



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE RONDÔNIA
Núcleo de Ciências e Tecnologia
Programa de Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente

CALOGÊNESE EM ÁPICES CAULINARES
DE *Bactris gasipaes* H.B.K.

ARÊSSA DE OLIVEIRA CORREIA

Porto Velho (RO)
2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE RONDÔNIA
Núcleo de Ciências e Tecnologia

CALOGÊNESE EM ÁPICES CAULINARES
DE *Bactris gasipaes* H.B.K.

ARÊSSA DE OLIVEIRA CORREIA

Orientador: Prof. Dr. Maurício Reginaldo Alves dos Santos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente, Área de Concentração em Ambiente, Saúde e Sustentabilidade, para obtenção do Título de Mestre em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente.

Porto Velho (RO)

20

FICHA CATALOGRÁFICA
BIBLIOTECA PROF. ROBERTO DUARTE PIRES

C8245	Correia, Arêssa de Oliveira Calogênese em ápices caulinares de <i>Bactris gasepaes</i> H. B. K. / Arêssa de Oliveira Correia. Porto Velho, Rondônia, 2010. 54f.: il. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente) Fundação Universidade Federal de Rondônia / UNIR. Orientador: Prof. Dr. Maurício Reginaldo Alves dos Santos. 1. Propagação <i>in vitro</i> 2. Reguladores de crescimento 3. Calogênese 4. <i>Bactris gasepaes</i> I. Santos, Maurício Reginaldo Alves dos II. Título. CDU: 577
-------	---

Bibliotecária Responsável: Ozelina Saldanha CRB11/947

ARÊSSA DE OLIVEIRA CORREIA

**CALOGÊNESE EM ÁPICES CAULINARES
DE *Bactris gasipaes* H.B.K.**

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Maurício Reginaldo Alves dos Santos
Orientador
Universidade Federal de Rondônia/Embrapa Rondônia

Dr. Maria das Graças Rodrigues Ferreira
Titular
Embrapa Rondônia

Prof. Dr. Ângelo Gilberto Manzatto
Titular
Universidade Federal de Rondônia

Porto Velho, _____ de _____ de
_____.

Resultado _____.

Dedico este trabalho a todos os meus familiares e amigos, que com pequenos gestos incentivaram e apoiaram esta realização.

“Sonho que se sonha só é só um sonho que se sonha só, mas sonho que se sonha junto, é realidade”.

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Concentrações de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e benzilaminopurina (BAP) utilizadas para indução de calos em explantes de ápices caulinares de <i>Bactris gasipaes</i> . PVH/RO, Embrapa Rondônia.....	34
Tabela 02: Efeito dos tratamentos na contaminação dos explantes em relação ao tempo de imersão e à concentração de hipoclorito de sódio. Porto Velho, Rondônia, Embrapa Rondônia.....	36
Tabela 03: Efeito dos tratamentos na necrose dos explantes em relação ao tempo de imersão e à concentração de hipoclorito de sódio aos 10 dias após o cultivo. Porto Velho, Rondônia, Embrapa Rondônia.....	38
Tabela 04: Análise de variância para indução de calos em explantes de ápices caulinares de <i>Bactris gasipaes</i> em relação às diferentes concentrações hormonais (2,4-D e BAP) utilizadas no meio de cultivo, após 36 dias de cultivo. Porto Velho, Rondônia, Embrapa Rondônia.....	39
Tabela 05: Número médio de indução de calos por explante em ápices caulinares de <i>Bactris gasipaes</i> em relação às diferentes concentrações hormonais (2,4-D e BAP) utilizadas no meio de cultivo, após 36 dias de cultivo. Porto Velho, Rondônia, Embrapa Rondônia.....	40

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01:** *Bactris gasipaes*,: Aspecto geral e perfilho. Porto Velho, Embrapa Rondônia, 2009.....17
- Figura 02:** Esquema dos métodos usualmente utilizados na cultura de tecidos vegetais.....21
- Figura 03:** *Bactris gasipaes*: (A) Ápice caulinar necrosado. (B) Contaminação do ápice por bactéria endógena Porto Velho, Embrapa Rondônia, 2009.....37
- Figura 04:** *Bactris gasipaes*: (A) Ápice caulinar sem presença de intumescimento e calos. (B) Ápice caulinar intumescido. (C) Ápice caulinar no início de indução de calo. (D) Calo de ápice caulinar. Porto Velho, Embrapa Rondônia, 2009.....41
- Figura 05:** Representação gráfica da Superfície de resposta da indução de calos em explantes de ápices caulinares de *Bactris gasipaes* em relação às diferentes concentrações hormonais (2,4-D e BAP) utilizadas no meio de cultivo, após 36 dias de cultivo. Porto Velho, Embrapa Rondônia, 2009.....42
- Figura 06:** Calo formado a partir de explantes de ápices caulinares de *Bactris gasipaes*, 36 dias após a inoculação. Porto Velho, Embrapa Rondônia.....44

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
1. OBJETIVOS	14
1.1 Geral	14
1.2 Específicos	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 A espécie <i>Bactris gasipaes</i> H.B.K.	15
2.2 O cultivo da pupunheira no Brasil	18
2.3 Propagação vegetativa e propagação <i>in vitro</i>	19
2.4 Aplicações da biotecnologia na propagação de plantas	20
2.4.1 Cultura de ápices caulinares	24
2.4.2 Calogênese	25
2.4.3 Embriogênese somática	27
2.4.4 Germinação <i>in vitro</i>	28
2.5 Desenvolvimento regional e meio ambiente	31
3 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 Amostras	33
3.2 Coleta das Amostras	33
3.3 Estabelecimento <i>in vitro</i>	33
3.4 Desinfestação dos explantes	33
3.5 Indução de calos	34
3.6 Análise dos dados	34
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1 Desinfestação dos explantes	36
4.2 Calogênese	39
CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

RESUMO

O agronegócio da pupunha vem destacando-se nos cultivos amazônicos, pois, além do seu cultivo ecologicamente desejável, tornou-se a principal fonte produtora de palmito, em substituição ao corte predatório de espécies de palmeiras nativas do gênero *Euterpe* (*E. oleraceae* Mart. e *E. edulis* Mart.) em matas tropicais. Contudo, as formas convencionais de propagação são extremamente lentas, podendo comprometer a eficiência dos programas de melhoramento. Técnicas de cultura de tecidos vegetais são uma ferramenta promissora para os programas de melhoramento dessa cultura, principalmente por permitir a clonagem de plantas selecionadas. Assim, o objetivo desse trabalho foi desenvolver protocolos de estabelecimento e propagação *in vitro* de pupunha, a partir de ápices caulinares. Foram coletados perfilhos de plantas jovens de pupunheira, os quais passaram por testes de desinfestação com hipoclorito de sódio nas concentrações de 25, 50 e 75% (v/v), por 10, 20 e 30 minutos. Após este procedimento, foram retirados os ápices, os quais foram inoculados em meio MS sem reguladores. Dez dias após foram avaliadas a percentagem de contaminação, necrose e oxidação dos explantes. Para indução da calogênese foram empregados ápices caulinares, quais foram cultivados em meio MS acrescido de 2,4-D (0,0; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0 mg.L⁻¹) e BAP (0,0; 3,0 e 6,0 mg.L⁻¹). Os cultivos foram mantidos no escuro, em sala de crescimento, a 24 ± 2°C. Ao final de 36 dias foi avaliado o percentual de explantes com calos. Os experimentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado com 3 repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por 10 tubos de ensaio contendo um explante em cada tubo. Os dados foram submetidos à análise de variância e regressão. A desinfestação foi mais efetiva combinando o período de 20 minutos de imersão com a concentração de hipoclorito de sódio de 50%, resultando em 90% de explantes sem contaminação. A maior percentagem de indução de calos foi de 60%, a qual foi obtida com a combinação de 10,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 3,0 mg.L⁻¹ de BAP.

Palavras-chave: propagação *in vitro*, reguladores de crescimento, calogênese, *Batris gasepaes*.

ABSTRACT

The agrobusiness of *Bactris gasipaes* is important in Amazonian cultures. In addition to its environmentally desirable cultivation, it became the main source of hearts of palm, in replacement to predatory slash of native palm tree species of the genus *Euterpe* (*E. oleracea* Mart. and *E. edulis* Mart.) in tropical forests. However, the traditional ways of propagation are very slow and compromise the efficiency of breeding programs. Techniques of plant tissue culture are a promissal tool to breeding programs of this culture, mainly to allow the cloning of selected plants. The objective of this study was develop protocols for establishment and *in vitro* propagation of *Bactris gasipaes* from shoot tips. Shoots were collected of young plantules of *B. gasipaes*, which were desinfecteds with sodium hypochlorite at the concentrations of 25, 50 and 75% (v/v), for 10, 20 and 30 minutes. After that, shoot tips were take of and inoculated in MS medium without regulators. Ten days after were evaluated the percentage of contamination, necrosis and oxidation of the explants. To induce calogenesis the shoot tips were cultivated in MS medium with 2,4-D (0.0, 5.0, 10.0, 20.0 and 40.0 mg.L⁻¹) and BAP (0.0, 3.0 and 6.0 mg.L⁻¹). The cultures were maintained in the dark in growth room at 24 ± 2°C. After 36 days was evaluated the percentual of explants with calli. The experimental design was entirely randomised replicated three times and ten tubes with one explant each per plot. The data were submitted to analyses of variance and regression. The desinfestation was efficient with 20 minutes of immersion and 50% sodium hypochlorite, which resulted in 90% of explants without contamination. The greater calogenesis percentege was 60%, which was obtained with 10.0 mg.L⁻¹ 2,4-D and 3.0 mg.L⁻¹ BAP.

Word-key: propagation in vitro, regulators of growth, calogênese, *Batris gasepaes*.

INTRODUÇÃO

A espécie *Bactris gasipaes* H. B. K. pertence à família Arecaceae, a qual tem sua origem e dispersão centrada por toda a região neotropical. Entretanto, os ameríndios pré-colombianos são considerados os responsáveis pela sua domesticação e desenvolvimento por toda região que abrange atualmente à Bolívia até Honduras (SOUZA et al., 1996; MIURA, 1993).

Essa espécie produz um palmito de excelente qualidade, tendo a vantagem de sofrer as menores taxas de oxidação após o corte, quando comparado, com outras espécies de palmeiras, das quais se extraem o palmito, como por exemplo, o palmito do açaí (*Euterpe oleracea*) e da juçara (*Euterpe edulis*) (VILLACHICA, 1996). Tal vantagem facilita o processamento permitindo outras formas mais simples de acondicionamento do produto, diminuindo os gastos e simplificando sua industrialização. Tal fato, juntamente com a possibilidade de corte ao ano todo, proporciona um lucro regular, mesmo ao pequeno produtor (GUERREIRO, 2002). Seu uso mais frequente atualmente na Amazônia brasileira é o consumo dos seus frutos cozidos, importante fonte de caroteno. O fruto também é utilizado para fabricação de farinha (que é semelhante à farinha de milho) e produção de ração animal. O óleo da pupunha produzido no mesocarpo do fruto é rico em ácidos graxos insaturados, possuindo grande aceitação no mercado, sendo importante industrialmente (VILLACHICA, 1996; CLEMENT, 1999).

Contudo, na região Amazônica, o uso dos recursos genéticos da pupunheira têm sido caracterizado por sua descontinuidade ao longo de duas décadas. A falta de políticas federais e estaduais de desenvolvimento agrícola na região, bem como à falta de políticas de ciência e tecnologia. Impedem avanços significativos sobre o conhecimento da espécie, variabilidade e potencial futuro (CLEMENT; YAYAMA; FLORES, 2001).

O apoio empresarial direto também oferece aos empresários uma oportunidade de ajudar a priorizar as pesquisas, de forma a melhor atender suas próprias necessidades, tanto imediatas, como de longo prazo. A interação dos empresários e produtores com os melhoristas garantirá que a pesquisa possa gerar resultados práticos antes que os mesmos sejam aproveitados em outros países (CLEMENT & BOVI, 1999).

A introdução de técnicas de propagação *in vitro* tem mostrado um grande potencial para a multiplicação dos genótipos superiores, em taxas mais altas e em curto espaço de tempo, além de romper barreiras de cruzamentos existentes nos métodos convencionais e

obtenção de ciclos de seleção mais curtos. Por isso, uma das alternativas para esse avanço na produção, nos últimos anos, a micropropagação vem ganhando um espaço bastante significativo entre os produtores, que inicialmente evitavam adquirir mudas de laboratórios, em especial devido ao elevado custo unitário. Com a crescente competitividade de mercado, que vem exigido cada vez mais plantas padronizadas, com ciclo homogêneo e isentas de doenças, a micropropagação vem conquistando um espaço grande, principalmente na propagação de espécies com melhores valores de mercado (MOTOS, 1998).

A utilização da micropropagação em âmbito comercial já é realidade em diversos países do mundo, com destaque para os da Europa Ocidental e os Estados Unidos. Os laboratórios comerciais surgiram, em grande maioria, agregados aos viveiros como iniciativa das próprias companhias produtoras de mudas. Eles trabalham com o objetivo de satisfazer as necessidades internas de material de propagação vegetativa. Um menor número de companhias trabalha exclusivamente com a produção de plantas *in vitro* para o abastecimento de viveiros de terceiros (TORRES, et al., 1998).

A capacidade dos tecidos vegetais cultivados *in vitro* para formar gemas, raízes ou embriões somáticos tem despertado a atenção de pesquisadores, por causa da sua grande implicação prática e importância para o avanço dos conhecimentos nas áreas de Fisiologia, Bioquímica e Genética de plantas. É reconhecida sua totipotência das células das plantas. Isto significa que as células são autônomas e têm a potencialidade de regenerar plantas, desde que submetidas a tratamentos adequados (TORRES et al., 1998).

O desenvolvimento de métodos de propagação vegetativa é essencial. Os métodos *in vitro* são mais complicados, mas a médio prazo são mais importantes porque podem multiplicar genótipos com muito mais rapidez, permitindo a instalação de ensaios de clones em todas as regiões produtoras do Brasil. 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 (CLEMENT & BOVI, 1999).

A propagação por meio de cultura de tecidos pode ser feita por via direta ou indireta, esta última via formação de calos que é considerada uma forma potencial de propagação em massa (PIERIK, 1987; LANDA et al., 2000). Estudos com calos devem ser desenvolvidos para determinar as condições de cultura que os explantes requerem para sobreviver e crescer (SIQUEIRA & INOUE, 1992). O cultivo de calos pode ser utilizado para se estudar o desenvolvimento celular, explorar produtos provenientes do metabolismo primário e secundário, obter suspensão celular e propagação via formação de gemas ou embriões somáticos (LANDA et al., 2000). O uso de múltiplas brotações tem sido amplamente

utilizado para a propagação em massa de diversas espécies, sendo que essas técnicas de cultura de tecidos têm sido geralmente realizadas através da formação de brotos, via calos. Tais técnicas estão sendo utilizadas em muitas espécies lenhosas e têm permitido a indução de calos, através dos quais é possível obter embriões somáticos e, ainda, permitir respostas morfogênicas capazes de produzir plântulas com excelentes características agronômicas (TSURO et al., 2000).

Como decorrência, espera-se auxiliar na ampliação da área plantada no Estado e incrementar a produtividade por área, o que contribuirá para o aumento da renda, principalmente do pequeno produtor, que geralmente não tem acesso a tecnologias de produção relativamente sofisticadas. Além disso, contribuirá para a geração de novos empregos e para o aumento da oferta do produto.

A importância da inovação tecnológica trazida por este estudo ao Estado de Rondônia, tem potencial para fomentar novas pesquisas a nível regional, sendo passível de divulgação a nível nacional e internacional e aumentar a qualificação de mão-de-obra regional.

1. OBJETIVOS

1.1. GERAL

Desenvolver protocolos para a micropropagação da espécie *Bactris gasipaes*, a partir de ápices caulinares.

1.2. ESPECÍFICOS

- Estabelecer culturas assépticas *in vitro* de ápices caulinares de perfilhos;
- Adequar o tipo e a concentração de fitormônios que permitam a indução eficiente de calos a partir de ápices caulinares.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. A ESPÉCIE *Bactris gasipaes*

A pupunheira (*Bactris gasipaes* H.B.K.) é uma palmeira de grande interesse econômico, pois produz palmito de alta qualidade (Figura 1). É uma espécie já domesticada, podendo ser cultivada como uma cultura agrícola “racional” e rentável, pois é uma planta que se reproduz vegetativamente, podendo o palmito ser extraído anualmente (TOZETTI, 2003).

É uma palmeira que pode ser encontrada na Amazônia (principalmente ao longo do rio Amazonas) e na América Central, particularmente na Costa Rica, Trinidad e Tobago, Honduras, Nicarágua e Panamá. Seus frutos, estipes e folhas já eram utilizados por povos de cultura pré-colombiana. Atualmente, esta espécie está se tornando uma importante fonte de palmito industrializado, em face da redução da exploração da palmiteira tradicionalmente usada para palmito (*Euterpe edulis*) no Centro-Oeste e do açazeiro (*Euterpe oleracea*) no Norte do Brasil (CARVALHO & ISHIDA, 2002).

Pode atingir mais de 20 m de altura, sendo que seu caule possui um diâmetro que varia de 15 a 30 cm e o comprimento dos entrenós é de 2 a 30 cm. Pode apresentar espinhos rígidos e pretos nos entrenós.

A coroa do ápice do estipe contém de 15 a 25 folhas pinadas, sendo os folíolos localizados em diferentes ângulos. No centro da coroa, as folhas tenras formam o palmito, um produto de grande importância econômica, que em plantas adultas, elas medem entre 1,5 e 4,0 metros (CLEMENT, et al. 1999).

A raque foliar é maior que o pecíolo, com numerosas nervuras. Na base de cada folha ou fronde, existe uma gema, a qual se desenvolve em um ramo quando localizada na base do caule ou em uma inflorescência se estiver na parte mais alta deste (UHL, 1987).

A polinização cruzada é realizada principalmente por insetos, porém as células do ovário podem não ser fecundadas, sendo muito comum a ocorrência de partenocarpia (ausência de sementes nos frutos) nas primeiras frutificações, devido a fatores relacionados à eficiência dos insetos polinizadores, fatores nutricionais, genéticos e climáticos (CLEMENT, 1987).

Os cachos podem conter de 50 a 100 frutos após a polinização, e cada um deles pode pesar entre 1 a 25 kg. O peso médio dos frutos individuais é de 10 a 250 gramas (CLEMENT et al. 1999). O fruto varia em tamanho, sendo ovóide, normalmente monospermico, pode ser de cor verde quando imaturo e amarelo ou vermelho quando atinge a maturidade. Em seu habitat natural, as árvores da pupunheira produzem, em média, de seis a oito cachos por ano. Normalmente, a frutificação da espécie ocorre de dezembro a maio. A coleta das sementes

ocorre de janeiro a março e de setembro a outubro. É importante que a coleta ocorra quando os frutos estão maduros. As sementes devem ser retiradas manualmente dos frutos tão logo sejam coletadas (NEVES et al., 2004).

O pericarpo muito delgado cobre o fruto e se adere ao mesocarpo pulposo, que possui fibras, e o endocarpo liso possui três poros (ALMEIDA & MARTIN, 1980; MORA-URPI, 1982; MORA-URPI, 1983; ROTHUH, 1983; VILLACHICA, 1996).

A planta forma de duas a oito inflorescências monóicas ao ano. Conforme a condição nutricional em que a planta se encontra, seu número de inflorescências é variado (MORA-URPI, 1984). Estas são constituídas por cerca de 10.000 a 30.000 flores masculinas e cerca de 20 a 1.000 flores femininas (CLEMENT, 1987). As flores estaminadas se distribuem em tríades e são geralmente de cor branco-amareladas. O androceu possui anteras curtas e é constituído por seis estames de filete delgado (UHL, 1987).

As panículas são originadas debaixo da copa das folhas, consistindo de ramificações simples e de um eixo central. Cada uma das ramificações contém flores masculinas pequenas (cor creme e amarelo claro) em maior número e por flores femininas, sendo em número menor. O período de florescimento da pupunha ocorre entre agosto e outubro, na Amazônia Central, e o período de coleta entre dezembro e março. Entretanto, em anos e solos favoráveis, poderá ocorrer período de menor florescimento entre maio e junho, com frutificação entre agosto e setembro (MORA-URPI, 1984).

O caule (estipe principal) é ereto alcançando diâmetro de 15 a 20 cm, apresentando entrenós curtos com cicatrizes nodais (UHL, 1987). Algumas variedades de pupunheiras podem apresentar o estipe recoberto por espinhos, que possuem comprimento de 5 a 20 cm (BONACCINI, 1997; BOVI, 1998; COUTO, et al. 1999).

A propagação ocorre também por perfilhamento, sendo comum encontrar cinco perfilhos por planta. (ALMEIDA & ALMEIDA, 2006; SOUZA, et al., 1996). Os perfilhos se iniciam na base do talo e são em número de 1 a 10; os que chegam a alcançar a maturidade são geralmente cerca de 3 a 4 perfilhos. Chaimsohn (2001) classificou uma variedade de perfilhos laterais que forma-se na parte basal do caule segundo a posição no estipe e forma de crescimento conforme a seguinte terminologia: 1º perfilho epígeo: origina-se sobre o nível do solo; 2º perfilho periférico: situa-se na periferia do estipe que está em contato com o solo, sua parte inferior agrega tecido rizógeno; 3º perfilho hipógeo: origina-se abaixo da superfície do solo. Especialmente quando o cultivo da pupunheira destina-se à produção de palmito, a porcentagem de plantas perfilhadas, bem como o número de perfilhos por planta, são

variáveis de grande importância, ambas responsáveis tanto pela produtividade, quanto pela duração econômica do cultivo (CLEMENT & BOVI, 1999).



Figura 1. *Bactris gasipaes*. (A) Aspecto geral. (B) Perfilho. Porto Velho, Embrapa Rondônia, 2009. Foto: Daniel Medeiros

A propagação desta espécie pode ocorrer por sementes, que germinam entre 30 e 90 dias (VILLACHICA, 1996). A partenocarpia nos frutos é uma ocorrência que dificulta a propagação (MORA-URPI, 1983). A viabilidade das sementes de pupunheira é afetada negativamente com a diminuição da umidade, sendo que a germinação com índices de umidade praticamente nulos resulta em valores inferiores a 17%; assim, a pupunheira é classificada como recalcitrante. De acordo com Mora-Urpi, et al. (1984), a reprodução por semente é pouco eficiente, devido a ocorrência de auto-incompatibilidade, sendo a xenogamia a forma predominante de reprodução nesta espécie. Outros fatores restritivos à reprodução por semente é o longo período necessário para a produção de sementes híbridas, as limitações de polinização cruzada no início da floração, com a conseqüente diminuição da produção de frutos por cacho e a formação de frutos partenocárpicos (ARIAS & HUETE, 1983).

Em termos de melhoramento genético, independentemente do produto almejado (palmito ou fruto), estas formas convencionais de propagação são extremamente lentas, podendo comprometer a eficiência dos programas de melhoramento. O número limitado de perfilhos inviabiliza a obtenção de grandes populações genotipicamente idênticas às plantas selecionadas. (ALMEIDA & ALMEIDA, 2006; SOUZA, et al., 1996).

Para produzir palmito, a pupunheira necessita de 18 a 24 meses, a partir do plantio no campo, para alcançar o ponto de corte, dependendo da fertilidade do solo, adubação e estado fitossanitário (MORA-URPI, et al., 1982; CLEMENT, et al., 1987).

2.2. O CULTIVO DA PUPUNHEIRA NO BRASIL

O Brasil é o maior produtor e consumidor de palmito do mundo, mas já não possui mais o título de maior exportador, pois nos últimos anos, a Costa Rica e o Equador, com plantios de pupunha de forma organizada, com ganhos de escala e conseqüentemente preços mais baixos, assumiram a liderança do mercado internacional. A perda do Brasil da primeira posição no *ranking* dos maiores exportadores mundiais deve-se aos fatos do palmito nacional apresentar baixa qualidade e de ser um produto não ecológico, pois é sustentado pelo corte de palmeiras nativas. A baixa qualidade do palmito é resultado do processo de extrativismo (GUERREIRO, 2002; SAMPAIO, 2007).

Assim, o esgotamento da oferta de matéria-prima, proveniente da coleta extrativa no centro sul, a intensificação da fiscalização de órgãos oficiais impedindo a devastação predatória, o custo da taxa de reflorestamento (próximo de 12% dos custos de industrialização), o alto preço do produto no mercado nacional e internacional, sendo que, no primeiro, a tonelada do produto líquido drenado vem sendo vendida a valores superiores a US\$ 4.000,00 são fatores que vêm estimulando o investimento e produção racional para palmito industrializado (VERRUMA-BERNARDI, 2007).

Atualmente, o cultivo da *Bactris gasipaes* Kunth (pupunheira) para produção de palmito tem aumentado em razão de sua boa aceitação pelo mercado consumidor (FERREIRA, et al., 1982; CLEMENT & ARKCOLL, 1991) e pela precocidade na produção de palmito (BOVI, 1999), tornando-se uma alternativa para o pequeno agricultor, devido à alta rentabilidade do cultivo, o qual vem despertando, desde a década de 70, o interesse de agricultores de todo o país, devido principalmente à alta demanda, tanto interna quanto externa, de palmito de boa qualidade e à alta lucratividade do setor. A busca de novas opções de cultivo em substituição às formas tradicionais, em virtude dos baixos preços alcançados por esses últimos no mercado, faz também com que empresários de outros setores se aventurem no agronegócio palmito de pupunha (BOVI, 2000).

O cultivo da pupunheira para produção de palmito vem ganhando espaço como atividade agrícola amazônica, e agradando agricultores e ambientalistas, tendo em vista as suas qualidades agronômicas, ecológicas, industriais e comerciais (YUYAMA, 2003; HERNANDEZ, et al., 2001).

Em razão do seu elevado potencial produtivo, está difundida nas diferentes regiões do Brasil. No entanto, na Região Norte, onde tem grande importância como fonte alimentícia pelo alto valor nutritivo dos seus frutos, tornou-se, também, uma alternativa economicamente viável para produção de palmito (FERNANDES, et al., 2003). Além de ser ecologicamente correto, seu cultivo ainda se tornou a principal fonte produtora de palmito, em substituição ao corte predatório de espécies de palmeiras espontâneas do gênero *Euterpe* (*E. oleraceae* Mart. e *E. edulis*) em matas tropicais, tanto para o mercado interno, quanto para o mercado externo, por se tratar de uma espécie que apresenta enormes vantagens devido a algumas características agronômicas importantes em relação às demais, como: precocidade, produtividade, rusticidade, adaptabilidade e capacidade de perfilhamento ao longo dos anos, fácil processamento, boa produtividade e qualidade (FERNANDES, et al., 2003; HERNANDEZ, et al., 2001).

A expansão das áreas de cultivo, até mesmo para o semi-árido, tem sido acompanhada de uma melhoria do nível tecnológico, com a utilização de calagens, adubações e irrigações, o que tem possibilitado uma exploração mais precoce. No entanto, isso leva à necessidade adicional de conhecimento e ao desenvolvimento de tecnologias agronômicas que conduzam ao aumento dos cultivos viáveis economicamente e de forma sustentável (FERNANDES, et al., 2003).

Seu cultivo é cada vez mais freqüente, com plantios em escalas consideráveis no Pará, Acre, Rondônia e Mato Grosso. Essa cultura encontra-se em intenso processo de disseminação fora da Amazônia, principalmente no Sudeste, e está sendo plantada em praticamente todo o Estado de São Paulo (ALMEIDA, 2005).

2.3. PROPAGAÇÃO VEGETATIVA E PROPAGAÇÃO *IN VITRO*

A propagação vegetativa é o método mais utilizado na produção comercial de diversas culturas ornamentais, florestais e frutíferas, tendo como vantagens a reprodução de características desejáveis, a multiplicação de indivíduos mais vigorosos e resistentes a determinadas doenças (HIGASHI, SILVEIRA & GONÇALVES, 2000). Pode uniformizar populações, possibilitando a produção de indivíduos padronizados de alta qualidade e ganho de tempo relacionado aos ciclos de produção. Também proporciona suporte técnico para programas de melhoramento genético e na multiplicação de plantas geneticamente modificadas (CID, 2001; HARTMANN, et al, 2002).

A propagação vegetativa pode ser alcançada pelo cultivo *in vitro* ou pela macropropagação. A macropropagação envolve os métodos de estaquia, enxertia, mergulhia e

alporquia (HIGASHI, et al, 2000). A multiplicação de plantas *in vitro* é realizada mediante as técnicas de micropropagação. As técnicas de cultura de tecidos vegetais são empregadas em etapas do melhoramento de plantas, não sendo necessariamente aplicadas no desenvolvimento direto de novos cultivares, mas oferecem alternativas como solução para os programas de melhoramento (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998; TORRES, 2001; TORRES, et al., 1998).

As técnicas de propagação *in vitro* apresentam mais vantagens que as outras técnicas de propagação tradicional, as quais podem ser assim resumidas: propagação de clones durante todo o ano, propagação vegetativa de espécies vegetais difíceis de serem propagadas pelos métodos usuais, rápida multiplicação clonal de espécies vegetais valiosas e eliminação de vírus de estoques infectados. Para iniciar-se a cultura, são utilizados pequenos explantes (fragmentos de plantas), que são inoculados em meio que contém condições fundamentais para sua sobrevivência, e podem produzir um maior número de plantas livres de doenças. Além disso, podem-se produzir plantas independentes da estação ou época do ano (GEORGE, 1996; TORRES, et al., 1998).

A regeneração de uma planta completa, a partir de células em cultura, pode ocorrer tanto a partir da diferenciação de gemas caulinares (organogênese) quanto de embriões somáticos (embriogênese somática). Essas duas vias de regeneração podem ser identificadas através das diferenças morfológicas existentes entre as gemas e os embriões somáticos. A organogênese é o processo pelo qual células e tecidos são forçados a sofrerem mudanças que induzem a produção de uma estrutura unipolar, normalmente um primórdio de raiz ou parte aérea, com um sistema vascular conectando com o tecido materno. Em contraste, a embriogênese somática induz a produção de uma estrutura bipolar contendo um eixo/parte aérea, com uma independência de sistema vascular conectando com o tecido materno. A embriogênese somática pode ser definida como um processo de formação e desenvolvimento do embrião a partir de células somáticas (TORRES et al., 1998).

2.4. APLICAÇÕES DA BIOTECNOLOGIA NA PROPAGAÇÃO DE PLANTAS

A micropropagação ou propagação vegetativa *in vitro* possui essa denominação devido ao tamanho dos propágulos utilizados (TORRES, et. al., 1998) e engloba vários protocolos de regeneração a partir de tecidos vegetais, incluindo como explantes: folhas, gemas apicais ou axilares, segmentos nodais, caulinares, ovários, embriões, anteras, pólen, raízes. A possibilidade de utilização destes vários tipos de explantes para iniciar a cultura se baseia na teoria da totipotência das células vegetais (Figura 2). Essa teoria postula que cada célula

vegetal, sob estímulo adequado, tem a capacidade de iniciar uma nova planta completa e funcional. A micropropagação é utilizada para propagação de genótipos modificados ou não, produção de biomassa de produtos bioquímicos do metabolismo secundário, produção de plantas livre de vírus, preservação de germoplasma e em investigações científicas. Técnicas de micropropagação têm sido utilizadas com sucesso para propagação de algumas espécies ornamentais, agrícolas, florestais e medicinais.

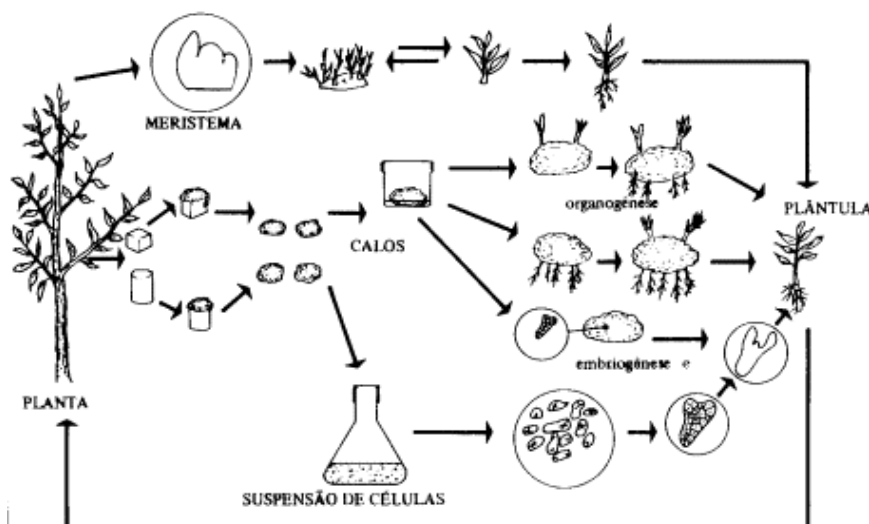


Figura 2. Esquema dos métodos usualmente utilizados na cultura de tecidos vegetais. Fonte: www.fruticultura.iciag.ufu.br/reproducao16.htm

A propagação vegetativa é um métodos amplamente estudado nas mais diversas espécies vegetais, sendo a modalidade dentro da Biotecnologia Vegetal que mais tem se difundido e encontrado aplicações práticas comprovadas. Entre as vantagens de sua utilização, estão a possibilidade de obtenção de várias plantas a partir de um explante inicial, independentemente da estação do ano; a redução do tempo e da área necessária para a propagação da espécie; as melhores condições sanitárias por meio do cultivo de meristemas previamente tratados por termoterapia, para eliminação de doenças; a reprodução do genótipo da planta-mãe, geralmente, com fidelidade durante a multiplicação; e a propagação vegetativa de espécies difíceis de serem propagadas por outros métodos (ERIG & SHUCH, 2005).

Na micropropagação, órgãos e tecidos de plantas são introduzidos *in vitro*, estabelecidos e mantidos em culturas assépticas para regenerar novas plantas (HARTMANN, et al., 2002). Os meios nutritivos fornecem substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos cultivados e também participam do controle do padrão de desenvolvimento *in vitro* (CALDAS, et. al., 1998). A micropropagação difere da propagação tradicional nos componentes biológicos de cada etapa, pois são separados dentro de estágios (estabelecimento

dos explantes *in vitro*, multiplicação, alongamento e enraizamento), aumentando assim o controle de cada aspecto da regeneração e dos processos de desenvolvimento. As etapas podem ser manipuladas pela seleção de explantes e controle do desenvolvimento da cultura (HARTMANN, et al., 2002; GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

A primeira fase de um protocolo de regeneração de plantas a partir de explantes é a seleção do material de onde serão retirados dos mesmos, levando em consideração critérios como: taxa de crescimento e conservação das características da espécie. Esta fase também inclui o estabelecimento de culturas assépticas, que ocorre por meio da desinfestação dos explantes (TORRES, et al., 1998). A segunda fase refere-se à produção de propágulos, ou seja, à multiplicação de brotos axilares ou adventícios, de embriões somáticos ou de órgãos. Propágulos produzidos nessa fase, especialmente brotos, podem ser utilizados em ciclos de multiplicação para aumentar o seu número (GEORGE, 1996). A terceira fase, compreende a transferência das partes aéreas produzidas para um meio de enraizamento e subsequente transplântio das plantas obtidas para substrato ou solo na última fase, a de aclimação (TORRES, et al., 1998).

A multiplicação é a segunda fase da propagação *in vitro* de plantas. Nesta fase os explantes já possuem um crescimento uniforme e adequado; por essa razão, o propósito desse estágio é a multiplicação das gemas ou das microestacas para posterior enraizamento. As plantas desenvolvidas a partir desses explantes, por possuírem gemas pré-existentes, geralmente são fiéis na reprodução do genótipo da planta matriz (HARTMANN, et al., 2002).

Os meios de cultura utilizados nos estágios de estabelecimento da cultura e multiplicação são similares, pois ambos possuem em suas formulações macro e micronutrientes, carboidratos, geralmente a sacarose, e alguns compostos orgânicos como vitaminas e aminoácidos. Entretanto, existem meios de cultura com específicas formulações como o MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) com altas concentrações de sais, sobretudo os íons nitrato e amônio, quando comparado a outras formulações salinas (GEORGE, 1996) e meios com menores concentrações de sais (especialmente nitrogênio e potássio), comparado ao MS.

Reguladores vegetais são adicionados ao meio de cultura para auxiliar o crescimento e também são importantes no direcionamento da resposta do desenvolvimento dos propágulos (HARTMANN et al., 2002). Dentre os fitorreguladores utilizados na fase de multiplicação destacam-se as citocininas, as quais participam de vários processos fisiológicos e de desenvolvimento, incluindo a divisão celular, morfogênese da parte aérea e das raízes e senescência (CALDAS, et al., 1998). Dentro do grupo de citocininas encontramos BAP

(benzilaminopurina), KIN (cinetina), 2-iP (2-isopentenil adenina) e ZEA (zeatina), as quais são empregadas para formação de brotos. Outro grupo, o das auxinas (AIA - ácido indol acético, ANA - ácido naftaleno acético e AIB - ácido indol 3-butírico), pode ser utilizado nessa fase, porém em baixas concentrações (CALDAS, et al., 1998; HARTMANN, et al., 2002). Já o 2,4-D (ácido 2,4- diclorofenoxiacético), que também é uma auxina, é usado para promover a formação de calos e pode também causar variação genética no cultivo de células ou de tecidos (GEORGE, 1996).

A escolha das citocininas e das auxinas nos cultivos *in vitro* depende de cada pesquisador, porém mesmo com escolhas diferentes, podem-se obter resultados similares. O estabelecimento de brotos e a multiplicação do número destes podem ser promovidos por uma citocinina sem a adição de auxinas. Experimentos com algumas espécies demonstraram que as auxinas podem ser desnecessárias e podem reduzir a capacidade dos brotos de enraizar. Já a adição de mais de uma citocinina pode aumentar a produção ou melhorar a qualidade dos brotos (GEORGE, 1996).

A taxa de proliferação ou multiplicação de brotos dependerá da concentração de citocininas aplicadas (CALDAS, et al., 1998; GEORGE, 1996). Geralmente, as concentrações altas induzem muitos brotos, mas podem afetar a qualidade destes, produzindo brotos pequenos e incapazes de alongarem-se, dificultando a separação (HARTMANN, et al., 2002). Os brotos produzidos podem ainda ter dificuldades para enraizamento, maior suscetibilidade à hiperhidricidade (vitrificação) e podem induzir a formação de brotos adventícios. Entretanto, concentrações baixas de citocininas podem estimular somente o crescimento de brotos axilares ou laterais (GEORGE, 1996; HARTMANN et al., 2002).

Na fase de multiplicação podem ser realizadas várias subculturas, cada uma tendo uma duração de duas a oito semanas. Entretanto, se o tempo de subcultura for demasiadamente longo, as folhas podem se tornar cloróticas e necróticas (HARTMANN, et al., 2002).

Dentre os métodos de micropropagação destaca-se a propagação a partir de brotos axilares, a qual inclui a cultura de gemas e segmentos nodais. Essas se referem à cultura de gemas com meristemas intactos e o propósito destas é a multiplicação de brotos e a repetida formação de ramos axilares. Para que a multiplicação ocorra, a dominância apical deve ser eliminada. Para isso, a gema apical pode ser retirada ou são utilizadas citocininas e/ou a mudança dos segmentos para a posição horizontal (GEORGE, 1996).

A fase de enraizamento consiste em transferir as partes aéreas produzidas na fase de multiplicação para um meio adequado à indução de raízes. Entre as fases de enraizamento e multiplicação pode ser necessária uma fase adicional de alongamento das partes aéreas, ou o

sistema pode ser simplificado, eliminando-se a etapa de enraizamento *in vitro* pela manipulação das partes aéreas como microestacas, as quais enraizariam diretamente no substrato de transplântio (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). A etapa de enraizamento caracteriza-se pela formação de raízes adventícias nas partes aéreas provenientes da multiplicação, permitindo o posterior transplântio para condições *ex vitro*. A capacidade de enraizamento pode ser reduzida quando se utiliza material menos juvenil, já que essa capacidade diminui quando a planta se aproxima da fase adulta (HARTMANN, et al., 2002).

A rizogênese pode ser dividida em indução, iniciação e alongamento das raízes. Na fase de indução, a capacidade para a formação da raiz é determinada. Já na fase de iniciação, visíveis mudanças citológicas ocorrem. Na última fase, o primórdio da raiz pode ser observado histologicamente, ocorrendo em seguida o desenvolvimento das raízes. Essa fase pode ser dividida em organização e alongamento (GEORGE, 1996). As fases de indução e iniciação das raízes respondem ou dependem de auxina, enquanto que o crescimento destas é inibido pela presença da mesma (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

2.4.1. Cultura de ápices caulinares

Segundo Torres, et al. (1998), o meristema apical do caule (explante mais freqüentemente utilizado nessa técnica) é o tecido que se encontra na região distal em relação ao mais novo primórdio foliar, assemelhando-se à uma cúpula proeminente ou à uma plataforma achatada. Seu tamanho não excede a 0,1 mm. Esse tecido possui grande competência organogenética, já que é composto de forma perene por células embrionárias indiferenciadas. O ápice caulinar consiste no meristema apical, juntamente com seus primórdios foliares e seu tamanho pode variar de 0,3 a 20 mm ou mais.

A cultura de ápices caulinares, também designada de forma incorreta como cultura de meristemas, já que não é excisado nesse processo exclusivamente o meristema, tem sido utilizada com freqüência para estabelecer a organogênese *in vitro* em várias culturas. Essa técnica permite a produção de explantes livres de patógenos, a fim de obter material com alta qualidade fitossanitária (TORRES, et al., 1998; KRIKORIAN, 1991).

A cultura de ápices caulinares consiste na extração, em condições assépticas, do meristema apical, que ainda não estabeleceu conexão vascular com o restante da planta, contendo usualmente um ou dois primórdios foliares. Para que essa técnica seja efetiva, deve ser excisado juntamente com o meristema apical, um ou dois primórdios foliares, de acordo com a espécie em questão. O ápice caulinar tem a capacidade de desenvolver-se em plantas diretamente, sem passar pela fase de calo (TORRES, et al., 1998; KRIKORIAN, 1991).

2.4.2. Calogênese

A formação de calos em um explante, denominada calogênese, é uma etapa básica para o desenvolvimento de sistemas de propagação massiva de plantas por organogênese ou embriogênese somática. É útil também quando se deseja produzir células para manipulações genéticas, como hibridações somáticas, poliploidizações e transformações (VENTURIERI & VENTURIERI, 2004).

O calo é um tecido que se desenvolve em resposta à uma injúria, podendo esta ser física ou química. Células do calo são diferenciadas, embora desorganizadas, sendo que as células diferenciadas apresentam-se altamente vacuolizadas, com citoplasma fino e células muito grandes. Os principais fatores que influenciam a formação de calos são o tipo de explante, a composição do meio nutritivo e as condições físicas de incubação, como luz e temperatura. Nessa fase, os melhores resultados são obtidos com o uso de tecidos jovens, cujas células possuem maior potencial de crescimento e divisão do que células adultas (TORRES, et al. 1999).

Para ocorrer a indução de calo, qualquer tecido vegetal pode ser utilizado como explante. Entretanto, procura-se utilizar explantes que contenham maior proporção de tecido meristemático ou que apresentem maior capacidade de expressar a totipotência (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Explantes oriundos de tecidos jovens, não lignificados, são mais apropriados para a cultura de calo (NOGUEIRA, 2007).

O tipo e a concentração de reguladores de crescimento no meio de cultura são determinantes para a indução de diferentes respostas dos explantes. A presença de auxina no meio de cultura, sozinha ou em combinação com citocininas, é essencial para a fase inicial de calogênese (VIEIRA & KOBAYASHI, 2002).

De acordo com Nogueira (2007), muitas vezes é necessário o suprimento exógeno de reguladores de crescimento para a indução de calo. O balanço hormonal obtido entre os níveis de citocininas e auxinas pode estimular a planta a crescer. Dentre os reguladores de crescimento mais utilizados na indução de calo destacam-se o 2,4-D e, mais recentemente, o TDZ (LU, 1993).

O desenvolvimento dos calos, partindo de um fragmento de tecido, pode ser dividido em três estágios: indução, divisão e diferenciação. Na fase de indução, durante a qual as células preparam-se para dividir-se, o metabolismo é ativado e as células permanecem com tamanho constante. A duração dessa fase varia com o estado fisiológico das células e as condições de cultura empregadas. Durante todo esse período ocorre síntese de proteína e DNA. A fase de divisão caracteriza-se pela síntese de compostos e decréscimo no tamanho

inicial das células e pela ocorrência de divisão nas camadas periféricas do explante. Durante essa fase, mudanças regressivas, envolvendo retomada para um estado meristemático (desdiferenciação) ocorrem nas regiões mais externas dos calos, formando células pequenas, vacuolizadas, que apresentam pouco citoplasma e são do tipo meristemáticas. Na fase de diferenciação ocorre a formação de meristemóides ou centros meristemáticos. Os meristemóides são estruturas formadas a partir das células epidérmicas e subepidérmicas que podem originar primórdios foliares e, esporadicamente, gemas, sendo que as células dos meristemóides são responsáveis pela expressão da via organogênica *in vitro*. Dependendo do local onde são formados, no explante ou no calo originado do explante, caracterizam a organogênese direta e indireta respectivamente (FERNANDO, 2005).

O conhecimento das mudanças bioquímicas e fisiológicas que ocorrem durante o crescimento *in vitro* de tecidos vegetais pode fornecer importantes informações relacionadas ao processo de estabelecimento e, conseqüentemente, propiciar a otimização das condições para seu cultivo. As células vegetais são laboratórios bioquímicos, onde são produzidas muitas substâncias com menor ou maior grau de complexidade.

As fases de crescimento de cultura de calos têm sido caracterizadas no crescimento celular, cujos parâmetros incluem peso da matéria fresca da célula, número de células e proteína celular total, atividades metabólicas e concentrações de nutrientes nos meios de cultura. As diversas etapas que compõem o crescimento do calos são: 1) fase Lag: caracteriza-se pelo número estacionário de células, pelo início da imobilização de metabólitos sem qualquer divisão celular, síntese de proteínas e síntese de metabólitos específicos; 2) fase exponencial: a divisão celular é máxima, o número de células aumenta e as células são pequenas, formando agregados com mais de dez células; 3) fase linear: ocorre a redução na taxa de crescimento de divisão celular; 4) fase de desaceleração progressiva: a divisão celular diminui e ocorre a expansão da célula; 5) fase estacionária: não ocorre divisão celular, não há síntese de biomassa ou aumento do número de células (SANTOS, et al., 2008).

A indução de calos está entre as técnicas mais utilizadas na seleção *in vitro* de mutantes induzidos ou provenientes da variação somaclonal e da produção de transgênicos e, conseqüentemente, no desenvolvimento de novas cultivares. Para tanto, faz-se necessário o prévio estabelecimento das condições necessárias para a regeneração de plantas via calos. O cultivo de calos pode ser utilizado para se estudar o desenvolvimento celular, explorar produtos provenientes do metabolismo primário e secundário, obter suspensão celular e propagação via formação de gemas ou embriões somáticos (SANTOS, et al., 2005). Após a etapa de indução dos calos, os explantes podem ser multiplicados por meio da organogênese

indireta ou da embriogênese somática.

2.4.3. Embriogênese somática

Embriões somáticos, adventícios ou assexuais são aqueles iniciados a partir de células que não são produtos da fusão de gametas. São estruturas bipolares com um eixo radical-apical que desenvolvem-se por meio de diferentes estádios embriogênicos, não possuem conexão vascular com a planta matriz e devem ser capazes de regenerar uma planta adulta normal (LITZ & JARRET, 1991; GUERRA, et al., 1999).

Podem ser distinguidos dois tipos de embriogênese somática: a direta e a indireta. Embriogênese direta consiste na formação de embriões diretamente do explante, sem passar pela fase de calo. A embriogênese indireta refere-se ao desenvolvimento de embriões a partir de calos, que apresentam células em vários estádios de diferenciação (GUERRA, et al., 1999). Para que esta técnica tenha sucesso são necessários a escolha correta da fase de desenvolvimento do explante, a combinação correta dos nutrientes e reguladores nos meios de cultura e a seqüência dos subcultivos (ALVES, 1993).

De modo geral, quase todos os tecidos vegetais têm capacidade para induzir a embriogênese somática e formar calos embriogênicos, porém os mais usados são ápices caulinares, hipocótilos, embriões, discos foliares, raízes e inflorescências (LITZ & JARRET, 1991; GUERRA et al., 1999,).

A composição do meio de cultivo também influencia diretamente na formação dos embriões somáticos. O meio mais comumente usado para os cultivos é o MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), por conter uma alta concentração de sais minerais, considerados benéficos para o crescimento dos embriões somáticos. Guerra, et al. (1999) argumentam que o fato do meio MS conter nitrogênio na forma de nitrato de amônio justifica seu uso na maior parte dos casos, pois algumas plantas demonstram necessitar de nitrogênio na forma amoniacal para o desenvolvimento de embriões somáticos. Para a embriogênese somática, geralmente são usadas duas formulações diferentes, uma para cada fase, sendo a primeira de indução da embriogênese e a segunda do desenvolvimento dos embriões somáticos (LITZ & JARRET, 1991; GUERRA, et al., 1999). O potássio e o ferro também são essenciais para a embriogênese somática, visto que, na sua ausência, muitas plantas não produzem embriões com desenvolvimento normal (GUERRA, et al., 1999).

Também é possível aumentar o potencial embriogênico expondo o explante a altos níveis de carboidratos. O carboidrato mais usado na embriogênese somática é a sacarose, nas concentrações de 2 a 3% chegando até 12%, muito embora outros carboidratos, como a manose, possam ser utilizados (LITZ & JARRET, 1991; BARBOSA, 2003; BARBOSA, et al.

2003). Maciel, et al. (2003) confirmaram a importância da utilização de sacarose nos processos de iniciação e diferenciação dos embriões somáticos e obtiveram maior formação de embriões a partir de calos embriogênicos friáveis, em meio de cultura acrescido de BAP.

2.4.4. Germinação *in vitro*

Atualmente, as técnicas de cultura de tecidos têm sido usadas como alternativa para obtenção de mudas em menor tempo. A utilização destas técnicas possibilita a multiplicação de grande número de plantas em curto espaço de tempo e também permite ao produtor adquirir mudas em qualquer época do ano (CARVALHO, 1997).

A germinação *in vitro* consiste em colocar as sementes em condições ideais de temperatura, luminosidade e umidade similares às do campo, mas com a vantagem de proporcionar um maior controle nas observações. Esta técnica possibilita um estudo da germinação das sementes. Para a germinação *in vitro* podem ser utilizadas sementes inteiras com tegumento, sementes com tegumento retirado e ainda pode-se utilizar o embrião isoladamente. Em algumas plantas a retirada do tegumento facilita a desinfestação e a germinação *in vitro* (BISOGNIN, et al., 2008). A presença do endocarpo nas sementes e baixas temperaturas atrasam a germinação, sendo que com a remoção do pergaminho e com temperatura de 32°C, sementes maduras de cafeeiro germinam em apenas 15 dias (RENA & MAESTRI, 1986). A retirada do tegumento facilita a germinação *in vitro* de sementes de porongo e a germinação ocorre em meio MS sem a adição de reguladores de crescimento (BISOGNIN, et al., 2008). Lima, et al. (2007) em experimentos realizados com urucum observaram maior porcentagem de germinação *in vitro* nas sementes desprovidas de tegumento sugerindo assim que este é o melhor método para superar a dormência das sementes dessa cultura.

Algumas sementes são sensíveis à perda de água, não sendo capazes de manter alta viabilidade quando armazenadas hidratadas, independente da temperatura de armazenamento, o que lhes confere um caráter recalcitrante. Neste sentido, o cultivo *in vitro* dessas sementes apresenta-se como uma alternativa de propagação da espécie e como possível fonte asséptica de explantes para experimentos posteriores de micropropagação (MARTINOTTO, et al., 2007). Outro aspecto a ser considerado é que a germinação de sementes *in vitro* permite freqüentemente, uma maior germinabilidade das sementes do que em viveiros, provavelmente porque as condições *in vitro* são mais adequadas aos processos de germinação e desenvolvimento inicial da plântula (LEDO, et al., 2007). Stein, et al. (2007) observaram em *Inga vera* que a taxa de germinação *in vitro* em meio WPM/2 (96%) foi superior à taxa de

germinação *ex vitro* feita em substrato do tipo Plantmax® (82%). Desse modo, eles afirmam que condições ambientais apropriadas para o processo de germinação podem ser fornecidas em laboratórios por meio da multiplicação *in vitro*. Assim, estudos sobre germinação *in vitro* servem tanto para maximizar a taxa de germinação como para obter plântulas uniformes com qualidade genética e fitossanitária.

Para que a germinação ocorra com eficiência é necessário que as sementes estejam viáveis, que as condições ambientais sejam favoráveis e que as sementes não estejam dormentes. A dormência pode ocorrer devido a diversos fatores, como: embrião imaturo, impermeabilidade do tegumento, presença de inibidores químicos e ausência de promotores de germinação e também exigências especiais de luz ou temperatura, além do efeito inibitório dos cotilédones (LIMA, et al., 2007). Para superar as barreiras naturais que conferem baixa taxa de germinação às sementes existem vários métodos, como a escarificação química, feita com ácidos e solventes orgânicos, a escarificação mecânica, a imersão das sementes em água quente, a adição de ácido giberélico, entre outras. É imprescindível conhecer estes mecanismos para o estabelecimento de qualquer espécie (FRANCO & FERREIRA, 2002). Há evidências de que a presença do endocarpo (pergaminho) na semente do café exerça influência negativa na sua germinação, por impedir a absorção de água e O₂ pelas sementes (PEREIRA, et al., 2001).

2.4.5. Cultura de embriões zigóticos

A cultura de embrião é empregada para descrever os processos de crescimento e desenvolvimento do embrião zigótico *in vitro*. Esta técnica tem sido utilizada para superar a dormência que algumas sementes apresentam, por causa da imaturidade do embrião ou da presença de substâncias inibidoras no endosperma; estudar os requerimentos nutricionais e fisiológicos do embrião em desenvolvimento; testar a viabilidade de sementes; resgatar embriões híbridos resultantes de cruzamentos interespecíficos ou intergenéricos, produzir indivíduos monoplóides; obter explantes de elevada totipotencialidade; e desenvolver e conservar bancos de germoplasma (LITZ, 1991; HU & FERREIRA, 1998; SANTANA-BUZZY, et al., 2007).

O desenvolvimento dos embriões vegetais caracteriza-se por um estágio inicial e heterotrófico e um tardio e autotrófico. Na fase heterotrófica, o embrião tem baixa capacidade de síntese e necessita de nutrientes do meio de cultura, como reguladores, vitaminas e carboidratos. À medida que se torna autotrófico, aumenta sua capacidade de síntese e pode ser cultivado *in vitro* em meios com poucos nutrientes. Existem alguns fatores

que interferem na cultura de embrião, tais como a desinfestação das sementes, o tipo de excisão, a constituição do meio de cultura, no que se refere às fontes e quantidades dos sais inorgânicos, carboidratos e reguladores e as condições de incubação, como luz e temperatura (LITZ, 1991; HU & FERREIRA, 1998).

O ponto marcante que permitiu a expansão da cultura de embriões foi a descoberta de que estes poderiam ser separados dos tecidos maternos e de reserva, e cultivados, assepticamente, em substrato artificial. Os embriões cultivados *in vitro* usualmente não apresentam um período de repouso, como ocorre em sementes intactas. O mais importante aspecto da cultura de embriões é a seleção do meio nutritivo correto capaz de estimular o desenvolvimento dos embriões. Com isso, têm-se buscado novas alternativas de meios nutritivos, que se aproximem da composição do endosperma ou do saco embrionário, possibilitando assim o cultivo de embriões em vários estádios de desenvolvimento. O cultivo de embriões imaturos, em alguns casos, exige técnicas mais refinadas e meios de cultura mais complexos (ANDREOLI, 1986).

É necessário que se determinem as concentrações ótimas dos componentes do meio de cultura, tais como: os macro e micronutrientes, sacarose e os reguladores de crescimento. As soluções de sais inorgânicos e açúcares que compõem os meios de cultura de tecidos não possuem efeito puramente nutritivo, mas também influenciam o crescimento celular e a morfogênese através de propriedades osmóticas (GEORGE, 1996).

Segundo Monnier (1976), a concentração ótima de sacarose para embriões imaturos é de 60 g/L, atingindo alta osmolaridade no meio MS. Se o meio estiver deficiente em sacarose, formam-se plântulas disformes, com baixa probabilidade de sobrevivência, ou não ocorre a germinação dos embriões.

Os reguladores de crescimento são amplamente utilizados na cultura de embriões quando estes são muito jovens. Tais substâncias possuem a capacidade de suprir as necessidades para a germinação, desenvolvimento e crescimento do embrião. George, (1996), observou que o desenvolvimento de embriões ocorre em baixas concentrações de auxinas. Dependendo da espécie, o embrião jovem pode ser estimulado a crescer pela adição de citocininas, auxinas ou giberelinas ao meio de cultura (KING, 1976). Embriões imaturos, removidos da semente e cultivados em meio de cultura, não somente superam o estágio de repouso, como também cessam os processos normais de desenvolvimento embriogênico. O ABA (ácido abscísico), conhecido como inibidor da germinação de muitos embriões maduros, também inibe a germinação precoce *in vitro* (ANDREOLI, 1986).

A cultura de embriões é uma metodologia que pode auxiliar os programas de

melhoramento do cafeeiro, pois permite o resgate de embriões provenientes de cruzamentos interespecíficos e antecipação da época de plantio. Esse método baseia-se no fato de que os embriões podem ser retirados da semente e transferidos para um meio de cultura contendo nutrientes apropriados e em concentrações adequadas.

2.5. SUBSÍDIOS PARA O DESENVOLVIMENTO REGIONAL

Com o surgimento de diferentes necessidades e limitações encontradas no processo de planejamento regional, a intervenção no espaço de gestão passou a demandar novas abordagens. A participação da sociedade começou a integrar as políticas e diretrizes de gestão e os projetos de desenvolvimento regional passaram a ser organizados num sistema integrado (FEDOZZI, 2001).

Em relação à estrutura do planejamento para o desenvolvimento regional, as recentes abordagens procuram utilizar uma visão sustentável inter-relacionada e fundamentada por três dimensões que compreendem: *a)* as questões institucionais, econômicas e sociais que abrangem, em grande parte, as ciências sociais aplicadas; *b)* as questões de natureza territorial que abrangem aspectos da geografia humana e organização do espaço regional; e *c)* as questões ambientais que abordam, essencialmente, o equilíbrio para o uso racional do meio ambiente local (VEIGA, 2006).

A sociedade ocidental consolidou, ao longo dos anos de 1990, à adoção de um novo referencial científico para se pensar a relação entre as populações humanas e o meio ambiente. Mediante conceitos provenientes da ecologia e da evolução, e também influenciados pelo movimento ambientalista, foi eleito o conceito de sustentabilidade ecológica como indicador mais importante de suas análises. Por sustentabilidade ecológica entende-se “a capacidade de uma dada população de ocupar uma determinada área e explorar seus recursos naturais sem ameaçar, ao longo do tempo, a integridade ecológica do meio ambiente” (LIMA & POZZOBON, 2005).

Na Amazônia as categorias socioambientais de ocupação humana são distinguidas em termos de pressão de uso e do impacto que exercem sobre o ambiente, relacionados ao modo como ocupam, exploram e concebem sua relação com a natureza. O comportamento de uma dada categoria socioambiental em relação ao ambiente é influenciado por características de sua formação social, tais como a orientação de sua produção econômica, grau de envolvimento com o mercado e a posse de uma cultura ecológica (LIMA & POZZOBON, 2005).

Contudo, as florestas da Amazônia não devem servir mais de “campo de experiências” dos chamados “modelos de desenvolvimento”. Com a implementação de medidas políticas eficazes será possível concentrar as atividades dos diversos grupos sociais e suas reivindicações e direitos de uso da terra em um desenvolvimento regional adaptados às características ecológicas e às necessidades socioeconômicas da população envolvida (KOHLHEPP, et al., 2002).

O desenvolvimento regional não ocorre sem o aproveitamento de todos os potenciais locais. Segundo os conceitos formulados pela teoria econômica, problemas enfrentados por uma determinada atividade refletem imediatamente no resultado global da economia, haja vista a interdependência setorial da produção. Da mesma maneira, se um setor apresenta crescimento, todos os demais tendem a deslanchar em conjunto (KROETZ, et. al., 2009).

Na perspectiva de se conceber uma nova proposta de desenvolvimento rural, os aspectos da localidade, interagindo com as demais características da sustentabilidade e integração social e territorial, emergem como um dos seus aspectos fundamentais. A noção de desenvolvimento centrado essencialmente no local apresenta-se com uma conotação essencialmente integracionista, alusiva à superação das carências específicas das localidades; e, de uma integração das especificidades locais, no sentido da formação de sinergias territoriais. Assim, o conceito de local adquire a conotação de alvo sócio-territorial das ações; não sendo, no entanto, propriamente, um espaço micro, podendo ser tomado como um município ou, inclusive, como uma região compreendendo vários municípios (ARAGÃO & BORRERO, 2007).

O setor agropecuário é composto por atividades agrícolas, pecuárias e da silvicultura. A partir destas atividades primárias, desmembram-se inúmeras outras, especialmente aquelas ligadas à industrialização de alimentos e de produtos da madeira, que por sua vez demandam serviços diversos. Este ciclo gera, em última instância, o desenvolvimento econômico regional (KROETZ, et. al., 2009). Por isso, é de suma importância que os estudos regionais contemplem todos os elos da cadeia produtiva local.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. PROCEDIMENTO DE CAMPO

Nesse estudo foram utilizados ápices caulinares oriundos de perfilhos de pupunheira de plantas-mãe cultivadas em Campo Experimental da Embrapa Rondônia, no município de Porto Velho, com aproximadamente 3 m de altura. Para a análise, fez-se uso de 125 perfilhos com 50 cm de comprimento cada, onde após a extração dos ápices caulinares, cortados em duas partes, resultam em 250 explantes.

3.2. ESTABELECIMENTO *IN VITRO*

Foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais - Embrapa Rondônia. Todas as manipulações foram efetuadas em câmara de fluxo laminar. As culturas foram mantidas em câmara de crescimento, com luminosidade de 2000 lux e fotoperíodo de 16 horas. O material inoculado foi mantido no escuro e com temperatura de $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Os tratamentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado com 3 repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por 10 tubos de ensaio contendo um explante em cada tubo (GATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

3.3. DESINFESTAÇÃO DOS EXPLANTES

Os ápices caulinares foram lavados e cortados, deixando somente a parte contendo o meristema apical que se encontra na região distal em relação ao mais novo primórdio foliar. Esses fragmentos foram devidamente lavados em água corrente com o auxílio de esponja estéril e detergente. Em seguida, em câmara de fluxo laminar, os mesmos foram imersos em etanol a 70% (v/v) por 1 minuto e logo após foram submersos em soluções de hipoclorito de sódio nas concentrações de 25, 50 e 75% (v/v), nos períodos de 10, 20 e 30 minutos. Após este procedimento, foram feitos cortes até chegar ao ápice, inoculando-os com a base em contato com meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) suplementado com $30,0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de sacarose e solidificado com 0,8 % de ágar. O pH foi ajustado para $5,8 \pm 1$ antes da autoclavagem a 121°C , durante 20 minutos, sem a presença de reguladores de crescimento. Foi realizada uma avaliação dez dias após a inoculação. Os aspectos avaliados foram as percentagens de contaminação e explantes necrosados/oxidados. As condições de luminosidade, fotoperíodo e temperatura, estabelecidas para a desinfestação dos explantes, seguem as mesmas citadas para o estabelecimento *in vitro*.

3.4. INDUÇÃO DE CALOS

Para indução de calos, os ápices caulinares ou meristemas apicais obtidos a partir de perfilhos de pupunheira foram desinfestados, seccionado em duas partes e inoculado com a face do corte em contato com meio de cultura MS, nas mesmas condições como já referido, acrescido de 2,4-D (0,0; 5; 10; 20 e 40 mg.L⁻¹) e BAP (0,0; 3,0 e 6,0 mg.L⁻¹) (Tabela 1). Após a inoculação, as amostras foram mantidas no escuro, em sala de crescimento. sob as mesmas condições de temperatura mencionados anteriormente (GATTAPAGLIA & MACHADO, 1998)

Tabela 1: Concentrações de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e benzilaminopurina (BAP) utilizadas para indução de calos em explantes de ápices caulinares de *Bactris gasipaes*. Porto Velho, Embrapa Rondônia, 2009.

Tratamentos	2, 4-D (mg.L ⁻¹)	BAP (mg.L ⁻¹)
1	0	0
2	0	3
3	0	6
4	5	0
5	5	3
6	5	6
7	10	0
8	10	3
9	10	6
10	20	0
11	20	3
12	20	6
13	40	0
14	40	3
15	40	6

3.6. ANÁLISE DOS DADOS

Os dados obtidos foram submetidos à Análise de Variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade.

Para o teste de desinfestação foi realizada apenas uma avaliação 10 dias após a inoculação dos explantes. Já para o teste de indução de calos, as avaliações ocorreram com intervalos de 10 dias, a contar da data da inoculação. Ao final de 36 dias, avaliou-se o percentual de explantes com a presença de calos, considerando seu surgimento a partir da estrutura típica de calos, com alteração na coloração e forma do tecido apical (GOMES, 1963).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. DESINFESTAÇÃO DOS EXPLANTES

Aos 10 dias a partir da inoculação, o tratamento que mostrou mais eficiência, devido à maior desinfestação e menor agressão dos ápices caulinares foi o tratamento que combinou o período de 20 minutos de imersão com a concentração de hipoclorito de sódio de 50%, resultando em 90% de explantes sem a presença de microrganismos (Tabela 2). Já nos outros tratamentos foram observados uma porcentagem muito maior de contaminação, chegando a apresentar 50% no tratamento que combinou o período de 10 minutos com a concentração de 25% de hipoclorito de sódio. Deste modo, Mateo-Sagasta, (1990) afirma que no início da desinfestação dos explantes, é utilizado etanol a 70% durante alguns segundos, para eliminar bolhas de ar e parte dos lipídios, aumentando assim o contato do desinfestante com o material vegetal. Posteriormente Teixeira (2009), constata que a desinfestação de segmentos de brotos, folhas e botões florais pode ser feita com sucesso utilizando etanol na concentração de 50 a 70%, por um período de 1 a 3 minutos, seguido de um tratamento com hipoclorito de sódio ou cálcio a 0,5 a 2% (p/v) por 5 a 20 minutos.

Tabela 2: Efeito dos tratamentos na contaminação dos explantes em relação ao tempo de imersão e à concentração de hipoclorito de sódio. Porto Velho, Embrapa Rondônia, 2009.

Tratamentos	Tempo (minutos)	Concentração (%)	Contaminação (%)*
1	10	25	50 a
2	10	50	40 ab
3	10	75	40 ab
4	20	25	30 b
5	20	50	10 c
6	20	75	30 b
7	30	25	30 b
8	30	50	40 ab
9	30	75	40 ab

*As letras indicam significância, pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Assim como a contaminação, o que dificulta também o estabelecimento de protocolos de regeneração de cultivares *in vitro*, são as porcentagens de oxidação, seguida de necrose do explante (Figura 3).

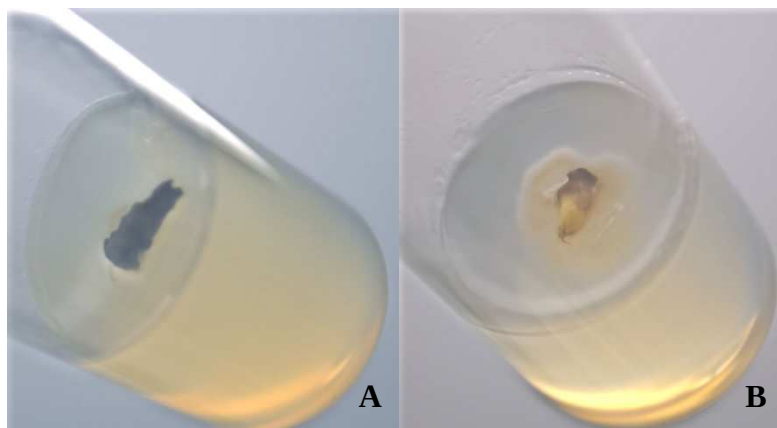


Figura 3. *Bactris gasipaes*. (A) Ápice caulinar necrosado. (B) Contaminação de ápice por bactéria endógena. Porto Velho, Embrapa Rondônia, 2009. Foto: Daniel Medeiros.

Neste estudo, observou-se que, na maioria dos tratamentos, houve 30% dos explantes oxidados aos 10 dias de cultivo (Tabela 3). Observou-se também uma relação positiva entre esta oxidação e o tempo de exposição e a porcentagem da solução de hipoclorito de sódio. Erig & Schuch (2002), em estudos com a cv. Galaxy de macieira perceberam que a contaminação bacteriana foi mais intensa quando se utilizou o hipoclorito de cálcio na desinfestação dos explantes (78,2%), comparado ao hipoclorito de sódio (27,8%). Assim, os autores concluíram que utilizando o hipoclorito de sódio na desinfestação e percentagem de sobrevivência dos explantes foi maior, quando comparada com o hipoclorito de cálcio (15,5% e 6,7%, respectivamente).

Este resultado está relacionado à contaminação por bactérias e por fungos que, de maneira geral, foram menores com a utilização de hipoclorito de sódio na desinfestação; conseqüentemente, mais explantes sobreviveram.

Além do hipoclorito de sódio agentes como, cloreto de mercúrio, o ácido clorídrico, o cloreto de benzalcônio, o peróxido de hidrogênio e, os mais comumente utilizados, o hipoclorito de cálcio, também podem ser usados para a desinfestação dos explantes (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Geralmente, um surfactante como Tween®, ou outro detergente, é adicionado à solução de hipoclorito para facilitar a sua ação, aumentando o contato da solução com os tecidos (TORRES, et. al., 1998). Porém, a adição deste pode, além de diminuir a contaminação, aumentar a toxicidade do hipoclorito para o tecido vegetal.

Tabela 3: Efeito dos tratamentos na oxidação dos explantes em relação ao tempo de imersão e à concentração de hipoclorito de sódio aos 10 dias após o cultivo. Porto Velho, Embrapa Rondônia, 2009.

Tratamentos	Tempo (minutos)	Concentração (%)	Oxidação (%) *
1	10	25	20 d
2	10	50	30 cd
3	10	75	30 cd
4	20	25	30 cd
5	20	50	30 cd
6	20	75	50 ab
7	30	25	40 bc
8	30	50	50 ab
9	30	75	60 a

*As letras indicam significância, pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A desinfestação é uma etapa problemática, pois o agente desinfestante utilizado deve eliminar os microrganismos do tecido vegetal sem danificar o mesmo. Alguns microrganismos podem ser endógenos ou estarem latentes tanto em sementes como em brotos. Por essa razão, muitas vezes a obtenção de tecidos vegetais livres de microrganismos é complexo. Porém, se apenas os meristemas forem retirados, esses geralmente estão livres de microrganismos (CALDAS, et al., 1998; ROCA & MROGINSKI, 1991).

A desinfestação do material juvenil geralmente não é difícil; entretanto, também são utilizados explantes de material adulto ou de plantas crescidas em condições de campo. Esta, apresenta dificuldades, pois as percentagens de contaminação são freqüentemente altas, quando comparadas com as de explantes juvenis ou retirados de mudas mantidas em casa-de-vegetação. A contaminação pode ser reduzida por pulverizações com inseticidas e fungicidas, envolvendo os brotos das plantas em sacos plásticos ou mantendo-os em casa-de-vegetação (HARTMANN, et al., 2002).

Um processo de desinfestação eficaz é aquele que combina uma taxa de contaminação e de oxidação menores, e com a menor exposição possível ao agente descontaminante (TORRES, et al., 1998). Deste modo, no presente estudo, utilizando explantes de ápices caulinares, verificou-se que o tratamento que combinou um tempo de 20 minutos com a concentração de 50% de hipoclorito de sódio é o tratamento que mostrou maior eficiência para desinfestação, tendo em vista a relação entre o número de explantes contaminados e oxidados. Fick (2007) mostrou que a pré-desinfestação com imersão em NaOCl a 5% por 30 minutos, a retirada do tegumento e a imersão das sementes em solução de álcool etílico 70%

por 30 segundos foram suficientes para uma efetiva desinfestação, visando ao estabelecimento *in vitro* de plântulas de louro-pardo.

Foram utilizados por Winnaar (1988), Schmildt (1994) e Litz & Conover (1978), soluções germicidas à base de hipoclorito de sódio por 10 a 20 minutos na assepsia de explantes de mamoeiro. Winnaar (1988) observou 4 a 29% de contaminação, resultado este considerado satisfatório; Schmildt (1994) encontrou 7,5 e 10% de contaminação microbiana, respectivamente, para os cultivares de mamoeiro Solo e Formosa. Reuveni, et al. (1990) observaram que o hipoclorito de sódio promove a descontaminação na superfície dos explantes, mas não controla a contaminação endofítica, concluindo sobre a necessidade da utilização de um tratamento complementar como o Saniagri® (ácido peracético 2%).

4.2. CALOGÊNESE

Nos segmentos de ápices caulinares de *B. gasipaes* inoculados na ausência de reguladores de crescimento não foram observados calogênese. O processo de indução de calos teve início aos 36 dias de cultivo após a inoculação, sendo que os explantes apresentaram intumescimento, indicando desta forma o início do processo de indução de calos (FIGURA 4). Assim, a indução de calos pode ocorrer em qualquer tecido vegetal, porém a utilização maior é daqueles tecidos com elevada proporção de células meristemáticas (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Na Tabela 4 constam os resultados da análise de variância da indução de calos em resposta às concentrações hormonais a que foram submetidos os explantes. Verificou-se que o efeito das concentrações de BAP não foi significativo. Consequentemente, não houve interação entre os dois tipos de hormônios. Por outro lado, as concentrações de 2,4-D tiveram efeito significativo sobre a indução de calos nos explantes.

Tabela 4. Análise de variância para indução de calos em explantes de ápices caulinares de *Bactris gasipaes* em relação às diferentes concentrações hormonais (2,4-D e BAP) utilizadas no meio de cultivo, após 36 dias de cultivo. Porto Velho, Embrapa Rondônia, 2009.

Causas de variação	Graus de liberdade	QM	F
Total	14	60,93	
2,4-D	4	51,60	11,73 **
BAP	2	0,53	0,24 ns
2,4-D x BAP	8	8,80	1,0 ns

** - significativo ao nível de 0,001.

ns - não significativo ao nível de 0,05.

Conforme mostra a Tabela 5, as combinações de 5,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D com 6,0 mg.L⁻¹ de BAP e 10,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D com 3,0 mg.L⁻¹ de BAP foram os que resultaram em maiores valores de indução de calos, com médias de 0,5 e 0,6, respectivamente. Os tratamentos com 5,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D em combinação com 3,0 mg.L⁻¹ de BAP mostraram média 0,4 de indução. Para Cerqueira, et al. (2002), o maior resultado para segmentos caulinares de erva-de-touro (*Tridax procumbens* L.) foi obtido com a presença de 1,0 mg.L⁻¹ de ANA + 2,0mg.L⁻¹ de BAP, o qual proporcionou 75% de área coberta do explante com calos. Em estudos com filete, Cangahuala-inocente, et al. (2007), utilizando a combinação 2,4-D (20 µM) e BAP (1 e 2 mg.L⁻¹) obteve um resultado de 100 % de indução de calos para pétalas de *Acca sellowiana*, todas as combinações formaram calos. Entretanto, as combinações de 2,4-D (20 µM) com BAP (1 mg.L⁻¹) ou 2-iP (2 mg.L⁻¹) formaram calos com características embriogenéticas. Em folhas de *Scaevola aemula* induzidas em meio MS suplementado com 0,2 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 0,2–0,5 mg.L⁻¹ de BAP produziram vários estádios de desenvolvimento de embriões somáticos (WANG & BHALLA, 2004). Outros estudos relatam diversos tipos de interação entre hormônios, como em Santos, et al. (2001), que obtiveram indução de calos em *Coffea arabica* Catuaí Vermelho somente em resposta aos meios com 2,4-D (1,5 µM) combinado com BAP (7,5 µM) e 2iP (25,0 µM) combinado com AIB (5,0 µM). Os níveis de citocininas e auxinas promovem um balanço hormonal que pode estimular o crescimento da planta (PALÚ, et. al., 2004).

Tabela 5. Número médio de indução de calos por explante em ápices caulinares de *Bactris gasipaes* em relação às diferentes concentrações hormonais (2,4-D e BAP) utilizadas no meio de cultivo, após 36 dias de cultivo. Porto Velho, Embrapa Rondônia, 2009.

2,4-D (mg.L ⁻¹)	BAP (mg.L ⁻¹)			
	0	3	6	Média total
0	0 a B*	0,0 a C	0,0 a B	0,0 B
5	0,4 a A	0,4 a B	0,5 a A	1,3 A
10	0,3 b A	0,6 a A	0,3 b AB	1,2 A
20	0,0 b B	0,1 a C	0,0 b B	0,1 B
40	0,2 a AB	0,0 a C	0,1 a B	0,3 B
Média total	0,9 a	1,1 a	0,9 a	2,9

*Médias seguidas da mesma letra minúscula nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

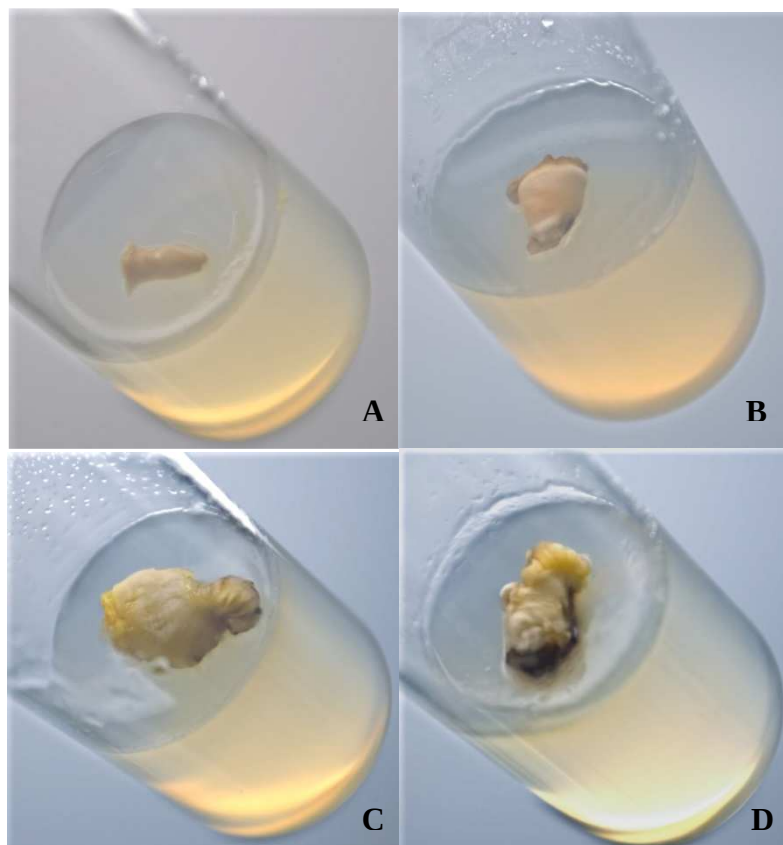
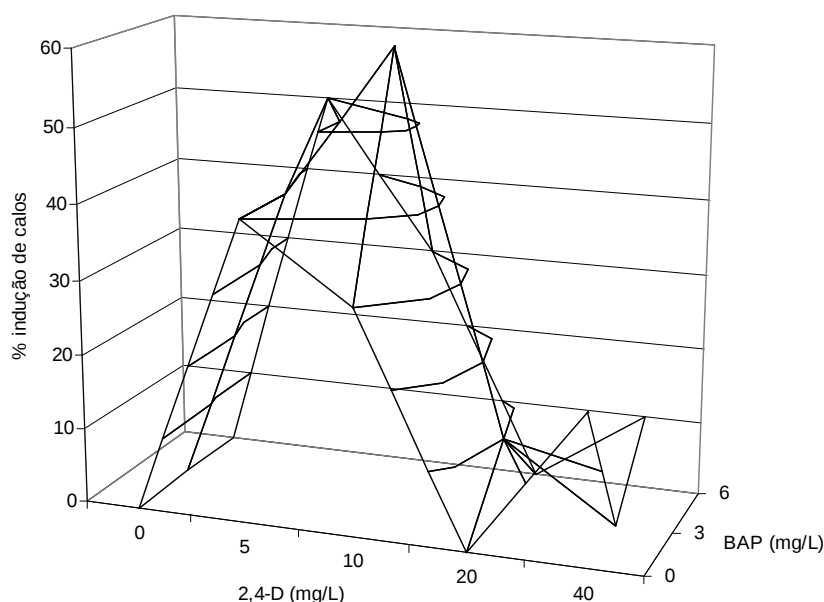


Figura 4. *Bactris gasipaes* (A) Ápice caulinar sem presença de intumescimento e calos. (B) Ápice caulinar intumescido. (C) Ápice caulinar no início de indução de calo. (D) Calo de ápice caulinar. Porto Velho, Embrapa Rondônia, 2009. Foto: Daniel Medeiros

Para os tratamentos contendo a combinação de $10,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D com $6,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP, resultaram em média 0,3; o tratamento com 40 mg.L^{-1} de 2,4-D sem a adição de BAP, resultou em média 0,2 e os tratamentos com $20,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D em combinação com $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP e $40,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D combinado com $6,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP induziram calos em apenas 0,1 dos explantes. Os demais tratamentos não apresentaram nenhuma indução de calos, assim como o tratamento controle, sem a presença de reguladores de crescimento no meio de cultura. Nehra, et al. (1990), estudando variação somaclonal em morangueiro, obtiveram calogênese em meios com 1-10 (mM de 2,4-D e BAP), sendo que as melhores respostas para o crescimento dos calos foram registradas com 5 mM de BAP e 2,4-D.

Na Figura 5 estão apresentadas as curvas de resposta da indução de calos em relação às diferentes combinações hormonais. Nota-se que, na ausência de 2,4-D, não ocorreu nenhuma indução de calos, e que esta aumentou concomitantemente com o aumento nas concentrações deste regulador de crescimento, até a concentração de $10,0 \text{ mg.L}^{-1}$, decrescendo

a partir então. O pico da superfície de resposta correspondeu com a combinação de 10,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D com 3,0 mg.L⁻¹ de BAP, atingindo 60% de indução de calos. Pode-se observar que esta concentração ótima de 2,4-D teve efeito bastante inferior (30%) quando em combinação com 6,0 mg.L⁻¹ de BAP ou na ausência deste.



$$10,0 \text{ mg.L}^{-1} \text{ 2,4-D: } Y = -3x^2 + 12x - 6 \text{ } R^2 = 1,00; \text{ 3,0 mg.L}^{-1} \text{ BAP: } Y = -1,2143x^2 + 6,9857x - 5,4 \text{ } R^2 = 0,75.$$

Figura 5. Superfície de resposta da indução de calos em explantes de ápices caulinares de *Bactris gasipaes* em relação às diferentes concentrações hormonais (2,4-D e BAP) utilizadas no meio de cultivo, após 36 dias de cultivo. Porto Velho, Embrapa Rondônia, 2009.

Assim, pode-se afirmar que o 2,4-D tem função importante na indução de calos em ápices caulinares de pupunheira. Corroborando com esse estudo, Arias & Huete (1983) relatam que a auxina 2,4-D tem um efeito estimulador na formação de calos na pupunha. Em um estudo realizado com ápices caulinares, segundo os autores, a formação de calos foi induzida por concentrações de 20 a 50 mg.L⁻¹ de 2,4-D, em dois meses de cultivo. Após os dois meses iniciais, os explantes foram transferidos para meio sem reguladores e em alguns cultivos se observaram embrióides, que aos cinco meses de desenvolvimento geraram vários brotos apicais com um sistema radial.

Ao contrário dos resultados acima mencionados, em *Gmelina arborea* (KANNAN e JASRAI, 1969) e em *Fagus grandifolia* (BARKER, et al., 1997), foram observados calos na base de segmentos nodais e ápices caulinares, respectivamente, induzidos somente em meios de cultura suplementados com concentrações maiores de BAP (superiores a 2,22 µM).

Ferreira, (2006), trabalhando com a figueira cultivar Roxo de Valinhos, relatou a formação de calos em segmentos caulinares apenas nos tratamentos que continham auxinas. Ao contrário deste resultado, Santos, et al. (2000) verificaram a influência positiva da relação auxina/citocinina em ensaios envolvendo indução de calos em cultivares de cafeeiro. Estes dados concordam com Jones, et al. (1988) que observaram a formação de calos em várias cultivares de morangueiro dentro de quatro a oito semanas em meio com 2,4-D e BAP.

Para Gomes, et al. (2004), a presença de 1,0 e 2,0 mg.L de 2,4-D no meio de cultura induziu maior a formação de calos em Nim indiano, sendo 100 e 80%, respectivamente, na ausência de BAP. Na ausência de 2,4-D, 80 e 90% dos explantes cultivados nas concentrações de 1,0 e 2,0 mg.L de BAP, respectivamente, apresentaram formação de calo. A presença de BAP no meio de cultura nas concentrações de 1,0 e 2,0 mg.L promoveu o maior desenvolvimento do calo na superfície dos segmentos nodais aos 14 dias. Entretanto, a presença de 2,0 mg.L de 2,4-D no meio de cultura induziu um menor desenvolvimento do calo (18,0%) quando comparado com a ausência (37,07%) e presença de 1,0 mg.L-1 (31,93%), discordando dos resultados obtidos por Soares, *et al.* (2003), que obtiveram uma produção inexpressiva de calos na ausência de 2,4-D.

Flores, et. al. (2006), observaram que uma maior proliferação de calos friáveis em é obtida cultivando-se segmentos nodais com 1 mM de BAP e 10 mM de 2,4-D. A regeneração de brotos via organogênese indireta ocorre quando esses explantes são cultivados com 1 mM de BAP e 1 mM de 2,4-D. Por outro lado, o ANA mostra-se mais efetivo que o 2,4-D na regeneração de *Pfaffia tuberosa* raízes adventícias. Os calos observados nesse estudo se apresentaram de cor esbranquiçada e aspecto compacto, como se observa na Figura 6. Esses resultados estão de acordo com os de Monteiro-Hara (2000), que obteve abundante proliferação de calo de aparência compacta e esbranquiçada nos explantes foliares de plantas recém germinadas de *Passiflora alata* em meio contendo BAP nas doses de 0,6; 0,8 e 1,0 mg.L⁻¹.

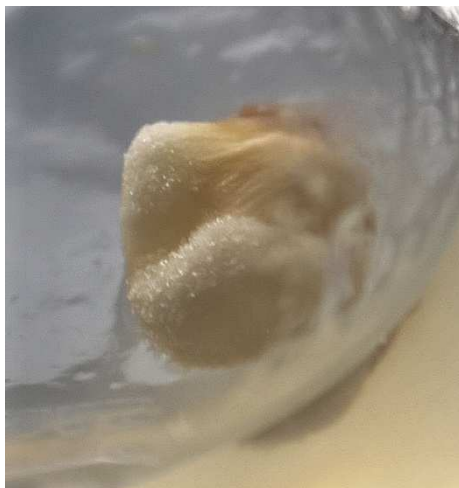


Figura 6. Calo formado a partir de explantes de ápices caulinares de *Bactris gasipaes*, 36 dias após a inoculação. Porto Velho, Embrapa Rondônia, 2009. Foto: Daniel Medeiros.

A interação da auxina 2,4-D com a citocinina BAP, mostrou importância na indução de calos para os explantes de *B. gasipaes*, sendo o tratamento 8, com a combinação de 10 mg.L⁻¹ de 2,4-D com 3 mg.L⁻¹ de BAP o mais responsivos (com maior porcentagem de indução de calos), obtendo-se 60% de indução. Nos tratamentos apenas com citocinina ou auxina, os explantes foram menos responsivos, mostrando que para este experimento com explantes de ápices caulinares, houve maior obtenção de calos, com a combinação dos dois hormônios.

CONCLUSÕES

Após as análises dos resultados pode-se afirmar que os tecidos de ápices caulinares de *Bactris gasipaes* são responsivos à indução de calos.

Condições ideais de desinfestação de explantes de ápices caulinares foram obtidas quando os mesmos foram tratados com álcool 70% (v/v) por 1 minuto seguido de imersão em solução de hipoclorito de sódio 50% (v/v) por 20 minutos.

Este trabalho permite afirmar pelos resultados obtidos que a interação entre a auxina 2,4-D e a citocinina BAP foi extremamente positiva para a calogênese em ápices caulinares desta espécie de planta, bem como, a presença de reguladores de crescimento no meio de cultura. A condição que obteve maior efeito no cultivo visando a indução de calos foi encontrada nas concentrações de 10 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 3 mg.L⁻¹ de BAP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, M.; ALMEIDA, C.V. Somatic embryogenesis and in vitro plant regeneration from pejibaye adult plant leaf primordial. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.9, 2006. p. 1449-1452.
- ALMEIDA, N.; MARTIN, F. W.; The Pejibaye. In: Departament of Agricultural, Washington. **Cultivation of Neglected Tropical Fruits With Promise**. New Oriens, 1980.
- ALMEIDA, C. V.; YARA, R.; ALMEIDA, M. Fungo endofílicos isolados de ápices caulinares de pupunheira cultivado in vivo e in vitro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, vol.40, nº5, Brasília, Mai., 2005.
- ALVES, M. P. **Cultura de tecidos de *Cecropia glaziovii* Sneth. (Moraceae):** Micropropagação vegetativa e regeneração por organogênese. 1993. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas na área de Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1993. p.101.
- ANDREOLI, C. Cultura de embriões. In: SIMPÓSIO DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, n.1, 1985, Brasília, DF. **Anais...** Brasília, DF: ABCTP/EMBRAPA, 1986. p.25-28.
- ARAGÃO, J.L., BORRERO, M.A.V. Esboço de uma política pública de desenvolvimento sustentável para a pecuária leiteira da agricultura familiar de Rondônia em consonância com o sistema contemporâneo capitalista. In: **Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente em Rondônia**. Edufro (Universidade Federal de Rondônia), 2007.
- ARIAS, O. M. & HUETE, F. V. **Propagación vegetativa in vitro de pejibaye (*Bactris gasipaes* H.B.K.)**. Turrialba, v. 33, n. 2, 1983. p.103-108.
- BARKER, M.J. et al. Micropropagation of juvenile and mature american beech. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.51, 1997. p.209-213.
- BARBOSA, W. M. **Embriogênese somática em cafés arábica e robusta**. 2003. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003. p.100.
- BARBOSA, W. M.; CORDEIRO, A. T.; CRUZ, A. C. F.; OTONI, W. C.; ZAMBOLIM, L.; SAKIYAMA, N. S. Manose como fonte de carboidrato na calogênese induzida em explantes foliares de *Coffea arabica* e de *C. canephora*. In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil e Workshop Internacional de Café & Saúde, (3. : 2003 : Porto Seguro). **Anais...** Brasília, DF : Embrapa Café, 2003. p.447.
- BISOGNIN, D. A. et al . Germinação e propagação in vitro de porongo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 2, 2008.
- BONACCINI, L. A. Produza palmito: a cultura da pupunha. Cuiabá.SEBRAE/MT, 1997. p.100. (Coleção agro-industrial v.12)
- BOVI, M, L. Palmito de Pupunha: Informações Básicas para o Cultivo. **Boletim Técnico**, IAC nº 173, Campinas 1998. p.50.

BOVI, M.L.A. Manejo agronômico da pupunheira: conhecimentos atuais e necessidades. In: SEMINÁRIO DO AGRONEGÓCIO Palmito de Pupunha na Amazônia. **Anais**. Porto Velho: EMBRAPA, CPAF, 1999. p.44-56.

BOVI, M. L. A. O agronegócio palmito de pupunha. **O Agrônomo**, Campinas, 52. v.1, 2000.

CALDAS et. al. Meios Nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformações genética de plantas**. Brasília: Embrapa-CNPq, v.1. 1998.

CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; CAPRESTANO, C. A.; DUCROQUET, J. P.; GUERRA, M. P. Competência embriogenética em tecidos florais de *Acca sellowiana* (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 87-89, jul. 2007.

CARVALHO, Gladyston Rodrigues. **Germinação de sementes e aclimatização de plântulas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) propagadas "in vitro"**. 1997. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Lavras : Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1997. 64p.

CARVALHO, C. J. R; ISHIDA, F. Y. Respostas de pupunheiras (*Bractris gasipaes* Kunth) jovens ao alagamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, vol.37, nº9, Brasília, Set., 2002.

CEQUEIRA, E. S; PINTO, J. E. B. P.; MORAIS, A. R.; CASTRO, N. E. A.; CARDOSO, M. G.; LAMEIRA, O. A. Indução de calos em erva-de-touro (*Tridax procumbens* L.) utilizando diferentes reguladores de crescimento e tipos de explantes. **Ciência Agrotécnica**., Lavras, v.26, n.2, mar./abr., 2002. p.301-308.

CHAIMSOHN, P. F. **Cultivo de pupunha para palmito**. Importância, mercado e aspectos biológicos e agronômicos In: curso sobre cultivo, processamento e comercialização de palmito de pupunha, IAPAR Londrina, 2001. p.7-69.

CID, L. P. B.; CRUZ, A. R. R. Indução de multibrotação em *C. arabica* cv. Catuaí vermelho/81, usando diferentes concentrações de BAP em biorreator de imersão permanente (BIPER). In: Simpósio Brasileiro de Pesquisa dos Cafés do Brasil (2). : 2001 : Vitória, ES). **Anais...** Brasília, D.F. : Embrapa Café, 2001. (CDROM), p. 382-385.

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

CLEMENT, C.R.; ARKCOLL, D.B. The pejibaye (*Bactris gasipaes* H. B. K. Palmae) as an oil crop: potential and breeding strategy. **Oléagineux**, v.46, 1991. p.293-99.

CLEMENT, C.R.; BOVI, M.L.A. Melhoramento genético da pupunheira: conhecimentos atuais e necessidades. **Anais...** I Seminário do Agronegócio de Palmito de Pupunha na Amazônia, Embrapa Rondônia, Porto Velho, RO, 1999, pp. 57-70.

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

COUTO, L.; DANIEL,O; ALMEIDA, A.C.G. A Cultura da Pupunha para Produção de Palmito. **Sistema de Produção e Processamento Industrial**, nº 020 Viçosa, 1999, 34p.

ERIG, A. C.; FORTES, G. R.de L. Estabelecimento de pereira (*Pyrus spp.*) *in vitro* a partir de meristemas e gemas. **Ciência Rural**, v.32, n.4, 2002. p.577-582.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.4, jul-ago, 2005. p.961-965.

FICK, T. A. **Estabelecimento *in vitro* e propagação de *Cordia trichotoma* (Vell.) Arrabida ex Steudel (louro-pardo)**. 2007. Dissertação. (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2007.

FEDOZZI, L. **Práticas inovadoras de Gestão Urbana: o paradigma participativo**. In: Revista Paranaense de Desenvolvimento, n. 100. Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social (IPARDES). Curitiba: 2001.

FERNANDES, A. R. et al. Crescimento de mudas de pupunheira (*Bractris gasipaes* H.B.K.) sob diferentes níveis de salinidade. **Ciência Agrotécnica**, vol.27,nº2, Lavras, Mar./Abr., 2003. p.278-284.

FERNANDO, J. A. **Estudos anatômicos e ultraestruturais da organogênese *in vitro* de *Passiflora edulis* J. Flavicarpa Deg.** 2005. 106. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. FNP. Agrianual-anuário estatístico da agricultura brasileira. São Paulo, 2005. p. 394-395.

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 ITAL**, v.12, p.255-272, 1982.

FERREIRA, E.A. **Micropropagação, calogênese e Irradiação da Figueira ‘Roxo de Valinos’**. 2006. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2006. P.103.

FLORES, R.; NICOLOSO, F. T.; VASCONCELLOS, N. J. S. Indução de calos e aspectos morfogênicos de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu, v.8, n.3, 2006, p. 89-95

FRANCO, E. T. H.; FERREIRA, A. G. Tratamentos pré-germinativos em sementes de *Didymopanax morotoni* (Aubl.) Dcne et Planch. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.12, n.1, 2002. p.10.

GEORGE, F. E. **Plant propagation by tissue culture**. Exegetics Limited: England, 2nd Edition, v.2, 1996.

GOMES, F. P. Curso de estatística experimental. 2ª edição. São Paulo: USP, ESALQ, 1963. 384 p.

GOMES, K. K. P. ; VIEIRA, G. S. S. ; LEDO, A. S.; BLANK, A. F. . Calogênese *in vitro* em segmentos nodais de nim indiano. In: 44º Congresso Brasileiro de Olericultura, 2004, Campo

Grande. **Horticultura Brasileira**. Campo Grande : Sociedade de Olericultura do Brasil, v.22, 2004.

GOMES, K. K. P. ; VIEIRA, G. S. S. ; LEDO, A. S.; BLANK, A. F. . Efeito de diferentes concentrações de BAP e tipos de explantes na indução de calo em nim indiano. In: 44º Congresso Brasileiro de Olericultura, 2004, Campo Grande. **Horticultura Brasileira**. Mato Grosso do Sul : Sociedade Brasileira de Olericultura do Brasil, v.22, 2004.

GATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. p. 183-260.

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 transformações genética de plantas**. Brasília: Embrapa-CNPq, 1999. v.2 p.533-568.

GUERREIRO, L. F. **Palmito de Pupunha**. (2002). Disponível em: www.desenbahia.ba.gov.br. Acesso em: 30/04/2009.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant Propagation: Principles and Practices**. 7 ed. New Jersey: Prentice Hall, 2002.

HERNADEZ, F. B. T.; JUNIOR, J. A.; LOPES, A. S. Irrigação na cultura da pupunha. In: Curso sobre cultivo, processamento e comercialização de palmito pupunha. **IAPAR**. Londrina, 2001, p.107-126.

HIGASHI, E.N.; SILVEIRA, R.L.V.A.; GONÇALVES, A.N. Propagação vegetativa de Eucalyptus: princípios básicos e a sua evolução no Brasil. Instituto de pesquisas e Estudos Florestais, **Circular Técnica**, n.192, 2000. p.14.

HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. Cultura de embriões. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformações genética de plantas**. Brasília: Embrapa-CNPq, v.1, 1998. p.509.

JONES, O. P.; WALLER, B. J.; BEECH, M. G. The production of strawberry plant from callus culture. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, v. 12, 1988. p. 235-241.

KANNAN, V.R.; JASRAI, Y.T. Micropropagation of *Gmelina arborea*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.46, 1969. p.269-271.

KING, J.E. Relationship between yield loss and severity of yellow rust recorded on large number of single stems of wheat. **Plant Pathology**, 1976. p.172-177.

KOHLHEPP, G. Conflitos de interesse no ordenamento territorial da Amazônia. Estudo Avançados, v.16, n.45, São Paulo, 2002. p. 37-61.

KROETZ, M. et.al., A evolução da agropecuária regional. In: **III Encontro de Economia Catarinense: Home Eventos Programa Comissões**. FURB – Blumenau/SC, 2009.

KRIKORIAN, A. D. Propagación clonal in vitro. In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. **Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos e aplicaciones**. Cali: CIAT. 1991. p.970.

LANDA, F.S.L. et al. Indução *in vitro* de calos em explantes foliares de pequi (Caryocar brasiliense Camb.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24 (Edição Especial), 2000. p.56-63.

LEDO, A. da S. et al. Crescimento inicial de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) em diferentes meios de germinação in vitro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 4, 2007.

LIMA, R. V. et al. Germinação in vitro de urucu. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 29, n. 1, 2007.

LIMA, D.; POZZOBON, J. Amazônia socioambiental: sustentabilidade ecológica e diversidade social. *Estudos avançados*, v.19, n. 54, São Paulo, 2005. p. 45-76.

LITZ, R. E.; CONOVER, R. In vitro propagation of papaya. **HortScience**, Alexandria, v. 13, n. 3, 1978. p. 241-242.

LITZ, R. E. Cultivo de embriones y óvulos. In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. 1991. **Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos e aplicaciones**. Cali: CIAT. 1991. p.970.

LITZ, R. E.; JARRET, R. L. Regeneración de plantas em el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. 1991. **Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos e aplicaciones**. Cali: CIAT. 1991. p.970.

LU, C. The use of thidiazuron in tissue cultures. **In Vitro, cellular and developmental biology Plant**, Oxon, v. 29, n. 2, 1993. p. 92-96.

MACIEL, A. L. de R.; PASQUAL, M.; PEREIRA, A. R.; REZENDE, J. C. de; SILVA, A. B.; DUTRA, L. F. Embriogênese somática indireta em explantes foliares de *Coffea arabica* L. Cv. Obatã. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n.1, 2003. p.107-116.

MARTINOTTO, C. et al. Efeito da escarificação e luminosidade na germinação in vitro de sementes de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 6, 2007.

MATEO-SAGASTA, L. A. **Cultivo in vitro de las plantas superiores**. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, 1990. p. 89-94.

MIURA, A.K. **Manual de plantas amazônicas**. Curitiba: IEA, p.45-47, 1993.

MONNIER, M. Culture *in vitro* de l'embryon médium for growth and bio assays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plant**. 1976. p.473-497.

MONTEIRO-HARA, A.C.B. de A. **Cultivo in vitro de três espécies do gênero Passiflora**, 2000. 82f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/USP, Piracicaba, 2000.

MORA-URPI, J. Polinización em *Bactris basipaes* H.B.K. (Palmae): nota adicional. **Revista de Biología Tropical**, San José, v.30, 1982. p.174-176.

MORA-URPI, J. El Pejibaye (*Bactris Gasipaes* H.B.K.): Oríem, Biología Floral y Manejo Agronómico. In: **Palmeiras poco utilizadas de América tropical**, Reunión de consulta. (Proceedings of the workshop on underutilized palms of tropical América, Turrialba, Costa Rica). 1983. FAO. Vol. 43. FAO/CATIE, San José, Costa Rica, 1983. p 118-160.

MORA-URPI, J. VARGAS, E.; LOPES, C.A.; VILLAPLANA, M.; ALLON, G.; BLANCO, C. **The Pejibaye Palm** (*Bactris gasipaes* H.B.K.) Food and agriculture Organization of the United Nations, San Jose, Costa Rica, 1984.

MOTOS, J. R. Micropropagação: uma alternativa cada vez mais utilizada para a propagação de flores e plantas ornamentais. **Ibraflor**, informativo, ano IV, nº17, 1998.

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

NEVES, E. J. M.; SANTOS, A. F.; MARTINS, E. G.; RODIGHERI, H.R.; BELLETTINI, S.; CORRÊA JUNIOR, C. Manejo de Pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth) para Palmito em Áreas sem Restrições Hídricas. **Circular Técnica 89**, Embrapa Rondônia, Colombo, PR, Dez., 2004.

NEHRA, N. S.; STUSHNOFF, C.; KARTHA, K. K. Regeneration of plant from immature leaf – derived callus of strawberry (*Fragaria ananassa*). **Plant Science**, v. 66, 1990. p.119-126.

NOGUEIRA, R. C. et al. Indução de calos em explantes foliares de murici-pequeno. **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, n.2, 2007. p.366-370.

PALÚ, E. G.; SILVA, A. B. da; PASQUAL, M. Calogênese *in vitro* em anteras de *Coffea arabica* L. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 4, jul./ago., 2004. p. 736-742.

PEREIRA, C.E.; VON PINHO, E.V.R.; KIKUTI, A.L.P. Determinação de inibidores da germinação no espermoderma de sementes de café. In: Congresso Brasileiro de Sementes. 2001. Curitiba. **Anais...** Informativo ABRATES, v.11, n.2, Curitiba, set., 2001. p. 58.

PIERIK, R. L. M. **In vitro culture of higher plants**. Martinus Nijhoff Publishers, Boston, 1987.

RENA, A.B.; MAESTRI, M. Fisiologia do cafeeiro. In: RENA, A.B.; MALAVOLTA, E.; ROCHA, M.; YAMADA, T. Cultura do Cafeeiro: fatores que afetam a produtividade. Piracicaba: **POTAFÓS**, 1986. p.13-85.

REUVENI, O.; SHLESINGER, D. R.; LAVI, U. In vitro clonal propagation of dioecious *Carica papaya*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 20, n.1, 1990. p.41-46.

ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. **Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos e aplicaciones**. Cali: CIAT. 1991. p.970.

ROTHSCHUH, J. Guia Técnico Para o Cultivo del Pejibaye (*Bactris gasipaes* H.B.K.) Ministério de Desarrollo Agropecuario y Reforma Agraria; **IICA**. Fondo Simon Belivar, 1983. p. 24.

SAMPAIO, L. C.; NETO, S. N. O.; LELES, P. S. S.; SILVA, J. A.; VILLA E. B. Análise técnica e econômica da produção de palmito de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth.) e de palmeira-real (*Archontophoenix alexandrae* Wendl. & Drude). **Revista Floresta e Ambiente**. v. 14, n. 1, 2007.

SANTANA-BUZZY, N.; ROJAS-HERRERA, R.; GALAZÁVALOS, R. M.; KU-CAUICH, J. R.; MIJANGOS-CORTÉS, J.; GUTTIÉRREZ-PACHECO, L. C.; CANTO, A.; QUIROZFIGUEROA, F.; LOYOLA-VARGAS, V. Advances in coffee tissue culture and its practical applications. **In Vitro Cell Developmental Biology Plant**, New York, v. 43, 2007. p. 507- 520.

SANTOS, A. C. P.; CORDEIRO, A. T.; CAMPOS, M. R. C.; OTONI, W. C.; ZAMBOLIM, L. Calogênese em *Coffea* via cultura semi-sólida. In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil (1.: 2000 : Poços de Caldas, MG). **Resumos expandidos**. Brasília, D.F. : Embrapa Café; Belo Horizonte : Minasplan, 2v. 2000. p.156-159.

SANTOS, A. C. P.; CORDEIRO, A. T.; FIGUEIRA, M. L.; ZANETTI, R. S.; CRUZ, A. C. F.; ZAMBOLIM, L. Calogênese friável em *Coffea arabica* e *C. canephora*. In: Simpósio Brasileiro de Pesquisa dos Cafés do Brasil (2. : 2001 : Vitória, ES). **Anais...** Brasília, D.F. : Embrapa Café, 2001. (CD-ROM), p. 285-292.

SANTOS, C. G.; PAIVA, R.; GOMES, G. A. C.; PAIVA, P. D. O. Germinação in vitro de *Coffea arabica* e *Coffea canephora*. In: Simpósio Brasileiro de Pesquisa dos Cafés do Brasil (2. : 2001 : Vitória, ES). **Anais...** Brasília, D.F. : Embrapa Café, 2001. (CD-ROM), p. 363-367.

SANTOS, B. R. et. al. Indução de calos friáveis em explantes foliares de *Salix* (*Salix humboldtiana* Willd) **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.3, 2005. p.510-514.

SANTOS, C. G.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O.; PAIVA, E. Indução e análise bioquímica de calos em segmentos foliares e nodais de *Coffea canephora* L. cv. apoatã. **Magistra**, Cruz das Almas-BA, v. 20, n. 1, jan./mar., 2008. p. 22-29.

SCHMILDT, E. R. **Enraizamento in vitro e ex vitro de ramos de mamoeiro (Carica papaya L.)**. 1994. Dissertação. (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1994.

SIQUEIRA, E.R. de; INOUE, M.T. Propagação vegetativa do coqueiro através da cultura de tecidos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.27, n.4, 1992. p.639-646.

SOARES, F.P.; PAIVA, R.; SANTOS, B.R.; TAVARES, T.S.; NOGUEIRA, R.C.; SANTOS, M.B. dos. Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D na formação de calos em segmentos nodais de nim (*Azadirachta indica*). In: I CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 1. 2003, Lavras-MG. **Anais...**, Lavras: ABCTP, 2003, p. 334.

SOUZA, A.G.C.; SOUZA, N.R.; SILVA, S.E.L.; NUNES, C.D.M.; CANTO, A.C.; CRUZ, L. A. A. **Fruteiras da Amazônia**. Brasília: Embrapa/SPI. 1996.

STEIN, V. C. et al . Germinação in vitro e ex vitro de *Inga vera* Willd. subsp. affinis (DC.) T.D. Penn. **Ciência e Agrotecnologia**. , Lavras, v. 31, n. 6, 2007.

TEIXEIRA, J. B. Limitações de ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas. Disponível em <<<http://www.redbio.org.br>>>. Acesso em 26 de novembro de 2009.

TORRES, C.A.; CALDAS, S. C.; BUSO, A. B. Meios Nutritivos. In: CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P. ; FERREIRA, M. E. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA-CNPB/EMBRAPA-SPI, 1998a. P. 102- 106.

TORRES, C.A. ; CALDAS, S. C. ; BUSO, A. B. Cultura de Ápices Caulinares e Recuperação de Plantas Livres de Vírus. In: **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA-CNPB/EMBRAPA-SPI, 1998b. P. 133-136.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas. Brasília: **ABCTP/EMBRAPA-CNPB**, 1990. p. 99-169.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. Biotecnologia na agricultura e na agroindústria. Guaíba: **Agropecuária**, 2001. p.257-276.

TOZETTI, A. D.; CONTEL, E. P. B. Padronização da isoenzima 6-fosfogluconato desidrogenase em pupunha (*Bractris gasipaes* H.B.K.). **Revista Científica Eletrônica Agronomia**, semestral – ano II, nº 4, São Paulo, Dez., 2003.

TSURO, M. Efficient plant regeneration from multiple shoots formed in the leaf-derived callus of *Lavandula vera*, using the “open culture system”. **Scientia Horticulturae**, v.86, 2000. p.81-88.

UHL, N, W. **Genera Plantarum e Internacional Palm Society**, Allen Press, Lawrence, KS. 1987.

VEIGA, J. E. **Territórios para um desenvolvimento sustentável**. In: Territórios, Ciência & Cultura, n. 58, jan./mar. São Paulo: 2006.

VENTURIERI, G. A.; VENTURIERI, G. C. Calogênese do híbrido *Theobroma grandiflorum* x *T.obovatum* (Sterculiaceae), **Acta Amazonica** v. 34 n. 4, 2004. p. 507-511.

VERRUMA-BERNARDI, M. R.; MORAES, C. W. S.; MACHADO, C. A.; KAJISHIMA S.; COSTA, E. Q. Análise descritiva quantitativa do palmito de pupunheira. **Acta Amazônica**, v. 37, n. 4, 2007.

VIEIRA, L.G.E.; KOBAYASHI, A. K. Micropropagação do cafeeiro. In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil (1.: 2000 : Poços de Caldas, MG). **Palestras**. Brasília, D.F. : Embrapa Café, 2002. (374p.), p. 147-167.

VILLACHICA. Pijuayo *Bactris gasipaes* H. B. K. In_____. **Frutales y Hortalizas Promissorios de la Amazônia**. Lima: ICA, cap. 31, 1996. p. 215-226.

WANG, Y.H. & BHALLA P.L. Somatic embryogenesis from leaf explants of Australian from flower *Scaevola aemula* R. Br. **Plant Cell Report**, 2004. p.408-414.

WINNAAR, W. Clonal propagation of papaya in vitro. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 12, n. 3, 1988. p. 305-310.

YUYAMA, K.; SILVA, F. M. S. Desenvolvimento inicial da pupunheira em monocultivo e intercalado com culturas anuais. **Horticultura Brasileira**, vol.21, nº1, Brasília, Jan./Mar. 2003.

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](#)