,00	1,00	± 0,00
T7	1,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00
T8	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00

DP = Desvio Padrão.

* Material não analisado por ausência de infiltração da histoiresina.

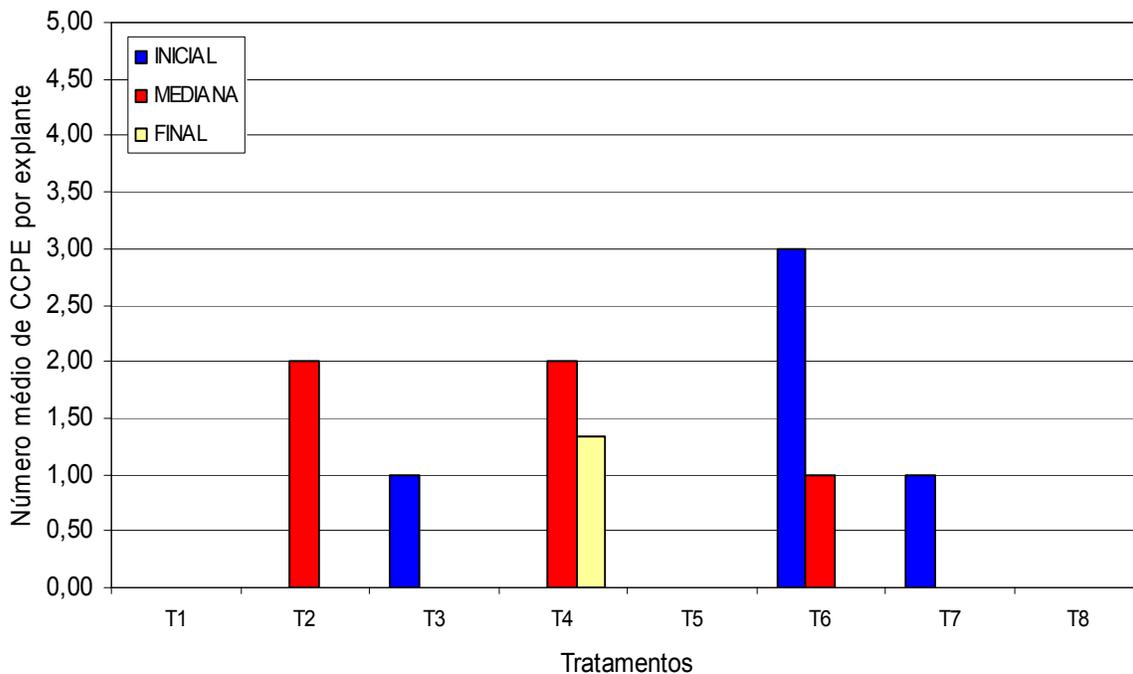


Figura 18 – Gráfico representativo do número médio de complexos celulares pró-embriogênicos (CCPE) por explante de microplantas de *B. gasipaes* nas regiões inicial, mediana e final da base dos explantes aos 140 dias de cultivo

Quando observada a atuação dos tratamentos sobre o desenvolvimento de CCPEs em função do período de cultivo, verificou-se que estas estruturas ocorreram em três períodos para o tratamento T4, aos 28, 112 e 140 dias de cultivo ou no T7 aos 28, 84 e 140 dias de cultivo. Já os tratamentos T1, T3 e T6 apresentaram CCPEs em dois períodos de cultivo (Tabelas 13 a 17 e Figuras 14 a 18). O tratamento T1 evidenciou CCPEs aos 28 e 84 dias de cultivo, T3 aos 28 e 140 dias de cultivo e T6 aos 56 e 140 dias de cultivo. Já os tratamentos T5, T8 e T2 evidenciaram CCPEs somente em um período, aos 28, 112 e 140 dias de cultivo, respectivamente. (Tabelas 13 a 17 e Figuras 14 a 18).

É importante salientar que, embora a frequência dos CCPEs tenha sido consideravelmente heterogênea na maioria dos tratamentos testados, os tratamentos T2 e T5 evidenciaram que o tempo de permanência nos respectivos meios influencia consideravelmente a aquisição para esta resposta morfogênética, sendo que explantes cultivados em T2 requerem um tempo de exposição superior em relação aos demais tratamentos, enquanto aqueles cultivados no tratamento T5 sofreram forte inibição ao desenvolvimento destas estruturas com a manutenção destes em tempo superior a 28 dias de cultivo (Tabelas 13 a 17 e Figuras 14 a 18).

4.3.4 Avaliação das rotas e padrões morfogênicos

As avaliações histológicas evidenciaram que todos os complexos celulares pró-embriogênicos (centros meristemáticos polarizados) observados em todos os tratamentos (4.3.3) foram oriundos de centros meristemáticos localizados na extremidade distal da região basal do explante, imediatamente abaixo do meristema apical caulinar e adjacentes aos demais centros meristemáticos comumente localizados na região propriamente dita, tanto no explante como nos propágulos desenvolvidos. Os centros meristemáticos, originados a partir da atividade meristemática proveniente da desdiferenciação do parênquima desta região, apresentaram células pequenas com paredes primárias delgadas, elevada relação nuclear/citoplasmática, isento de um padrão típico de organização e circundadas por um estrato de células maiores, com paredes primárias delgadas e com baixa relação nuclear/citoplasmática, e os embriões somáticos apresentaram-se com regiões distintas em pró-embrião e suspensor, sendo frequentemente circundados por células com elevado conteúdo idioblástico (Figuras 19 A e B).

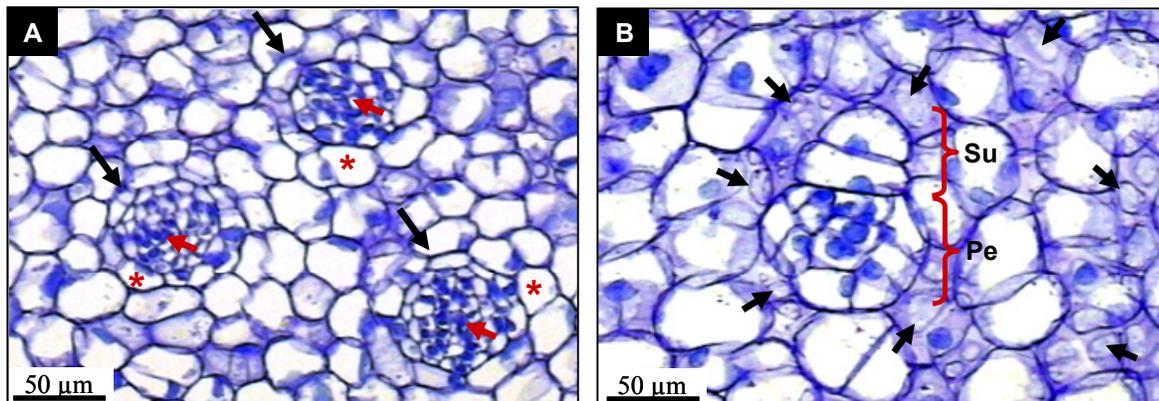


Figura 19 – A e B. Secções longitudinais de explantes de microplantas de *B. gasipaes* evidenciando centros meristemáticos e complexo celular pró-embriogênico (centro meristemático polarizado). A. Centros meristemáticos (setas pretas), característicos da região sob os meristemas apicais caulinares, na extremidade distal dos explantes e primórdios foliaria, com presença de células pequenas com paredes primárias delgadas, elevada relação nuclear/citoplasmática, isento de um padrão típico de organização (setas vermelhas) e circundadas por um estrato de células maiores, com paredes primárias delgadas e com baixa relação nuclear/citoplasmática (asterisco vermelho). B. Complexo celular pró-embriogênico (centro meristemático polarizado), evidenciando um pró-embrião (Pe) contendo o suspensor (Su). Observar a elevada quantidade de células contendo idioblastos (setas pretas) circundando esta estrutura

Embriões somáticos com origem multicelular (Figura 20 A e B), diretamente do explante, foram observados nos tratamentos T1 e T7 aos 28 dias de cultivo; no tratamento T2 aos 28 e 84 dias de cultivo e no tratamento T4 aos 56 dias de cultivo. Nos demais tratamentos não se observou o desenvolvimento de embriões somáticos com origem multicelular nos explantes.

A exceção do embrião somático originado no explante cultivado na presença isolada de ANA (T2) aos 28 dias de cultivo, os demais embriões somáticos supracitados desenvolveram-se na periferia da região central da base dos explantes, muito provavelmente a partir da polarização de centros meristemáticos (complexos celulares pró-embriogênicos) que se originaram a partir da atividade meristemática proveniente da desdiferenciação do tecido parenquimático nesta região (Figuras 20 A e B). Os tecidos meristemáticos dos embriões somáticos apresentaram-se diferenciados em protoderme, tecido meristemático fundamental e procâmbio, com completa ausência de conexão vascular com o tecido materno (Figura 20 B).

Dois centros meristemáticos pequenos e aparentemente sem conexão com o tecido materno também puderam ser observado adjacentes ao primórdio radicular do embrião somático induzido em meio isento de biorreguladores (T1) aos 28 dias de cultivo (Figura 20 B, C e D).

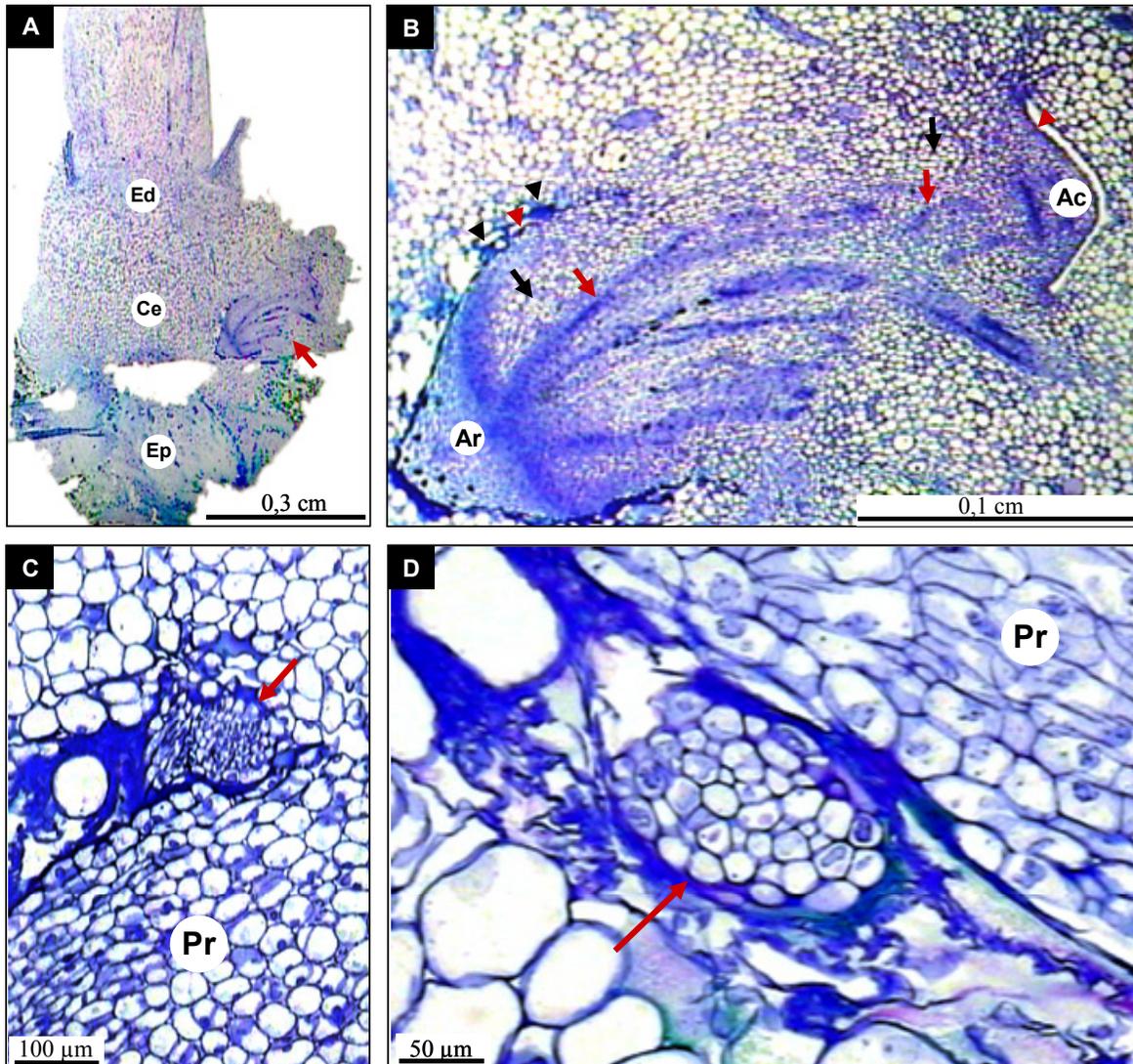


Figura 20 – A, B, C e D. Secções longitudinais de explantes de microplantas de *B. gasipaes* mantidos em meio isento de biorreguladores (T1) aos 28 dias de cultivo. A. Visão geral da secção longitudinal evidenciando embrião somático com origem multicelular (seta) desenvolvido na periferia da região central da base do explantes. Ed = extremidade distal, Ce = Central e Ep = extremidade proximal. B. Detalhe do embrião somático com origem multicelular evidenciando os tecidos meristemáticos diferenciados em protoderme (pontas de setas vermelhas), tecido meristemático fundamental (setas pretas) e procâmbio (setas vermelhas). Observar a ausência de conexão vascular com o explante e a presença de dois centros meristemáticos soltos e adjacentes ao primórdio radicular do embrião somático (pontas de setas pretas). Ar = Ápice radicular; Ac = Ápice caulinar. C. Detalhe de um centro meristemático (seta vermelha) observado em B aparentemente solto e adjacente ao primórdio radicular (Pr) do embrião somático. D. Detalhe de outro centro meristemático (seta vermelha) sem conexão vascular com o tecido materno observado em B. Pr = Primórdio radicular

Embriões somáticos no estágio pró-embriônico com origem unicelular a partir da atividade meristemática proveniente da desdiferenciação do tecido parenquimático da extremidade proximal da base do explante (Figuras 21 A, B, C e D; Figuras 22 B e C) e um embrião somático no estágio globular com origem unicelular a partir da atividade meristemática proveniente da desdiferenciação epidérmica radicular (Figuras 22 A, B e D) também foram observados aos 28 dias no tratamento T2.

Os pró-embriões apresentaram-se em distintas fases de desenvolvimento, sendo que alguns em estágio mais avançados e isolados entre si pelo acúmulo de pectinas e desenvolvimento de mucilagem, evidenciados pela coloração com azul de toluidina. A presença de dois nucléolos também foi evidenciada nestas estruturas. O tecido epidérmico apresentou-se desestruturado, rompido e com considerável grau de oxidação e numerosos centros meristemáticos não polarizados foram também observados (Figuras 21 A, B, C e D).

A epiderme da região de excisão de uma raiz para obtenção dos explantes e estabelecimento inicial no meio de cultura, também evidenciou processo oxidativo, cujos tecidos subepidérmicos e corticais apresentaram o mesmo padrão de intensa atividade meristemática observada anteriormente e o desenvolvimento de embriões somáticos no estágio proembriônico. Um centro meristemático não polarizado e sem conexão ao tecido materno também pode ser observado (Figuras 22 A, B, C e D).

Um embrião somático no estágio globular originado diretamente a partir da atividade meristemática proveniente da desdiferenciação epidérmica de outra raiz adjacente também pôde ser observado. As células epidérmicas da raiz evidenciaram-se pequenas e isodiamétricas, com paredes primárias delgadas, elevada relação nuclear/citoplasmática e contínuas à protoderme do embrião somático. Não foram evidenciados feixes procambiais e o pólo radicular no presente estágio de desenvolvimento (Figuras 22 A, B e D).

Nas demais amostras analisadas e correspondentes aos períodos subsequentes, não mais puderam ser observados o desenvolvimento de pró-embriões com origem unicelular e (ou) embriões somáticos no estágio globular com origem unicelular nas raízes dos explantes cultivados na presença isolada de ANA (T2).

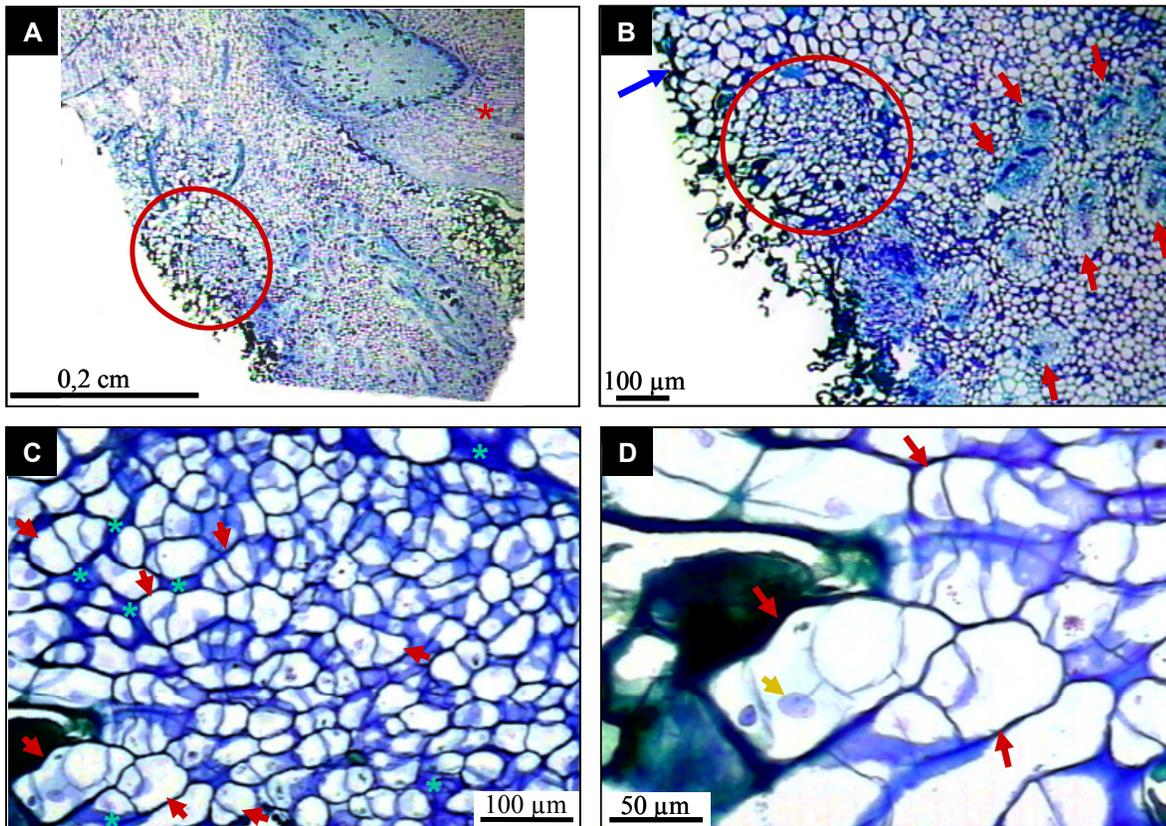


Figura 21 – A-D. Secções longitudinais de explantes microplantas de *B. gasipaes* evidenciando centro meristemático e uma zona meristemática contendo embriões somáticos no estágio pró-embriônico com origem unicelular a partir da atividade meristemática proveniente da desdiferenciação do tecido parenquimático da extremidade proximal do explante cultivado em T2 aos 28 dias de cultivo. A. Fotomicrografia da extremidade proximal periférica da região basal do explante apresentando intensa atividade meristemática (círculo vermelho). Observar o desenvolvimento de uma raiz (asterisco vermelho). B. Detalhe da região observada em A, evidenciando um centro meristemático característico (círculo vermelho), uma zona meristemática adjacente (seta azul), estruturas diferenciadas em embriões somáticos no estágio pró-embriônico e numerosos centros meristemáticos não polarizados (setas vermelhas). Observar a oxidação e desestruturação da epiderme. C. Detalhe do centro meristemático contendo estruturas diferenciadas em embriões somáticos no estágio pró-embriônico (setas vermelhas) e isoladas pelo acúmulo de mucilagem (asteriscos verdes). D. Estruturas embriogênicas no estágio pró-embriônico (setas vermelhas) observados em C apresentando distintos planos de divisão celular e a presença de dois nucléolos (seta amarela)

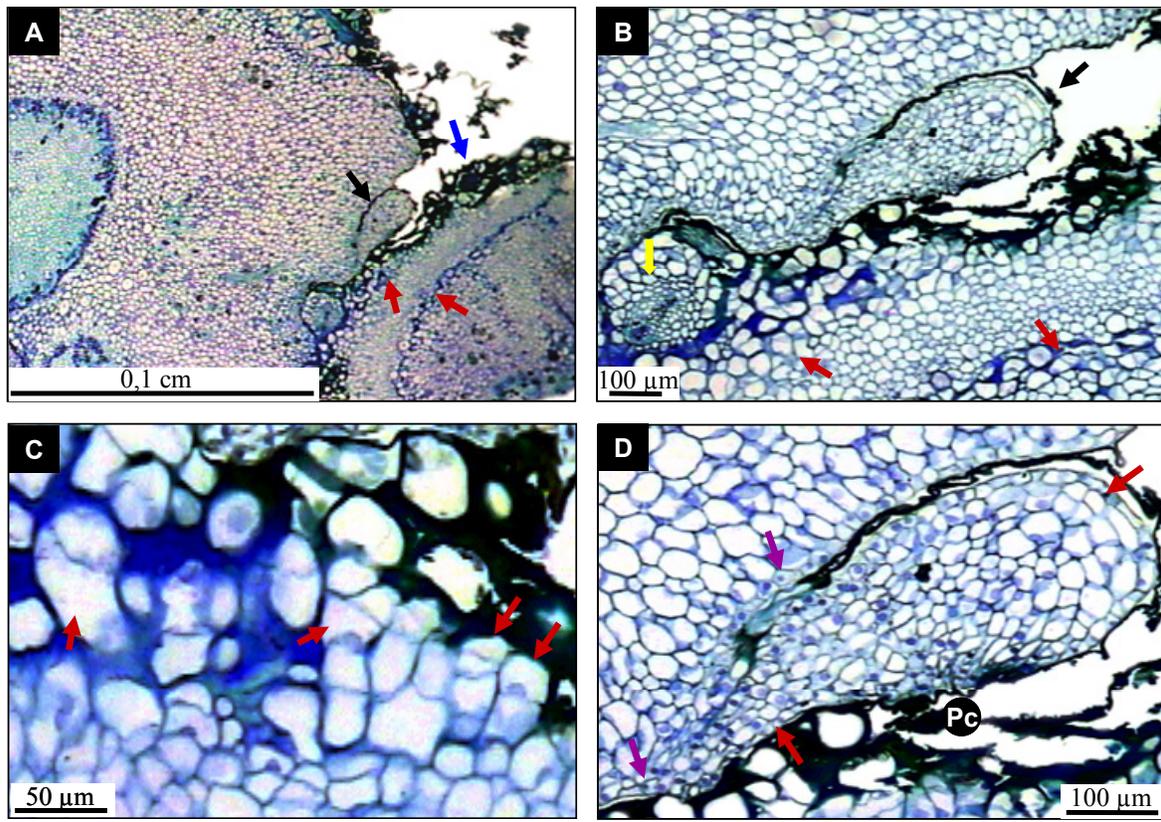


Figura 22 – A-D. Seções longitudinais de explantes de microplantas de *B. gasipaes* evidenciando intensa atividade meristemática na região de excisão das raízes dos explantes cultivados em T2 aos 28 dias de cultivo. A. Seções transversais de duas raízes evidenciando o desenvolvimento de um embrião somático (seta preta), tecidos subepidérmicos e corticais com intensa atividade meristemática (setas vermelhas) e epiderme rompida e oxidada (seta azul). B. Detalhe do embrião somático no estágio globular (seta preta), tecidos subepidérmicos e corticais contendo células em intensa atividade meristemática (setas vermelhas), e centro meristemático não polarizado (seta amarela). C. Detalhe dos estratos celulares subepidérmicos observados em A e B, apresentando intensa atividade meristemática proveniente da dediferenciação deste tecido e estruturas embriogênicas no estágio pró-embriônico (setas vermelhas) com origem unicelular. D. Detalhe do embrião somático no estágio globular observado em A e B, originado diretamente do explante a partir da atividade meristemática proveniente da dediferenciação epidérmica (origem unicelular) de uma raiz seccionada para o estabelecimento do explante no respectivo meio de cultura. Observar a continuidade da epiderme meristemática radicular (setas lilás) com a protoderme do embrião somático (setas vermelhas). Não foram evidenciados tecidos procambiais e o pólo radicular. Pc = Pólo caulinar contendo células meristemáticas

Pró-embriões no estágio globular com origem multicelular foram observados aos 28 dias de cultivo no tratamento T4 diretamente a partir da atividade meristemática apical caulinar, a qual promoveu a formação de falhas na delimitação epidérmica do explante (Figuras 23 A e B) e epidérmica e subepidérmica nas pinas jovens, com predomínio de divisões periclinais nestas regiões (Figuras 23 A, B e C). Em alguns pró-embriões, ocorreram divisões anticlinais na periferia, delimitando o tecido protodérmico e divisões em diversos planos na região interna destas estruturas, a partir dos quais se desenvolverão os tecidos meristemáticos fundamentais e procambiais (Figura 23 B e D); outros pró-embriões, entretanto, não evidenciaram a constituição dos tecidos meristemáticos primários, mas estruturas com divisões em diversos planos. Observou-se também, duas células semelhantes àquelas constituintes do suspensório em um dos pró-embriões sem conexão ao explante e adjacente às pinas jovens, em cujos tecidos epidérmicos e subepidérmicos observou-se intensa atividade meristemática, caracterizando a origem multicelular para o pró-embrião observado (Figura 23 C). Evidenciou-se ainda, a ausência de delimitação do tecido epidérmico no meristema apical caulinar devido à intensa atividade meristemática presente nesta região, o que provavelmente promoveu o seu rompimento (Figuras 23 A e B).

No primeiro primórdio foliar das gemas adventícias originadas diretamente do explante cultivado neste tratamento, observou-se intensa atividade meristemática epidérmica com predomínio de divisões periclinais na região de origem de pró-embriões, caracterizando a origem unicelular para estas estruturas provenientes da desdiferenciação deste tecido (Figura 23 D). Um dos pró-embriões foi evidenciado sem conexão ao explante, adjacente à região epidérmica com intensa atividade meristemática, caracterizando um embrião somático no estágio globular com protoderme delimitada pelas divisões anticlinais (Figura 23 D).

Aos 56 e 140 dias de cultivo, observou-se o mesmo padrão de intensa atividade meristemática apical caulinar, epidérmica e subepidérmica nas pinas jovens do explante e epidérmica na região apical caulinar das gemas adventícias (propágulos), embora sem evidência de pró-embriões no estágio globular, conforme observado aos 28 dias de cultivo.

Intensa atividade meristemática foi observada também no meristema apical dos explantes cultivados em T7 aos 56 e 84 dias de cultivo, embora sem a presença dos pró-embriões evidenciadas em T4. Tanto nos primeiros primórdios foliares das gemas desenvolvidas, como nas pinas das folhas jovens não foram evidenciadas atividade epidérmicas e (ou) subepidérmicas. Nos

demais períodos não foram observadas atividades meristemáticas epidérmicas e subepidérmicas no meristema apical caulinar.

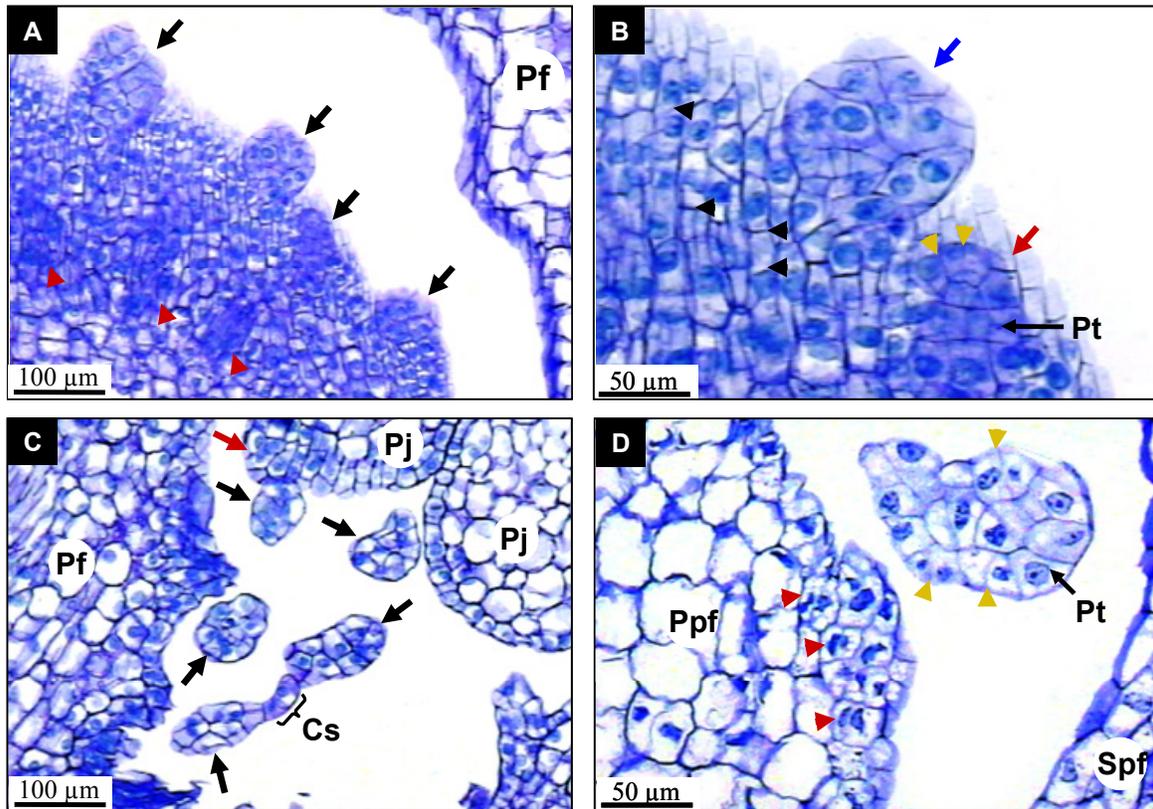


Figura 23 – A-D. Secções longitudinais de explantes de microplantas de *B. gasipaes* evidenciando pró-embriões no estágio globular desenvolvidos no meristema apical caulinar (A e B), nas pinas jovens (C) e no primeiro primórdio foliar de gema adventícia (D) em explantes cultivados em T4. A. Intensa atividade meristemática no meristema apical caulinar aos 28 dias de cultivo em explantes cultivados em T4. Observar os pró-embriões (setas pretas) com origem multicelular, desenvolvidos a partir da atividade meristemática nesta região, a presença de feixes pré-procambiais (pontas de setas vermelhas) e a ausência de delimitação da epiderme. PF = Primórdio foliar. B. Detalhe da atividade meristemática subepidérmica evidenciada em A com predomínio de divisões periclinais (ponta de seta preta) e o desenvolvimento de pró-embrião (seta vermelha) com protoderme (Pt) originada a partir de divisões anticlinais (pontas de setas amarelas) e de pró-embrião (seta azul) com divisão celular em diversos planos, sem evidência da protoderme. C. Atividade meristemática epidérmica e subepidérmica (seta vermelha) observada nas pinas jovens (Pj) dos explantes cultivados em T4 aos 28 dias de cultivo, a qual originou pró-embriões (setas pretas) no estágio globular com origem multicelular, evidenciados aos 28 dias de cultivo. Observar um pró-embrião contendo duas células constituindo muito provavelmente o suspensório. Cs = Células do suspensório; Pf = Primórdio foliar. D. Pró-embrião apresentando protoderme (PT) oriunda de divisões anticlinais (setas amarelas) da camada periférica, observada aos 28 dias de cultivo no tratamento T4 e intensa atividade meristemática epidérmica com predomínio de divisões periclinais (ponta de setas vermelhas) no primeiro primórdio foliar (Ppf) de uma gema adventícia nos explantes cultivados no mesmo meio aos 28 dias de cultivo, caracterizando a origem unicelular para o pró-embrião observado. Spf = Segundo primórdio foliar

Centros meristemáticos esféricos e soltos foram observados na região mediana da base dos explantes cultivados em T1 e T7 aos 28 dias de cultivo, e em T4 e T6 aos 84 dias de cultivo (Figuras 24 A, B e C).

Secções longitudinais realizadas em todos os explantes dos tratamentos supracitados evidenciaram que os centros meristemáticos somente puderam ser observados nas secções realizadas na região mediana dos explantes emblocados (Figuras 24 A, B e C). As secções da região inicial ou final do explante evidenciaram apenas intensa atividade meristemática no tecido parenquimático, na região correspondente aos centros meristemáticos maiores e soltos observados nas secções da região mediana (Figura 24 D).

Cabe salientar que as células dos centros meristemáticos observados nesta região apresentaram-se, da mesma forma que os centros meristemáticos localizados na extremidade distal, abaixo do meristema apical caulinar (Figura 19 A), pequenas e isodiamétricas, com paredes delgadas e elevada relação nuclear/citoplasmática (Figuras 24 B e C). Os centros meristemáticos apresentaram, também, dimensões consideravelmente maiores, embora com a mesma forma esférica dos centros meristemáticos localizados na extremidade distal, abaixo do meristema apical caulinar nos cortes longitudinais efetuados. A semelhança destes últimos, os centros meristemáticos soltos localizados na região mediana da base dos explantes apresentaram uma camada de células circundando as células centrais, porém, com dimensões maiores, embora isodiamétricas, com baixa densidade citoplasmática, apresentando intensa atividade meristemática e caracterizando, por vezes, estruturas individualizadas, provavelmente pela deposição de mucilagem evidenciada pela coloração com azul de toluidina e assemelhando-se a embriões somáticos no estágio pró-embriônico (Figuras 24 B e C).

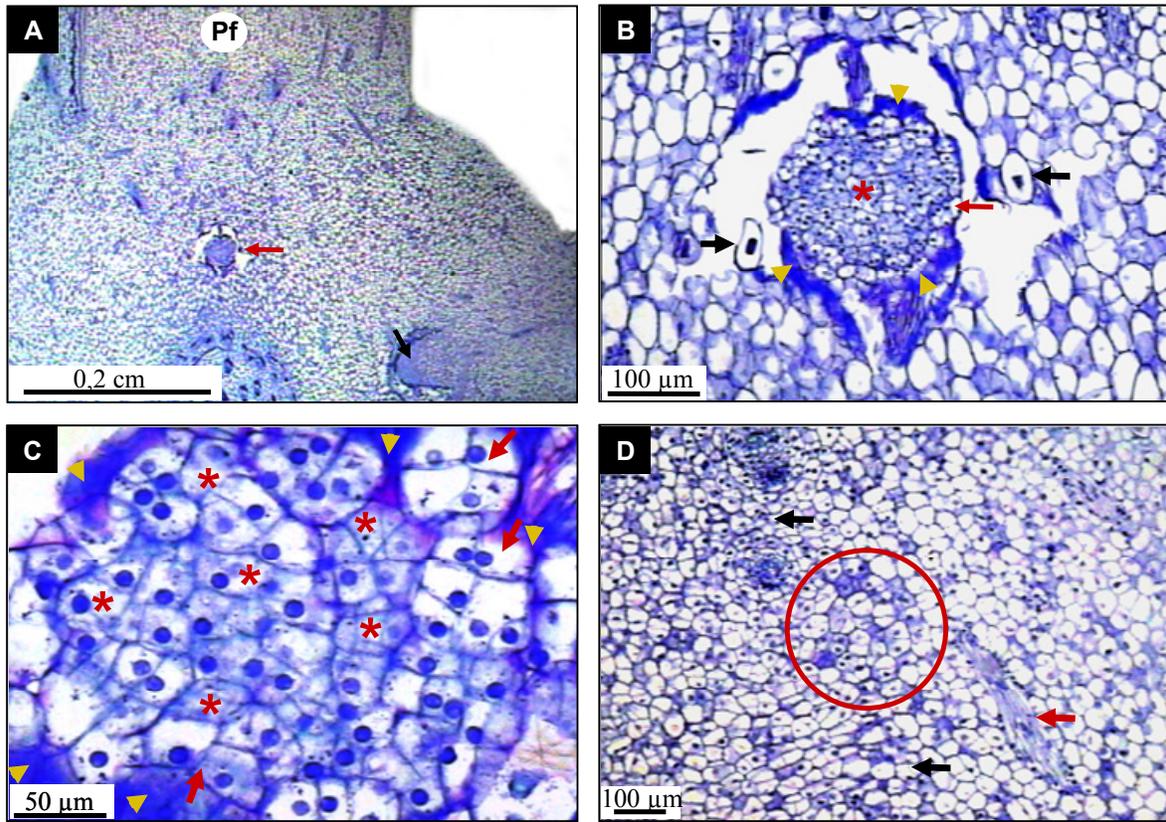


Figura 24 – A-D. Secções longitudinais na região mediana da base de explantes de microplantas de *B. gasipaes* evidenciando o desenvolvimento de centros meristemáticos soltos em explantes cultivados em T4 e T6 aos 84 dias de cultivo. A. Secção efetuada na região mediana da base dos explantes emblocados evidenciando um centro meristemático solto (seta vermelha). PF = Primórdio foliar; seta preta = ápice radicular de um embrião somático com origem multicelular. B. Detalhe do centro meristemático observado em A, evidenciando a presença de células meristemáticas desprovidas de organização e com elevada relação nuclear/citoplasmática (asterisco vermelho) circundadas por um estrato de células com baixa relação nuclear/citoplasmática (seta vermelha). Observar a presença de material mucilaginoso (pontas de setas amarelas) na superfície do centro meristemático. Setas pretas = ráfides. C. Detalhe do observado em B, evidenciando as células meristemáticas não organizadas pequenas e isodiamétricas, com paredes primárias delgadas, com elevada relação nuclear/citoplasmática (asteriscos vermelhos), sofrendo divisões em diversos planos e envolvidas por um estrato celular externo (setas vermelhas) contendo células semelhantes às centrais, porém, com densidade citoplasmática mais baixa. Observar a deposição de mucilagem (pontas de setas amarelas) isolando estruturas semelhantes a pró-embriões. D. Secção longitudinal inicial ou final da base dos explantes emblocados nos tratamentos supracitados evidenciando a presença de intensa atividade meristemática (círculo vermelho), correspondente ao local contendo o centro meristemático solto observado em secções medianas dos explantes emblocados. As setas pretas indicam a presença de intensa atividade meristemática adjacente a esta região e a seta vermelha, um feixe procambial

Gemas adventícias em conexão vascular com os feixes procambiais do explante foram observadas na extremidade distal da região basal, entre os primórdios foliares mais jovens dos explantes cultivados em T2 aos 28, 84, 112 e 140 dias de cultivo, em T3 e T4 aos 28 dias de cultivo, em T6 aos 28, 56, 84, 112 e 140 dias de cultivo, em T7 aos 28 e 140 dias de cultivo e em T8 aos 28, 84 e 112 dias de cultivo (Figuras 25 A, B, C, D e E). Os tratamentos T1 e T5 foram os únicos a não promover o desenvolvimento destas gemas adventícias na extremidade distal da região basal, entre os primórdios foliares mais jovens.

A exceção dos tratamentos T3 e T4 aos 28 dias de cultivo e T7 aos 140 dias de cultivo (Figuras 9 C, D e E), os demais tratamentos não promoveram a diferenciação dos ápices meristemáticos das gemas adventícias em primórdios foliares, permanecendo constituídos apenas pelo promeristema (Figuras 25 A e B).

O desenvolvimento das gemas adventícias se deu a partir de uma zona meristemática com intensa proliferação epidérmica e subepidérmica proveniente da desdiferenciação destes tecidos entre os primórdios foliares, que por meio de divisões anticlinais das células meristemáticas da epiderme dos primórdios foliares, originaram a primeira camada celular (túnica) do meristema apical da nova gema em desenvolvimento (Figuras 25 A, B e C). Entretanto, no tratamento T4 aos 28 dias de cultivo, observou-se que uma gema adventícia foi originada adjacente à região compreendida entre os primórdios foliares, mais precisamente na face abaxial basal do primórdio foliar mais interno (Figuras 25 D e E). Além disso, observou-se que, embora a epiderme da face abaxial tenha apresentado intensa atividade meristemática, a túnica do promeristema apical caulinar da gema adventícia não teve sua origem a partir desse tecido, mas sim de estratos celulares subepidérmicos (Figura 25 E).

Nenhuma atividade calogênica foi observada, caracterizando o padrão direto de regeneração das gemas adventícias localizadas entre os primórdios foliares.

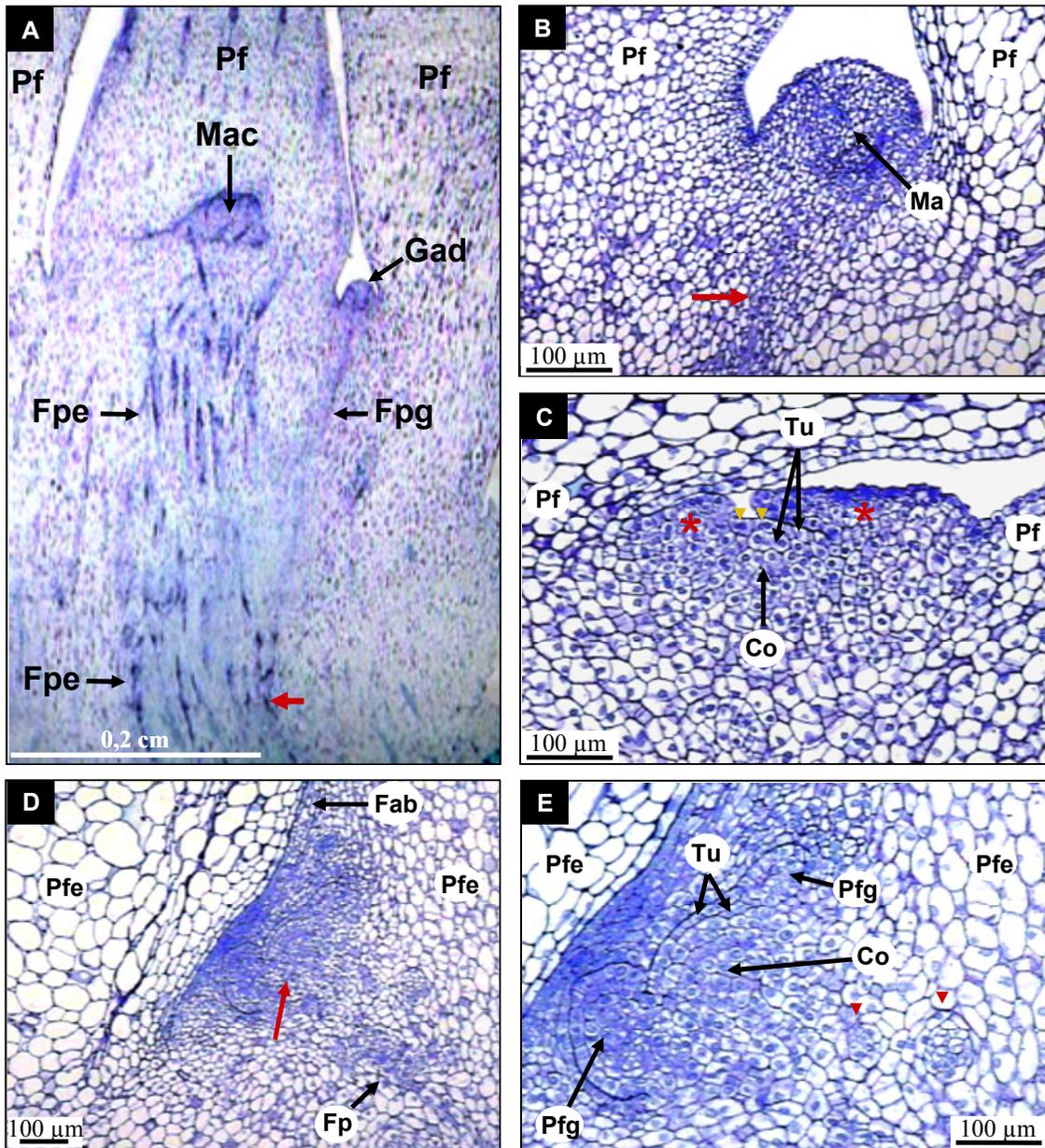


Figura 25 – A-D. Secções longitudinais de explantes de microplantas de *B. gasipaes* evidenciando o desenvolvimento de gemas adventícias diretamente do explante entre os primórdios foliares em T2, T3 e T4 aos 28 dias de cultivo. A. Gema adventícia (Gad) desenvolvida entre os primórdios foliares (Pf) em explantes cultivados em T2 aos 28 dias de cultivo. Observar a conexão vascular da gema adventícia (Gad) (seta vermelha) por meio de feixes procambiais da gema (Fpg) com os feixes procambiais do explante (Fpe). B. Detalhe da gema adventícia entre os primórdios foliares (Pf) observada em A, evidenciando o meristema apical (Ma), os feixes procambiais (seta vermelha) e a ausência de primórdios foliares. C. Gema adventícia desenvolvida em explantes cultivados em T3 aos 28 dias de cultivo. Observar a origem da primeira camada de células do promeristema (túnica) (Tu) a partir da atividade meristemática proveniente da dediferenciação da epiderme dos primórdios foliares por meio de divisões anticlinais (pontas de setas amarelas), a intensa atividade meristemática subepidérmica constituindo o corpo (Co) e os primórdios foliares da gema adventícia (asteriscos vermelhos). Pfe = Primórdio foliar do explante. D. Gema adventícia (seta

vermelha) em desenvolvimento na face abaxial (Fab) basal de primórdio foliar (Pf) em explante cultivado em T4 aos 28 dias de cultivo a partir da intensa atividade meristemática proveniente da desdiferenciação epidérmica e subepidérmica nesta região. Observar a presença de feixes procambiais, os quais estabelecem conexão vascular com o explante, conforme evidenciado em A. Pfe = Primórdios foliares dos explantes.. E. Detalhe da gema adventícia observada em D, evidenciando a túnica (Tu) com origem a partir de camadas de células meristemáticas subepidérmicas. Observar a presença dos primórdios foliares da gema (Pfg) em desenvolvimento e centros meristemáticos (pontas de setas vermelhas) abaixo do promeristema apical. Pfe = Primórdios foliares do explante; Co = Corpo

Gemas adventícias originadas diretamente do tecido materno também foram observadas na periferia da extremidade proximal da região basal dos explantes cultivados em T1 aos 56, 84, 112 e 140 dias de cultivo, em T2 aos 112 dias de cultivo, em T3 aos 112 dias de cultivo, em T4 aos 28 e 84 dias de cultivo, em T6 aos 84 dias de cultivo e em T7 aos 56, 84 e 140 dias de cultivo (Figuras 16 A e B). Os tratamentos T5 e T8 não evidenciaram o desenvolvimento de gemas adventícias.

Dois estruturas rizomatosas em estágio inicial de desenvolvimento foram evidenciadas no explante cultivado em T4 aos 28 dias de cultivo, essas apresentaram origem a partir da atividade meristemática de feixes procambiais do explante próximos à extremidade proximal da região basal do explante (Figura 26 A) e a partir da atividade meristemática de feixes procambiais de uma gema adventícia originada diretamente no explante na extremidade proximal da região basal (Figuras 26 B e C). Estratos celulares meristemáticos foram também observados na extremidade destas estruturas (Figura 26 C).

Agregados de gemas adventícias (“tufos”) sem a precedência de calos foram observados na extremidade proximal da região basal dos explantes cultivados em T7 aos 140 dias de cultivo, caracterizando o padrão de organogênese direta a partir da atividade meristemática proveniente da desdiferenciação epidérmica e subepidérmica, característica de explantes cultivados na presença de isolada de TDZ (T4) ou em associação com ANA (T7), conforme observado anteriormente na região meristemática apical dos explantes analisados. Algumas destas gemas apresentaram seus primórdios foliares bem desenvolvidos e intensa proliferação dos feixes procambiais foi também observada em todo o tecido parenquimático (Figura 26 D).

Nenhuma atividade calogênica foi observada, caracterizando o padrão direto de regeneração das gemas adventícias localizadas na periferia do centro da região basal dos explantes. Devido ao estágio avançado de desenvolvimento das gemas adventícias, a rota organogênica não pôde ser elucidada, sendo provável que estas tenham se originado a partir na

(uni) polarização de centros meristemáticos provenientes da desdiferenciação do tecido parenquimático nesta região ou diretamente da (uni) polarização do procâmbio do tecido materno, caracterizando a origem multicelular para estas estruturas.

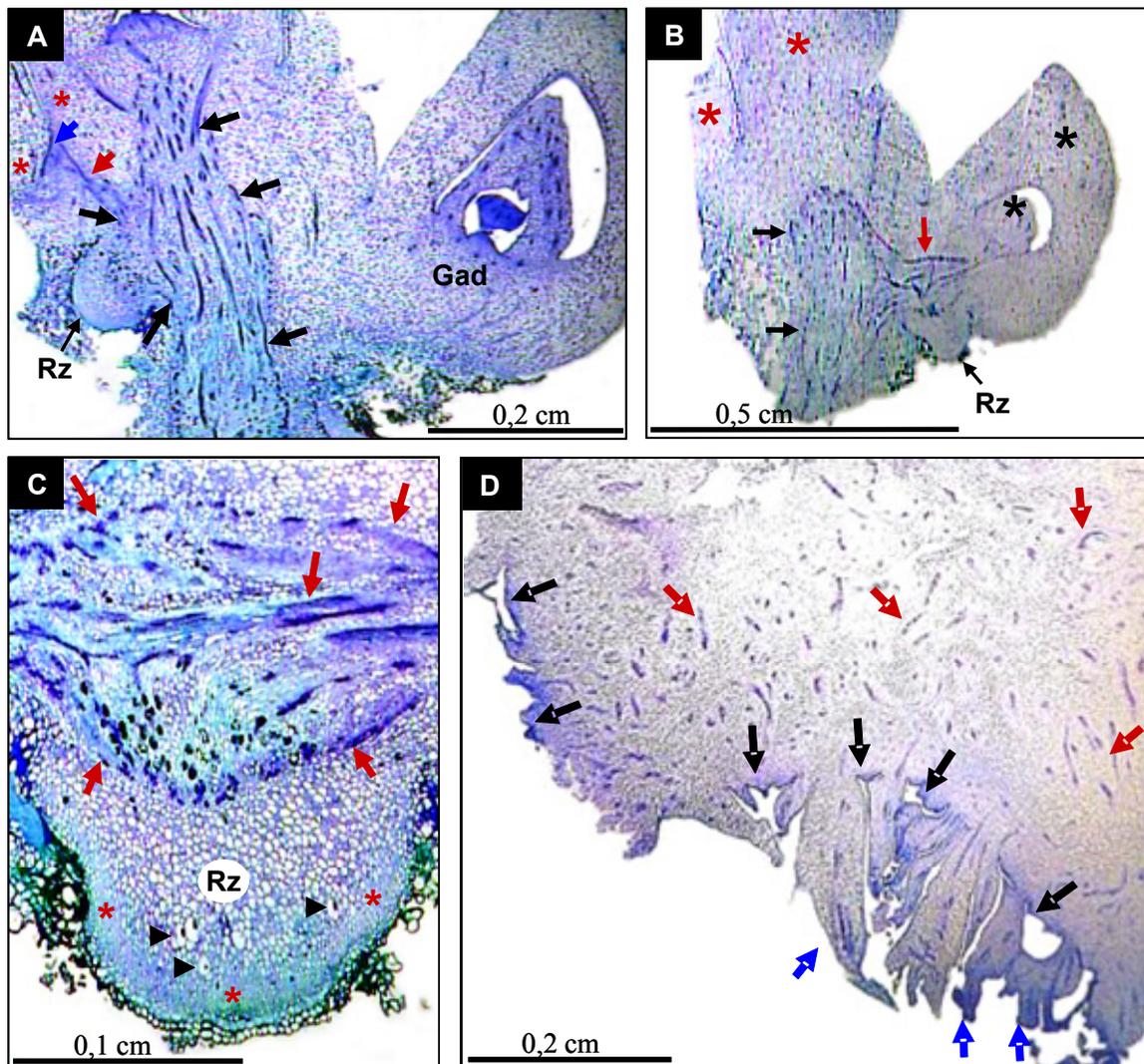


Figura 26 – A-D. Secções longitudinais de explantes de microplantas de *B. gasipaes* evidenciando o desenvolvimento de gemas adventícias diretamente do explante (A, B e D) e de estruturas rizomatosas (A, B e C). A. Gema adventícia (Gad) desenvolvida diretamente na extremidade proximal da região basal de explantes cultivados em T4 aos 28 dias de cultivo. Uma gema adventícia (seta azul) pode ser observada em desenvolvimento na face abaxial basal do primórdio foliar e em conexão vascular (seta vermelha) aos feixes procambiais do explante (setas pretas). Um rizoma (Rz) em estágio inicial de desenvolvimento com origem a partir de feixes procambiais do explante (setas pretas), próximo à extremidade proximal da região basal também foi evidenciado. Asteriscos vermelhos = primórdios foliares. B. Nova secção do material analisado em A, evidenciando outro rizoma (Rz) em estágio inicial de desenvolvimento a partir da atividade meristemática de feixes procambiais da gema adventícia (setas vermelhas). Setas pretas = feixes procambiais do explante; asteriscos vermelhos = primórdios foliares do explante; asteriscos pretos = primórdios foliares da gema adventícia.. C. Detalhe do rizoma (Rz) observado em B, evidenciando sua origem a partir da atividade meristemática de feixes procambiais (setas vermelhas) da gema adventícia. Asteriscos vermelhos = estratos celulares meristemáticos; pontas de setas pretas = ráfides. D. Agregados de gemas adventícias (setas pretas) observados na extremidade proximal da região basal dos explantes cultivados em T7 aos 140 dias de cultivo originados a partir da atividade meristemática proveniente da desdiferenciação epidérmica e

subepidérmica característica de explantes cultivados em T4 ou em T7. Observar a presença de gemas com os primórdios foliares bem desenvolvidos (setas azuis) e muitos traços procambiais no tecido parenquimático (setas vermelhas)

No tratamento T4, observou-se um feixe pré-procambial unipolarizado localizado na extremidade distal do material seccionado longitudinalmente, abaixo do meristema apical caulinar, junto aos centros meristemáticos comumente presentes nesta região aos 28 dias de cultivo e provenientes da desdiferenciação do tecido parenquimático, caracterizando a origem multicelular para esta estrutura em processo organogênico. Nos explantes dos demais tratamentos e nos cinco períodos de cultivo não foram observadas estas estruturas (Figuras 27 A e B).

Muitos acúleos pluricelulares e não ramificados foram observados nas bainhas, na maioria dos explantes cultivados na presença isolada de TDZ (T4) ou mesmo em associação com ANA (T7) (Figuras 27 C, D, E e F), sendo que estes apresentaram origem na atividade meristemática proveniente da desdiferenciação epidérmica das bainhas por meio de divisões anticlinais, caracterizando a origem unicelular para estas estruturas (Figura 27 E). Diversos planos de divisões celulares foram observados na região basal proximal (Rp) destas estruturas, com predominância de divisões periclinais no início da região mediana (Rm), região esta em que as células encontram-se em processo de alongamento (Figura 11 E). Já a região distal Rd, correspondente ao ápice do tricoma, apresentou-se pluricelular e unisseriada (Figura 11 F).

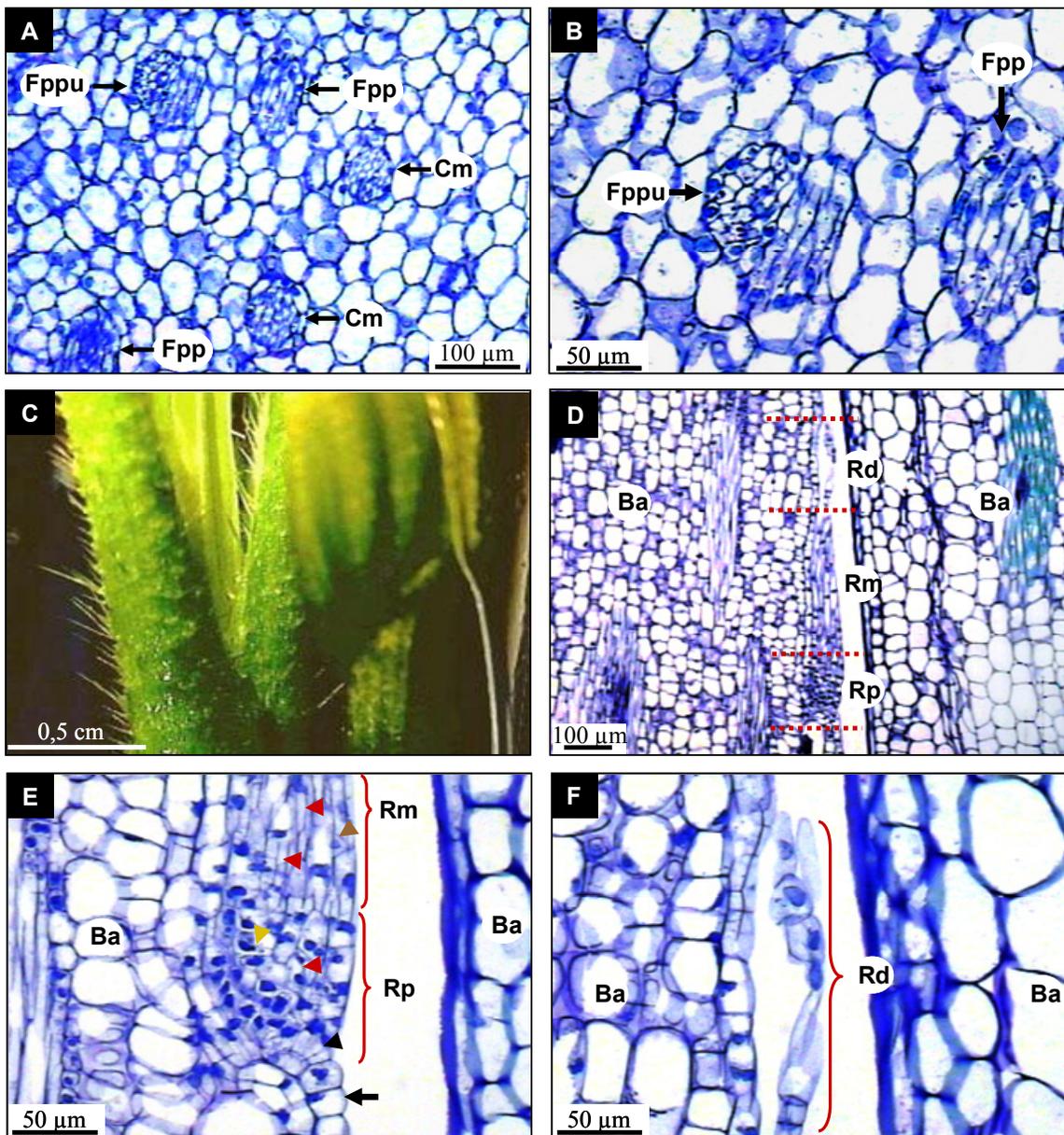


Figura 27 – A e B. Secções longitudinais de explantes de microplantas de *B. gasipaes* evidenciando um feixe pré-procambial unipolarizado (Fppu) com origem multicelular localizado na extremidade distal do explante, abaixo do meristema apical caulinar e adjacente aos centros meristemáticos não diferenciados (Cm) e aos centros meristemáticos em processo de diferenciação em feixes pré-procambiais (Fpp) em explantes cultivados em T4 aos 28 dias de cultivo. C-F. Acúleos observados nas bainhas da maioria dos explantes cultivados em T4 ou T7. C. Fotomicrografia em estereomicroscópio Micronal, evidenciando a elevada quantidade de acúleos observados no pecíolo e folhas desenvolvidas dos explantes cultivados nos tratamentos TDZ. D. Secção longitudinal das bainhas evidenciando um acúleo (tricoma tector) pluricelular contendo uma região proximal (Rp), uma região mediana (Rm) e uma região distal (Rd) unisseriada. Ba = Bainha. E. Detalhe da região proximal (Rp) e início da região mediana (Rm) do acúleo originado a partir da atividade meristemática epidérmica (seta preta) da bainha (Ba) por meio de divisões anticlinais (ponta de seta preta). Observar que as células se dividem tanto anticlinalmente (pontas de seta preta e amarela) como periclinalmente (pontas de setas vermelhas) ou obliquamente (ponta de seta marrom) em ambas as regiões e a presença de

células alongadas na região mediana (Rm).. F. Detalhe da região distal (Rd) pluricelular e unisseriada do acúleo. Ba = Bainha

4.4 Discussão

As análises histológicas permitiram evidenciar as tendências à aquisição de competência organogênica e/ou embriogênica somática de regiões e tecidos da base de microplantas de *B. gasipaes*, estabelecendo desta forma as rotas e padrões morfogenéticos da espécie submetida à biorreguladores.

Os resultados baseados no desenvolvimento de centros meristemáticos evidenciaram a eficiência do ANA associado à TDZ na indução e desenvolvimento destas estruturas em relação aos demais tratamentos testados, sendo que a região mediana destaca-se sobre as periféricas, embora se verifique distribuição heterogênea quando comparadas estas regiões (Tabelas 3 a 7; Figuras 4 a 8). Não obstante, ocorreu distribuição uniforme dos centros meristemáticos nos explantes na ausência de biorreguladores (Tabelas 3 a 7; Figuras 4 a 8), sugerindo que a adição destes aos meios de cultura altera consideravelmente a competência para o desenvolvimento destas estruturas tanto quantitativamente, como para a região de ocorrência.

Os centros meristemáticos comumente desenvolvidos em cultura de tecidos mediante a utilização de biorreguladores e em regiões distintas aos meristemas residuais, também apresentam elevado potencial morfogenético, conforme observaram Almeida e Almeida (2006) ao evidenciarem embriogênese somática direta a partir de células parenquimatosas do mesófilo foliar de ápices caulinares de pupunheiras estabelecidas em meio MS acrescido de ANA e BAP. Para tanto, os explantes foram cultivados previamente em meio MS com a presença isolada de BAP, o qual promoveu a formação de centros meristemáticos ou complexos celulares pró-embriogênicos. Após cultivados em meio MS acrescido de ANA em associação à BAP, os autores observaram a indução de embriões somáticos em 82% dos explantes a partir da polarização dos centros meristemáticos. No presente trabalho, entretanto, observou-se que os explantes cultivados em meio contendo a presença isolada de BAP (T3) desenvolveram poucos centros meristemáticos em suas bainhas e/ou primórdios foliares dos propágulos e somente aos 28º e 84º dia de cultivo, evento morfogenético este muito reduzido em relação ao tratamento contendo ANA em associação à BAP (T6), que evidenciou maior número e maior frequência destas estruturas (Tabelas 8 a 12; Figuras 9 a 13). Diferentemente do observado por Almeida e

Almeida (2006), nenhuma polarização foi constatada para os centros meristemáticos desenvolvidos nas bainhas dos explantes e/ou primórdios foliares dos propágulos, não apenas com estes tratamentos (T3 e T6), mas para todos os tratamentos testados. Não obstante, a polarização dos centros meristemáticos, caracterizando a formação de complexos celulares pró-embriogênicos foi amplamente observada na extremidade distal da região basal dos explantes, abaixo do meristema apical caulinar (Figura 19 B) e em todos os tratamentos testados. ESAU (1949) já relatava que os tecidos meristemáticos residuais, oriundos do meristema apical caulinar são passíveis de diferenciarem em estruturas não vasculares. De fato, Harhash e El-Wakil (1998) relatam que quando o meristema apical de tamareiras (*Phoenix dactylifera* L.) é decapitado por injúrias, como doenças, ataques de insetos ou devido à extração da bebida doce conhecida como “Lagby” para fins comerciais, algumas células dos meristemas residuais do domo apical podem se diferenciar em gemas adventícias.

Já o T7 favoreceu não apenas o desenvolvimento de elevado número de centros meristemáticos a partir da atividade meristemática proveniente da desdiferenciação do tecido parenquimático (Tabelas 3 a 7; Figuras 4 a 8), mas promoveu também a (bi) polarização destas estruturas na extremidade distal da base dos explantes, caracterizando o desenvolvimento de pró-embriões com origem multicelular (Figura 19 B), embora Parrot, Merkle e Williams (1991) relatem que os embriões somáticos originam-se de células únicas e que o desenvolvimento de centros meristemáticos seja característico da organogênese. Almeida e Almeida (2006), conforme mencionado, também obtiveram embriões somáticos com origem multicelular mediante a polarização de centros meristemáticos localizados nas células parenquimáticas do mesofilo de primórdios foliares. De forma semelhante, Conger *et al.*, 1983 apud Srivastava (2002a) também obtiveram embriões somáticos diretamente do mesofilo de *Dactylis glomerata* L. com origem multicelular mediante a polarização de centros meristemáticos, porém sem o requerimento de adição de auxinas exógenas. O último autor salienta ainda, que a competência à embriogênese somática é mais facilmente adquirida em tecidos mais jovens e pouco diferenciados, como ocorre com as células presentes no meristema apical de embriões zigóticos, cujo explante não requer a adição exógena de auxinas para a indução da embriogênese somática.

Vidal, Vargas e García (2000) também obtiveram embriões somáticos diretamente de centros meristemáticos originados na região perivascular dos primórdios foliares de ápices

caulinares de *Musa* sp. cultivados em meio de indução à embriogênese somática contendo 5,0 μ M de 2,4-D e 1,0 μ M de zeatina.

O desenvolvimento de CCPE em explantes cultivados em todos os tratamentos (Tabelas 13 a 17; Figuras 14 a 18), ocorreu muito provavelmente devido aos elevados níveis endógenos auxínicos presentes em regiões próximas ao meristema apical caulinar, bem como pela presença de tecidos pouco diferenciados. Há fortes evidências de que as auxinas são predominantemente produzidas no caule (DAVIES, 1995 apud PERES *et al.*, 1997) principalmente no meristema apical, sendo que, em altas concentrações, são promotoras da diferenciação do xilema e do floema (TAIZ; ZAIGER, 2006). De fato, nesta região, a maioria dos meristemas desenvolvidos na extremidade distal da região basal dos explantes, abaixo do meristema caulinar, se diferenciam em tecidos procambiais, sendo que alguns adquiriram competência à embriogênese somática muito provavelmente em decorrência ao elevado nível endógeno de auxina presente próximo à região de síntese deste hormônio. Além disso, elevado número de CCPE desenvolvidos nesta região evidenciaram a presença de inúmeros idioblastos, cujo conteúdo não foi identificado, em células adjacentes a esta estrutura (Figura 19 B), sugerindo a aquisição de competência embriogênica, conforme constataram histologicamente Sané *et al* (2006) em calos friáveis e suspensões celulares induzidos em segmentos foliares com 1 cm de altura mediante a aplicação exógena de 2,4-D a 9,05 μ M. Os autores observaram ainda que o acúmulo de reservas (amido e proteínas) esteve presente tanto nos calos friáveis, como nas suspensões celulares e nos pró-embriões desenvolvidos.

De forma semelhante, Kanchanapoom e Domyoas (1999) observaram que embriões somáticos foram obtidos a partir de células únicas em calos desenvolvidos em embriões zigóticos excisados de sementes de *Elaeis guineensis*, as quais apresentaram numerosos grãos de amido como recurso energético no citoplasma.

As auxinas promovem também, dois distintos eventos na embriogênese somática: o estabelecimento do eixo caulinar-radicular e a simetria bilateral, bem como a indução da divisão das células dos tecidos dos explantes ou das culturas de células durante a embriogênese somática (SRIVASTAVA, 2002b). De acordo com o autor, a partir destes eventos, o transporte polar da auxina já é estabelecido.

Desta forma, a indução elevada de CCPE a partir dos meristemas localizados na extremidade distal da região basal dos explantes, abaixo do meristema apical caulinar em T7

(Tabelas 13 a 17; Figuras 14 a 18) poderia ser decorrente desta citocinina promover a síntese ‘de novo’ de auxinas, conforme observaram Murthy, Murch e Saxena, 1995 apud Murthy; Murch e Saxena (1998) em plântulas de amendoim, evento este verificado pelo incremento de IAA citosólico bem como de triptamina. Hutchinson, Krishnaraj e Saxena (1996) também observaram que a aplicação isolada do TDZ e na mesma concentração utilizada no presente trabalho (0,36 μM) induziu o maior número médio de embriões somáticos (20,8) em hipocótilos de gerânio (*Pelargonium x hortorum* Bailey cv. Scarlet Orbit Improved) após 21 dias de cultivo sem a precedência de calos, seguido pelo tratamento suplementado com AIA a 1,0 μM e BAP a 8,0 μM (12,0). Avaliações periódicas dos níveis endógenos hormonais foram também realizadas, evidenciando que em ambos os tratamentos, os níveis endógenos de auxinas foram elevados, como provável consequência do estímulo da síntese ou pela ação inibitória da conjugação do AIA, inativando esta enzima, além de elevar os níveis de citocininas endógenas.

Isto sugere, portanto, que a introdução exógena de ANA, aliada ao esperado incremento de AIA endógeno promovido pelo TDZ tenha exacerbado os eventos morfogenéticos relacionados à indução de complexos celulares pró-embriogênicos nos meristemas localizados na extremidade distal da região basal dos explantes, abaixo do meristema apical caulinar em explantes cultivados neste tratamento contendo ANA em associação com TDZ (T7). Não obstante, o TDZ é um composto altamente estável e resistente às oxidases (MOK *et al.*, 1987; PERES, 2002; SRIVASTAVA, 2002c; KERBAUY, 2004), podendo potencializar sobremaneira as respostas associadas ao incremento endógeno de AIA.

Não se sabe ao certo, porém, se estes pró-embriões localizados em tecidos mais internos estão aptos a desenvolverem-se plenamente ou serão abortados. Além disso, o desprendimento do tecido materno seria consideravelmente dificultado devido à localização de seu desenvolvimento.

Além da origem multicelular dos pró-embriões a partir da (bi) polarização dos centros meristemáticos localizados na extremidade distal da região basal dos explantes, embriões somáticos contendo todos os tecidos meristemáticos primários também apresentaram origem multicelular na extremidade proximal da região basal dos explantes cultivados em T1 e T7 aos 28 dias de cultivo, em T4 aos 56 dias de cultivo e em T2 aos 84 dias de cultivo (Figura 20), evidenciando a não necessidade de submeter estes explantes ao cultivo inicial em meio contendo a presença isolada de auxina com o propósito de induzir a embriogênese somática, conforme também observaram Almeida e Almeida (2006) ao induzirem embriões somáticos diretamente do

mesofilo em primórdios foliares de *B. gasipaes* sem empregar auxina como meio indutor para obter esta resposta morfogênica. Os autores empregaram o ANA em associação com BAP nas mesmas concentrações empregadas no presente trabalho após inoculação prévia em meio contendo a presença isolada de BAP a 7,1 μM , no qual este último promoveu o desenvolvimento de centros meristemáticos e o ANA em associação com BAP promoveu a polarização destas estruturas. É interessante observar que no presente trabalho, o maior número de centros meristemáticos presentes na bainha dos explantes e nos primórdios foliares dos propágulos foram obtidos com a aplicação do ANA associado à BAP (T6) em relação à aplicação do BAP isoladamente (T3) (Tabelas 8 a 12; Figuras 9 a 13) e, conforme mencionado anteriormente, nenhuma polarização destas estruturas foi evidenciada nos primórdios foliares dos explantes cultivados em quaisquer tratamentos testados.

Os tecidos meristemáticos destes embriões somáticos observados apresentaram-se diferenciados em protoderme, tecido meristemático fundamental e procâmbio, com completa ausência de conexão vascular com o tecido materno (Figura 20 A e B), características estas semelhantes aos embriões zigóticos desta espécie, conforme descreveu Steinmacher (2005).

Muito provavelmente estes embriões somáticos tiveram sua origem a partir da (bi) polarização de centros meristemáticos desenvolvidos pela atividade meristemática proveniente da desdiferenciação de células parenquimáticas desta região, corroborada pela presença dos centros meristemáticos adjacentes ao embrião somático em explante cultivado no meio isento de reguladores de crescimento aos 28 dias de cultivo (Figuras 20 B, C e D).

Almeida (1994) observou o desenvolvimento de embrião somático diretamente do explante na base de ápices caulinares de plântulas obtidas a partir embriões zigóticos excisados de sementes de pupunheiras desenvolvidos na presença de ANA em associação com BAP nas mesmas concentrações utilizadas no presente trabalho. As análises histológicas realizadas pelo autor evidenciaram, entretanto, que o embrião apresentou reduzido contato com o explante por meio de uma estrutura semelhante ao suspensor, enquanto que os embriões somáticos evidenciados no presente trabalho, embora localizados na mesma região relatada pelo autor, tiveram sua origem em tecido mais interno, conforme supracitado e sem a presença de uma estrutura semelhante ao suspensor (Figuras 20 A e B).

Cabe salientar que não foi observado o desenvolvimento destes característicos embriões somáticos com origem multicelular em meio contendo ANA em associação com BAP (T6),

muito provavelmente devido ao número médio relativamente baixo destas estruturas observadas nas análises morfofisiológicas realizadas no Capítulo 2 (2.3.1.2), pois, em todos os tratamentos testados, a exceção daqueles contendo a presença isolada das citocininas BAP (T3), TDZ (T4) ou 2iP (T5), foram observados embriões somáticos desenvolvidos na base dos explantes. Embora estas análises tenham evidenciado o desenvolvimento de embriões somáticos no tratamento contendo ANA em associação com BAP (T6), no presente Capítulo não puderam ser evidenciados histologicamente e, inversamente, o tratamento contendo a presença isolada de TDZ (T4) evidenciou estas estruturas nas análises histológicas, embora as análises morfofisiológica não as tenham evidenciadas (Capítulo 2; 2.3.1.2).

A aquisição de competência, desdiferenciação e rediferenciação são processos primariamente regulados por substâncias reguladoras do crescimento, como as auxinas e citocininas (MURTHY; MURCH; SAXENA, 1998), cujo emprego isolado do TDZ em cultura de tecidos proporciona resultados favoráveis à embriogênese somática, substituindo com sucesso a utilização combinada de auxinas e citocininas requeridas à embriogênese somática em algumas espécies (SAXENA *et al.*, 1992; VISSER *et al.*, 1992; GILL *et al.*, 1993 apud MURTHY; MURCH; SAXENA, 1998).

Explantos cultivados em meio contendo a presença isolada de ANA (T2) evidenciaram ainda, e somente aos 28 dias de cultivo, o desenvolvimento de aglomerados pró-embriogênicos em distintos estádios de desenvolvimento (assincronizado) originados de uma única célula a partir de um centro meristemático e de uma zona meristemática provenientes da desdiferenciação de células no tecido parenquimático da extremidade proximal da região basal dos explantes, caracterizando a via direta de regeneração de embriões somáticos (Figura 21).

Cabe salientar que os pró-embriões apresentaram-se em processo de individualização pelo acúmulo de mucilagem entre as células, evidenciado pela coloração com azul de toluidina (Figura 21 C), assim como observou Moura (2007), após obter agrupamentos de duas a oito células e pró-embriões somáticos em calos desenvolvidos em embriões zigóticos maduros excisados de sementes de macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Martius) estabelecidos em meio contendo sais completos Y3 acrescido de picloram a 9 μ M. O autor relata que estas estruturas tornaram-se isoladas pela desintegração da parede, pelo acúmulo de pectinas e pela formação de mucilagem nesta região. Assim como observou o autor, nesse trabalho os pró-embriões desenvolvidos no tratamento contendo a presença isolada de ANA também originaram-

se de células contendo núcleos com dois nucléolos evidentes (Figura 21 D), cuja mudança na morfologia celular em relação ao tecido precursor é um sinal da aquisição da competência embriogênica. Sané *et al.* (2006) também observaram que polissacarídeos provenientes da quebra das paredes celulares promoveram o isolamento físico dos pró-embriões somáticos desenvolvidos em calos friáveis e suspensões celulares induzidos em segmentos foliares com 1 cm de altura mediante a utilização de 2,4-D a 9,05 μM .

As análises anatômicas realizadas por Fernando (2005) em explantes hipocotiledonares de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. População FB-100 cultivados em meio MS suplementados com 4,44 μM de BAP evidenciaram o mesmo padrão morfogenético observado no presente trabalho para o desenvolvimento dos aglomerados de pró-embriões no explante cultivado na presença isolada de ANA aos 28 dias de cultivo, embora o autor tenha evidenciado apenas o desenvolvimento de protuberâncias, gemas ou primórdios foliares. Assim como observado pelo autor, os centros meristemáticos observados parecem ter se originado de zonas meristemáticas periféricas por meio de intensa atividade meristemática no tecido parenquimático (Figura 21). Enquanto no trabalho de Fernando (2005) estes centros meristemáticos se diferenciaram em protuberâncias, gemas ou primórdios foliares, neste trabalho observou-se a aquisição de competência embriogênica na zona meristemática e no centro meristemático. Em ambos os trabalhos foi observado o isolamento destas estruturas, cujas análises anatômicas e ultra-estruturais realizadas pelo autor evidenciaram o acúmulo de matriz celular, constituída por pectina. Cabe salientar que no presente trabalho, a epiderme apresentou-se desestruturada, rompida e com considerável grau de oxidação (Figura 21 B).

Embora Moura (2007) e Sané *et al.* (2006) relatem a natureza mucilagínosa da substância responsável pelo isolamento das estruturas pró-embriogênicas, Ovecka e Bobák, 1999 apud Fernando (2005) mencionam que a produção de substâncias extracelulares no processo de embriogênese somática é constituído por uma rede fibrilar, cuja função é de adesão e reconhecimento celular, promovendo a coordenação dos estágios iniciais de embriões somáticos, e portanto, distingue-se da natureza mucilagínosa das substâncias extracelulares no processo organogênico.

Como estas estruturas embriogênicas somente foram evidenciadas aos 28 dias de cultivo, não foi possível acompanhar o posterior desenvolvimento dos pró-embriões. Moura (2007) relatou que, do aglomerado de pró-embriões observados em calos desenvolvidos em embriões

zigóticos maduros excisados de sementes de macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Martius) estabelecidos em meio contendo sais completos Y3 acrescido de picloram a 9 μM , poucos se desenvolveram, muito provavelmente devido à competição entre eles.

A embriogênese somática a partir de explantes radiculares é comumente relatada em palmáceas (ZAID; TISSERAT, 1984; ALMEIDA, 1994; OTHMAN, 2003) e não palmáceas (CHANG; HSING, 1980; BHAU, 1999; ALOUFA, 2002; SEO *et al.*, 2007), embora envolvam o desenvolvimento de atividades calogênicas e ausência de análises histológicas. Nesse trabalho, entretanto, observou-se que um explante cultivado na presença isolada de ANA adquiriu competência embriogênica aos 28 dias de cultivo, quando pró-embriões com origem unicelular se desenvolveram a partir da atividade meristemática proveniente da desdiferenciação das células dos tecidos subepidérmicos e corticais (Figuras 22 A, B e C) em uma raiz seccionada transversalmente em ocasião da excisão para o estabelecimento do explante no respectivo meio de cultura. Um embrião somático com origem unicelular desenvolvido a partir da atividade meristemática proveniente da desdiferenciação das células epidérmicas também foi observado em outra raiz adjacente, o qual apresentou a protoderme bem delimitada e contínua ao tecido epidérmico da raiz, e pólo caulinar contendo células meristemáticas, embora os tecidos procambiais e o pólo radicular não tenham sido evidenciados (Figuras 22 A, B e D).

Almeida (1994) utilizou ápices radiculares com 1,0 cm de comprimento como fonte de explante de plantas de pupunheiras crescidas em condições assépticas em meios de cultura MS adicionados ou não de várias concentrações e combinações de ANA, BA, 2iP e GA3. Quando o autor inoculou estes segmentos e os manteve por um período de três meses em meios acrescidos com 2,4-D ou picloram em distintas concentrações, somente calos puderam ser evidenciados. A transferência destas estruturas calogênicas para meio contendo a presença isolada de ANA, eventualmente promoveu o desenvolvimento raízes após seis meses de cultura e quando transferidas para meio contendo a presença isolada de BAP, nenhuma resposta morfogênica foi evidenciada. Já OTHMAN (2003) utilizou segmentos radiculares com 1,0 cm de altura de raízes excisadas de plantas assépticas de *B. gasipaes* e inoculou em meio MS contendo a presença de uma auxina e de uma citocinina (biorreguladores e concentrações não publicadas), o qual promoveu o desenvolvimento de calos em ápices radiculares. O autor relatou que o cultivo dos calos em meio isento de reguladores de crescimento promoveu o desenvolvimento de culturas embriogênica.

Aloufa (2002) verificou ainda, que plantas de batata-doce cv *Leucorhiza* só poderiam ser regeneradas a partir de meristemóides (centros meristemáticos) originados a partir do cilindro central de discos radiculares cultivados em meio MS suplementado com 2,26 μM de 2,4-D e 0,46 μM de cinetina quando algum tecido materno estivesse presente. Segundo o autor, isto sugere que os tecidos maternos das raízes fornecem alguma substância reguladora de crescimento ou nutrientes necessários ao crescimento e desenvolvimento de meristemóides (centros meristemáticos). Cabe salientar que no local da excisão das raízes ocorre a produção de hormônios em resposta a injúrias, os quais, junto à introdução exógena de biorreguladores, induzem quantidade superior de embriões somáticos em relação a regiões nas quais os tecidos radiculares não foram excisados (PAUL; SIKDAR, 2005).

Explantos cultivados em meio contendo a presença isolada de TDZ ou em associação com ANA evidenciaram intensa atividade meristemática apical caulinar dos explantes (Figuras 23 A e B), sendo que somente na presença isolada do TDZ observou-se intensa atividade meristemática epidérmica nos primeiros primórdios foliares das gemas adventícias desenvolvidas (Figura 23 D) e nos tecidos epidérmicos e subepidérmicos das pinas jovens (Figura 23 C), além do desenvolvimento de pró-embriões com origem multicelular a partir da atividade meristemática proveniente da desdiferenciação dos tecidos epidérmicos e subepidérmicos (Figuras 23 A, B e C) e unicelular a partir da atividade meristemática proveniente da desdiferenciação epidérmica das pinas jovens e dos primórdios foliares das gemas adventícias, respectivamente (Figura 23 D). Paiva Neto, Mota e Otoni (2003) também observaram que o TDZ a 4,56 μM acrescido ao meio MS promoveu intensa atividade mitótica em segmentos hipocotiledonares enraizados ou não, obtidos de plantas crescidas em meio asséptico de annatto (*Bixa orellana*). Segundo os autores, esta intensa proliferação mitótica promoveu o desenvolvimento de muitas zonas meristemáticas adjacentes à epiderme e no tecido cortical externo e, posteriormente ambas as células epidérmicas e corticais, formaram um tecido adicional na região superficial seccionada, na qual a epiderme pareceu formar um tecido semelhante à periderme, embora nenhuma gema individualizada tenha se desenvolvido. Micheluzzi (2007) ao analisar a organogênese *in vitro* em folhas jovens de macieira (*Malus domestica* Borkh) cultivar Galaxy desenvolvidas em segmentos nodais desta espécie cultivados em meio MS contendo distintas concentrações de BAP, observou que a presença do TDZ no meio MS contendo também a auxina ANA no qual os explantes foliares foram cultivados, promoveu intensa atividade meristemática no tecido parenquimático próximo à

epiderme abaxial e nas regiões de excisão, conduzindo à ruptura ou desintegração da epiderme nestes locais, conforme observado no presente trabalho (Figuras 23 A e B). O autor também evidenciou divisões periclinais na epiderme, corroborando o observado neste trabalho (Figura 23 B) e meristemóides (centros meristemáticos) com origem a partir de divisões de células parenquimáticas, as quais promoveram o desenvolvimento de elevado número gemas adventícias.

Hutchinson, Krishnaraj e Saxena (1996) obtiveram, entretando, embriões somáticos diretamente de explantes hipocotiledonares de gerânio (*Pelargonium x Hortorum* Bailey) cultivados em meio MS suplementado com TDZ em concentração semelhante à utilizada no presente trabalho (0,4 μM) ou com AIA (1,0 μM) associado com o BAP (8,0 μM). Os autores observaram que, embora a maioria dos embriões somáticos tivesse sua origem unicelular no tecido epidérmico, alguns se desenvolveram a partir de células subepidérmicas mediante sucessivas divisões celulares.

Os resultados observados por Paiva Neto, Mota e Otoni (2003) e Hutchinson, Krishnaraj e Saxena (1996) corroboram com os observados no presente trabalho, evidenciando o potencial do TDZ à indução de intensas zonas meristemáticas e à embriogênese somática diretamente do explante em nível epidérmico e subepidérmico. Neste trabalho, embora a aplicação do ANA em associação com TDZ tenha promovido a mesma atividade meristemática epidérmica e subepidérmica no meristema apical caulinar dos explantes, o uso isolado do TDZ foi essencial ao desenvolvimento de estruturas semelhantes a embriões somáticos no estágio globular (Figura 23).

Não há relatos similares na literatura para os centros meristemáticos esféricos e isentos de contato com o tecido materno evidenciados na região mediana da base dos explantes cultivados em T1 e T7 aos 28 dias de cultivo, em T4 e T3 aos 84 dias de cultivo (Figuras 24 A, B e C). Conforme já mencionado, nas secções iniciais ou finais dos materiais emblocados, observou-se intensa atividade meristemática na região correspondente ao centro meristemático isento de conexão com os tecidos do explante evidenciado em secções medianas (Figura 24 D). Por algum motivo ainda não elucidado, as células presentes nos centros meristemáticos soltos evidenciados na região mediana da base dos explantes seguiram o padrão morfogenético similar ao observado para os explantes cultivados em meio contendo a presença isolada de ANA aos 28 dias de cultivo, em cujo centro ou zona meristemática desenvolveram-se estruturas semelhantes a pró-embriões e isolados pelo acúmulo de mucilagem (Figuras 24 B e C). A resposta morfogenética para o desenvolvimento de pró-embriões nos centros meristemáticos soltos diferencia-se daquela

observada para o tratamento contendo a presença isolada de ANA (T2) apenas pela localização pouco comum para o desenvolvimento destas estruturas e pela presença de uma camada de células com citoplasma menos denso circundando as centrais, as quais evidenciaram maior densidade citoplasmática. (Figuras 24 B e C).

O desenvolvimento de gemas adventícias com origem multicelular a partir da atividade meristemática proveniente da desdiferenciação dos tecidos epidérmicos e subepidérmicos entre os primórdios foliares mais jovens dos explantes cultivados nos tratamentos T2, T3, T4, T6, T7 e T8 (Figura 25) e a completa ausência desta resposta morfogenética para aqueles cultivados no tratamento isento de biorreguladores (T1), sugere que os níveis endógenos hormonais (balanço auxina/citocinina) destes explantes de pupunheiras não favorecem o desenvolvimento destas estruturas próximas ao meristema apical, requerendo a adição exógena de biorreguladores, particularmente da associação do ANA com BAP ou da presença isolada do ANA, pois explantes submetidos a estes tratamentos evidenciaram competência organogênica em número consideravelmente maior de períodos em relação aos demais tratamentos. Além disso, todas as gemas adventícias, com ou sem primórdios foliares apresentaram tamanho reduzido (Figura 25) durante todos os períodos analisados, sugerindo que estas permaneceram em estado de dormência nos períodos analisados.

Em decorrência à sua origem, não pode ser descartada a possibilidade de que estes tratamentos tenham induzido o desenvolvimento de gemas axilares, evento morfogenético também observado em algumas culturas *in vitro* de *Phoenix dactylifera* L. (GABR; TISSERAT, 1985; TISSERAT, 1987; BEKHEET; SAKER, 1998), embora análises anatômicas não tenham sido apresentadas pelos autores. É importante salientar que, estudos ontogenéticos são necessários para comprovar as estruturas evidenciadas nas análises histológicas no presente trabalho em explantes cultivados na presença de biorreguladores.

Indução de gemas axilares *in vitro* também ocorreu com frequência em coqueiros (FISHER; TSAI, 1979 apud TISSERAT, 1987) e em *Phoenix canariensis* L. (GABR; TISSERAT, 1985) presumidamente porque estas espécies não produzem gemas axilares na natureza (*in vivo*) (TISSERAT, 1987). De acordo com Gabr e Tisserat (1985) a proliferação de gemas axilares a partir de ápices caulinares de clones conhecidos, deveria ser o método escolhido à propagação de palmeiras. Cabe salientar que *Phoenix dactylifera* L. raramente apresenta brotações na região apical, porém, este evento foi observado em duas localidades do Egito como

um evento associado à segregação genética (HARHASH; EL-WAKIL, 1998). Os autores relataram ainda, que esta espécie parece possuir a capacidade de emissão de gemas adventícias a partir da atividade meristemática de células dos meristemas residuais do domo apical mediante injúrias nesta região por ataque de insetos, doenças ou pela decapitação de gemas adventícias ou meristema apical com a finalidade de extração da bebida doce conhecida como “Lagby” para fins comerciais. Além disso, gemas axilares podem ser induzidas *in vitro* a partir gemas axilares emitidas por algumas espécies desse gênero (TISSERAT, 1987) a partir da base do estipe materno (TOMLINSON, 1962).

O tratamento contendo a presença isolada de 2iP (T5) desfavoreceu tanto o desenvolvimento de gemas adventícias entre os primórdios foliares mais jovens, como o desenvolvimento de gemas adventícias na extremidade proximal da região basal do explante, visto que nenhuma destas estruturas foram evidenciadas nas análises histológicas efetuadas nos explantes. O tratamento contendo 2iP em associação com ANA (T8) também não promoveu o desenvolvimento de gemas adventícias na região basal. Estes resultados corroboram com o observado por Almeida (1994) cujos ápices caulinares da mesma espécie, isolados de plântulas derivadas de embriões zigóticos excisados de sementes e germinados em meio MS isento de reguladores de crescimento, quando transferidos para meio contendo a presença isolada de 2iP ou em meio contendo 2iP em associação com ANA não desenvolveram nenhuma gema adventícia. O autor observou também, que a transferência destas plântulas provenientes de embriões zigóticos excisados de sementes para o mesmo meio de cultura (isento de biorreguladores), da mesma forma não promoveu o desenvolvimento de respostas organogênicas. No presente trabalho, entretanto, gemas adventícias com origem direta na extremidade proximal da região basal do explante e em conexão aos feixes procambiais do tecido materno foram observadas nas análises histológicas realizadas aos 56, 84, 112 e 140 dias de cultivo em explantes cultivados em T1e em T7, caracterizando as melhores respostas para este evento morfogênico em relação aos demais tratamentos (Figuras 26 A e B).

Cabe salientar que, a exceção do tratamento T2 aos 112 dias de cultivo e T6 aos 84 dias de cultivo, o desenvolvimento de gemas adventícias entre os primórdios foliares mais jovens e o desenvolvimento de gemas adventícias na extremidade proximal da região basal dos explantes não foram eventos simultâneos observados em um mesmo explante, mas isolados.

Infelizmente a origem das gemas adventícias desenvolvidas na extremidade proximal da região basal dos explantes não pôde ser elucidada devido ao avançado estágio de desenvolvimento observado, porém, não pode ser descartada a possibilidade de estas terem se desenvolvido a partir de centros meristemáticos unipolarizados via desdiferenciação do tecido parenquimático nesta região, visto que o processo organogênico envolve o desenvolvimento de meristemóides (centros meristemáticos) (JIMÉNEZ, 2005) ou da atividade meristemática do próprio procâmbio do tecido materno, pois Almeida (1994) verificou que as gemas adventícias observadas em ápices caulinares mantidas em meio MS contendo ANA em associação com BAP, nas mesmas concentrações utilizadas no presente trabalho, após cultivo prévio em meio MS contendo a presença isolada de BAP a 8,00 μM , originaram-se a partir de uma camada periférica pronunciada de células meristemáticas na base do explante, muito semelhantes ao procâmbio.

Gemas adventícias com origem multicelular desenvolvidas por meio do mesmo padrão morfogenético relatados foram observadas na maioria dos períodos analisados (Figuras 26 A e B), além do desenvolvimento de múltiplas brotações nos explantes cultivados em T7 (Figura 26 D), corroborando com o observado por Micheluzzi (2007) ao analisar a organogênese *in vitro* em folhas jovens de macieira (*Malus domestica* Borkh) cultivar Galaxy desenvolvidas em segmentos nodais desta espécie cultivados em meio MS contendo distintas concentrações de BAP. O autor observou que a presença do TDZ no meio MS contendo também a auxina ANA no qual os explantes foliares foram cultivados, promoveu o desenvolvimento de grande quantidade de gemas adventícias na face abaxial da folha, região esta que permaneceu em contato com o meio de cultura. De forma similar, no presente trabalho, a extremidade da região proximal da região basal do explante contendo múltiplas brotações (Figura 26 D) também permaneceu em contato direto com o meio de cultura, sugerindo que a região do explante imersa no meio de cultura está mais susceptível às atuações promovidas pelo TDZ. O autor observou ainda, que muitas gemas adventícias se desenvolveram diretamente a partir de meristemóides (centros meristemáticos) originados no tecido parenquimático destes explantes. No presente trabalho e de forma similar ao observado pelo autor supracitado, as múltiplas gemas observadas no explante cultivado em T7 parecem ter se originado da intensa atividade meristemática proveniente da desdiferenciação epidérmica e subepidérmica na extremidade proximal da região basal, a qual possibilitou o desenvolvimento de centros meristemáticos e posteriormente, meristemas apicais, caracterizando a origem multicelular para estas estruturas (Figura 26 D).

Murthy, Murch e Saxena (1998) após uma extensa revisão de literatura sobre os efeitos do thidiazuron na morfogênese relataram que, embora geralmente o desenvolvimento de múltiplas brotações ou formação de gemas são obtidos com níveis elevados de citocininas, a utilização do TDZ em baixas concentrações tem promovido a diferenciação de centros de crescimento organizados e regeneração de brotos com mais eficiência que as demais citocininas (KERNES; MEYER, 1986; FELLMAN; READ; HOSIER, 1987; FIOLA *et al.*, 1990; MALIK; SAXENA, 1992a, 1992b apud MURTHY; MURCH; SAXENA, 1998).

Huetteman e Preece (1993) relataram ainda, que o TDZ em baixas concentrações promove o desenvolvimento direto de gemas adventícias e (ou) axilares em ápices caulinares por reduzir a dominância do meristema apical.

Conforme analisado no Capítulo 2 (2.3.1.4), explantes cultivados em T4 ou T7 não desenvolveram raízes, mas alguns explantes cultivados nestes tratamentos evidenciaram o desenvolvimento de estruturas semelhantes a rizomas. As análises histológicas corroboraram com as observações morfofisiológicas, pois, aos 28 dias de cultivo, dois rizomas em estágio inicial de desenvolvimento foram observados no explante cultivado em T4 a partir da atividade meristemática das células procambiais do tecido materno (Figuras 26 A, B e C), embora nos explantes cultivados em T7 as análises histológicas não tenham evidenciado o desenvolvimento destas estruturas. Almeida (1994) também observou o desenvolvimento de estrutura rizomatosa na base de ápices caulinares de pupunheiras, porém, cultivados em meio contendo ANA em associação com BAP nas mesmas concentrações testadas no presente trabalho. O autor constatou por meio de análises histológicas, que estas estruturas apresentaram continuidade física com explante, por meio de estrato de células meristemáticas e de feixes vasculares, assim como evidenciado no presente trabalho. Ainda de acordo com o autor, quando as estruturas rizomatosas apresentavam um estreitamento em sua base, na junção com o explante caulinar que o originou, estavam aptas a serem isoladas e reinoculadas em meio contendo a mesma composição e a promoverem a regeneração de muitas gemas adventícias a partir do cordão de procâmbio da estrutura.

A utilização do TDZ isoladamente também promoveu o a (uni) polarização de um feixe pré-procambial originado a partir da diferenciação de um centro meristemático localizado na extremidade distal do material seccionado longitudinalmente e abaixo do meristema apical caulinar (Figuras 27 A e B), provavelmente devido à redução da dominância apical promovida

por esta citocinina, como proposto por Huetteman e Preece (1993). Embora este tenha sido um evento isolado, provavelmente esta estrutura monopolar se diferenciaria em uma gema adventícia, ressaltando novamente o elevado potencial morfogenético dos meristemas presentes na extremidade distal da região basal dos explantes, mais precisamente abaixo do meristema apical caulinar, ao desenvolvimento tanto de complexos celulares pró-embriogênicos, como à organogênese com origem multicelular

Outra resposta promovida pela aplicação do TDZ isoladamente (T4) ou em associação com ANA (T7) foi o desenvolvimento de acúleos nas bainhas, no pecíolo e nas primeiras folhas desenvolvidas dos explantes, e nos primórdios foliares das gemas adventícias na maioria dos explantes cultivados nestes meios, conforme relatado nos Capítulos 2 e 3, cujas análises histológicas evidenciaram que os mesmos apresentaram-se pluricelulares, não ramificados e originados a partir da atividade meristemática provenientes da desdiferenciação epidérmica das bainhas dos explantes, caracterizando a origem unicelular para estas estruturas (Figuras 27 C, D, E e F). Em pupunheiras, estas estruturas apresentam origem epidérmica e ausência total de vascularização (TOMLINSON, 1962), motivo pelo qual são designadas como acúleos no presente trabalho, corroborando com as descrições realizadas por Alquini *et al.* (2006), quanto a sua origem.

Não há descrições anatômicas na literatura vigente sobre os acúleos observados nesta espécie, embora deva ser ressaltado que a análise anatômica desta estrutura realizada no presente trabalho foi oriunda de explantes cultivados em meios de cultura acrescidos de TDZ, cuja presença pode ter alterado significativamente as características anatômicas devido a todas as respostas promovidas por esta citocinina anteriormente descritas, principalmente em nível epidérmico e subepidérmico, por meio da intensa atividade meristemática nestes tecidos.

De acordo com Clement, 1986 apud Clement e Manshardt (2000), devido à elevada variação dos ‘espinhos’ presentes em estipes de pupunheiras, provavelmente há mais de um gene envolvido na expressão destes, cuja presença em quantidade significativa nos explantes cultivados em meio contendo a presença do TDZ sugere que esta citocinina ativou o (s) gene (s) específico (s) à expressão destas estruturas.

4.5 Considerações finais

- O emprego dos biorreguladores exerceu influência no número de centros meristemáticos desenvolvidos na região basal do explante, nas bainhas dos explantes e/ou nos primórdios foliares dos propágulos, assim como a distribuição destas estruturas.
- A utilização do ANA em associação com TDZ no meio de cultura MS promoveu o desenvolvimento de maior número de centros meristemáticos na região basal em secções medianas do explante e heterogeneidade à distribuição destas estruturas quando comparadas a periferia (inicial e final) e as três regiões analisadas (inicial, mediana e final). Menor número de centros meristemáticos na região mediana do explante ocorreu para o tratamento contendo ANA em associação com 2iP, cuja distribuição homogênea dos centros meristemáticos nas três regiões analisadas foi observada com maior frequência no tratamento isento de biorreguladores ou contendo a presença isolada de TDZ..
- Embora os centros meristemáticos localizados nas bainhas dos explantes e/ou primórdios foliares dos propágulos tenham se desenvolvido em número reduzido e apresentado elevada heterogeneidade à distribuição nas três regiões seccionadas (inicial, mediana e final) dos explantes em todos os tratamentos e períodos avaliados, a presença do ANA em associação com BAP ou com TDZ favoreceu o desenvolvimento de número elevado destas estruturas em relação aos demais tratamentos.
- Maior frequência de centros meristemáticos nas bainhas dos explantes e/ou nos primórdios foliares foi evidenciada no tratamento contendo ANA em associação à BAP, seguido pelo tratamento contendo a presença isolada de ANA, enquanto que a menor frequência foi evidenciada em explantes cultivados em meio contendo a presença isolada de TDZ ou 2iP.
- Todos os tratamentos promoveram o desenvolvimento de complexos celulares pró-embriogênicos na região basal dos explantes a partir da (bi) polarização dos centros meristemáticos desenvolvidos na extremidade distal, abaixo do meristema apical caulinar,

os quais variaram em número segundo o (s) biorregulador (es) empregado (os), sugerindo que novos estudos sejam conduzidos a fim de explorar o potencial regenerativo destas estruturas.

- Explantes cultivados em meio MS contendo ANA em associação com TDZ ou BAP desenvolveram maior número de complexos celulares pró-embriogênicos nos períodos analisados. Não foram observadas estas estruturas tanto nas bainhas dos explantes, como nos primórdios foliares dos propágulos desenvolvidos.
- Explantes cultivados em meio MS contendo a presença isolada de 2iP ou ANA, ou ambos associados (2iP/ANA) evidenciaram complexos celulares pró-embriogênicos somente em um período de cultivo, permitindo estabelecer um tempo mínimo de exposição destes ao biorregulador (es) empregado (s) para evidenciar esta resposta morfogenética.
- A exceção dos tratamentos contendo a presença isolada de ANA ou contendo ANA associada ao BAP ou 2iP, todos os demais evidenciaram CCPE aos 28 dias de cultivo.
- Explantes cultivados em meio MS contendo a presença isolada de ANA ou de TDZ ou na associação de ambos (ANA/TDZ) favoreceram o desenvolvimento de embriões somáticos com origem multicelular, diretamente na região proximal da região basal dos explantes, muito provavelmente pela diferenciação de centros meristemáticos originados a partir da desdiferenciação de células parenquimáticas nesta região, que formaram estruturas (bi) polarizadas.
- A presença isolada do ANA favoreceu o desenvolvimento de embriões somáticos no estágio pró-embrionário com origem unicelular diretamente do explante a partir de centros e zonas meristemáticas provenientes da desdiferenciação do tecido parenquimático da extremidade proximal da região basal do explante e da atividade meristemática dos estratos subepidérmicos radicular. O ANA também promoveu o desenvolvimento de embrião somático no estágio globular diretamente da atividade meristemática epidérmica e cortical radicular.

- O TDZ isoladamente ou em associação com ANA promoveu intensa atividade meristemática proveniente da desdiferenciação epidérmica e subepidérmica na região do promeristema caulinar, proporcionando o desenvolvimento de pró-embriões no estágio globular no tratamento contendo a presença isolada do TDZ, inclusive nas pinas jovens e nos primeiros primórdios foliares das gemas desenvolvidas nos explantes.
- Centros meristemáticos contendo estruturas semelhantes a embriões somáticos no estágio pró-embrionário e isentos de conexão com o tecido materno foram observados na região mediana da base dos explantes cultivados nos tratamentos isento de biorreguladores, contendo a aplicação isolada de TDZ ou contendo o ANA associado à BAP ou TDZ.
- Explantes cultivados em meio MS contendo ANA em associação com BAP ou na presença isolada do ANA desenvolveram, com elevada frequência, gemas adventícias reduzidas entre os primórdios foliares mais jovens, sugerindo que estes tratamentos promoveram o desenvolvimento de gemas axilares.
- Gemas adventícias se desenvolveram diretamente na extremidade proximal da região basal dos explantes cultivados em no tratamento isento de biorreguladores e no tratamento contendo o ANA associado à TDZ, as quais foram evidenciadas na maioria dos períodos de cultivo analisados com provável origem a partir de centros meristemáticos provenientes da desdiferenciação do tecido parenquimático ou a partir da atividade meristemática do procâmbio do tecido materno nesta região.
- O desenvolvimento de gemas adventícias entre os primórdios foliares mais jovens e na região basal dos explantes, em geral, não foram eventos simultâneos observados em um mesmo explante.
- A utilização do TDZ isoladamente promoveu o desenvolvimento de rizomas e parece ter estimulado a expressão de gene (s) ao desenvolvimento de acúleos nos explantes cultivados nos tratamentos contendo a presença desta citocinina.

- O TDZ, quando utilizado isoladamente no meio de cultura MS, promoveu o desenvolvimento de um feixe pré-procambial unipolarizado na extremidade distal da região basal dos explantes, evento este relacionado à organogênese.

4.6 Conclusões

- ANA em associação com TDZ induz elevado número de centros meristemáticos na base dos explantes a partir da desdiferenciação do tecido parenquimático, sendo a região mediana do explante a mais responsiva para este evento morfogenético.
- Na bainha dos explantes e/ou primórdios foliares dos propágulos desenvolvidos, o maior número de centros meristemáticos foi observado no tratamento contendo ANA em associação à BAP ou à TDZ.
- A atividade meristemática subepidérmica e cortical radicular é induzida pela utilização de ANA, propiciando a formação de pró-embriões com origem unicelular.
- Pró-embriões com origem unicelular são induzidos pela desdiferenciação do tecido parenquimático da extremidade proximal da base do explante na presença de ANA; pela desdiferenciação da epiderme de primórdios foliares de gemas adventícias na presença de TDZ e pela aquisição de competência embriogênica de células em centros meristemáticos desenvolvidos na região mediana da base do explante em meio MS isento de biorreguladores, ou com TDZ, ou ANA e BAP ou ANA e TDZ.
- Pró-embriões com origem multicelular são induzidos pela presença de TDZ em células do meristema apical, pela desdiferenciação da epiderme e subepiderme de pinas jovens, ou pela presença combinada de ANA e TDZ, em centros meristemáticos desenvolvidos na extremidade distal do explante.
- Embriões somáticos com origem multicelular são induzidos na ausência ou na presença de ANA e TDZ, isolados ou em associação, a partir da (bi) polarização de centros

meristemáticos (complexos celulares pró-embriogênicos) originados da desdiferenciação das células do tecido parenquimático na região central da base dos explantes.

- Gemas adventícias são induzidas com maior frequência em explantes cultivados na ausência de biorreguladores ou na presença de ANA e TDZ, a partir da (uni) polarização de centros meristemáticos originados pela desdiferenciação do tecido parenquimático ou (uni) polarização de traços procambiais do tecido materno na extremidade proximal na base dos explantes.

- Entre os primórdios foliares dos explantes, maior frequência de gemas adventícias ocorre em meio MS contendo a presença isolada de ANA, a partir da atividade meristemática proveniente da desdiferenciação epidérmica e subepidérmica nesta região.

Referências

- ALMEIDA, M. **Emprego da Cultura “in vitro” para multiplicação vegetativa em pupunha (*Bactris gasipaes* H.B.K.)** Palmae. 1994. 121p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biocências –Universidade de São Paulo, São Paulo, 1994.
- ALMEIDA, W.A.B. **Caracterização anatômica da organogênese *in vitro* e transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens* em citrus sp.** 2002. 138p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.
- ALMEIDA, M., ALMEIDA, C.V. Somatic embryogenesis and *in vitro* plant regeneration from pejobaye adult plant leaf primordial. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.9, p.1449-1452, 2006.
- ALMEIDA, M.; KERBAUY, G.B. Micropropagation of *Bactris gasipaes* H.B.K. (Palmae) through flowers bud culture. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Lavras, v.8, p.215-217, 1996.
- ALOUFA, M.A. Some factors affecting the callus induction and shoot formation in two cultivars of sweet potato *Ipomoea batatas* (L.) POIS. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.26, n.5, p.964-969, 2002.
- ALQUINI, Y.; BONA, C.;BOERGER, M.R.T., COSTA, C.G.; BARROS, C.F. Epiderme. In:APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S.M. (Ed.) **Anatomia vegetal**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2006. 438p.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; FERNANDO, J.A.; MACHADO, S.R.; VIEIRA, M. L. C. Estudos morfológicos, anatômicos, histoquímicos e ultra-estruturais da organogênese *in vitro* do maracujazeiro. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (Ed.). **Maracujá - germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: EMBRAPA Cerrados, 2005. cap.16, p.387-408.
- BEKHEET, S. A. AND SAKER, M.M. ***In vitro* propagation of Egyptian date palm: II-Direct and indirect shoot proliferation from shoot-tip explants of *Phoenix dactylifera* L. c.v. Zaghlool.**The first international conference on date palm. 1998. Faculty of Agriculture Science-United Arab Emirates University, 1998.
- BHAU, B.S. Regeneration of *Coryphantha elephantidens* (Lem.) Lem. (cactaceae) from root explants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.81, p.337-344, 1999.
- BOVI, M.L.A. Palmito pupunha-informações básicas para o cultivo. In: FURIA, L.R.R. (Ed.). **Encontro sobre produção de palmito**, Piracicaba, CALQ/Departamento de Agricultura, 1993. p.12-23.

BOVI, M.L.A.; MARTINS, C.C.; SPIERING, S.H. Desidratação de sementes de quatro lotes de pupunheira: efeito sobre a germinação e vigor. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, n.1, 109-112, 2004.

CHANG, W.C.; HSING, Y.I. Plant regeneration through somatic embryogenesis in root-derived callus of ginseng (*Panax ginseng* C.A.Meyer). **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v.57, p.133-135, 1980.

CLEMENT, C.R.; MANSCHARDT, R.M. A review of the importance of spines for pejobaye heart-of-palm production. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.83, p.11-23, 2000.

ESAU, K. Anatomical differentiation in shoot and root axes. In: LOOMIS, W.E. (Ed.). **Growth and differentiation in plants**. Ames: The Iowa State College Press, 1949. p.69-100.

ESHRAHGI, P.; ZARGHAMI, R.; MIRABDULBAGHI, M. Somatic embryogenesis in two Iranian date palm cultivars. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.4, n.11, p.1309-1312, 2005.

FERNANDO, J.A. **Estudos anatômicos e ultra-estruturais da organogênese *in vitro* de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.** 2005. 106p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

FERREIRA, S.A.N.; SANTOS, L.A. Viabilidade de sementes de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth). **Acta Amazônica**, Manaus, v.22, p.303-307, 1992.

GABR, M.F.; TISSERAT, B. Propagating palms *in vitro* with special emphasis on the date palm (*Phoenix dactylifera* L.) **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.25, p.255-262, 1985.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCT/EMBRAPA-CNPq, 1990. p.99-169.

GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S., BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CBAB, 1999. v.2, p.533-568.

HARHASH, M.M.; EL-WAKIL, H.E. Branching abnormality and axillary buds outgrowth after apical dome decapitation of date palm (*Phoenix dactylifera*, L.). In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON DATE PALMS, 1., Al-Ain. **Proceedings**...Al-Ain: UAE, 1998. Proceeding 46. Disponível em: < <http://www.pubhort.org/datepalm/index1.htm> >. Acesso em: 31 maio 2009.

HANDRO, W.; FLOH, E.I.S.; Aspectos básicos do controle da morfogênese *in vitro*. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCT/EMBRAPA-CNPq, 1990. p.203-212.

HUERTE, V.F.; ARIAS, M.O., 1981. Propagación vegetativa del pejobaye. **Asbana**, San Jose, v.5, n.14, p.10-13.

- HUETTEMAN, C.A.; PREECE, J.E. Thidiazuron: a potent cytokinin for wood plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.33, n.2, p.105-119, 1993.
- HUTCHINSON, M.J.; KRISHNARAJ, S.; SAXENA, P.K. Morphological and physiological changes during thidiazuron-induced somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium x hortorum* Bailey) hypocotyl cultures. **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v.157, n.4, p.440-446, 1996.
- JIMÉNEZ, V.M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v.47, p.91-110, 2005.
- KANCHANAPOOM, K.; DOMYOAS, P. The origin and development of embryoids in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) embryo culture. **Science Asia**, Mahidol, v.25, p.195-202, 1999.
- KARNOVSKY, M.J.A. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v.27, n.2, p.137-138, 1965.
- KERBAUY, G.B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara, 2004. 452p.
- MELO, B.; PINTO, J.E.B.P.; LUZ, J.M.Q.; PEIXOTO, J.R.; JULIATTI, F.C. Efeitos de ANA e AIB *in vitro* no enraizamento e crescimento da parte aérea da plântula da guarirobeira [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.]. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.17, n.1, p.49-59, 2001.
- MICHELUZZI, F.C. **Estudo da organogênese *in vitro* de explantes foliares de macieira (*Malus domestica* Borkh) Cv.Galaxy**. 2007. 78p. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2007.
- MOK, M.C.; MOK, D.W.S.; TURNER, J.E.; MUJER, C.V. Biological and biochemical effects of cytokinin-active phenylurea derivatives in tissue culture systems. **Hortscience**, Alexandria, v.22, p.1194-1197, 1987.
- MOURA, E.F. **Embriogênese somática em macaúba: indução, regeneração e caracterização anatômica**. 2007. 66p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F.: A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Plant Physiology**, Rockville, v.15, p.473-497, 1962.
- MURTHY, B.N.S.; MURCH, S.J.; SAXENA, P.K. Thidiazuron: a potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Berlin, v.34, p.267-275, 1998.
- OTHMAN, R. **Tissue culture of Bactris**. Malasian Palm Oil Board Information Series, n.187, 2003. Disponível em : <<http://palmoilis.mpob.gov.my/webbased/tt187.pdf>>. Acesso em: 17 mar. 2009.

PAIVA NETO, V.B.; MOTA, T.R.; OTONI, W.C. Direct organogenesis from hypocotyl-derived explants of annatto (*Bixa orellana* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.75, p.159-167, 2003.

PARROT, W.A.; MERLKE, S.A.; WILLIAMS, E.G. Somatic embryogenesis: potencial for use in propagation and gene transfer systems. In: MURRAY, D.R. **Advanced methods in plant breeding and biotechnology**. Melkham: Redwood, 1991. p.158-200.

PAUL, S.; SIKDAR, S.R. Regeneration of plants from root explant of two Indian cultivars of *Brassica campestris* L. through somatic embryogenesis. **Current Science**, Bangalore, v.89, n.8, 2005. Scientific Correspondence.

PERES, L.E.P. Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. **Biociência e Desenvolvimento**, Brasília, n.25, 2002.

PERES, L.E.P.; MERCIER, H.; KERBAUY, G.B.; ZAFFARI, G.R. Níveis endógenos de AIA, citocininas e ABA em uma orquídea acaule e uma bromélia sem raiz, determinados por HPCL e ELISA. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Lavras, v.9, n.3, p.169-176, 1997.

SAKAI, W.S. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. **Stain Technology**, Saint Louis, v.48, n.5, p.247-49, 1973.

SANÉ, D.; ABERLENC-BERTOSSI, F.; GASSAMA-DIA, Y.K.; SAGNA, M.; TROUSLOT, M.F.; DUVAL, Y.; BORGEL, A. Histochemical analysis of callogenesis and embryogenesis from cell suspensions of date palm (*Phoenix dactylifera*). **Annals of Botany**, Oxford vol. 98, p.301-308, 2006.

SEO, J. KIM, S.W.; MIN, S.R.; LIU, J.R. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration in root explant cultures of carnation. **Plant Biotechnol Report.**, v.1, p.67-70, 2007. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/j77143513n026557/fulltext.pdf>>. Acesso em: 30 maio 2009.

SKOOG, F.; MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. In: PORTER, K.H. (Ed.). The biological action of growth substances. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, Cambridge, v.11, p.118-131, 1957.

SRIVASTAVA, L.M. Embryogenesis. _____. **Plant growth and development – hormones and environment**. London: Academic Press, 2002b. chap. 3, p.75-92.

_____. Apical dominance and some other phenomena illustrating correlative effects of hormones. In: _____. **Plant growth and development – hormones and environment**. London: Academic Press, 2002b. chap. 14, p.303-339.

_____. Cytokinins. In: _____. **Plant growth and development – hormones and environment**. London: Academic Press, 2002c. chap.8, p.191-204.

STEINMACHER, D.A. **Germinação *in vitro*, criopreservação e embriogênese somática em pupunha**. 2005. 107p. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 719p.

TERMIGNONI, R.R. **Cultura de tecidos vegetais**. Porto Alegre: UFRGS, 2005. 182p.

TISSERAT, B. Palms. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. (Ed.). **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, Boston, Lancaster, 1987. v.3, p.338-356.

TISSERAT, B.; DeMASON, E.A. Occurrence and histological structure of offshoots and inflorescences produced from *Phoenix dactylifera* L. plantlets *in vitro*. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, New York, v.112, n.1, p.35-42, 1985.

TOMLINSON, P.B. **Anatomy of the monocotyledons. II. Palmae**. London: Oxford University Press, 1961. 453p.

_____. Essays on the morphology of palms. VII. A digression about spines. **Príncipes**, Lawrence, v.6, p.44-52, 1962.

THORPE, T.A. Organogenesis *in vitro*: structural, physiological, and biochemical aspects. In: VASIL, I.K. (Ed.). **Perspectives in plant cell and tissue culture**. New York: Academic Press, 1980. p.71-111.

THORPE, T.A.; MURASHIGE, T. Some histochemical changes underlying shoot initiation in tobacco callus. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.48, p.276-285, 1970.

VALVERDE, R.; ARIAS, O. THORPE, T. Estudio histológico em callos de pejybaye. **Agronomia Costarricense**, San Jose, v.16, n.2, p.225-229, 1992.

VALVERDE, R.; GÓMES, L.; ARIAS, O.; THORPE, T. Respuesta morfogenética de los ápices de pejybaye (*Bactris gasipaes* H.B.K.) cultivados *in Vitro* en condiciones de luz y oscuridad. **Agronomia Costarricense**, San Jose, v.11, n.1, p.97-102, 1987.

VIDAL, M.C.; VARGAS, T.E.; GARCÍA, E. Estudios anatómicos y morfológicos de la iniciación de embriones somáticos obtenidos a partir de ápices meristemáticos de *Musa* sp. **Acta Científica Venezolana**, Caracas, v.51, p.78-83, 2000.

ZOID, A.; TISSERAT, B. Morphogenetic responses obtained from a variety of somatic explant tissues of date palm. **The Botanical Magazine**, Tokyo, v.96, p.67-73, 1983.

ANEXOS

ANEXO A – Porcentagem de explantes de microplantas de *B. gasipaes* com propágulos (EP) e número de propágulos desenvolvidos por explante aos 28 dias de cultivo *in vitro*

Repetições	Tratamentos							
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
1	0	1	2	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	1	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	1	0	0	0	0	0	1
6	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	1	0	0	0	0	1	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0
EP (%)	0	30	10	0	0	0	20	10

ANEXO B – Porcentagem de explantes de microplantas de *B. gasipaes* com propágulos (EP) e número de propágulos desenvolvidos por explante aos 56 dias de cultivo *in vitro*

Repetições	Tratamentos							
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
1	0	2	0	1	0	0	0	1
2	0	0	1	0	0	0	1	0
3	0	1	0	9	0	0	0	0
4	2	1	0	0	0	0	1	0
5	0	2	0	0	0	0	0	1
6	0	0	0	1	0	1	1	0
7	0	0	0	0	1	0	0	0
8	0	1	0	0	0	0	1	0
9	0	0	0	0	0	0	0	1
10	0	1	0	0	0	0	0	0
EP (%)	10	60	10	30	10	10	40	30

ANEXO C – Porcentagem de explantes de microplantas de *B. gasipaes* com propágulos (EP) e número de propágulos desenvolvidos por explante aos 84 dias de cultivo *in vitro*

Repetições	Tratamentos							
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
1	3	2	0	2	0	1	0	2
2	1	0	3	0	0	1	2	0
3	1	1	1	9	0	1	1	0
4	4	1	0	0	0	0	2	0
5	0	2	0	0	0	1	0	2
6	0	0	0	1	0	1	2	0
7	4	0	0	0	1	1	2	0
8	0	2	0	0	0	1	1	1
9	1	0	0	1	0	0	0	2
10	1	2	0	0	0	0	2	0
EP (%)	70	60	20	40	10	70	70	40

ANEXO G – Porcentagem de explantes de microplantas de *B. gasipaes* com embriões somáticos (EES) e número de embriões somáticos desenvolvidos por explante aos 56 dias de cultivo *in vitro*

Repetições	Tratamentos							
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0
4	1	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0
EES (%)	10	0	0	0	0	0	0	0

ANEXO H – Porcentagem de explantes de microplantas de *B. gasipaes* com embriões somáticos (EES) e número de embriões somáticos desenvolvidos por explante aos 84 dias de cultivo *in vitro*

Repetições	Tratamentos							
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0
4	2	0	0	0	0	0	0	0
5	0	2	0	0	0	0	0	1
6	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	1	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0
EES (%)	10	10	0	0	0	0	10	10

ANEXO I – Porcentagem de explantes de microplantas de *B. gasipaes* com embriões somáticos (EES) e número de embriões somáticos desenvolvidos por explante aos 112 dias de cultivo *in vitro*

Repetições	Tratamentos							
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0
4	2	0	0	0	0	0	1	0
5	0	2	0	0	0	0	1	1
6	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	1	0	0
8	0	0	0	0	0	0	1	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	1	0	0	0	0	0	0
EES (%)	10	20	0	0	0	10	30	10

ANEXO J – Porcentagem de explantes de microplantas de *B. gasipaes* com embriões somáticos (EES) e número de embriões somáticos desenvolvidos por explante aos 140 dias de cultivo *in vitro*

Repetições	Tratamentos							
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0
4	2	0	0	0	0	1	1	0
5	0	2	0	0	0	0	1	1
6	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	1	0	0
8	0	0	0	0	0	0	1	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	1	0	0	0	0	0	0
EES (%)	10	20	0	0	0	20	30	10

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)