

**DOUGLAS ANDRÉ STEINMACHER**

**GERMINAÇÃO *IN VITRO*, CRIOPRESERVAÇÃO E  
EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM PUPUNHA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito à obtenção do título de MESTRE EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS.

**Orientador: Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra**

Florianópolis

2005

À Nádia G. Krohn, por sua beleza  
e apoio incondicional,  
**Ofereço.**

Aos meus pais  
Álvaro e Mirta Steinmacher.  
Por vossa confiança e carinho,  
**Dedico.**

**“Se pude enxergar mais longe,  
foi porque me pus de pé nos  
ombros de um gigante”.**

Isaac Newton

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer aos meus pais, Álvaro e Mirta Steinmacher, e minhas irmãs Nádia e Fernanda Steinmacher, que sempre confiaram em meus sonhos e me ensinaram a acreditar que é possível realizá-los, além de me mostrarem que trabalho e perseverança são as ferramentas ideais para atingirmos nossas metas.

A Nádia G. Krohn, a quem eu ofereço este trabalho, por sempre estar me apoiando, acreditando na minha capacidade e me trazendo muitas felicidades.

Meus sinceros agradecimentos ao Prof. Miguel P. Guerra com grande admiração, pelo excelente convívio e amizade e pelos conhecimentos transmitidos.

Ao Prof. Charles R. Clement, pelo apoio à realização deste projeto, envio de material vegetal e pelas constantes contribuições.

Ao Prof. Aparecido L. da Silva por sua amizade, por acreditar nas minhas conquistas e importantes sugestões.

Ao Sr. Carlos e a Sra. Iraci de Toledo, pela amizade, material vegetal doado e confiança no projeto.

Ao Projeto RECA, ao qual almejo sucesso, em especial a Eunice Sordi pelo envio de material vegetal.

À Maria Luisa Peixoto e ao Beto, pelo auxílio técnico e pela amizade construída.

Ao amigo Lírio L. dal Vesco pelas conversas, colaboração e companheirismo.

Meus agradecimentos também à Cleber W. Saldanha, cuja ajuda foi essencial ao desenvolvimento deste trabalho.

Às amigas Adriana Dantas, Gabriela Cangahuala-Inocente e Neusa Steiner, pela importante colaboração em todas as etapas de meu trabalho.

Aos meus amigos: Richard W. Lischka, Clarissa A. Caprestano, Luciana Leite, Marcelo Borghezan (*quase coloquei Dr. Pópo*), Giampaolo Marchesi, Paulo Teixeira, Karine L. dos Santos, Liziane Kadine A. de Moraes e Monita F. de Abreu pelo excelente convívio.

Aos *deutsch* Leocir Welter, Marcelo Rogalski e Valdir M. Stefenon pela amizade e artigos enviados.

Enfim, à todos que de alguma forma contribuíram para minha formação meus sinceros agradecimentos.

## INDÍCE

ABREVIATURAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	vi
1 INTRODUÇÃO GERAL	1
2 OBJETIVO GERAL	3
<b>CAPÍTULO I – Estado da arte e situação do problema</b>	<b>4</b>
1 INTRODUÇÃO	4
1.1 Descrição Botânica e Origem da Espécie	4
1.2 Importância Econômica	4
1.3 Recursos Genéticos da Espécie	6
2 GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS	8
3 CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS	10
4 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA	13
4.1 Introdução	13
4.2 Aquisição da competência embriogenética	15
4.3 Embriogênese somática em palmeiras	18
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
<b>CAPÍTULO II - Germinação <i>in vitro</i> de embriões zigóticos de pupunha</b>	<b>28</b>
1 RESUMO	28
2 ABSTRACT	29
3 INTRODUÇÃO	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Material Vegetal	31
4.2 Meios de cultura e condições de cultivo	32
4.3 Delineamento estatístico	32
5 RESULTADOS	34
6 DISCUSSÃO	38
7 CONCLUSÕES	40
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
<b>CAPÍTULO III – Criopreservação de embriões zigóticos de pupunha</b>	<b>43</b>
1 RESUMO	43
2 ABSTRACT	44
3 INTRODUÇÃO	45
4 MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1 Material Vegetal	46
4.2 Procedimentos para o encapsulamento e criopreservação	47
4.3 Procedimentos para a germinação <i>in vitro</i>	48
4.4 Análises Histoquímicas	48
4.5 Aclimatização das plântulas	48
4.6 Delineamento estatístico	49
5 RESULTADOS	50
6 DISCUSSÃO	56
7 CONCLUSÕES	59
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

<b>CAPÍTULO IV – Embriogênese somática em pupunha</b>	<b>63</b>
<b>I - Utilização de embriões zigóticos como fonte de explantes</b>	<b>63</b>
1 RESUMO	63
2 ABSTRACT	64
3 INTRODUÇÃO	65
4 MATERIAL E MÉTODOS	66
4.1 Material Vegetal	66
4.2 Meios de cultura e condições de cultivo	66
<i>Ensaio A: Efeito do Picloram e do 2-iP</i>	66
<i>Ensaio B: Efeito do AgNO<sub>3</sub></i>	67
4.3 Análises Morfo-Histológicas e Bioquímicas	67
4.4 Aclimatização das plântulas	68
4.5 Delineamento estatístico	69
5 RESULTADOS	70
5.1 Ensaio A: Efeito do Picloram e do 2-iP	70
5.2 Ensaio B: Efeito do AgNO <sub>3</sub>	71
5.3 Caracterização Morfo-histológica e Bioquímica	72
5.4 Aclimatização das Plântulas	77
6 DISCUSSÃO	78
7 CONCLUSÕES	82
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
<b>II - Utilização de Inflorescências como fonte de explantes</b>	<b>88</b>
1 RESUMO	88
2 ABSTRACT	89
3 INTRODUÇÃO	90
4 MATERIAL E MÉTODOS	91
4.1 Material Vegetal	91
4.2 Meios de cultura e condições de cultivo	91
4.3 Delineamento estatístico	92
5 RESULTADOS	92
6 DISCUSSÃO	95
7 CONCLUSÕES	101
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
<b>III - Aplicação da metodologia de TCL</b>	<b>104</b>
1 RESUMO	104
2 ABSTRACT	105
3 INTRODUÇÃO	106
4 MATERIAL E MÉTODOS	107
4.1 Material Vegetal	107
4.2 Meios de cultura e condições de cultivo	109
4.3 Aspectos histológicos	109
4.4 Delineamento estatístico	110
5 RESULTADOS	110
5.1 Aspectos Morfo-histológicos	112
6 DISCUSSÃO	114
7 CONCLUSÕES	119
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119
CONSIDERAÇÕES FINAS E PERSPECTIVAS FUTURAS	123

**ABREVIATURAS**

2,4-D	Ácido 2,4-diclofenolacético
2-iP	2-isopenteniladenina
AAB	Ácido absísico
AgNO <sub>3</sub>	Nitrato de prata
AIB	Ácido Indol Butírico
ANA	Ácido naftalenoacético
BA	6-benzilamino
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de cálcio
Dicamba	Ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico
DMSO	Dimetilsulfoxido
DNA	Ácido Desoxiribunucleico
KDa	Kilo Daltons
MS	Meio de cultura proposto por Muraschige & Skoog, 1962
NaClO	Hipoclorito de sódio
PAGE	Gel de Poliacrilamida
PAS	Ácido periódico de Schiff
PBZ	Paclobutrazol
Picloram	Ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
PVC	Cloropolivinila
SDS	Dodecil sulfato de sódio
WH	Meio de cultura proposto por White, 1942
Y3	Meio de cultura proposto por Eeuwens, 1976

## LISTA DE FIGURAS

<b>CAPÍTULO I – Estado da arte e situação do problema</b>	<b>4</b>
<b>FIGURA 1.</b> Aspectos gerais da pupunha ( <i>Bactris gasipaes</i> Kunth).	5
<b>FIGURA 2.</b> Distribuição geográfica de pupunha ( <i>Bactris gasipaes</i> Kunth) e suas diferentes raças.	5
<b>FIGURA 3.</b> Processo esquemático de dois ciclos para indução e para a modulação da embriogênese somática.	18
 <b>CAPÍTULO II - Germinação <i>in vitro</i> de embriões zigóticos de pupunha</b>	 <b>28</b>
<b>FIGURA 1.</b> Germinação <i>in vitro</i> de embriões zigóticos de pupunha ( <i>Bactris gasipaes</i> Kunth).	37
 <b>CAPÍTULO III – Criopreservação de embriões zigóticos de pupunha</b>	 <b>43</b>
<b>FIGURA 1.</b> Criopreservação de embriões zigóticos de pupunha	52
<b>FIGURA 2.</b> Valores obtidos para a criopreservação de embriões zigóticos de pupunha ( <i>B. gasipaes</i> Kunth).	53
<b>FIGURA 3.</b> Análises histológicas de embriões zigóticos de pupunha ( <i>B. gasipaes</i> Kunth) submetidos à desidratação e à criopreservação.	55
<b>FIGURA 4.</b> Representação esquemática do protocolo proposto para a criopreservação de embriões zigóticos de pupunha.	60
 <b>CAPÍTULO IV – EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM PUPUNHA:</b>	 <b>63</b>
<b>I - Utilização de embriões zigóticos como fonte de explantes</b>	<b>63</b>
<b>FIGURA 1.</b> Efeito de diferentes concentrações de AgNO <sub>3</sub> na massa fresca de calos, obtidos a partir de embriões zigóticos de pupunha ( <i>B. gasipaes</i> Kunth).	71
<b>FIGURA 2.</b> Efeito de diferentes concentrações AgNO <sub>3</sub> na indução de calos com características embriogênicas e no número de embriões somáticos obtidos a partir de embriões zigóticos de pupunha ( <i>B. gasipaes</i> Kunth).	72
<b>FIGURA 3.</b> Embriogênese somática a partir de embriões zigóticos de pupunha ( <i>B. gasipaes</i> ).	74
<b>FIGURA 4.</b> Análises histológicas da embriogênese somática a partir de embriões zigóticos de pupunha ( <i>B. gasipaes</i> ).	75
<b>FIGURA 5.</b> Análise do perfil protéico em gel de poliacrilamida-SDS de calos primários de pupunha ( <i>B. gasipaes</i> ) sem competência embriogênica (NE), com competência embriogênica (E) e dos calos embriogênicos propriamente ditos (CE) induzidos em meio de cultura MS suplementado com 10µM de picloram. Padrão de peso molecular (Sigma-Marker <sup>®</sup> 4038).	76
<b>FIGURA 6.</b> Efeito do pré-tratamento com PBZ na aclimatização de plântulas de pupunha ( <i>B. gasipaes</i> Kunth) regeneradas por embriogênese somática.	77
<b>FIGURA 7.</b> Representação esquemática do protocolo proposto para a regeneração de plântulas de pupunha a partir de embriões zigóticos maduros como fonte de explantes.	83
 <b>II - Utilização de inflorescências como fonte de explantes</b>	 <b>88</b>
<b>FIGURA 1.</b> Embriogênese somática e regeneração de plântulas a partir de inflorescências de pupunha ( <i>Bactris gasipaes</i> Kunth).	96
<b>FIGURA 2.</b> Representação esquemática do protocolo proposto para a regeneração de plântulas de pupunha a partir de inflorescências não emitidas como fonte de explantes.	100

**III - Aplicação da metodologia de TCL****104**

- FIGURA 1.** Modelo esquemático para a obtenção de explantes a partir de plântulas de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth) cultivadas *in vitro*. 108
- FIGURA 2.** Efeito de diferentes posições do explante e de diferentes concentrações de picloram para a percentagem de indução de calos primários após três meses de cultivo em explantes obtidos a partir de plântulas de pupunha (*B. gasipaes* Kunth) cultivadas *in vitro*. 111
- FIGURA 3.** Efeito de diferentes posições do explante e de diferentes concentrações de picloram para a percentagem de indução de calos embriogênicos após cinco meses de cultivo em explantes obtidos a partir de plântulas de pupunha (*B. gasipaes* Kunth) cultivadas *in vitro*. 112
- FIGURA 4.** Embriogênese somática em explantes obtidos a partir de plântulas de pupunha (*B. gasipaes*) mantidas *in vitro*. 115
- FIGURA 5.** Análises histológicas da embriogênese somática em explantes obtidos a partir de plântulas de pupunha (*B. gasipaes*) mantidas *in vitro*. 116

## LISTA DE TABELAS

<b>CAPÍTULO I – Estado da arte e situação do problema</b>	<b>4</b>
<b>TABELA 1</b> - Alguns exemplos de trabalhos com a cultura de embriões zigóticos de palmeiras (Família: Arecaceae).	10
<b>CAPÍTULO II - Germinação <i>in vitro</i> de embriões zigóticos de pupunha</b>	<b>28</b>
<b>TABELA 1</b> - Composição química das diferentes composições salinas utilizadas para a germinação <i>in vitro</i> de embriões zigóticos de pupunha ( <i>Bactris gasipaes</i> Kunth).	33
<b>TABELA 2</b> - Efeito de diferentes composições salinas no meio de cultura na percentagem de germinação aos 30 dias após a inoculação e para a altura da parte aérea (cm) aos 90 dias após a inoculação de embriões zigóticos de pupunha ( <i>B. gasipaes</i> ) germinados <i>in vitro</i> na presença ou ausência de carvão ativado (1,5 g.L <sup>-1</sup> ).	35
<b>TABELA 3</b> - Efeito de diferentes composições salinas no meio de cultura para o número de raízes e classes de tamanho de haustório (0 – ausência; 1 – haustório <3 mm; 2 – haustório entre 3 e 5 mm; 3 – haustório >5 mm) aos 90 dias após a inoculação de embriões zigóticos de pupunha ( <i>B. gasipaes</i> ) germinados <i>in vitro</i> na presença ou ausência de carvão ativado (1,5 g.L <sup>-1</sup> ).	36
<b>TABELA 4</b> - Correlação entre a presença e tamanho de haustório e as variáveis de percentagem de germinação, altura da parte aérea (cm) e número de raízes de embriões zigóticos de pupunha ( <i>B. gasipaes</i> ) germinados <i>in vitro</i> em meio de cultura com diferentes composições salinas na presença ou ausência de 1,5 g.L <sup>-1</sup> de carvão ativado..	36
<b>CAPÍTULO III – Criopreservação de embriões zigóticos de pupunha</b>	<b>43</b>
<b>TABELA 1</b> - Efeito da criopreservação e do pré-tratamento em meio de cultura com 1M de sacarose durante 24h para a germinação de embriões zigóticos e para a altura da parte aérea de plântulas de pupunha ( <i>B. gasipaes</i> Kunth) e teste <i>F</i> para os fatores avaliados.	51
<b>CAPÍTULO IV – Embriogênese somática em pupunha</b>	<b>63</b>
<b>I - Utilização de embriões zigóticos como fonte de explantes</b>	<b>63</b>
<b>TABELA 1</b> - Efeito de diferentes concentrações de Picloram (0; 10; 20 e 40 µM) e de 2iP (0 e 5 µM) suplementado ao meio de cultura para a percentagem de indução de calos primários e de calos embriogênicos a partir de embriões zigóticos de pupunha ( <i>B. gasipaes</i> Kunth) e teste <i>F</i> para os fatores testados.	71
<b>II - Utilização de Inflorescências como fonte de explantes</b>	<b>88</b>
<b>TABELA 1</b> - Efeito de diferentes fontes e concentrações de auxina suplementadas ao meio de cultura para as respostas morfogênicas de inflorescências não-emitidas de pupunha ( <i>B. gasipaes</i> Kunth).	94
<b>TABELA 2</b> - Efeito de diferentes estágios de desenvolvimento ( <i>Infl1</i> - 5-8 cm; <i>Infl2</i> - 8-12 cm; <i>Infl3</i> - 12-16 cm) e do pré-tratamento em meio de cultura contendo 200 µM de 2,4-D durante 30 dias nas respostas morfogênicas de inflorescências não-emitidas de pupunha ( <i>B. gasipaes</i> Kunth) e teste <i>F</i> para estes fatores e sua interação.	95

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth – Arecaceae) é uma palmeira domesticada, com provável centro de diversidade no sudoeste da Amazônia. São relatadas várias utilizações para a mesma, como a produção de palmito, o consumo dos frutos cozidos, a produção de farinha para consumo humano e animal, além da produção de óleo. A existência de genótipos ou ideótipos de pupunha para a produção de palmito ou frutos tem sido descrita, porém pesquisadores relatam dificuldades relacionadas ao seu melhoramento genético.

Trabalhos com a pupunha sugerem o emprego de técnicas baseadas na cultura *in vitro* para o melhoramento genético e para a conservação desta espécie. O melhoramento genético convencional desta espécie pode levar muito tempo, devido às suas características botânicas, como longo ciclo juvenil e presença de auto-incompatibilidade. Desse modo, a inserção de protocolos baseados na propagação clonal *in vitro* pode reduzir o tempo necessário para o melhoramento genético, principalmente por possibilitar a captura e a fixação do ganho genético de plantas selecionadas. Da mesma forma, os programas de conservação para a pupunha podem empregar diretamente os protocolos de cultura de *in vitro*, como uma forma alternativa e complementar à conservação, através do desenvolvimento de replicatas em bancos de germoplasma *ex situ* de pupunha.

Para a conservação *ex situ* de plantas cujas sementes são recalcitrantes, como a pupunha, a criopreservação é tida como uma aproximação segura para a conservação em longo prazo e o desenvolvimento de protocolos para esta técnica vem sendo realizado para diferentes espécies vegetais.

A embriogênese somática é baseada na teoria da totipotencialidade das células vegetais e consiste na formação de estruturas bipolares sem conexão vascular com o tecido matriz, apresentando o padrão de desenvolvimento similar ao observado para embriões zigóticos. Esta técnica apresenta várias vantagens sobre os demais métodos de micropropagação, incluindo a possibilidade de automação com obtenção de grande número de propágulos e a menor incidência de variação somaclonal.

Para uma melhor compreensão dos resultados, o texto foi estruturado na forma de capítulos, sendo que no capítulo I é apresentada a revisão de literatura, retratando a situação do problema e o estado da arte das técnicas propostas. No capítulo II estão descritos os fatores que interferem na germinação *in vitro* de embriões zigóticos de pupunha, que pode se constituir numa ferramenta para a aplicação de vários protocolos de cultura de tecidos. No capítulo III

estão apresentados os resultados obtidos para a criopreservação de embriões zigóticos. O capítulo IV aborda a embriogênese somática em diferentes fontes de explantes. Este capítulo foi dividido em três sub-capítulos, considerando que foram desenvolvidos estudos utilizando três fontes de explantes, em experimentos independentes. Dessa forma, no Capítulo IV.I é descrito um protocolo regenerativo a partir de embriões zigóticos como fonte de explantes, enquanto que no capítulo IV.II são apresentados os resultados obtidos a partir de inflorescências não emitidas como fonte de explantes. Por fim, no capítulo IV.III é apresentado um protocolo baseado na metodologia de TCL, empregando plântulas germinadas *in vitro* como fonte de explantes.

## 2 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente trabalho foi elucidar os aspectos envolvidos na germinação *in vitro* e criopreservação de embriões zigóticos, como também na regeneração de plântulas por embriogênese somática utilizando diferentes fontes de explantes.

Os objetivos específicos foram:

Estabelecer um protocolo para a germinação *in vitro* de embriões zigóticos;

Estudar os fatores que afetam a criopreservação de embriões zigóticos pela técnica de desidratação-encapsulamento;

Avaliar o efeito das condições de cultivo na embriogênese somática;

Caracterizar as principais alterações morfo-histológicas da embriogênese somática de pupunha;

Estudar a técnica de TCL para a indução de embriogênese somática em pupunha.

## CAPÍTULO I - ESTADO DA ARTE E SITUAÇÃO DO PROBLEMA

### 1 INTRODUÇÃO

#### 1.1 Descrição Botânica e Origem da Espécie

A pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth) pertence à família Arecaceae (Palmae) e também é identificada com as sinônimas *Guilielma speciosa* Martius, *G. utilis* Oersted, *G. gasipaes* (H.B.K.) L.H. Bailey.

A pupunha é uma palmeira cespitosa (Figura 1.A) que pode atingir 20 m de altura. O diâmetro do caule varia de 15 a 30 cm e o comprimento dos entrenós de 2 a 30 cm. Os entrenós são armados com numerosos espinhos rígidos (Figura 1.D), em tons de cores variando entre o preto ou marrom escuro, entretanto, existem mutações sem espinhos, selecionadas pelos ameríndios em diversas áreas de ocorrência da espécie. O ápice da estipe sustenta uma coroa formada por 15 a 25 folhas pinadas, com os folíolos inseridos em diferentes ângulos. A inflorescência monóica aparece nas axilas das folhas senescentes. Após a polinização, os cachos (Figura 1.C) podem conter entre 50 a 1000 frutos e pesar de 1 a 25 kg. Os frutos individuais pesam entre 10 e 250 g e apresentam grande valor econômico. O fruto maduro (Figura 1.B) possui um epicarpo fibroso que varia de cor, podendo ser vermelha, laranja ou amarela, e um mesocarpo amiláceo ou oleoso e úmido, com um endocarpo envolvendo um endosperma fibroso e oleoso (Clement, 1987).

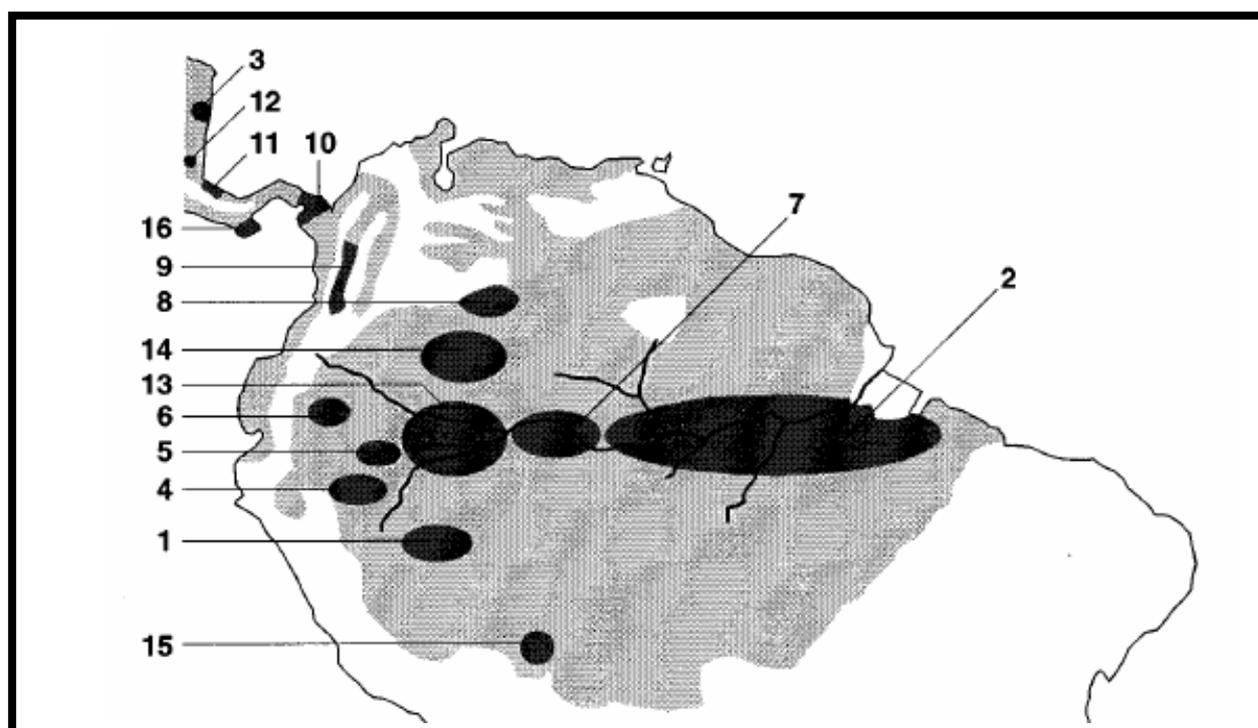
Devido à necessidade de armazenamento dos frutos pelos ameríndios nas épocas de estiagem foi realizada uma seleção de plantas e, assim, um início de domesticação da espécie. Dessa forma, tem-se que seu centro de diversidade encontra-se na bacia amazônica com seu provável centro de origem seja no sudoeste da Amazônia (Figura 2) (Clement, 1987; 1988; 1990).

#### 1.2 Importância Econômica

No norte da América do Sul numerosas espécies do gênero *Bactris* são usadas ocasionalmente em virtude de seus frutos comestíveis, porém nenhuma delas atinge a importância alimentar da pupunha (Clement, 1987). Pelo valor nutricional do fruto e a variedade de alimentos obtidos a partir da pupunha, essa palmeira era um dos principais produtos alimentícios básicos para muitas comunidades de ameríndios da América Central e do Sul (Clement, 1988).



**FIGURA 1.** Aspectos gerais da pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth). A – Planta adulta apresentando vários perfilhos em sua base. B – Cacho de frutos de pupunha. C – Aspecto dos frutos e sementes de pupunha. D – Estipe com presença de espinhos nos entre-nós.



**FIGURA 2.** Distribuição geográfica de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth) e suas diferentes raças: Microcarpa (1) Juruá, (2) Pará, (3) Rama, (16) Azüero; Mesocarpa (4) Pampa Hermosa, (5) Tigre, (6) Pastaza, (7) Solomões, (8) Inirida, (9) Cauca, (10) Tuirá, (11) Utilis, (12) Guatuso; Macrocarpa (13) Putumayo, (14) Vaupés. Fonte: Mora-Urpí et al. (1997)

Mora-Urpí et al. (1997) descreveram várias utilizações para a pupunha, dentre as quais se destacam a produção de palmito, o consumo do fruto cozido, à produção de farinha para consumo humano e animal e à produção de silagem a partir de frutos ou mesmo de resíduos provenientes da colheita do palmito (Rodrigues Neto et al., 2001), além da produção de óleo (Mora-Urpí et al., 1997).

Pesquisas revelaram que os frutos de pupunha são uma excelente fonte alimentícia, essencialmente energética, com boas quantidades de lipídios, caroteno (pró-vitamina A), baixa quantidade de proteínas, porém com a presença de todos os aminoácidos essenciais (Yuyama et al., 2003). Apesar destas qualidades, sua utilização não tem despertado o interesse econômico industrial resultando apenas no consumo em mercados regionais (Clement et al., 2004).

Dentre todos os recursos alimentícios que a pupunha apresenta atualmente o palmito é o produto de maior importância econômica. Os fatores que fazem com que uma espécie seja preferida em relação à outra são a abundância, a palatabilidade, a cor, o formato, a ausência de princípios tóxicos, o rendimento e a facilidade de extração (Bovi, 1997), sendo todas essas características atendidas pela pupunha. Adicionalmente, o palmito desta espécie apresenta baixa atividade das enzimas peroxidase e polifenoloxidase, o que possibilita a comercialização *in natura* do mesmo, abrindo novos nichos de mercado (Clement et al., 1999).

### **1.3 Recursos Genéticos da Espécie**

A pupunha cultivada hoje é um complexo de diversas populações (Mora-Urpi et al., 1997). Diferenças fenotípicas em peso e composição da polpa da fruta, estipe inerme, diâmetro de caule, área foliar, susceptibilidade à pragas e à doenças e outros caracteres têm sido observados em diferentes populações no campo e em bancos de germoplasma (Martel & Clement, 1987; Nishikawa, 1995; Neto, 1999). Essa ampla diversidade genética pode ser explicada pelos diferentes estágios de domesticação em diferentes ambientes como também por seu sistema de reprodução predominantemente alógamo (Clement, 1999).

Um critério inicial de classificação das raças e populações de pupunha foi definido utilizando o tamanho dos frutos como referência, sendo divididos em três grupos raciais. Essa característica de tamanho de fruto pode ser correlacionada com o grau de domesticação das diferentes raças. A raça Microcarpa, enquadra as plantas cujos frutos pesam entre 5 e 20 g, a Mesocarpa incorpora as plantas produtoras de frutos com peso entre 20 e 70 g, e por fim, a Macrocarpa agrupa aquelas plantas cujos frutos pesam entre 70 a 120 g (Mora-Urpí et al., 1997).

A partir da variabilidade genética encontrada entre as várias populações, certas

características desejáveis para produção de frutos ou palmito podem ser encontradas em populações específicas (Mora-Urpi et al, 1997). Assim, programas de melhoramento devem partir de raças com características próximas da desejada. Como por exemplo, as raças Pampa Hermosa, Putumayo e Guatuso apresentam características que podem ser bem aproveitadas para a produção de palmito, como ausência de espinhos na estirpe. Já as raças Putumayo e Vaupes podem ser utilizadas para a produção de frutos destinados ao fabrico de farinha para consumo humano ou animal por apresentarem frutos de maior peso, e maiores quantidades de amido. Por fim, a raça Pará pode ser cultivada para a colheita de frutos destinados à produção de óleo (Clement, 1997a).

No entanto, está ocorrendo erosão genética em populações naturais de pupunha sendo que algumas dessas desapareceram completamente e várias outras ainda correm esse risco, especialmente algumas das encontradas nos vales dos Andes no Peru e em algumas áreas em desenvolvimento no Brasil (Clement, 1986).

Clement (1996) propôs que as causas da ocorrência de erosão genética nessa espécie podem ser as de ordem biológicas, que inclui pragas, doenças e falta de conhecimento sobre o manejo; as de ordem político-institucionais, incluindo falta de uma política de desenvolvimento regional coerente e com apoio nacional (ou seja, recursos de longo prazo); e aquelas de ordem infra-institucionais, incluindo especialmente a dependência da manutenção e estabelecimento de pesquisas centradas em poucas pessoas. Mora-Urpi et al. (1997) citaram que os colonizadores europeus promoveram cultivos de plantas de ciclo curto (ex. banana, arroz e milho) em detrimento de espécies de cultivo local, com especial ênfase à pupunha, causando uma grande erosão desses recursos. Ainda segundo os autores, a contaminação genética pela introdução de germoplasma de diferentes origens de uma mesma espécie também resulta na diminuição da integridade genética na maioria das famílias. No Brasil, por exemplo, a integridade da raça Putumayo está sendo ameaçada com a diluição através de hibridizações e introgressão pela raça Pampa Hermosa. Por fim, pelo fato da pupunha ser uma das poucas palmeiras domesticadas pelos ameríndios (Clement, 1987), culmina na dependência da espécie ao ser humano e assim, uma grande erosão genética desses recursos ocorreu, principalmente, devido ao declínio da população indígena Amazônica no período do contato Europeu (Clement, 1999).

Esforços para a conservação da pupunha têm sido direcionados completamente para o estabelecimento de bancos de germoplasma ativos, que servem para a pesquisa e utilização da espécie em questão, no entanto, esse modelo de conservação não pode ser considerado uma aproximação segura em longo prazo (Mora-Urpi et al., 1997). Como exemplo dessa insegurança

e instabilidade cita-se o caso do primeiro banco de germoplasma estabelecido no Brasil para conservação de pupunha, que foi realizado pelo então Instituto Agrônomo do Norte – IAN, hoje CPATU/EMBRAPA. Durante as negociações de transferência, os dados de passaporte foram perdidos, tornando a coleção apenas mais uma plantação de pupunha (Clement, 1997a), que mais tarde foi dizimada. Descontinuidades institucionais, menos drásticas, resultaram no semi-abandono na coleção de *B. gasipaes* do INPA entre 1989 e 1995. Estas descontinuidades resultaram na perda de 60% dos acessos e 82% das plantas da coleção geral de fruteiras do INPA (Clement, 1997b). Assim, nota-se que até o presente a conservação em bancos de germoplasma ativos tem sido o método mais empregado para conservação dos recursos genéticos de pupunha. Nesses bancos de conservação de germoplasma, vários problemas relacionados a ataques de pragas e doenças, altos custos de manutenção, flutuações de âmbito político e dificuldade na troca de germoplasma têm sido descritos. Todas estas características acarretam um paradigma, ou seja, erosão genética no local de conservação da espécie, fato enfrentado pela pupunha (Clement, 1997b). E, ainda mais alarmantes são os fatores antrópicos que atingem diretamente os bancos de germoplasma, como por exemplo, o roubo de palmitos dentro das coleções de campo (Marilene Leão Alves Bovi, comunicação pessoal).

A forma alternativa bastante empregada utiliza-se da conservação *ex situ* de sementes, as quais passam por um processo de dessecação e são mantidas em ambientes resfriados. No entanto, sementes de numerosas espécies nativas tropicais e subtropicais apresentam problemas ligados à conservação de sementes, devido à característica recalcitrante de tais espécies (Engelmann, 1997), e dentre essas cita-se a pupunha (Ferreira & Santos, 1992; Bovi et al., 2004). Assim, Mora-Urpí et al. (1997) citaram a cultura de tecidos como uma das formas mais promissoras para a conservação e manutenção de recursos genéticos de pupunha.

As técnicas de cultura *in vitro* possibilitam a conservação de grande número de propágulos em pequeno espaço físico, obtenção de clones para manutenção em outros bancos de germoplasma, segurança devido ao baixo risco de ataques de pragas e possibilidade de integrar essas técnicas com as demais formas de conservação (Engelmann, 1997).

## **2 GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS**

A técnica de cultura de embriões zigóticos tem importância como um método alternativo para a rápida multiplicação vegetal. Esta técnica permite estudar as necessidades nutricionais e físicas dos embriões durante o desenvolvimento *in vitro*, superar a dormência em certos tipos de sementes e, como ferramenta primordial para o melhoramento, resgatar embriões híbridos

imaturos de cruzamentos incompatíveis, nos quais ocorrem barreiras sexuais na formação de sementes (Monnier, 1995; Hu & Ferreira, 1998).

Para Raghavan (2003), a principal razão da técnica de cultura de embriões é a de permitir a manipulação do meio de cultura para estudo das respostas morfofisiológicas. Da mesma forma, trabalhos apontam que a regeneração de plântulas a partir de tecidos criopreservados é bastante influenciada pelas condições de cultivo após a criopreservação (Gagliardi et al., 2003). Neste sentido, a cultura de embriões zigóticos deve ser considerada um passo crítico para o estabelecimento destes bancos de germoplasma, integrando protocolos de criopreservação e facilitando o intercâmbio de germoplasma (Engelmann et al., 2002). Esta técnica também possibilita elucidar aspectos da fisiologia do desenvolvimento em condições *in vitro*, podendo ser utilizada como modelo para otimização dos fatores para crescimento das plântulas provenientes da micropropagação (Triques et al., 1997), da mesma forma que fornece plântulas em condições uniformes e estéreis para trabalhos de cultura de tecidos.

Em palmeiras, um dos primeiros trabalhos em cultura de tecidos envolveu o estudo do crescimento de embriões zigóticos de *Cocos nucifera*, inoculados em meio de cultura com composição salina de White (1942) modificada, adicionado do endosperma líquido desta mesma palmeira (Gutter & Wilson citados por Tabai, 1992). Após esse trabalho inicial, a germinação *in vitro* de embriões zigóticos de diferentes palmeiras tem sido descrita (Tabela 1).

O meio de cultura é um dos aspectos mais importante da cultura de embriões zigóticos, dessa maneira a seleção do mesmo é necessária para sustentar o crescimento contínuo do embrião (Monnier, 1995; Hu & Ferreira, 1998). Nesse sentido, Tabai (1992) utilizou a técnica de cultura de embriões em meio de cultura contendo sais de MS, reduzindo o tempo necessário para a obtenção de plântulas.

Entretanto, a principal dificuldade encontrada na cultura *in vitro* de embriões zigóticos de *C. nucifera* é o desenvolvimento lento das plântulas quando comparado com o crescimento de plântulas originadas de sementes germinadas *in situ* (Hoche et al., 1998). Essa característica possivelmente esteja relacionada com a menor quantidade de ácidos graxos presente nas plântulas germinadas *in vitro* devido a ausência de componentes orgânicos presentes no endosperma desta espécie (López-Villalobos et al., 2001).

Dentre todos os fatores relacionados ao meio de cultura para o cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de palmeiras a presença de carvão ativado parece influenciar positivamente tanto a germinação como o posterior crescimento das plântulas (Tabela 1). Nessas espécies, a ocorrência de oxidação dos explantes devido à liberação de compostos fenólicos no meio de

cultura é tida como um dos principais problemas relatados (Blake, 1983), sendo relatada a capacidade do carvão ativado em adsorver tais compostos (Pan & Staden, 1998).

Em relação à pupunha, a germinação *in vitro* de embriões zigóticos foi descrita por Almeida (1994), que testou diferentes fontes e concentrações de substâncias reguladoras de crescimento, e concluiu que o meio de cultura composto por sais de MS (Murashige & Skoog, 1962) isento desses reguladores resultou em maiores percentagens de germinação e crescimento das plântulas. No entanto, ensaios realizados para a germinação *in vitro* de embriões zigóticos de pupunha nessas condições mostraram um crescimento lento e alguns casos de oxidação foram observados (Steinmacher et al., 2001) indicando a necessidade de otimizar o protocolo para esta técnica.

**TABELA 1** - Alguns exemplos de trabalhos com a cultura de embriões zigóticos de palmeiras (Família: Arecaceae).

<i>Espécie</i>	<i>Meio de cultura</i>	<i>Carvão Ativado</i>	<i>Germinação (%)</i>	<i>Referência</i>
<i>Acrocomia aculeata</i>	MS	3,0g.L <sup>-1</sup>	-	Tabai, 1992
<i>Euterpe oleraceae</i>	MS	2,5g.L <sup>-1</sup>	84	Ledo et al., 2001
<i>E. edulis</i>	MS/2	1,5g.L <sup>-1</sup>	-	Guerra, 1989
<i>Calamos manan</i>	MS	2,0g.L <sup>-1</sup>	91,67	Krishnapillay et al., 1995
<i>Cocos nucifera</i>	MS	2,0g.L <sup>-1</sup>	64,3-96,3	Assy-Bah, 1986
<i>Howea fosteriana</i>	MS	0,8g.L <sup>-1</sup>	37-82	Moura & Carneiro, 1992
<i>H. fosteriana</i>	MS	2,0g.L <sup>-1</sup>	92,5	Chin et al., 1988
<i>Hyophorbe lagenicaulis</i>	MS	3,0g.L <sup>-1</sup>	20-70	Sarasan et al., 2002
<i>Mauritia flexuosa</i>	WPM	3,0g.L <sup>-1</sup>	92	Spera et al., 2001
<i>Phoenix dactylifera</i>	MS	3,0g.L <sup>-1</sup>	-	Tisserat, 1984
<i>Syagurus oleracea</i>	MS	1,5g.L <sup>-1</sup>	90	Melo et al., 2001
<i>Veitchia merrilli</i>	MS	2,0g.L <sup>-1</sup>	87,5	Chin et al., 1988

### 3 CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS

A criopreservação é definida como a conservação de material biológico em temperaturas ultrabaixas, usualmente em nitrogênio líquido a -196°C, ou em sua fase de vapor a -150°C (Santos, 2000). Uma coleção de germoplasma em nitrogênio líquido é considerada uma coleção de base e atua com caráter complementar, pois garante a estabilidade genética e a segurança do

material conservado (Santos, 2000). Contudo, a utilização da técnica também é descrita para outros fins, como a conservação de células vegetais derivadas de processos biotecnológicos (Benson et al., 1998) ou para crioterapia, técnica auxiliar na eliminação de viroses (Helliot et al., 2000).

O processo de criopreservação é, em princípio, aplicável a quaisquer tecidos que tenham capacidade de regeneração. Tal processo foi aplicado com sucesso em várias espécies vegetais, utilizando como fontes calos, células em suspensão, ápices, embriões somáticos e zigóticos (Engleman, 1997; Santos, 2000).

Dentre as vantagens deste sistema de conservação está o custo, que após o aperfeiçoamento da técnica tornou desnecessária a utilização de resfriamento programado, sendo relativamente menor quando comparado a outros métodos de conservação *in vitro*, visto que após a criopreservação do material vegetal a utilização de energia elétrica e subcultivos são dispensáveis (Engelmann, 1997; Valois, 2001; Engelmann, 2004).

No entanto, para que a conservação seja efetiva, deve haver todo o cuidado para que seja evitada a erosão genética pela perda ou redução da viabilidade dos explantes e a instabilidade genética, pelo aparecimento de mutações ou variação somaclonal, devido aos processos utilizados na cultura de tecidos (Valois, 2001). Para tanto, a metodologia escolhida deve ser comprovadamente a mais adequada e deve ser estabelecido um consistente procedimento do monitoramento das coleções criopreservadas.

O desenvolvimento de protocolos de criopreservação para espécies vegetais tem sido crescente ao longo dos últimos anos (Engelmann, 2004). De acordo com Benson et al. (1998) o principal fator relacionado ao aumento da utilização de criopreservação na conservação de plantas tem sido o concomitante aperfeiçoamento das técnicas de cultura de tecidos, aliado ao desenvolvimento de métodos de criopreservação simples e eficientes. Contudo, a validação destes novos procedimentos de criopreservação é fundamental para o desenvolvimento de bancos de germoplasma incorporando a técnica de criopreservação (Reed et al., 2001).

Para o sucesso da técnica, as células devem ser condicionadas para sobreviverem após a exposição ao nitrogênio líquido, através da manipulação da quantidade de água (Engelmann, 1997). Neste contexto, várias técnicas e protocolos têm sido sugeridos, contudo, estes são divididos em três linhas gerais, correspondendo ao congelamento lento, à vitrificação ou à desidratação.

O congelamento lento, considerado como metodologia clássica, foi o primeiro protocolo de criopreservação. Contudo, este procedimento utiliza congelamento com velocidade

programada ( $0,5$  a  $2^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ), de modo que ocorra uma desidratação induzida por congelamento. O resfriamento do compartimento extracelular faz com que a água se difunda do interior da célula e se converta em gelo na superfície das células ou entre o protoplasto e a parede celular, tendo a membrana plasmática função de barreira física, prevenindo a formação de cristais de gelo (Engelmann, 1997; Santos, 2000). O controle preciso da velocidade de congelamento e o impedimento da formação de cristais de gelo intracelular são passos críticos para o sucesso dessa técnica (Reed et al., 2001).

Por sua vez, protocolos de vitrificação envolvem o pré-tratamento dos espécimes com soluções altamente concentradas contendo aditivos, como o glicerol, o DMSO, o etileno glicol, e a sacarose, com a função de crioproteção de forma que a água intracelular permaneça no estado vítreo sem a formação de cristais de gelo (Engelmann, 1997). A água em estado vítreo é uma solução supersaturada e de alta viscosidade, o que lhe confere as propriedades mecânicas de um sólido embora não haja formação de uma estrutura cristalina (Santos, 2000). Entretanto, as soluções de vitrificação podem ser tóxicas para as células, assim, sua aplicação e remoção precisam ser controladas com precisão evitando, dessa forma, danos às células (Reed et al., 2001).

Outra metodologia descrita para a criopreservação de plantas é a desidratação dos explantes por evaporação. Esta metodologia é considerada simples, pois consiste em desidratar os explantes por exposição ao ar contínuo da câmara de fluxo ou em sílica gel, seguido de imersão rápida em Nitrogênio líquido (Engelmann, 2004). Este procedimento foi aprimorado utilizando o encapsulamento dos explantes em matriz de alginato. Esta técnica desenvolvida por Dereuddre et al. (1991) e denominada de encapsulamento-desidratação, emprega a tecnologia de sementes sintéticas combinando dois tratamentos crioprotetores, a desidratação por evaporação e pelo potencial osmótico devido às altas concentrações de sacarose as quais as cápsulas são pré-tratadas.

O principal desafio a ser contornado num processo de criopreservação é alcançar o congelamento evitando a formação de cristais de gelo intracelular, pela nucleação dos cristais de gelo (Santos, 2000). Esta nucleação dos cristais de gelo causaria a ruptura das membranas celulares, de forma que estas perderiam a função de semi-permeabilidade e compartimentalização, resultando em colapso celular (Engelmann, 1997) principalmente devido a danos físicos a ao tonoplasto, mitocôndrias e cloroplastos (Dumet & Benson, 2000).

Os principais estresses aos quais as células são submetidas nestas condições correspondem ao estresse osmótico ou por desidratação, ao estresse oxidativo e as alterações no

pH intracelular. Segundo Dumet & Benson (2000), a desidratação das células resultaria em aumento da concentração de solutos, interrupções das trocas iônicas e alterações nas interações moleculares, enquanto o estresse oxidativo afetaria os arranjos metabólicos, aumentaria a produção de radicais livres e a oxidação de lipídios, influenciando diretamente as interações das membranas celulares. Ainda segundo os autores, os danos relacionados aos aspectos mecânicos e da rehidratação estão ligados a retração permanente do citoplasma devido a diminuição do volume celular, além da lise celular, perda de compartimentalização e de eletrólitos essenciais. Da mesma forma, a alteração no pH intracelular em consequência da desidratação afetaria a atividade enzimática, o transporte iônico e também o gradiente eletroquímico. Por sua vez, Dumet & Benson (2000) citam que a ruptura dos domínios de membranas devido a formação de cristais de gelo resultaria na perda de compartimentalização e outros danos irreversíveis.

## **4 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA**

### **4.1 Introdução**

Durante o desenvolvimento vegetal, por serem sésseis, as plantas devem se adaptar a todas as condições extremas através da plasticidade do desenvolvimento vegetal. O termo plasticidade do desenvolvimento vegetal, proposto por Trewavas (1981), parte de duas características básicas, fundamentais para a sobrevivência das plantas, que é o crescimento em ápices meristemáticos e o fato de todas as células permanecerem indeterminadas internamente.

Tal característica é baseada na teoria da totipotencialidade das células vegetais, postulada por Haberlandt, afirmando que, teoricamente, todas as células somáticas, em uma determinada planta, contêm toda a informação genética necessária para a geração de uma nova planta (Guerra et al., 1999). Para tanto, a regulação espacial e temporal da expressão gênica é o principal ponto de controle da ontogenia vegetal (Merkle et al., 1995; Rojas-Herrera et al., 2002). Assim, um dos exemplos mais extremos e extraordinários da plasticidade do desenvolvimento vegetal é a capacidade de vários tipos celulares, em adição ao zigoto, de iniciar o desenvolvimento embriogenético (Fehér et al., 2003).

A embriogênese somática é um processo pelo qual células somáticas haplóides ou diplóides se diferenciam em plantas completas seguindo estágios de citodiferenciação embriogenéticos característicos (Williams & Maheswaran, 1986; Emons, 1994). Sinonímias à embriogênese somática, como embriogênese adventícia ou embriogênese assexual, são geralmente utilizadas para designar o mesmo processo. Entretanto, esses termos são empregados

preferencialmente quando tal processo ocorre *in vivo*, como a formação de embriões de origem nucelar em algumas espécies do gênero *Citrus* e outras espécies de plantas (Sharma & Thorpe, 1995). Assim, usualmente o termo embriogênese somática tem sido utilizado sempre que o processo embriogenético é conduzido em condições experimentais *in vitro*.

Historicamente, os créditos da descoberta desse padrão morfogênico foram dados à Reinert e à Steward e co-autores, que em 1958 independentemente descobriram a produção de plântulas de *Daucus carota* a partir de estruturas bipolares que se originavam de células em suspensão (Guerra et al., 1999).

Contudo, para Merkle et al. (1995) tais créditos caberiam a Levine que em 1947 reportou a obtenção de plântulas de *D. carota* a partir de tecidos expostos a baixas concentrações de ANA, por meio de um processo cuja descrição está estreitamente relacionada com a embriogênese somática. No entanto, atualmente é reconhecido o trabalho de 1957 conduzido por Warris, com culturas assépticas de *Oenanthe avuatica*, como sendo a primeira publicação científica relatando a regeneração de plântulas a partir de estruturas bipolares, sendo o pesquisador inclusive homenageado em um volume de livro<sup>1</sup> relevante sobre o tema (Simola, 2000).

Diferentes padrões na origem dos embriões somáticos têm sido descritos (Williams & Maheshwaran, 1986). Tais padrões de desenvolvimento são distinguidos entre diretos e indiretos, dos quais o termo embriogênese somática direta é aplicado para explantes cuja ocorrência de proliferação celular para a formação do embrião somático é nula ou mínima, ao contrário da utilização do termo de embriogênese somática indireta que requer um período maior em condições adequadas para a proliferação de células indeterminadas antes da formação do embrião somático (Halperin, 1995).

A morfogênese é um processo complexo de desenvolvimento e implica primeiramente na predeterminação de células ou grupos de células que sofrem um conjunto de mudanças morfológicas, para depois expressar a diferenciação e o crescimento (Guerra, 1989). O padrão de resposta da embriogênese somática manifesta-se pela formação de uma estrutura bipolar integrada em um único eixo, sem ligações vasculares com o tecido matriz, o que o torna diferente do padrão organogenético (Guerra et al., 1999).

Uma das principais aplicações da embriogênese somática em programas de melhoramento de plantas perenes relaciona-se com a possibilidade de fixação do ganho genético

---

<sup>1</sup> Jain, S.M.; Gupta, P.K.; Newton, R.J. (eds.) **Somatic Embryogenesis in Woody Plants**. v. 6, 746p., Kluwer Academic Publisher, 2000.

pela captura dos componentes aditivos e não aditivos da variância genética. Além da possibilidade do uso na produção em larga escala de sementes sintéticas, a embriogênese somática pode ser usada na regeneração de plantas geneticamente transformadas, plantas poliplóides ou de híbridos somáticos. (Guerra et al., 1999).

#### **4.2 Aquisição da competência embriogenética**

Competência celular é basicamente a capacidade da célula em responder a sinais específicos, como por exemplo, reguladores de crescimento ou condições ambientais. A indução ocorre quando um sinal específico desencadeia resposta única no desenvolvimento vegetal, a partir de um tecido competente. Após o tecido competente sofrer um processo de indução, este se torna determinado ou diferenciado, que por sua vez, é o processo pelo qual o desenvolvimento de uma célula ou grupamento celular se torna canalizado e restrito a um padrão particular de desenvolvimento (Yeung, 1995; Guerra et al., 1999).

A aquisição da competência embriogenética, considerada um dos passos críticos no processo de embriogênese somática, é altamente dependente da divisão e desdiferenciação celular. A desdiferenciação é um processo pelo qual os padrões de transcrição e tradução genômica são alterados, de forma a permitir às células a definição de um novo padrão de desenvolvimento (Fehér et al., 2003).

Dessa forma, a recalcitrância de muitas plantas, principalmente monocotiledôneas, está relacionada com a capacidade das células em reiniciar o ciclo celular a partir de células diferenciadas (Emons, 1994). Sandoval et al. (2003) estudaram a recalcitrância de *Cocos nucifera* em responder a estímulos *in vitro*, através da avaliação da distribuição das células nas diferentes fases do ciclo celular. Tais autores encontraram que aproximadamente 90% das células dos tecidos cultivados *in vitro* situavam-se na fase G0/G1 do ciclo celular, ligando este fato à recalcitrância destes tecidos às condições *in vitro*. Mesmo após o tratamento com elevadas concentrações de *aphidicholin* (substância que sincroniza o ciclo celular na fase S) grandes quantidades de células permaneciam na fase G0/G1, que levou os autores a concluir que estas células apresentam algum bloqueio para a mudança da fase G1 para a fase S, na qual a síntese protéica precede a divisão celular.

Neste contexto, a série de divisões celulares permite a mudança de célula somática para embriogênica. Entretanto, essa divisão celular deve apresentar uma expressão coordenada de um padrão de genes e modificações pós-genômica das proteínas que, entre outros, podem também estar envolvidos no controle da divisão e do ciclo celular. Todavia, dependendo da complexa

interação entre células e estímulos externos, as divisões celulares podem resultar em calos com crescimento não organizado ou em crescimento polarizado com um padrão coordenado de formação, resultando no desenvolvimento do embrião somático (Dudits et al., 1995).

A desdiferenciação do padrão de desenvolvimento e a aquisição da competência em um processo embriogênico podem ser iniciadas por procedimentos anteriores à excisão dos explantes, ou pela exposição destes explantes em uma nova condição ambiental (Yeung, 1995). Visto que as células são expostas a condições sub-ótimas e desbalanceadas, como por exemplo, quantidades não fisiológicas de reguladores de crescimento, Dudits et al. (1995) propuseram a idéia de que a embriogênese somática seria a última adaptação celular às novas condições ambientais. Os autores, ainda propõem que um dos principais fatores que modulam a transição de célula somática para embriogênica seria o nível de estresse cuja célula é submetida. Nesta hipótese, considera-se que a resposta às condições de estresse depende de dois parâmetros fundamentais, o nível de estresse e o estado fisiológico da célula. Assim, se o nível de estresse exceder a tolerância as células colapsam, e ao contrário, ocorre aumento no metabolismo, que desencadeia mecanismos de adaptação (Davletova et al., 2001; Fehér et al., 2003).

Dos vários fatores que afetam a indução à embriogênese somática, os principais são o genótipo e a origem do explante, bem como a composição do meio de cultura, particularmente os reguladores de crescimento. Além disso, a seleção do estágio específico de desenvolvimento do explante, as transferências seqüenciais e as condições apropriadas de cultivo são importantes para o sucesso da embriogênese, principalmente no que se refere à aquisição de competência embriogênica (Terzi & Loschiavo, 1990; Guerra et al., 1999).

A auxina é considerada ser o principal regulador de crescimento requerido para a ativação da divisão celular, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Guerra et al., 1999; Geldner et al., 2000), e de uma maneira geral, a embriogênese somática é induzida por análogos de auxinas considerados fortes (Guerra et al., 1999), como por exemplo, o 2,4-D, o picloram e o dicamba. Assim, uma célula somática expressa sua totipotência, adquirindo competência para originar uma linhagem de células-filhas que irão formar embriões somáticos (Guerra et al., 1999).

Estudos evidenciaram que a presença de análogos de auxina no meio de cultura altera o padrão de metilação do DNA (LoSchiavo et al., 1989). Um dos possíveis sítios de ação da auxina está relacionado com a expressão, portanto, demetilação de genes que codificam para proteínas quinases (*cdc2*) do controle do ciclo celular (Féher et al., 2002) fazendo com que estas células entrem no ciclo mitótico. Entretanto, outros fatores podem ser relacionados com a capacidade de análogos de auxina induzir a divisão celular e a embriogênese somática. Em células em

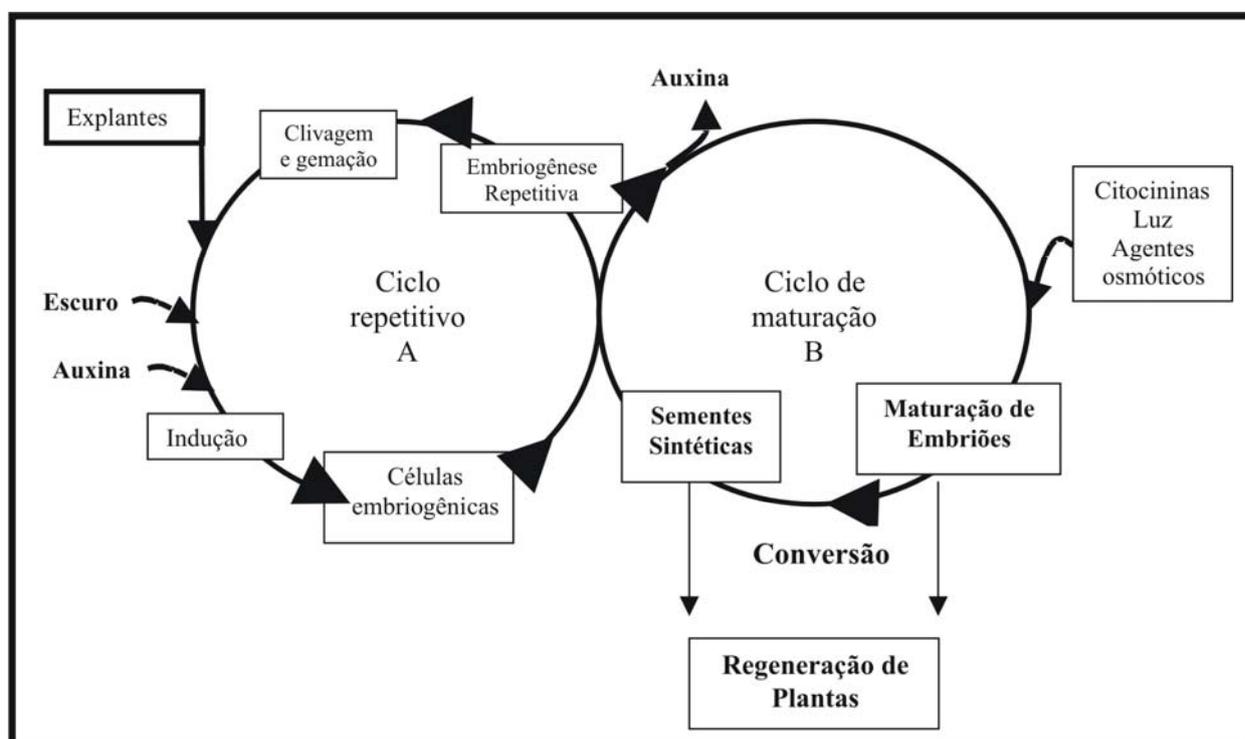
suspensão de *D. carota* (Ribnicky et al., 1996), como também em protoplastos de *Mendicago sativa* (Pasternak et al., 2002) a utilização de 2,4-D influenciou o metabolismo de auxina endógena. Nestes estudos, foi constatado que a presença do 2,4-D no meio de cultura aumentou significativamente a quantidade de AIA e seus conjugados na célula, e nesses estudos foi observada uma relação positiva entre a quantidade de AIA endógeno e a capacidade embriogênica. Essas observações permitem especular que análogos de auxina desempenham papel ambíguo na indução à embriogênese somática, induzindo a divisão celular e atuando como uma fonte de estresse. Fundamentando esta hipótese, Féher et al. (2002) citaram o fato de células embriogênicas serem induzidas por altas concentrações (10  $\mu\text{M}$ ) de 2,4-D ou, baixas concentrações (1  $\mu\text{M}$ ) dessa substância em conjunto com alguma fonte de estresse (ferro, cobre, paraquat).

Da mesma forma, Kitamiya et al. (2000) alcançaram a indução direta da embriogênese somática, em hipocótilos de *D. carota*, através da aplicação de 450  $\mu\text{M}$  de 2,4-D durante um período de 2 horas. Através de estudos de expressão diferencial de genes os autores encontraram que esse choque auxínico resultou na expressão de dois genes, um (*Dchsp-1*) homólogo às proteínas de choque de temperatura e outro (*Dcarg-1*) homólogo aos genes regulados por auxinas *in vivo*. Interessantemente, os autores ainda avaliaram a expressão de diferentes genes quando segmentos de hipocótilos foram submetidos a outras fontes de estresse, como AAB, temperatura e cádmio. Nesses, o gene *Dchsp-1*, portanto o gene ligado à resposta ao estresse, foi expresso em todas as condições avaliadas. Entretanto, o gene *Dcarg-1*, transcrito em resposta a auxina, não foi expresso em nenhum caso de estresse, e a obtenção de embriões somáticos somente foi alcançada quando da expressão de ambos os genes.

Trabalhos clássicos evidenciaram que a embriogênese somática pode ser obtida por outros indutores que não a auxina. Como por exemplo, estresse salino (Kiyosue et al., 1989), inoculação em meio de cultura contendo altos níveis de sacarose (Kamada et al., 1993) e incubação em altas temperaturas (Kamada et al., 1994), porém conforme destacado por Féher et al. (2003), vale notar que os explantes utilizados proviam de ápices meristemáticos, região com grande quantidade endógena de auxina. Recentemente foi descrita a obtenção de embriões somáticos em hipocótilos de plântulas de *D. carota* por Nishiwaki et al. (2000), pela simples aplicação de ácido absísico. Da mesma forma, neste experimento dois fatores foram críticos, o tamanho do hipocótilo e a presença do ápice meristemático nas plântulas, concluindo os autores que uma ou mais substâncias que são translocadas basipetalmente, são requeridas para a indução à embriogênese somática.

Apesar das auxinas induzirem células embriogênicas, sua presença no meio de cultura parece ser antagônica a progressão dessas células à formação do embrião somático (Halperin, 1964), bloqueando o desenvolvimento desses nos estágios iniciais do desenvolvimento (Merkle et al., 1995; Guerra et al., 1999).

Dessa forma, o processo de embriogênese somática segue um duplo-ciclo, sendo no primeiro a indução e o desenvolvimento de células embriogênicas, que pode resultar em um ciclo repetitivo. Já no segundo ciclo, os pró-embriões recebem estímulos a se desenvolverem, pela redução ou completa remoção da fonte de auxina, ou ainda outros tratamentos que promovam tal condição. Nesse ciclo de maturação ocorre a formação dos embriões somáticos propriamente ditos (Figura 3) (Guerra et al., 1999).



**FIGURA 3.** Processo esquemático de dois ciclos para indução e para a modulação da embriogênese somática. Adaptado de Guerra et al (1999).

Vários trabalhos retrataram a importância funcional do tipo, da sua concentração e do balanço entre os diferentes reguladores de crescimento utilizados na formação e proliferação celular de embriões somáticos, como também na regeneração de plantas. Os estudos mostraram uma especificidade de ação dos diferentes reguladores a um determinado órgão da planta e também entre genótipos (George, 1993; Halperin, 1995; Guerra et al., 1999).

Para Vasil (1987), a competência embriogenética é aparentemente adquirida durante o período inicial em cultura na presença de altos níveis de auxina. Contudo, embriões somáticos são formados somente se os níveis de 2,4-D estiverem abaixo de determinada concentração, o que pode ser obtido por meio de repicagens para meios com baixos valores de fitorreguladores ou longos períodos de repicagens, pois sua presença por longos períodos parece ser antagônica ao desenvolvimento celular organizado.

O sistema de embriogênese somática é dependente do genótipo. Desde os estudos iniciais sobre a morfogênese em cultura *in vitro*, era reconhecido que certos grupos de plantas respondiam mais prontamente em cultura do que outros, dentro de uma mesma espécie ou mesmo dentro de uma única variedade. Adicionalmente, vários trabalhos reportam a embriogênese somática como sendo uma característica herdável (Kumar et al., 1998; McLean & Nowak, 1998; Barro et al., 1999; Seabrook et al., 2001). No entanto, tais diferenças genotípicas na capacidade embriogenética podem ser reflexo da habilidade da célula em ativar elementos específicos para a aquisição de competência embriogenética (Merkle et al., 1995), como por exemplo, receptores de membrana.

### 4.3 Embriogênese somática em palmeiras

A formação de embriões a partir de células somáticas é uma característica única e específica das plantas que promove uma eficiente forma de regeneração de plântulas *in vitro*. Nesse contexto, a embriogênese somática apresenta vantagens sobre as demais técnicas de micropropagação como a capacidade de produzir grande número de embriões num espaço limitado e o desenvolvimento direto de plantas a partir de embriões individualizados (Guerra et al., 1999).

Da mesma forma que nas demais culturas, especialmente monocotiledôneas (Guerra et al., 1999), em palmeiras a transição de células somáticas para embriogênica aparentemente é mediada por altas concentrações de auxina. Neste contexto, Hocher et al (1998) citaram que a origem de embriões somáticos de *C. nucifera*, pode ser tanto unicelular quanto pluricelular, necessitando para sua indução, maiores (80 a 120 mg.L<sup>-1</sup>)<sup>2</sup> e menores (40 a 60 mg.L<sup>-1</sup>)<sup>2</sup> doses de auxinas (usualmente 2,4-D), respectivamente, em meio de cultura suplementado com carvão ativado. Ainda em *C. nucifera*, protocolos de regeneração de plântulas por embriogênese somática foram estabelecidos usando como fonte de explante inflorescências imaturas (Verdeil et al., 1994; Blake & Hornung, 1995; Cueto et al., 1997), plúmula (Chan et al., 1998) e embriões

---

<sup>2</sup> Na presença de carvão ativado.

imaturos (Karunaratne & Periyapperuma, 1989). Verdeil et al. (1994) citaram que a aquisição de competência embriogênica foi obtida somente quando segmentos (1 a 1,5 mm) de inflorescências imaturas foram inoculados em meio contendo 200 a 300  $\mu\text{M}$  de 2,4-D<sup>2</sup> e os calos regenerados fossem transferidos para meios contendo uma elevada quantidade desta auxina (450 a 500  $\mu\text{M}$ )<sup>2</sup>. Nessas condições, aproximadamente 10% dos calos adquiriram competência embriogênica em todos os genótipos testados.

Teixeira (1989), trabalhando com *E. guineensis*, propôs a utilização de embriões, maduros ou imaturos, como fonte de explantes pelas vantagens que tais embriões apresentam como a possível utilização em larga escala, a uniformização, a facilidade de colheita, a possibilidade de transporte em grandes distâncias e a proteção do embrião contra fungos e bactérias por parte dos frutos, resultando numa diminuição de contaminações. Adicionalmente, cita-se o fato de embriões zigóticos apresentarem uma elevada capacidade de expressar sua totipotência. Utilizando esses explantes Teixeira et al. (1993) induziu calos em 55% a 88% dos embriões imaturos inoculados. Já para embriões maduros esse resultado foi de 93% e, aproximadamente, após nove meses de cultivo alguns setores de tais calos primários formavam calos embriogênicos friáveis.

A cultura de tecidos em pupunha foi primeiramente estudada por Huete & Arias (1981), que relataram alto grau de oxidação em tecidos de folhas jovens, não sendo superado pela aplicação de ácido ascórbico. Desde o desenvolvimento desse trabalho, foram realizados aproximadamente 20 estudos da aplicação da cultura de tecidos em pupunha (Arias & Huete, 1983; Chaverri, 1984; Arias, 1985; Salazar, 1986; Pinedo, 1987; Valverde et al., 1987a e 1987b; Stein, 1988; Stein & Stephens, 1991; Almeida, 1994; Almeida & Kerbauy 1996). Dessas várias pesquisas direcionadas à cultura de tecidos em pupunha, segundo Almeida (1994), muitas apresentaram resultados aleatórios e baixos índices de regeneração, tanto para organogênese como para a embriogênese somática.

Devido vários fatores, Arias & Huete (1983) sugerem a embriogênese somática para melhorar substancialmente a taxa de reprodução *in vitro* da pupunha, pois após 8 a 12 semanas de cultura 33% das massas celulares apresentaram uma relação de 3 a 5 plantas em casos bem sucedidos. Respostas morfogenéticas de ápices de pupunha mostraram que o peso da massa celular e a percentagem de oxidação apresentaram um efeito positivo quando do cultivo no escuro, e também que quando cultivados a luz, ocorreu uma diminuição acentuada na taxa de crescimento (Valverde et al., 1987b).

A embriogênese somática apresenta um papel fundamental na propagação da pupunha,

no entanto, poucos trabalhos relatam a obtenção desta rota morfogênica com sucesso. Dessa forma, estudos visando o estabelecimento de protocolos regenerativos devem ser realizados, possibilitando a inserção desta técnica como uma ferramenta para o melhoramento, conservação e propagação massal dessa espécie.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, M de **Emprego da cultura *in vitro* para a multiplicação vegetativa de pupunha (*Bactris gasipaes* H.B.K.)**. 1994, 79p, Tese (Doutorado em Botânica), São Paulo: USP.
- ALMEIDA, M.; KERBAUY, G.B. Micropropagation of *Bactris gasipaes* (Palmae) through flower bud culture. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.8(3), p.215-217, 1996.
- ARIAS, O. Propagacion vegetativa por cultivo de tejidos del pejibaye (*Bactris gasipaes* H.B.K.). **ASBANA**, v.24(9), p.24-27, 1985.
- ARIAS, O.; HUETE, V. Propagation vegetativa *in vitro* de pejibaye (*Bactris gasipaes* H.B.K.); **Turrialba**, v 33(2), p.103-108, 1983.
- ASSY-BAH, B. Culture *in vitro* d'embryons zygotiques de cocotiers. **Oleagineux**, v.41(7), p.321-328, 1986.
- ASSY-BAH, B.; DURAND-GASSELIN, T.; PANNETIER, C. Use of zygotic embryo culture to collect germplasm of coconut (*Cocos nucifera* L.). **Plant Genetic Resources Newsletter**, v.71, p.4-10, 1987.
- BARRO, F.; CANALEJO, A.; MARTÍN, A. Genomic influence on somatic embryogenesis in the Triticeae. **Plant Cell Reports**, v.18, p.769-772, 1999.
- BENSON, E.E.; GLYN, P.T.L.; STACEY, N. Advances in plant cryopreservation technology: current applications in crop plant biotechnology. **AgBiotech News and Information**, v.10(5), p133n-142n, 1998.
- BLAKE, J. Tissue culture propagation of coconut, date palm and oil palm. In.: DODDS, J.H. (ed.) **Tissue Culture of Trees**. Westport, Connecticut: Avi Publishing Company, 1983. p.29-50.
- BLAKE, J.; HORNUNG, R. Somatic embryogenesis in coconut In.: JAINS, S.; GUPTA, P.& NEWTON, R. **Somatic embryogenesis in woody plants**. Kluwer, Dordrecht. 1995. p.327-349.
- BOVI, M.L.A. Expansão do cultivo da pupunheira para palmito no Brasil. **Horticultura Brasileira**, v.15 (suplemento), p.183-185, 1997.
- BOVI, M.L.A., MARTINS, C.C.; SPIERING, S.H. Desidratação de sementes de quatro lotes de pupunheira: efeitos sobre a germinação e o vigor. **Horticultura Brasileira**, v.22(1), p.109-112, 2004.
- CHAN, J. L.; SAENZ, L.; TALAVERA, C.; HORNUNG, R.; ROBERT, M.; OROPEZA, C. Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic emryogenesis. **Plant Cell Reports**, v.17, p.515-521, 1998.
- CHAVERRI, Y. J. **Efecto de diferentes fuentes y niveles de nitrógeno em el médio nutritivo para el cultivo *in vitro* de ápices de pejibaye (*Bactris gasipaes* H.B.K.)**. 1984, 63p, Master Science Tesis, San José: Universidade de Costa Rica.
- CLEMENT, C. R. Pupunha, uma árvore domesticada. **Ciência hoje**, v.5(29), p.42-49, 1987.

CLEMENT, C.R. 1942 and the loss of amazonian crop genetic resources. I. The relation between domestication and human population decline. **Economic Botany**, v.53(2), p.188-202, 1999.

CLEMENT, C.R. A erosão genética nas coleções ex situ de fruteiras da Amazônia. **1o Encontro de Botânica Econômica de espécies Nativas da América Latina**, IAC/CENATGEN-EMBRAPA, Campinas, SP, 1997b.

CLEMENT, C.R. Domestication of the pejobaye palm (*Bactris gasipaes* H.B.K.): past and present. **Advances in Economic Botany**, v.6, p.155-174, 1988.

CLEMENT, C.R. Erosão Genética nas coleções de germoplasma da Amazônia Brasileira: causas, conseqüências e opções; **8o Encontro de Pesquisadores da Amazônia**, Porto Velho, RO, 14-17 outubro, 1996.

CLEMENT, C.R. Pupunha: Recursos genéticos, pesquisas realizadas e tecnologias disponíveis; Anais **1o. Workshop sobre as Culturas de Cupuaçu e pupunha da Amazônia**, 25-29 de Março. CPAA/EMBRAPA, Manaus, AM. 1997a., pp. 33-49

CLEMENT, C.R. Regeneração natural de pupunha. **Acta Amazônica**, v.20, p.399-403, 1990.

CLEMENT, C.R. Survey and collection of peach palm in Amazon Basin. **FAO/IPGRI Plant Genetic Resources Newsletter**, v.67, p.22-25, 1986.

CLEMENT, C.R. Domestication of the pejobaye palm (*Bactris gasipaes* H.B.K.): past and present. **Advances in Economic Botany**, v.6, p.155-174, 1988.

CLEMENT, C.R.; SANTOS, L.A.; ANDRADE, J.S. Conservação de palmito de pupunha em atmosfera modificada. **Acta Amazônica**, v.29(3), p.437-445, 1999.

CLEMENT, C.R.; WEBER, J.C.; van LEEUWEN, J.; DOMIAN, C.A.; COLE, D.M.; LOPEZ, L.A.A.; ARGÜELLO, H. Why extensive research and development did not promote use of peach palm fruit in Latin America. **Agroforestry Systems**, v.61, p.195-205, 2004.

DAVLETOVA, S.; MÉSZAROS, T.; MISCOLKZI, P.; OBERSCHALL, A.; TÖRÖK, K.; MAGYAR, Z.; DUDITS, D.; DEÁK, M. Auxin and heat shock activation of a novel member of the calmodulin like domain protein gene family in cultured alfalfa cells. **Journal of Experimental Botany**, v.52(355), p.215-221, 2001.

DE GUZMAN, E.V. The growth development of coconut makapunha embryo *in vitro*. The induction of rooting. **Philippine Agriculturist**, v.53, p.65-78, 1969.

DUDITS, D., GYÖRGYÉY, J., BÖRGE, L.; BAKÓ, L. Molecular biology of somatic embryogenesis. p.267-308. In: T.A. THORPE (ed.), **In vitro Somatic Embryogenesis**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1995.

DUMET, D.; BENSON, E.E. The use of physical and biochemical studies to elucidate and reduce cryopreservation-induced damage in hydrated/desiccated plant germplasm. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (ed). **Cryopreservation of tropical germplasm**. Rome: JIRCAS/IPGRI, 2000. p.43-56.

EMONS, A.M.C. Somatic embryogenesis: cell biological aspects. **Acta Botanica Neerlandica**, v.43(1), p.1-14, 1994.

ENGELMANN, F. Plant Cryopreservation: Progress and prospects. **In vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, v.40, p.427-433, 2004.

ENGELMANN, F. *In vitro* conservation methods. In: CALLOW, J.A.; FORD-LLOYD, B.V.; NEWBURY, H.J. (eds.); **Biotechnology and Plant Genetic Resources**. CAB INTERNATIONAL, p.119-161, 1997.

ENGELMANN, F.; BATUGAL, P.; OLIVER, J.(eds.); **Coconut embryo *in vitro* culture: Part II**. Malásia: International Plant Genetic Resources Institute, Regional office for Asia, the Pacific and Oceania (IPGRI-APO), 2002, 190p.

FEHÉR, A., PASTERNAK, T.P. AND DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.74, p.201-228, 2003.

FÉHER, A.; PASTERNAK, T.; DUDITS, D. Activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived alfafa cells: the role of auxins and stress. **Acta Biologica Szegediensis**, v.46(3-4), p.13-14, 2002.

FERREIRA, S.A.N.; SANTOS, L.A. Viabilidade de sementes de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth). **Acta Amazônica**, v.22(3), p.303-307, 1992.

GAGLIARDI, R.F.; PACHECO, G.P.; CARNEIRO, L.A.; VALLS, J.F.M.; VIEIRA, M.L.C.; MANSUR, E. Cryopreservation of *Arachis* species by vitrification of *in vitro*-grown shoot apices and genetic stability of recovered plants. **CryoLetters**, v.24, p.103-110, 2003.

GARCIA, T.B. **Efeito do Acido Indol 3-Butirico no enraizamento de diferentes tamanhos de perfilhos de pupunheira (*Bactris gasipaes* H.B.K.)**. 1988, 36p, Dissertação (Mestrado em Agronomia), Viçosa: UFV.

GELDNER, N.; HAMANN, T.; JÜRGENS, G. Is there a role for auxin in early embryogenesis? **Plant Growth Regulation**, v.32, p187-191, 2000.

GEORGE, E.F. **Plant Propagation by Tissue Culture**. 2o Ed, Edington: Ed. Exegetic Limited, 1993. 574p.

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

GUERRA, M.P. **Embriogênese somática em *Euterpe edulis* Mart. (Palmae)**. 1989, 233p, Tese (Doutorado em Botânica). São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

GUERRA, M.P.; HANDRO, W. Somatic embryogenesis and plant regeneration in different organs of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae): Control and structural features. **Journal of Plant Research**, v.111, p. 65-71, 1998.

GUERRA, M.P.; HANDRO, W. Somatic embryogenesis and plant regeneration in embryo culture of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae). **Plant Cell Reports**, v.7, p.550-552, 1988.

HALPERIN, W.; *In vitro* somatic embryogenesis: Some historical issues and unresolved problems. In: Thorpe, T.A. (ed.); ***In vitro* embryogenesis in plants**. p.1-16, Kluwer Academic Publishers, 1995.

HALPERIN, W.; Morphogenetic studies with partially synchronized cultures of carrot embryo. **Science**, v.146, p.408-410, 1964.

HELLIOT, B.; PANIS, B.; POUMAY, Y.; SWENNEN, R.; LEPOIVRE, P.; FRISON, E. Cryopreservation for the elimination of cucumber mosaic and banana streak viruses from banana (*Musa* spp.). **Plant Cell Reports**, v.20, p.1117-1122, 2000.

HOCHER, V.; VERDEIL, J.L.; GRASDEMANGE, F.; HUET, C.; BOURDEIX, R.; N'CHO, Y.; SANGARE, A.; HORNUNG, R.; JACOBSEN, H.J.; RILLO, E.; OROPEZA, C.; HAMON, S. Collaboration internationale pour la maîtrise de la multiplication végétative *in vitro* du cocotier (*Cocos nucifera* L.). **Cahiers Agricultures**, v.7(6), p.499-505, 1998.

- HU, C.Y.; FERREIRA, A.G.; Cultura de embriões. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.& BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: SPI/EMBRAPA, v.1. 1998. p.371-394.
- HUETE, V.F.; ARIAS, M.O.; Propagacion vegetativa del pejibaye. **ASBANA**, v.5(14), p.10-13, 1981.
- KAMADA, H.; ISHIKAWA, K. SAGA, H.; HARADA, H. Induction of somatic embryogenesis in carrot by osmotic stress. **Plant Tissue Culture Letter**, v.10, p. 38-44, 1993.
- KAMADA, H.; TACHIKAWA, Y.; SAITOU, T.; HARADA, H. Heat stresses induction of carrot somatic embryogenesis. **Plant Cell Tissue Culture Letter**, v.11(3), p.229-232, 1994.
- KARUNARATNE, S.; PERIYAPPERUMA, K. Culture of immature embryos of coconut: callus proliferation and somatic embryogenesis. **Plant Science**, v.62, p.247-253, 1989.
- KITAMIYA, E.; SUZUKI, S.; SANO, T.; NAGATA, T. Isolation of two genes that were induced upon the initiation of somatic embryogenesis on carrot hypocotyls by high concentrations of 2,4-D. **Plant Cell Reports**, v.19, p.551-557, 2000.
- KIYOSUE, T.; KAMADA, H.; HARADA, H. Induction of somatic embryogenesis by SALT stress in carrot. **Plant Tissue Culture Letter**, v.6, p.162-164, 1989.
- KRISHNAPILLAY, B.; CHIN, H.F.; MARZALINA, M. Cryopreservation of germplasm of ornamental palms (*Veitchia*, *Howea*, and *Calamus* species). In. BAJAJ (ed). **Biotechnology in Agriculture and Forestry** v.32, 1995. p.170-179.
- KUMAR, S.; SHARMA, P.; PENTAL, D. A genetic approach to *in vitro* regeneration of non-regenerating cooton (*Gossypium hirsutum* L.) cultivars. **Plant Cell Reports**, v. 18, 59-63, 1998.
- LEDO, A.S.; LAMEIRA, O.A.; BENBADIS, A., K.; MENEZES, I.C.; LEDO, C.A.S.; OLIVEIRA, M.S.P. Cultura *in vitro* de embriões zigóticos de açaizeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.23(3), p.468-472, 2001.
- LÓPEZ-VILLALOBOS, A.; DODDS, P.F.; HORNUNG, R. Changes in fatty acid composition during development tissues of coconut (*Cocos nucifera*) embryos in the intact nut and *in vitro*. **Journal of Experimental Botany**, v.52(358), p.933-942, 2001.
- LOSCHIAVO, F.; PITTO, L.; GIULIANO, G.; TORTI, G.; NUTI-RONCHI, V.; MARAZZITI, D.; VERGARA, R.; ORSELLI, S.; TERZI, M. DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. **Theoretical and Applied Genetics**, v.77, p.325-331, 1989.
- MARTEL, J.H; CLEMENT, C.R. Comparação preliminar da área foliar de três acessos de pupunha (*Bactris gasipaes* H.B.K.) oriundos de três população distintas da Amazônia Ocidental. **Acta Amazônica**, v.16/17, p.13-18, 1987.
- McLEAN, N.L.; NOWAK, J. Inheritance of somatic embryogenesis in red clover (*Trifolium pratense* L.). **Theoretical and Applied Genetic**, v.97, p.557-562, 1998.
- MELO, B.; PINTO, J.E.B.F.; LUZ, J.M.Q.; PEIXOTO, J.R.; JULIATTI, F.C. Diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e desenvolvimento das plântulas na cultura *in vitro* de embriões da guarirrobeira [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.]. **Ciência e Agrotecnologia**, v.25(6), p.1301-1306, 2001.
- MERKLE, S.A.; PARROTI, W.A.; FLINN, B.S. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In.: Thorpe, T.A. (ed.); **In vitro embryogenesis in plants**. p.155-203, Kluwer Academic Publishers, 1995.

- MERKLE, S.A.; PARROTT, W.A.; FLINN, B.S. Morphogenetic aspects of somatic embryogenesis. In.: Thorpe, T.A. (ed.); **In vitro embryogenesis in plants**. Kluwer Academic Publishers, p.155-203. 1995.
- MONNIER, M. Culture oz zygotic embryos. In.: Thorpe, T.A. (ed.); **In vitro embryogenesis in plants**. p.117-153, Kluwer Academic Publishers, 1995.
- MORA-URPÍ, J. Consideraciones preliminares sobre el desarrollo de uma técnica de polinizacion controlada en pejibaye (*Bactris gasipaes* H.B.K.). **Agronomia Costarricense**, v.4(1), p.119-121, 1980.
- MORA-URPÍ, J.; WEBERAND, J. C; CLEMENT, C. R. **Peach Palm (*Bactris gasipaes* Kunth) – Promoting the conservation and use of undrutilized and neglected crops 20**. Rome: Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatsleben/ International Plant Genetic Resources Institute, 1997. 81p.
- MOURA, I.; CARNEIRO, M.F.N. *In vitro* culture of immature embryos of *Howea fosteriana* Becc. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.31, p.207-209, 1992.
- MURASHIGE, T; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiology Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- NETO, J.T.F. Estimativas de parâmetros genéticos em progênes de meio-irmãos de pupunha. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n.39; p.109-117, 1999.
- NISHIKAWA, M.A.N. **Avaliação de progênes de meio irmãos de pupunha (*Bactris gasipaes* H.B.K.)**. 1995, 95p, Dissertação (Mestrado em Agronomia), Jaboticabal: UNESP.
- NISHIWAKI, M.; FUJINO, K.; KODA, Y.; MASUDA, K.; KIKUTA, Y. Somatic embryogenesis induced by the simple application of acid absisic to carrot (*Daucus carota* L.) seedlings in culture. **Planta**, v.211, p.756-759, 2000.
- PAN, M.J.; van STADEN, J. Use of charcoal in *in vitro* culture – A review. **Plant Growth Regulation**, v.26, p.155-163, 1998.
- PINEDO P., M. H. **Organogenesis directa em ápices caulinares de pejibaye (*Bactris gasipaes* H.B.K.)**. 1987, 110p, Magister Tesis, Turrialba:Costa Rica.
- RAGHAVAN, V. One hundred years of zygotic embryo culture investigations. **In vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, v.39, p.437-442, 2003.
- REED, B.M.; DUMET, D.; DENOMA, J.M.; BENSON, E.E. Validation of cryopreservation protocols for plant germplasm conservation: a pilot study using *Ribes* L. **Biodiversity and Conservation**, v.10, p.939-949, 2001.
- RIBNICKY, D.M.; ILIÉ, N.; COHEN, J.D.; COOKE, T.J. The effects of exogenous auxins on endogenous indole-3-acetic acid metabolism: The implications for carrot somatic embryogenesis. **Plant Physiology**, v.112, p.549-558, 1996.
- RODRIGUES NETO, A.J.; BERGAMASCHINE, A.F.; ISEPON, O.J.; ALVES, J.B.; HERNANDEZ, F.B.T.; MACEDO, M.P. Efeito de aditivos no valor nutritivo de silagens feitas com subproduto da extração do palmito de pupunha (*Bactris gasipaes* H.B.K.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30(4), p.1367-1375, 2001.
- ROJAS-HERRERA, R.; QUIROZ-FIGUEROA, F.; SÁNCHEZ-TEYER, L.; LOYOLA-VARGAS, V.M. Molecular analysis of somatic embryogenesis: An overview. **Physiology Molecular Biology of Plants**. V.8(2), p.171-184, 2002.

- SALAZAR, S. S. **The effect of 2,4-D, Lighth and Activated Charcoal on offshoot-tip culture of the pejibaye palm (*Bactris gasipaes* H.B.K.)**. 1986, 70p, Master Science Thesis, Birmingham: University of Birmingham.
- SANDOVAL, A.; HOCHER, V.; VERDEIL, J. Flow cytometric analysis of the cell cycle in different coconut palm (*Cocos nucifera* L.) tissues cultured *in vitro*. **Plant Cell Reports**, v.22, p.25-31, 2003.
- SANTOS, I.R.I. Criopreservação: Potencial e Perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 12 (Edição especial): 70-84, 2000.
- SARASAN, V.; RAMSAY, M.M.; ROBERTS, A.V. *In vitro* germination and induction of direct somatic embryogenesis in “Bottle palm” [*Hyophorbe lagenicaulis* (L. Bailey) H.E.Moore] a critically endangered Mauritian palm. **Plant Cell Reports**, v.20, p.1107-1111, 2002.
- SEABROOK, J.E.A.; DOUGLASS, L.K.; TAI, G.C.C. Segregation for somatic embryogenesis on stem-internode explants from potato seedlings. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.65, p.69-73, 2001.
- SHARMA, K.K.; THORPE, T.A. Asexual embryogenesis in vascular plants in nature. In: Thorpe, T.A. (ed.); ***In vitro embryogenesis in plants***. p.17-72, Kluwer Academic Publishers, 1995.
- SIMOLA, L.K. Harry Waris, a pioneer in somatic embryogenesis; In: Jain, S.M.; Gupta, P.K.; Newton, R.J. (eds.); ***Somatic embryogenesis in woody plants***. v.6, p.1-16, Kluwer Academic Publishers, 2000.
- SPERA, M.R.N.; CUNHA, R.; TEIXEIRA, J.B. Quebra de dormência, viabilidade e conservação de sementes de buriti (*Mauritia flexuosa*). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36(12), p.1567-1572, 2001.
- STEIN, K.M. **Tissue culture of the pejibaye palm (*Bactris gasipaes* H.B.K.)**. 1988, 187p, Master Science Thesis, Iowa: Iowa State University.
- STEIN, K.M.; STEPHENS, C. Effect of 2,4-Diclorophenoxyacetic acid and activated charcoal on Somatic Embryogenesis of *Bactris gasipaes* H.B.K. **Turrialba**, v.4, p.196-201, 1991.
- STEINMACHER, D.A.; PEIXOTO, M.L.; GUERRA, M.P.; KROHN, N.G.; SOUZA, M.A.; AGUILA, R.M. Germinação *in vitro* de embriões zigóticos de pupunha (*B. gasipaes* H.B.K.). X Encontro Anual de Iniciação Científica. **Anais...**, Ponta Grossa, PR, p.28-29, 2001.
- TABAI, S. A. **Propagação da palmeira macaúba (*Acrocomia aculeata* Jacq Loddiges) através de métodos *in vitro***. 1992, 121p, Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas), Piracicaba: ESALQ/USP.
- TEIXEIRA, J. B. **Development of *in vitro* techniques of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.)**. 1989, 161p, PhD thesis, New Jersey: State University of New Jersey.
- TEIXEIRA, J.B.; SÖNDHAL, M.R.; KIRBY, E.G.; Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of oil palm. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v.34, p. 227-233, 1993.
- TERZI, M.; LOSCHIAVO, F. Somatic embryogenesis. In: BHOJWANI, S. S. (ed.). **Plant Tissue Culture: applications & limitations**. Elsevier, Amsterdam-Oxford-Tokyo, 1990. p. 54-66.
- TISSERAT, B. Date Palm. In: AMMIRATO, P.V., EVANS, D.A., SHARP, W., YAMADA, Y. **Handbook of plant cell culture**. New York: Macmillan Publishing Company, v.2, 1984, p.505-545.

TREWAVAS, A. How do plant growth substances work? **Plant, Cell and Environment**, v.4, p.203-228, 1981.

TRIQUES K., RIVAL A., BEULÉ T., PUARD M., ROY J., NATO A., LAVERGNE D., HAVAUX M., VERDEIL J.L., SANGARE A., HAMON S. Photosynthetic ability of *in vitro* grown coconut (*Cocos nucifera* L.) plantlets derived from zygotic embryos. **Plant Science**, v127, p39-51, 1997.

VALOIS, A. C. D. Conservação ex situ de Recursos Genéticos Vegetais. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. **Recursos Genéticos e Melhoramento**. Fundação MT: Rondonópolis, MT. pp. 123-148, 2001.

VALVERDE, R.; ARIAS, O.; THORPE, T. A. Plicoram-induced somatic embryogenesis in pejobaye palm (*Bactris gasipaes* H.B.K.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.10, p.149-156, 1987a.

VALVERDE, R.; GOMEZ, L.; ARIAS, O.; THORPE, T.A. Respuesta morfogénica de los ápices de pejobaye (*Bactris gasipaes* H.B.K.). **Agronomia Costarricense**, v.11(1), p.97-102, 1987b.

VASIL, I.K. Developing cell tissue culture systems for the improvement of cereal and grass crops. **Journal of Plant Physiology**, v.128, p.193:218, 1987.

VERDEIL, J. L.; HUET, C.; GROSDÉMANGE, F.; BUFFARD-MOREL, J. Plant regeneration from cultured immature inflorescences of coconut (*Cocos nucifera* L.): evidence of somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**, v.13, p.218-221, 1994.

VICENT, C. M.; MARTÍNEZ, F. X. The potential uses of somatic embryogenesis in agroforestry are not limited to synthetic seed technology. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.10(1), p.1-12, 1996.

WHITE, P.R. Plant tissue cultures. **Annual Review of Biochemistry**, v.11, p.615-628, 1942.

WILLIAMS, E.S.; MAHESWARAN, B. Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany**, v.57, p.443-462, 1986

YEUNG, E.C. Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. In: THORPE, T.A.(ed.) **In vitro embryogenesis in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Pub., 1995. p.205-247.

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

CAPÍTULO II - GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE PUPUNHA

**1 RESUMO**

A pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth) é uma palmeira domesticada que apresenta hábito de crescimento cespitoso, aptidão para a produção de frutos e de palmito e sementes recalcitrantes à desidratação. Técnicas de cultura de tecidos são ferramentas importantes para o estabelecimento de estratégias de conservação desta espécie. Vários trabalhos evidenciaram que a conservação de embriões zigóticos pode ser uma alternativa para a conservação genética de palmeiras e, para tanto, a técnica de cultura de embriões zigóticos deve ser otimizada. O objetivo do presente trabalho foi determinar a composição do meio de cultura e o papel do carvão ativado na germinação *in vitro* de embriões zigóticos e no crescimento inicial das plântulas. Embriões zigóticos foram dissecados e inoculados em meios de cultura de MS; Y3 ou WH suplementados ou não com 1,5 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado. A presença de carvão ativado aumentou significativamente a porcentagem de germinação e subsequente crescimento das plântulas. Maiores taxas de germinação foram observadas em meio de cultura MS ou Y3 suplementado com carvão ativado, resultando em valores médios de 90,0% e 96,5% de germinação, respectivamente. Em meio de cultura de WH suplementado com carvão ativado a porcentagem de germinação foi baixa (17,5%). Após 90 dias em cultivo, a altura média das plântulas em meios de cultura MS e Y3 foi de 4,3 cm; com a suplementação de carvão ativado a altura das plântulas foi de 5,4 cm e 5,9 cm, respectivamente. Da mesma forma, maior número de raízes foi observado em meios de cultura MS e Y3, com valor médio de 1,6 raízes por plântula. Adicionalmente, as condições de cultivo influenciaram o crescimento do haustório e o desenvolvimento dessa estrutura apresentou correlação significativa com a altura das plântulas. Análises histológicas revelaram que o haustório era composto por células grandes, com parede celular delgada, presença de grânulos (amiloplastos e cloroplastos) e com presença de feixes vasculares.

**Palavras-chaves:** Cultura de embriões; Germinação; Carvão ativado; Micropropagação; Meio de cultura.

CHAPTER II - IN VITRO GERMINATION OF PEACH-PALM ZYCOTIC EMBRYOS

**2 ABSTRACT**

Peach-palm (*Bactris gasipaes* Kunth) is a domesticated, caespitose multi-use palm species. The seeds are non-orthodox, thus tissue culture techniques comprise useful tools for its conservation. Several studies showed that storage of excised embryos would be an alternative for palm genetic conservation, although the technique of zygotic embryo culture must be optimized. The objective of the present study was to evaluate the role of culture medium composition and activated charcoal on zygotic embryo germination. Mature embryos were excised and inoculated on MS, Y3 or WH culture medium supplemented or not with 1.5 g.L<sup>-1</sup> activated charcoal. Activated charcoal enhanced germination rate and subsequent plantlets growth. High germination rates were achieved on MS or Y3 culture medium supplemented with activated charcoal, showing 90.0% and 96.5% germination rate, respectively. In contrast, on WH culture medium supplemented with activated charcoal the germination rate was the lowest (17.5%). After 90 days of culture, plantlet heights on either MS or Y3 culture medium was 4.3 cm on average. When activated charcoal was added to these media this value increased to 5.4 cm and 5.9 cm, respectively. Highest root number was observed on MS or Y3 culture medium, with a mean value of 1.6 roots per plantlet. Additionally, culture conditions influenced haustorium growth and the development of this structure showed close correlation with plantlet height. Histological analysis showed that the haustorium was composed of large cells with thin cell walls, the presence of amiloplasts and chloroplasts, and several vascular bundles.

**Key-Words:** Embryo culture; Germination; Activated Charcoal; Micropropagation; Culture Medium.

### 3 INTRODUÇÃO

A pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth) é uma palmeira alógama, que foi domesticada pelos ameríndios no período pré-colombiano. São descritas várias utilizações para esta espécie, dentre as quais a produção de frutos, como fonte de amido ou óleo e a produção de palmito merecem destaques (Mora-Urpí et al., 1997). Atualmente a conservação dessa espécie é realizada em bancos ativos de germoplasma a campo, contudo, essa forma de conservação apresenta vários problemas relacionados a fatores bióticos e abióticos (Mora-Urpí et al., 1997; Valois, 2001). Por outro lado, a pupunha apresenta sementes recalcitrantes à conservação (Ferreira & Santos, 1992; Bovi et al., 2004) implicando na necessidade do desenvolvimento de métodos alternativos para a sua conservação.

Para a pupunha o estabelecimento de bancos de germoplasma *in vitro* é sugerido como uma importante ferramenta para a sua conservação (Mora-Urpí et al., 1997). Neste sentido, a cultura de embriões zigóticos deve ser considerada um passo crítico para o estabelecimento de tais bancos de germoplasma, integrando protocolos de criopreservação e facilitando o intercâmbio de germoplasma (Batugal & Engelmann, 1998; Engelmann et al., 2002).

A cultura de embriões zigóticos também possibilita elucidar aspectos da fisiologia do desenvolvimento em condições *in vitro*, podendo ser utilizada como modelo para otimização dos fatores que afetam o crescimento das plântulas provenientes da micropropagação (Triques et al., 1997), da mesma forma que fornece plântulas em condições uniformes e estéreis para trabalhos de cultura de tecidos. Assim, a utilização desta técnica com diferentes propósitos tem sido reportada em várias espécies pertencente à família Arecaceae (Assy-Bah, 1986; Ledo et al., 2001; Sarasan et al., 2002). Para o sucesso da cultura de embriões zigóticos faz-se necessária a otimização da composição do meio de cultura, pelo fato deste sustentar o crescimento contínuo do embrião e da plântula (Monier, 1995; Hu & Ferreira, 1998).

A utilização da germinação *in vitro* de embriões zigóticos em pupunha foi primeiramente descrita por Almeida (1994), que sugeriu o emprego do meio de cultura composto pela formulação salina de MS (Murashige & Skoog, 1962) isento de fitorreguladores. No entanto, ensaios iniciais indicaram que embriões zigóticos de pupunha apresentam alta capacidade de germinação nestas condições, porém crescimento lento e alguns casos de oxidação foram observados (Steinmacher et al., 2001).

Em palmeiras, a oxidação tem sido observada em vários tecidos vegetais em condições *in vitro* (Blake, 1983). Esse fenômeno ocorre principalmente devido à liberação de compostos

fenólicos, que em contato com o oxigênio formam quinonas, diminuindo o crescimento e causando a morte dos explantes (Monaco et al., 1977).

Para controlar a oxidação dos explantes, o carvão ativado é amplamente empregado por ter a capacidade de adsorver os compostos fenólicos liberados pelos tecidos vegetais bem como as quinonas formadas. Entretanto, apesar dos fatores envolvidos nos efeitos do carvão ativado ainda não terem sido completamente elucidados, principalmente por haver adsorção não-seletiva e ser influenciado pelas propriedades do meio de cultura (Ebert & Taylor, 1990), cita-se que esta substância apresenta vários benefícios ao desenvolvimento vegetal. Dentre estas, destacam-se a adsorção dos íons excessivos e uma liberação lenta e gradual dos mesmos. Tal característica pode ser benéfica ao desenvolvimento vegetal por manter, dessa forma, o meio de cultura em equilíbrio de adsorção (Pan & Staden, 1998) sustentando o crescimento contínuo das plântulas ao longo do cultivo *in vitro*. Ainda neste contexto, Pan & Staden (1998) citam que o carvão ativado tem outras propriedades benéficas, principalmente para o crescimento radicular, podendo ser atribuídos ao escurecimento do meio de cultura, à adsorção de substâncias reguladoras do crescimento e outros compostos orgânicos e ainda auxiliar na oxigenação do meio de cultura. Em pupunha essa substância foi utilizada na concentração de 2,5 g.L<sup>-1</sup> por Stein & Stepens (1991), e apesar de não ter observado problemas com oxidação na espécie, plântulas foram regeneradas apenas na presença de carvão ativado, evidenciando a existência de outros benefícios além do controle da oxidação.

Dada a importância da cultura de embriões zigóticos e os diferentes fatores associados a essa técnica, o presente trabalho objetivou estudar a influência de diferentes formulações salinas e do carvão ativado sobre a germinação *in vitro* de embriões zigóticos e crescimento das plântulas de pupunha.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

Todos os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal, do Departamento de Fitotecnia integrado ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina em Florianópolis.

### **4.1 Material Vegetal**

O material vegetal utilizado no presente estudo foi cedido pelo Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA. Sementes provenientes de plantas de polinização aberta da população Yurimáguas foram utilizadas como fonte de explantes. Essas sementes foram retiradas

de frutos, cujo estágio fisiológico de maturação encontrava-se na transição da coloração verde escura para a coloração característica do fruto maduro.

Para a desinfestação das sementes, primeiramente foi retirado o endocarpo dos frutos de forma não asséptica e posteriormente, as sementes propriamente ditas foram enxaguadas em água destilada. Já em câmara de fluxo laminar, a desinfestação desses explantes foi realizada pela imersão em álcool 70°GL durante 5 min seguida de outra imersão, de 40 min, em solução de hipoclorito de sódio comercial a 60% (2 a 2,5% de cloro ativo), adicionado de 1 gota de surfactante Tween-20® para cada 100ml dessa solução. Posteriormente foram efetuados três enxágües com água destilada deionizada e estéril para remoção do excesso de hipoclorito.

#### **4.2 Meios de cultura e condições de cultivo**

Para avaliação do potencial de germinação, embriões zigóticos dissecados com o auxílio de estereoscópio de forma asséptica foram imediatamente inoculados em meio de cultura composto por diferentes composições salinas, sendo avaliadas a formulação de MS (Murashige & Skoog, 1962), de Y3 (Eeuwens, 1976) e de WH (White, 1942) (Tabela 1) em interação com a presença ou ausência de 1,5 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado. A fonte de ferro foi mantida de acordo com a concentração original de MS (Murashige & Skoog, 1962). A este meio foram adicionadas vitaminas de Morel & Wetmore (1951), 30,0 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 7,0g.L<sup>-1</sup> de Agar (Merse®), com pH ajustado para 5,8 antes da adição do gelificante.

Os tubos de ensaio (150x25 mm) contendo 10 mL de meio de cultura por tubo foram fechados com tampas translúcidas de polietileno e selados com filme de PVC (cloropolivinila). Todos os meios de cultura foram autoclavados a 121°C durante 15 minutos a 1 kgf.cm<sup>-2</sup>. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 26±1°C e fotoperíodo de 16 h de luz branca fria com intensidade de 50-60 μ mol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>.

#### **4.3 Delineamento estatístico**

O experimento foi composto por um bifatorial 3x2 (composição salina x carvão ativado) conduzido em blocos inteiramente casualizados, com quatro repetições, contendo dez unidades amostrais por repetição, sendo cada uma destas composta por um tubo de ensaio contendo um embrião zigótico.

**TABELA 1** - Composição química das diferentes composições salinas utilizadas para a germinação *in vitro* de embriões zigóticos de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth).

Compostos	Formulações Salinas		
	MS <sup>1</sup>	Y <sub>3</sub> <sup>2</sup>	WH <sup>3</sup>
	Macroelementos (mg.L <sup>-1</sup> )		
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	–	–
NH <sub>4</sub> Cl	–	535	–
KNO <sub>3</sub>	1900	2020	80,0
MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	370	247	737,1
CaCl <sub>2</sub> ·2 H <sub>2</sub> O	440	294	–
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	–	–
KCl	–	1492	65,0
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	–	312	16,5
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	–	–	200
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	–	–	287,8
Microelementos (mg.L <sup>-1</sup> )			
KI	0,83	8,3	0,75
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,20	3,10	1,50
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	15,6	11,2	5,28
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8,60	7,20	3,00
NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,25	0,24	–
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,025	0,16	0,10
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,025	0,24	–
NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	–	0,024	–
MoO <sub>3</sub>	–	–	0,01
Fontes de Ferro (mg.L <sup>-1</sup> ) <sup>4</sup>			
Na <sub>2</sub> EDTA	37,3	37,3	37,3
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27,8	27,8	27,8

<sup>1</sup> Formulação salina de Murashige & Skoog (1962). <sup>2</sup> Formulação salina de Eeuwens (1976) <sup>3</sup> Formulação salina de White (1942). <sup>4</sup> A fonte ferro e a concentração de ferro foi mantida a original de MS para todos os meios de cultivo.

As variáveis avaliadas foram a porcentagem de germinação aos 30 dias, considerando germinado embriões zigóticos que apresentaram crescimento de parte aérea. Aos 90 dias após a inoculação avaliou-se a altura das plântulas, a presença e o número de raízes e a presença e tamanho do haustório. Para a análise do tamanho do haustório, esse foi dividido em classes ordenais: 0 - a ausência de haustório; 1 - haustório com diâmetro menor que 3 mm; 2 - haustório com diâmetro entre 3 e 5 mm; e 3 - haustório cujo diâmetro fosse maior que 5 mm.

Para a realização de análises histológicas, foram realizadas secções transversais em tecido fresco, com auxílio de uma lâmina. As secções foram acondicionadas em lâminas de vidro e analisadas em microscópio de luz.

Os dados foram submetidos à análise da variância (ANOVA) e quando necessário ao teste SNK (Student-Newamn-Keuls) para separação das médias, com 5% de significância. Para verificar o efeito do tamanho do haustório com as demais variáveis foi efetuada a análise de correlação.

## **5 RESULTADOS**

A excisão e a posterior inoculação de embriões zigóticos de pupunha (Figura 1A) foi realizada para avaliar o potencial de germinação *in vitro* desses. Após uma semana de inoculação foi possível observar intumescimento, início do processo germinativo (Figura 1B) e o desenvolvimento da lâmina cotiledonar (Figura 1C). Posteriormente, foi observada a formação dos pontos de crescimento: radícula e plúmula, sendo que esta estrutura adquiria coloração marrom-avermelhada (Figura 1D). Após o período de 30 dias de cultivo iniciou-se a emissão da bainha foliar, raiz primária e o desenvolvimento completo do haustório, com coloração verde (Figura 1E). Após o período de 90 dias plântulas completas foram obtidas (Figura 1F).

Observou-se que para a porcentagem de germinação e para a altura das plântulas houve interação significativa entre a composição salina e a presença ou ausência de carvão ativado no meio de cultura. Maiores porcentagem de germinação foram observadas em meio de cultura de MS ou de Y3 na presença de carvão ativado, com valores 90,0% e 96,5%, respectivamente, sem denotar diferença estatística entre si (Tabela 2).

Para a variável altura de parte aérea foi observada diferença estatística apenas entre a presença e ausência do carvão ativado e não entre as composições salinas de MS e de Y3, que por sua vez diferiram de WH. As maiores médias foram obtidas em meio de cultura de MS e de Y3 na presença de carvão ativado, alcançando 5,4 cm e 5,9 cm, apresentando (Tabela 2).

**TABELA 2** - Efeito de diferentes composições salinas de meio de cultura para a percentagem de germinação de embriões zigóticos e para a altura da parte aérea (cm) de pupunha (*B. gasipaes* Kunth) germinados *in vitro* na presença ou ausência de carvão ativado ( $1,5\text{g.L}^{-1}$ ).

Meio de Cultura	Germinação (%)			Altura da Parte Aérea (cm)		
	Carvão Ativado		Média *	Carvão Ativado		Média *
	Presença	Ausência		Presença	Ausência	
MS <sup>1</sup>	90,0aA	35,5bAB	62,7A	5,4aA	3,1bA	4,3A
Y3 <sup>2</sup>	96,5aA	55,0bA	75,7A	5,9aA	2,7bA	4,3A
WH <sup>3</sup>	17,5aB	7,5aB	12,5B	0,9aB	0,1aB	0,5B
Média*	68,0a	32,7b		4,0a	2,0b	
CV <sup>4</sup> (%)	31,7			28,5		

<sup>1</sup>Formulação salina de Murashige & Skoog (1962); <sup>2</sup>Formulação salina de Eeuwens (1976); <sup>3</sup>Formulação salina de White (1942); <sup>4</sup>Coefficiente de variação, expresso em percentagem; \* Médias seguidas por letras distintas, minúsculas nas linhas e maiúsculas na coluna, diferem entre si ao nível de significância de 95%, pelo teste de SNK.

Por outro lado, para o número de raízes não houve interação significativa entre as diferentes composições salinas e a adição de carvão ativado (Tabela 3). Contudo, a adição de carvão ativado apresentou diferença estatística significativa em comparação com a ausência. Em relação à composição salina do meio de cultura, o número médio de raízes foi de 1,6 raízes em meio de cultura de MS e Y3, diferindo estatisticamente do meio de cultura de WH. Ainda para meio de cultura de WH sem carvão ativado, o desenvolvimento de raízes foi completamente inibido (Tabela 3).

No presente estudo, a lâmina cotiledonar que formava o haustório apresentou desenvolvimento intenso durante as primeiras semanas de cultivo (Figura 1C-E). Análises histológicas revelaram que o haustório era composto por células grandes, com parede celular delgada e presença de feixes vasculares (Figura 1J) e com presença amiloplastos nas células internas, enquanto aquelas da periferia desenvolviam cloroplastos (Figura 1L) estimulados pela presença de luz.

Para avaliar se o desenvolvimento do haustório foi influenciado pelas condições impostas na cultura *in vitro*, o tamanho dessa estrutura foi dividido em classes de tamanho. Para essa variável, a presença de carvão ativado resultou em maior crescimento do haustório, alcançando 1,7 em uma escala ordinal de 0 a 3 (Tabela 3). O mesmo valor foi encontrado para os meios de cultura de MS e de Y3 sendo significativamente superior ao valor observado em meio de cultura de WH (Tabela 3). Estes resultados indicam que em meio de cultura de MS ou Y3 suplementado com carvão ativado, o haustório apresentava diâmetro entre 3 mm e 5 mm, enquanto que em meio de cultura WH as plântulas apresentavam haustório menor que 3 mm.

**TABELA 3** - Efeito de diferentes composições salinas no meio de cultura para o número de raízes e classes de tamanho de haustório (0 – ausência; 1 – haustório <3 mm; 2 – haustório entre 3 e 5 mm; 3 – haustório >5 mm) aos 90 dias após a inoculação de embriões zigóticos de pupunha (*B. gasipaes* Kunth) germinados *in vitro* na presença ou ausência de carvão ativado (1,5g.L<sup>-1</sup>).

Meio de Cultura	Número de Raízes		Média *	Tamanho do Haustório		Média *
	Carvão Ativado			Carvão Ativado		
	Presença	Ausência		Presença	Ausência	
MS <sup>1</sup>	2,2	1,0	1,6A	2,0	1,5	1,7A
Y3 <sup>2</sup>	2,0	1,2	1,6A	2,2	1,2	1,7A
WH <sup>3</sup>	1,2	0,0	0,6B	1,0	0,1	0,5B
Média *	1,8a	0,7b		1,7a	0,9b	
CV <sup>4</sup> (%)	33,4			30,7		

<sup>1</sup>Formulação salina de Murashige & Skoog (1962); <sup>2</sup>Formulação salina de Eeuwens (1976); <sup>3</sup>Formulação salina de White (1942); <sup>4</sup>Coefficiente de variação, expresso em percentagem; \* Médias seguidas por letras distintas, minúsculas nas linhas e maiúsculas na coluna, diferem entre si ao nível de significância de 95%, pelo teste de SNK.

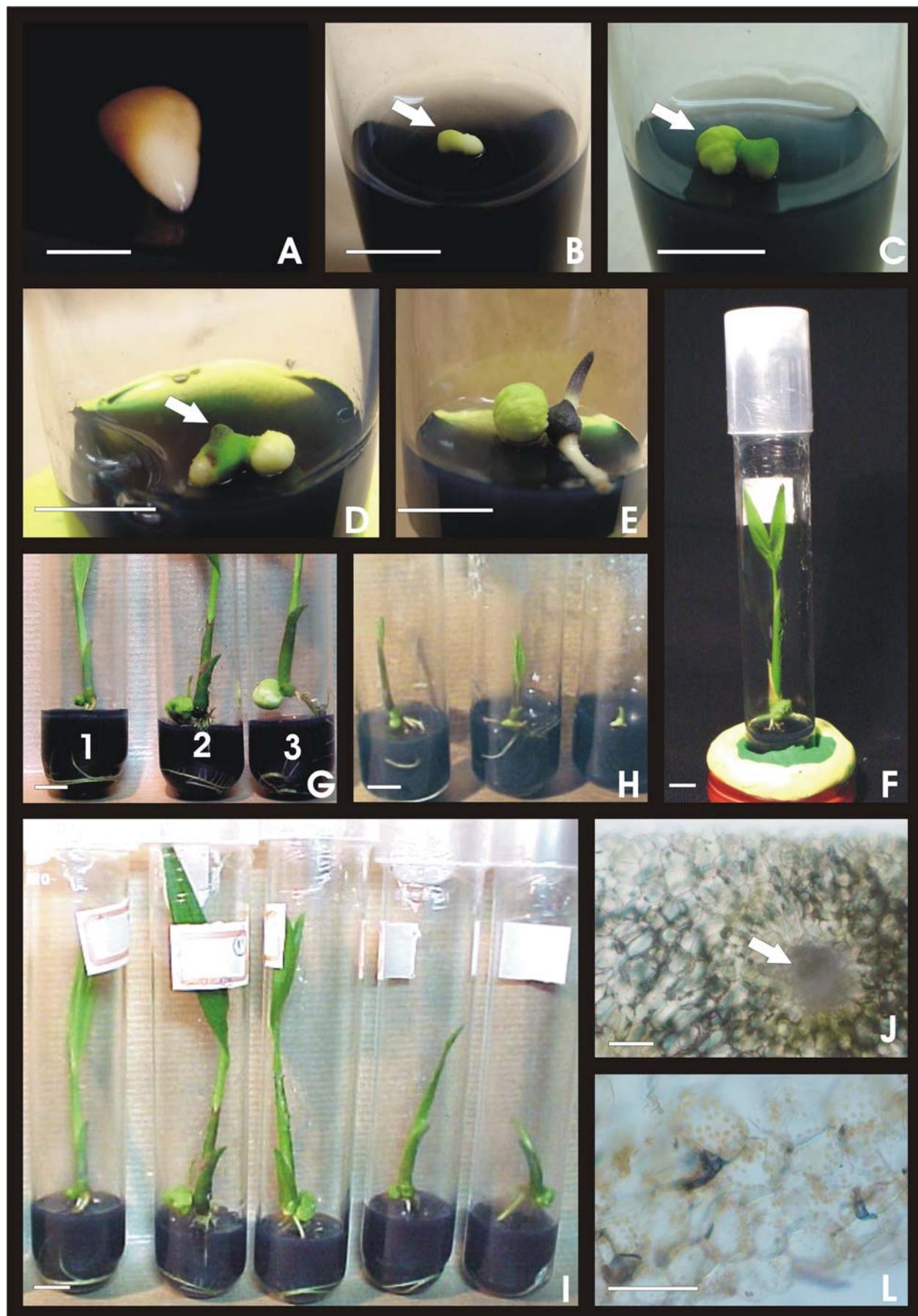
Para avaliar se o tamanho do haustório influenciou o crescimento das plântulas, os valores dessa variável foram submetidos à análise de correlação com as demais variáveis. Com exceção do meio de cultura composto por sais de WH ausente de carvão ativado, em todos os demais tratamentos a altura da parte aérea apresentou correlação significativa com a classe de tamanho do haustório (Tabela 4).

**TABELA 4** - Correlação entre a presença e tamanho de haustório e as variáveis de percentagem de germinação, altura da parte aérea e número de raízes de embriões zigóticos de pupunha (*B. gasipaes* Kunth) germinados *in vitro* em meio de cultura com diferentes composições salinas na presença ou ausência de 1,5g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado.

Composição Salina	Carvão Ativado		Haustório <sup>4</sup>
MS <sup>1</sup>	Presença	Germinação	5,8 <sup>ns</sup>
		Altura	60,3 <sup>**</sup>
		Nº de Raízes	19,1 <sup>ns</sup>
	Ausência	Germinação	10,7 <sup>ns</sup>
		Altura	49,2 <sup>**</sup>
		Nº de Raízes	33,5 <sup>*</sup>
Y3 <sup>2</sup>	Presença	Germinação	35,8 <sup>*</sup>
		Altura	40,2 <sup>*</sup>
		Nº de Raízes	39,6 <sup>*</sup>
	Ausência	Germinação	6,2 <sup>ns</sup>
		Altura	43,4 <sup>**</sup>
		Nº de Raízes	36,3 <sup>**</sup>
WH <sup>3</sup>	Presença	Germinação	25,0 <sup>ns</sup>
		Altura	59,7 <sup>**</sup>
		Nº de Raízes	35,5 <sup>*</sup>
	Ausência	Germinação	3,8 <sup>ns</sup>
		Altura	33,3 <sup>ns</sup>
		Nº de Raízes	0,0 <sup>ns</sup>

<sup>1</sup>Formulação salina de Murashige & Skoog (1962); <sup>2</sup>Formulação salina de Eeuwens (1976); <sup>3</sup>Formulação salina de White (1942); <sup>4</sup>Valores de r, valores baseados em 40 amostras, exceto MSaus = 39 e Y3pres = 37; <sup>ns</sup> não significativo \*Significativo (p<0,05); \*\* Altamente significativo (p<0,01).

**FIGURA 1.** Germinação *in vitro* de embriões zigóticos de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth). A – Aspecto do embrião zigótico. B – Embrião zigótico após 7 dias de cultivo. Notar intumescimento na região da plúmula (Seta). C – Embrião zigótico após 14 dias de cultivo. Notar o desenvolvimento da lâmina cotiledonar (Seta). D – Formação dos pontos de crescimento, radícula e plúmula. Notar coloração marrom-avermelhada na plúmula (Seta). E – Emissão da bainha foliar e raiz primária, e formação completa do haustório. F – Aspecto de uma plântula completa. G – Detalhe do haustório e classes de tamanhos deste (1 – haustório <3 mm; 2 – haustório entre 3 e 5 mm; 3 – haustório >5 mm). H – Morfologia das plântulas cultivadas em meio de cultura de WH. I – Morfologia das plântulas cultivadas em meio de cultura de MS e Y3. J – Secção transversal de tecido fresco do haustório. Notar a presença de feixe vascular (Seta). L – Secção transversal de tecido fresco do haustório apresentando células parenquimáticas com grande quantidade de grânulos. Figura 1A – Barra=1 mm; Figura J e L – Barra=200 µm; Demais Figuras barra=1 cm.



## 6 DISCUSSÃO

De uma forma geral, a composição do meio de cultura para a germinação *in vitro* de embriões zigóticos pode ser relacionada com o estágio de desenvolvimento destes embriões. Embriões zigóticos maduros necessitam de um meio de cultura de composição mais simples, contendo uma composição simples de sais minerais e uma fonte de energia (Monier, 1995). Contudo, o presente estudo mostra que para a aplicação da técnica de germinação *in vitro* de embriões zigóticos de pupunha um meio de cultura com composição salina mais complexa é necessário.

No presente estudo, foi possível observar que plântulas mantidas em meio de cultura MS ou Y3 apresentavam um crescimento mais vigoroso, coloração verde intensa, emissão de folhas, e balanço entre parte aérea e o sistema radicular (Figura 1I). Por outro lado, plântulas mantidas em meio de cultura de WH apresentavam baixo desenvolvimento, pouca emissão de folhas, e crescimento desbalanceado entre a parte aérea e a raiz (Figura 1H). Estas observações estão de acordo com Paranjothy (1984), que observou que embriões zigóticos de *Elaeis guineensis* apresentaram baixo vigor e crescimento desbalanceado de raízes e parte aérea quando cultivados em meio de cultura WH, sugerindo também a necessidade de um meio de composição mais complexa para a cultura de embriões zigóticos dessa espécie. O fato de o meio de cultura composto por sais de White (1942) apresentar menor germinação e crescimento das plântulas pode ser devido a sua baixa força iônica ( $13,23 \text{ meq.L}^{-1}$ ) em comparação com a composição de Murashige & Skoog (1962) e Eeuwens (1976), que apresentam  $52,12 \text{ meq.L}^{-1}$  e  $61,23 \text{ meq.L}^{-1}$ , respectivamente. Adicionalmente, outro fator que pode estar ligado ao baixo vigor das plantas em meio de cultura WH é o balanço de nitrogênio. O nitrato é a fonte de nitrogênio mais utilizada pelas plantas, contudo, essa forma deve ser reduzida antes de ser redirecionada ao metabolismo vegetal pelas enzimas nitrato e nitrito redutase (Taiz & Zeiger, 2002). Da mesma forma, explantes e plântulas obtidas em meio de cultura contendo ambas as formas de N ( $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ ) apresentam crescimento mais vigoroso (George, 1993). Neste contexto, o suprimento de nitrogênio no meio de cultura pode ter sido um fator determinante, visto que na formulação WH não há a suplementação de amônia, enquanto que em MS e Y3 a relação nitrato:amônia é de 1,91 e 1,99, respectivamente.

Além da composição do meio de cultura, a presença de carvão ativado incrementou todas as variáveis avaliadas. Apesar da oxidação não ter sido um fator limitante na ausência de carvão ativado, as plântulas obtidas nessas condições apresentavam crescimento lento e desbalanceado.

De maneira geral, dentre todos os fatores relacionados ao meio de cultura para o cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de palmeiras, a presença de carvão ativado influenciou positivamente tanto a germinação quanto o crescimento das plântulas. Embriões zigóticos de *E. guineensis* desenvolveram-se rapidamente em plântulas quando cultivados em meio de cultura contendo carvão ativado, como também o desenvolvimento de raízes foi geralmente ausente em meios de cultura sem carvão ativado (Paranjothy, 1984). Embriões zigóticos de *Cocos nucifera* apresentaram desenvolvimento apenas em meio de cultura adicionado de carvão ativado (Assy-Bah, 1986).

Já em *Syagrus oleracea*, a utilização de carvão ativado não diferiu estatisticamente dos resultados obtidos com o ácido ascórbico, porém, ainda assim apresentou as melhores médias de germinação (Melo et al., 2001). Adicionalmente, Sarasan et al. (2002) utilizaram o carvão ativado para controlar a oxidação e o baixo crescimento de embriões zigóticos de *Hyophorbe lagenicaulis*, palmeira endêmica de Mauritius.

Da mesma forma que para as demais variáveis, o desenvolvimento do haustório foi influenciado pelas condições impostas durante a cultura *in vitro*. Essa estrutura apresentou crescimento intenso durante as primeiras semanas de cultivo, e apresentou-se morfológicamente isodiamétrico e de coloração verde, bastante similar ao haustório de plântulas de *Elaies guineensis* obtidas *in vitro* e descrito por Rabechault & Cas (1974).

O haustório é a estrutura correspondente à lâmina cotiledonar, sendo característico em palmeiras e responsável pela secreção de enzimas que irão digerir o endosperma e redirecionar estas reservas para o metabolismo e crescimento das plântulas (Verdeil & Hocher, 2003). Contudo, não existem evidências claras sobre a função que esta estrutura desempenha em condições *in vitro*.

Estudos com cultivo *in vitro* de embriões zigóticos das palmeiras *Veitchia merilli* e *Howea fosteriana* evidenciaram que plântulas foram obtidas mesmo sem a presença do haustório, o qual foi danificado pela criopreservação (Chin et al., 1988). Da mesma forma, conforme será apresentado posteriormente (Capítulo III), em pupunha a obtenção de plântulas sem haustório foi observada, sugerindo que esta estrutura não é essencial ao desenvolvimento *in vitro*. Por outro lado, o presente estudo mostra que existe correlação positiva entre a presença e o tamanho do haustório e a altura das plântulas de pupunha. Da mesma forma, Sarasan et al. (2002) observaram que plântulas de *Hyophorbe lagenicaulis* apresentavam relação positiva entre o tamanho do haustório e o crescimento da parte aérea e radicular. Adicionalmente, embriões zigóticos de *E. guineensis* não apresentavam crescimento da parte aérea a menos que uma parte

do haustório fosse mantida durante a cultura (Rabehault & Cas, 1974).

Estudos da germinação *in situ* de pupunha evidenciaram que nessa espécie o haustório é composto por células parenquimáticas, com parede celular delgada, grandes espaços intercelulares e presença de grânulos de amido nas células (Damião-Filho et al., 1999). Tais características foram observadas também *in vitro* no presente estudo, de forma semelhante aquelas descritas em *E. guineensis* (Rabehault & Cas, 1974) e podem, de fato, influenciar diretamente o crescimento das plântulas *in vitro*, principalmente por transferir tais reservas ao desenvolvimento destas. Mais especificamente, devido à presença de vários elementos de vaso, o tamanho do haustório pode influenciar o crescimento das plântulas por apresentar uma maior superfície de contato com o meio de cultura, ou ainda secretar enzimas chaves que regulam a hidrólise e o metabolismo dos compostos orgânicos presentes no meio de cultura. Contudo, estudos mais detalhados devem ser conduzidos para elucidar o papel dessa estrutura em condições *in vitro*.

## **7 CONCLUSÕES**

O presente trabalho descreve a germinação *in vitro* de embriões zigóticos de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth) e o estabelecimento de condições otimizadas para a cultura *in vitro* destes. Esta técnica pode ser empregada como um modelo para avaliar o desenvolvimento *in vitro* de plântulas de pupunha, como também ser associada a técnicas de conservação e multiplicação massal desta espécie. A composição do meio de cultura influenciou a germinação dos embriões zigóticos e o crescimento das plântulas. Os maiores valores para a percentagem de germinação de embriões zigóticos, a altura da parte aérea e para o número de raízes foram observados em meio de cultura composto por sais de MS ou de Y3 suplementado com 1,5 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado. O desenvolvimento *in vitro* do haustório e o tamanho dessa estrutura pode ser correlacionado com a altura das plântulas. Análises histológicas revelaram que o haustório é composto por células grandes com presença de vários grânulos e elementos de vasos.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, M de; **Emprego da cultura *in vitro* para a multiplicação vegetativa de pupunha (*Bactris gasipaes* H.B.K.)**. 1994, 79p, Tese (Doutorado em Botânica), São Paulo: USP.
- ASSY-BAH, B. Culture *in vitro* d'embryons zygotiques de cocotiers. **Oleagineux**, v.41(7), p.321-328, 1986.
- BATUGAL, P. A.; ENGELMANN, F. Coconut embryo *in vitro* culture. First workshop on embryo culture. Philippines, 1998 **Proceedings of....** Philippines: APO/CONGENT, 1998, 164p.
- BLAKE, J. Tissue culture propagation of coconut, date palm and oil palm. In.: DODDS, J.H. (ed.) **Tissue Culture of Trees**. Westport, Connecticut: Avi Publishing Company, 1983, p.29-50.
- BOVI, M.L.A.; MARTINS, C.C.; SPIERING, S.H. Desidratação de sementes de quatro lotes de pupunheira: efeitos sobre a germinação e o vigor. **Horticultura Brasileira**, v.22(1), p.109-112, 2004.
- CHIN, H.F.; KRISHNAPILLAY, B.; ALANG, Z.C. Cryopreservation of *Veitchia* and *Howea* palm embryos: non-development of the haustorium. **Cryo-Letters**, v.9, p.372-379, 1988.
- DAMIÃO-FILHO, C.F.; MÔRO, F.V.; MÔRO, J.R.; TAVEIRA, L. Pejibaye palm (*Bactris gasipaes*) propagative structures and seedlings morphological study. **Acta Horticulturae**, v.486, p.175-181, 1999.
- EBERT, A.; TAYLOR, H.F. Assessment of the changes of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentrations in plant tissue culture media in the presence of activated charcoal. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.20, p.165-172, 1990.
- EEUWENS, C.J. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera*) and cultured *in vitro*. **Physiology Plantarum**, v.36, p.23-28, 1976.
- ENGELMANN, F.; BATUGAL, P.; OLIVER, J.(eds.); **Coconut embryo *in vitro* culture: Part II**. Malásia: International Plant Genetic Resources Institute, Regional office for Asia, the Pacific and Oceania (IPGRI-APO), 2002, 190p.
- FERREIRA, S.A.N.; SANTOS, L.A. Viabilidade de sementes de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth). **Acta Amazônica**, v.22(3), p.303-307, 1992.
- GEORGE, E.F. **Plant Propagation by Tissue Culture**. 2<sup>o</sup> Ed, Edington: Ed. Exegetic Limited, 1993. 574p.
- HU, C.Y.; FERREIRA, A.G.; Cultura de embriões. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.& BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: SPI/EMBRAPA, v.1. 1998. p.371-394.
- LEDO, A.S.; LAMEIRA, O.A.; BENBADIS, A., K.; MENEZES, I.C.; LEDO, C.A.S.; OLIVEIRA, M.S.P.; Cultura *in vitro* de embriões zigóticos de açaizeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.23(3), p.468-472, 2001.
- MELO, B.; PINTO, J.E.B.F.; LUZ, J.M.Q.; PEIXOTO, J.R.; JULIATTI, F.C.; Diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e desenvolvimento das plântulas na cultura *in vitro* de embriões da guarirrobeira [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.]. **Ciência e Agrotecnologia**, v.25(6), p.1301-1306, 2001.
- MONIER, M.; Culture of zygotic embryos. In.: THORPE, T.A. (ed.); ***In vitro* embryogenesis in plants**. Neatherlands: Kluwer Academic Publishers, 1995. p.117-153.

- MORA-URPÍ, J.; WEBER, J. C.; CLEMENT, C. R. **Peach Palm (*Bactris gasipaes* Kunth) – Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops 20**. Rome: Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/ International Plant Genetic Resources Institute, 1997, 81p.
- MOREL, G.; WETMORE, R.H. Tissue culture of monocotyledons. **American Journal of Botany**, v.38, p.138-140, 1951.
- MURASHIGE, T; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiology Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- PAN, M.J.; STADEN, J. V. Use of charcoal in *in vitro* culture – A review. **Plant Growth Regulation**, v.26, p.155-163, 1998.
- PARANJOTHY, K. Oil Palm. In.: AMMIRATO, P.V.; EVANS, D.A.; SHARP, W.; YAMADA, Y. **Handbook of plant cell culture**. New York: Macmillan Publishing Company, v.3, 1984, p.591-605.
- RABECHAULT, H.; CAS, S. Recherches sur la culture *in vitro* des embryos de palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq. var. *dura* Becc.). X.Culture de segments d'embryons. **Oleagineux**, v.29, p.73-78, 1974.
- SARASAN, V.; RAMSAY, M.M.; ROBERTS, A.V.; *In vitro* germination and induction of direct somatic embryogenesis in “Bottle palm” [*Hyophorbe lagenicaulis* (L. Bailey) H.E.Moore] a critically endangered Mauritian palm. **Plant Cell Reports**, v.20, p.1107-1111, 2002.
- STEIN, K.M.; STEPHENS, C. Effect of 2,4-Diclorophenoxyacetic acid and activated charcoal on Somatic Embryogenesis of *Bactris gasipaes* H.B.K. **Turrialba**, v.4, p.196-201, 1991.
- STEINMACHER, D.A.; PEIXOTO, M.L.; GUERRA, M.P.; KROHN, N.G.; SOUZA, M.A.; AGUILA, R.M.; Germinação *in vitro* de embriões zigóticos de pupunha (*B. gasipaes* H.B.K.). X Encontro Anual de Iniciação Científica. **Anais...**, Ponta Grossa, PR, p.28-29, 2001.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 3<sup>o</sup>ed. USA: Sinaur Associates Inc., 2002, 690p.
- TRIQUES, K.; RIVAL, A.; BEULÉ, T.; PUARD, M.; ROY, J.; NATO, A.; LAVERGNE, D.; HAVAUX, M.; VERDEIL, J.L.; SANGARE, A.; HAMON, S. Photosynthetic ability of *in vitro* grown coconut (*Cocos nucifera* L.) plantlets derived from zygotic embryos. **Plant Science**, v.127, p39-51, 1997.
- VALOIS, A.C.D. Conservação *ex situ* de Recursos Genéticos Vegetais. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C. **Recursos Genéticos e Melhoramento**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001, p.123-148.
- VERDEIL, J.L.; HOCHER, V. Digestion and absorption of food in plants: a plant stomach. **Trends in Plant Science**, v.7(6), p.280-281, 2003.
- WHITE, P.R. Plant tissue cultures. **Annual Review of Biochemistry**, v.11, p.615-628, 1942.

## CAPÍTULO III - CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE PUPUNHA

**1 RESUMO**

A criopreservação é considerada como uma opção segura e de baixo custo para a conservação de germoplasma de plantas que apresentam sementes recalcitrantes, como a pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth). O objetivo do presente trabalho foi estabelecer um protocolo para a criopreservação de embriões zigóticos de pupunha, baseado na técnica de encapsulamento-desidratação. Após a excisão, os embriões zigóticos foram encapsulados em uma matriz de 3% de alginato com 2 M glicerol e 0,4 M de sacarose e pré-tratados ou não com 1 M de sacarose durante 24 h, seguido de desidratação por evaporação. Com base no peso fresco, o conteúdo de água das cápsulas decresceu de 83,0% e 86,6% a 17,5% e 20,0% para aquelas cápsulas pré-tratadas ou não, respectivamente, após 4h de desidratação. O pré-tratamento com sacarose a 1 M resultou nos menores valores para a percentagem de germinação de embriões zigóticos e de altura das plântulas, em comparação com aquelas não pré-tratadas. A percentagem de oxidação foi estatisticamente influenciada pelo tempo de exposição ao fluxo de ar, sendo que no tempo 0 ocorreu 4,0% de oxidação e após 8 h de desidratação valores médios de 46,2% de oxidação foram observados. Condições ótimas para a regeneração de plântulas a partir de embriões zigóticos incluíram o encapsulamento e a desidratação durante 4h em câmara de fluxo até 20% de teor de água seguido de imersão rápida em nitrogênio líquido (-196<sup>0</sup>C), permanecendo nesta condição por um período mínimo de 24 horas, e posterior descongelamento rápido em banho-maria a 45<sup>0</sup>C. Nestas condições 28,5% dos embriões germinaram *in vitro*. Contudo, plântulas obtidas a partir de embriões zigóticos desidratados apresentaram menor altura e haustório atrofiado. Análises histológicas evidenciaram que as células do haustório eram grandes, vacuoladas e com poucos corpos protéicos, por outro lado, células pequenas com alta relação núcleo:citoplasma formavam o meristema apical, que são os únicos tipos celulares que apresentam características favoráveis para sobreviver à exposição ao nitrogênio líquido. Plântulas foram aclimatizadas com sucesso, apresentando 41,4±9,3% e 87,5±3,7% de sobrevivência para plântulas provenientes de embriões zigóticos criopreservados e não criopreservados, respectivamente, após doze semanas de aclimatização.

**Palavas-chaves:** Conservação de germoplasma, Cultura *in vitro*, embriões zigóticos, sementes sintéticas.

## CHAPTER III - CRYOPRESERVATION OF PEACH-PALM ZYGOTIC EMBRYO

**2 ABSTRACT**

Cryopreservation is a safe and cost-effective option for long-term germplasm conservation of non-orthodox seed species, such as peach-palm (*Bactris gasipaes* Kunth). The objective of the present study was to establish a cryopreservation protocol for peach-palm zygotic embryos based on the encapsulation-dehydration technique. After excision, zygotic embryos were encapsulated with 3% sodium alginate plus 2 M glycerol and 0.4 M sucrose, and pre-treated or not with 1 M sucrose during 24 h, followed by air-drying. On fresh weight basis, water contents of capsules decreased from 83.0% and 86.6% to 17.5% and 20.0% for those capsules pre-treated or not, respectively, after 4h of dehydration. Sucrose pre-treatment at 1 M caused lower zygotic embryo germination rate and plantlet height in contrast with non-treated capsules. Oxidation rate was statistically influenced by duration of exposition to air, control capsules showed 4.0% oxidation and after 8 h of dehydration 46.2% oxidation was observed. Optimal conditions for recovery of cryopreserved zygotic embryos include encapsulation and dehydration for 4 h in a flow cabinet to 20% water content followed by rapid freezing in liquid nitrogen (-196<sup>0</sup>C) and rapid thawing at 45<sup>0</sup>C. In these conditions 28.5% of the zygotic embryos germinated *in vitro*. However, plantlets obtained from dehydrated zygotic embryos had lower heights and stunted haustoria. Histological analysis showed that haustorium cells were large, vacuolated, with few proteins bodies. In contrast, small cells with high nucleus:cytoplasm ratios formed the apical meristem, which were the cell types with favorable characteristics for survival after exposure to liquid nitrogen. Plantlets were successfully acclimatized and showed 41.4±9.3% and 87.5±3.7% survival rates for plantlets from cryopreserved and non-cryopreserved treatments, respectively, after twelve weeks of acclimatization.

**Key-Words:** Germplasm conservation, *in vitro* culture, zygotic embryos, synthetic seeds.

### 3 INTRODUÇÃO

A pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth) é uma palmeira domesticada e apresenta alta variabilidade genética (Mora-Urpi et al., 1997), possivelmente devido aos vários eventos de domesticação que ocorreram simultaneamente. Atualmente a conservação dos recursos genéticos dessa espécie é realizada em coleções de campo, que apresentam várias vantagens, porém elevada vulnerabilidade (Clement, 1997).

A conservação *on farm* tem sido sugerida como uma forma eficiente para a manutenção da variabilidade genética para pupunha (Adin et al., 2004), no entanto, a necessidade de replicatas é de extrema importância para assegurar a conservação a longo prazo (Valois, 2001). Neste sentido, justifica-se a utilização de bancos de conservação *ex situ* como forma complementar às demais técnicas de conservação. No entanto, essa espécie apresenta sementes recalcitrantes à desidratação (Bovi et al., 2004), perdendo sua viabilidade completamente após pequenos períodos de armazenamento.

Para a conservação *ex situ* de plantas cujas sementes são recalcitrantes, a criopreservação é tida como a melhor técnica alternativa para a conservação a longo prazo. Essa técnica pode ser descrita como a manutenção da viabilidade celular pela paralisação do seu metabolismo em temperaturas ultra-baixas, alcançadas geralmente com o uso do nitrogênio líquido (-192°C) ou sua fase vapor (-150°C) (Engelmann, 2004).

Diferentes metodologias foram desenvolvidas para assegurar a viabilidade celular após a exposição ao nitrogênio líquido (Engelmann, 2004) e dentre estas, cita-se a utilização do encapsulamento-desidratação. Essa técnica, desenvolvida por Dereuddre et al. (1991), emprega a tecnologia de sementes sintéticas combinando dois tratamentos crioprotetores, a desidratação por evaporação e pelo potencial osmótico devido às altas concentrações de sacarose. Posteriormente essa técnica foi aprimorada por Sakai et al. (2000), adicionando sacarose e glicerol na matriz de alginato. Adicionalmente ao encapsulamento, para aumentar a tolerância das células à desidratação tem sido sugerido o emprego de um pré-tratamento dos explantes com concentrações de sacarose variando de 0,3 a 1,5 M (Dereuddre et al., 1991; Dumet et al., 1993; Ishikawa et al., 1997; Hirai & Sakai, 1999). Os mecanismos envolvidos nesse aumento de tolerância são ligados a uma maior estabilidade das membranas celulares (Engelmann, 2004), ao acúmulo de polissacarídeos (Bagniol et al., 1992; Gonzáles-Arno et al., 2003) e a fragmentação dos vacúolos (Helliot et al., 2003) devido a esse pré-tratamento dos explantes.

Em palmeiras, a utilização da criopreservação foi reportada utilizando meristemas apicais

de *Phoenix dactylifera* (Bagniol & Engelmann, 1991), plúmula de *Cocos nucifera* (Hornung et al., 2001) e embriões somáticos de *Elaeis guineensis* (Dumet et al., 1993; Engelmann et al., 1995) como fonte de explantes. Contudo, para assegurar a integridade genética das plantas conservadas, a utilização de embriões zigóticos é tida como a melhor fonte de explantes e protocolos para *Cocos nucifera* (Assy-Bah & Engelmann, 1992), *Elaeis guineensis* (Grout et al., 1983), *Areca catechu* (Raja et al., 2004), *Veitchia merrillii* e *Howea fosteriana* (Chin et al., 1988).

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver um protocolo para a criopreservação e regeneração de plântulas a partir de embriões zigóticos utilizando a técnica de encapsulamento e desidratação, visando a conservação a longo prazo de pupunha.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

Todos os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal, do Departamento de Fitotecnia integrado ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina em Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

### **4.1 Material Vegetal**

Foram utilizadas sementes provenientes de plantas mantidas na área de produção do Projeto RECA – Reflorestamento Econômico Consorciado Adensado, localizada em Nova Califórnia, RO, para avaliar o potencial de criopreservação de embriões zigóticos de pupunha. Os frutos que continham as sementes estavam no estágio de transição da coloração verde para a coloração amarela ou vermelha.

Os procedimentos para a desinfestação e obtenção dos embriões zigóticos foram os mesmos descritos para a germinação *in vitro* de embriões zigóticos (Capítulo II). Após a dissecação dos embriões, estes foram mantidos em meio de cultura composto pelos sais de MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com vitaminas de Morel e Wetmore (1951) e 0,3 M de sacarose. O pH do meio de cultura foi ajustado a 5,8 antes da adição de 7,0 g.L<sup>-1</sup> de Agar (Merse®) e esterilizado por autoclavagem à 121°C a 1 kgf.cm<sup>-2</sup> durante 15min. O meio de cultura foi envasado em 30 mL por placa de Petri. Em cada placa de petri foram inoculados 25 embriões zigóticos mantidos em câmara, tipo B.O.D., à 25°C em escuro total por um período de aproximadamente 12 horas.

## **4.2 Procedimentos para o encapsulamento e criopreservação**

Embriões zigóticos intactos foram selecionados e encapsulados em matriz de alginato para a criopreservação. Essa matriz foi composta por 3% de alginato de sódio, 2 M de glicerol e 0,4 M de sacarose, segundo metodologia de Sakai et al. (2000). Para a complexação das cápsulas foi utilizada uma solução de 100 mM de CaCl<sub>2</sub>. Todas as soluções utilizadas foram autoclavadas à 121°C a 1 kgf.cm<sup>-2</sup> durante 15min. O encapsulamento dos embriões zigóticos foi realizado com o auxílio de uma micropipeta, com capacidade de 1000 µL e ponteira aparada. As cápsulas permaneceram na solução de CaCl<sub>2</sub> por um período de 30 min, sendo em seguida enxaguadas em água destilada deionizada estéril uma vez e colocadas sobre papel filtro para remoção do excesso.

Para avaliar o efeito do pré-tratamento das unidades encapsuladas, foi utilizado meio de cultura líquido com composição salina de MS e vitaminas de Morel, adicionado de 1 M de sacarose, com pH aferido a 5,8 e autoclavado a 121°C a 1 kgf.cm<sup>-2</sup> durante 15min. As cápsulas permaneceram em frascos de Erlenmeyer, contendo 100 mL de meio de cultura, no escuro a 25°C, em agitador horizontal a 80 rpm durante um período de 24 horas.

Para a desidratação das cápsulas, foram testados diferentes tempos de exposição (0, 2, 4 ou 8 horas) ao fluxo contínuo, com ou sem o pré-tratamento em sacarose descrito acima. Estas cápsulas foram colocadas em placas de Petri e expostas ao fluxo contínuo da câmara de fluxo estéril. Para acompanhar a curva de perda de água, todas as cápsulas foram pesadas antes e após os tratamentos e o peso seco inicial foi determinado a partir de 15 cápsulas contendo um embrião zigótico para cada tratamento, colocadas em estufa a 105°C durante 48 horas.

Para avaliar o efeito da criopreservação, metade das unidades encapsuladas foi imersa em nitrogênio líquido e as demais foram reservadas para avaliar o potencial de germinação dos embriões zigóticos não criopreservados. A criopreservação das unidades encapsuladas foi realizada acondicionando-as em criotubos (1,5 mL), dispostos em canaletas de alumínio, sendo rapidamente imersas em nitrogênio líquido, permanecendo nesta condição por um período mínimo de 24 horas. Posteriormente, as unidades foram submetidas à técnica de descongelamento rápido, colocando os criotubos em banho-maria à 45°C durante 2 min.

Após os tratamentos, todas as cápsulas obtidas foram submetidas a um tratamento de rehidratação adaptado da metodologia de Ishikawa et al. (1997). Estas cápsulas foram transferidas para tubos de 2mL (*Eppendorf*<sup>®</sup>) contendo 1,5mL de meio de cultura líquido suplementado com 1M de sacarose, conforme descrito anteriormente. Após 30min nessas

condições, 0,5mL desse meio de cultura foi retirado e outros 0,5mL de meio de cultura suplementado com 0,1M de sacarose foi adicionado, permanecendo durante 10min. Esse procedimento foi repetido três vezes.

#### **4.3 Procedimentos para a germinação *in vitro***

Para a obtenção dos embriões zigóticos, as unidades após o processo de rehidratação tiveram suas cápsulas fisicamente removidas com o auxílio de uma pinça e os embriões zigóticos foram transferidos para o meio de cultura.

O meio de cultura composto por sais de MS (Murashige & Skoog, 1962) e vitaminas de Morel & Wetmore (1951), suplementado com 1,5 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado foi utilizado no presente estudo com base nos resultados dos ensaios anteriores (Capítulo II). O pH foi ajustado para 5,8 antes da adição de 7,0 g.L<sup>-1</sup> de Agar (Merse®). O meio de cultura foi disperso em aproximadamente 10 mL por tubo de ensaio e autoclavado a 121°C a 1 kgf.cm<sup>-2</sup> durante 15min.

Dois embriões zigóticos foram inoculados em cada tubo de ensaio e as culturas foram mantidas em sala de crescimento à temperatura de 26±1°C e fotoperíodo de 16h com intensidade luminosa de 50-60 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>.

#### **4.4 Análises Histoquímicas**

Amostras para a realização de estudos histoquímicos foram fixadas em paraformaldeído 2% durante 48h, desidratadas em série alcoólica (30 a 100°GL) e embebidas em historesina (Leica®). Secções de 5 μM de espessura foram obtidas em micrótomo rotatório manual (Slee Technik), distendidas sobre uma gota de água em uma lâmina de vidro e secas rapidamente por calor, em bico de Bunsen. Após o preparo e secção das amostras, estas foram submetidas à coloração para proteínas com Coomassie brilliant blue R250 (Sigma®). Com o objetivo de evitar artefatos da técnica de histologia, as amostras foram coletadas de um único bloco e preparadas simultaneamente.

#### **4.5 Aclimatização das plântulas**

As plântulas mantidas nas condições descritas acima por um período de vinte semanas e com altura superior a 4 cm foram selecionadas. O haustório foi removido, quando presente, e o sistema radicular reduzido para facilitar o manejo das plântulas e estimular o desenvolvimento de novas raízes. Em seguida as plântulas foram lavadas em água corrente para remoção dos resíduos do meio de cultura.

Estas plântulas foram então transferidas para bandejas de Poliestireno expandido (Isopor<sup>®</sup>) contendo células isoladas de 3x3 cm. Foi utilizado como substrato o composto comercial Plantmax<sup>®</sup> HT (Condutividade Elétrica 1,5-2,0) e palha de arroz carbonizada (1:1). As bandejas contendo as plântulas foram colocadas dentro de caixas plásticas com uma lâmina de água, de forma que a água não tivesse contato com a bandeja. Uma lâmina de vidro foi colocada sobre a caixa, permitindo a entrada de luz, contudo evitando a perda excessiva de umidade. A irrigação foi realizada diariamente, por meio de pulverizador manual. Após quatro semanas nessas condições, uma abertura de aproximadamente 30% da lâmina de vidro foi realizada, permitindo a troca de umidade. Após seis semanas essa abertura passou a 50% da área total da caixa. As caixas com as bandejas foram mantidas em sala de crescimento a  $26\pm 1^{\circ}\text{C}$  sob fotoperíodo de 12h com intensidade luminosa de  $100\text{-}120\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

Após 12 semanas nessas condições, as plântulas foram transferidas para sacos plásticos contendo o mesmo substrato e mantidas em estufa plástica, com irrigação diária e iluminação natural.

#### **4.6 Delineamento estatístico**

Foi delineado um experimento em trifatorial,  $2\times 2\times 4$  – Criopreservados ou não x Pré-tratamento com 1 M de sacarose ou não x quatro períodos de desidratação, perfazendo um total de 16 tratamentos. O presente estudo foi conduzido em delineamento de blocos completos, com cinco blocos, sendo cada bloco uma planta matriz. Cada bloco foi constituído de seis unidades amostrais (embriões zigóticos) por tratamento, divididas em três tubos de ensaio, totalizando 48 tubos de ensaio por bloco. Foram realizadas observações periódicas, contudo, para a apresentação dos dados foi considerada a avaliação realizada no terceiro mês após a inoculação, sendo observada a percentagem de germinação e de oxidação, e a altura da parte aérea dos embriões zigóticos. Os dados foram transformados para  $\sqrt{(x+5)}$  e submetidos à análise de variância (ANOVA). Quando necessário, foi aplicado o teste de separação de médias de Duncan a 5% significância. Para a aclimatização de plântulas foi observada apenas a sobrevivência total após 12 semanas de aclimatização, sendo os dados expressos como média $\pm$ erro padrão.

## 5 RESULTADOS

Embriões zigóticos de pupunha (*B. gasipaes* Kunth) (Figura 1A) cultivados em meio de cultura contendo 0,3M de sacarose (Figura 1B) foram selecionados e encapsulados em matriz de alginato, resultando em cápsulas de aproximadamente 4 mm (Figura 1C). Ensaio preliminares evidenciaram que embriões zigóticos mantidos nas cápsulas para a germinação *in vitro* não apresentavam desenvolvimento, possivelmente devido ao alto potencial osmótico dessas cápsulas. Dessa forma, no presente estudo, após os tratamentos de desidratação e criopreservação, as cápsulas foram rehidratadas possibilitando a remoção dos embriões zigóticos de forma intacta (Figura 1D). Após um período de 90 dias de cultivo avaliou-se a taxa de germinação e de oxidação (Figura 1E), bem como a altura da parte aérea das plântulas. Durante o período de cultura alguns casos de desenvolvimento anormal do embrião foram observados (Figura 1F). Contudo, apenas embriões zigóticos que apresentara o desenvolvimento de parte aérea foram considerados germinados (Figura 1H).

A percentagem de germinação e a altura das plântulas diminuíram significativamente pela criopreservação e pelo pré-tratamento com sacarose ( $p < 0,01$ ), contudo sem apresentar interação entre estes fatores (Tabela 1). Embriões zigóticos que foram apenas desidratados apresentaram em média 38,1% de germinação, enquanto aqueles que antes da desidratação foram pré-tratados em meio de cultura contendo 1 M de sacarose apresentaram 21,2% de germinação em média. Adicionalmente, a criopreservação diminuiu a viabilidade com médias de 13,3% e 46,1% de germinação para os embriões zigóticos criopreservados ou não, respectivamente.

A partir da análise de variância foi possível observar a interação significativa entre o tempo de exposição das cápsulas ao fluxo de ar e a criopreservação em nitrogênio líquido ( $p < 0,01$ ) para a germinação dos embriões zigóticos. Já para a altura das plântulas, a interação entre os três fatores testados apresentou-se de forma significativa ( $p < 0,05$ ) (Tabela 1).

Com base no peso fresco, o teor de água inicial das cápsulas decresceu rapidamente, atingindo 14,0% e 18,0% de teor de água, para cápsulas pré-tratadas ou não, respectivamente (Figura 2A). Da mesma forma, a percentagem de oxidação dos embriões zigóticos foi significativamente ( $p < 0,01$ ) influenciada pelo tempo de desidratação e, portanto, pelo teor de água das cápsulas (Figura 2B). E ainda, a alteração no teor de água das cápsulas afetou a percentagem e a velocidade de germinação dos embriões zigóticos não criopreservados. Embriões zigóticos encapsulados e não desidratados (tempo 0) apresentavam o início da germinação após uma semana de cultura, enquanto que para aqueles embriões desidratados a

germinação foi observada somente duas a três semanas após a inoculação (dados não apresentados).

**TABELA 1** - Efeito da criopreservação e do pré-tratamento em meio de cultura com 1M de sacarose durante 24h para a germinação de embriões zigóticos e para a altura da parte aérea de plântulas de pupunha (*B. gasipaes* Kunth) e teste *F* para os fatores avaliados.

Tratamentos	Germinação (%)			Altura da Parte Aérea (cm)		
	Pré-tratamento		Média <sup>1</sup>	Pré-tratamento		Média <sup>1</sup>
	Ausente	Presente		Ausente	Presente	
Não criopreservado	58,5	33,7	46,1A	2,32	0,99	1,13A
Criopreservado	17,8	8,8	13,3B	0,71	0,35	0,53B
Média	38,1a	21,2b		1,51a	0,67b	
CV <sup>2</sup> (%)	30,65			4,2		
F <sup>3</sup> (Blocos)	7,14 <sup>**</sup>			2,79 <sup>ns</sup>		
F (A:Tempo de exposição)	1,36 <sup>ns</sup>			2,24 <sup>ns</sup>		
F (B: Pré-tratamento)	14,80 <sup>**</sup>			17,60 <sup>**</sup>		
F (C: Criopreservação)	71,22 <sup>**</sup>			28,42 <sup>**</sup>		
F (A x B)	1,49 <sup>ns</sup>			2,77 <sup>*</sup>		
F (A x C)	9,77 <sup>**</sup>			4,87 <sup>**</sup>		
F (B x C)	0,90 <sup>ns</sup>			0,45 <sup>ns</sup>		
F (A x B x C)	1,74 <sup>ns</sup>			2,91 <sup>*</sup>		

<sup>1</sup>Valores médios, agrupando os valores do tempo de desidratação e dos blocos. Valores seguidos por letra diferente, maiúscula na coluna e minúscula na linha, diferem estatisticamente pelo teste *F*. <sup>2</sup> Coeficiente de variação. <sup>3</sup>Valores de teste *F* obtidos a partir da análise de variância. <sup>\*\*</sup> Altamente significativo (p<0,01). <sup>\*</sup> Significativo (p<0,05), <sup>ns</sup> Não significativo.

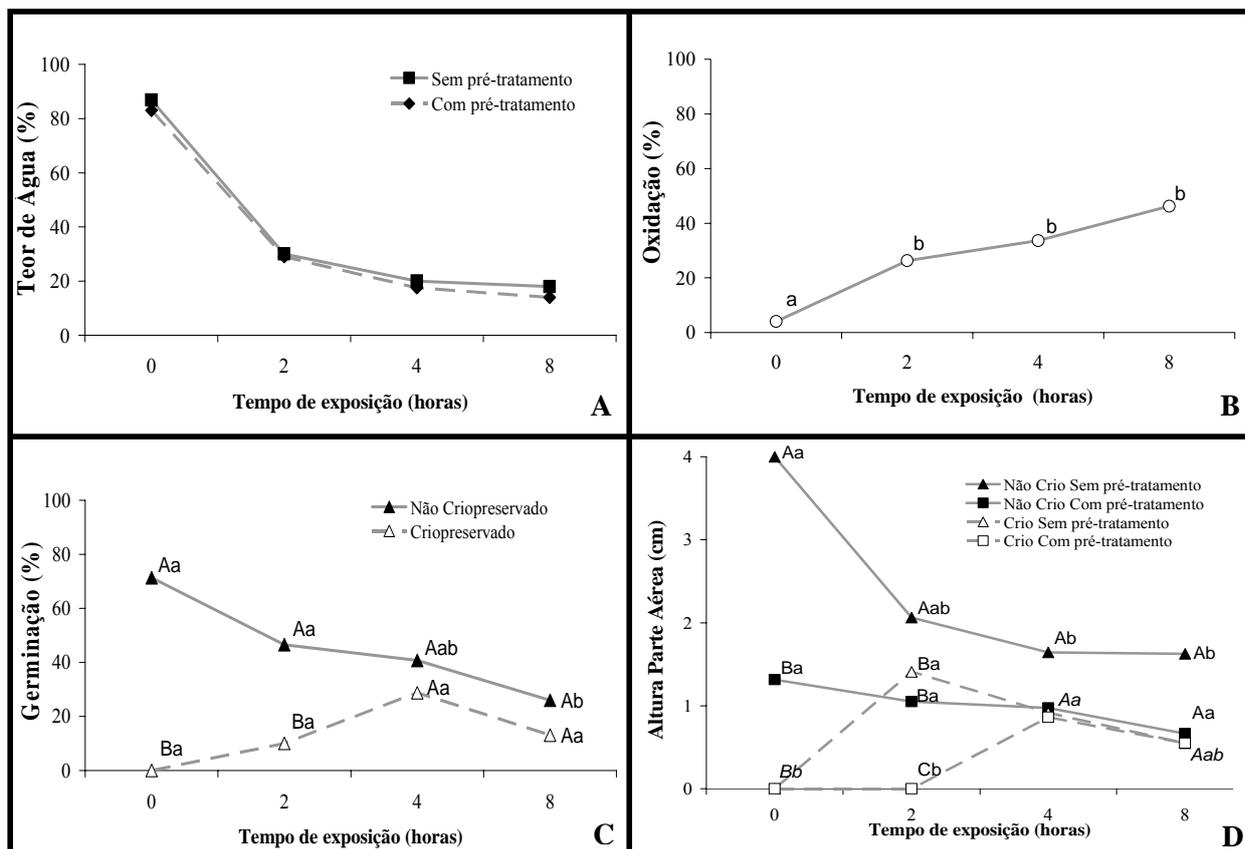
Para a manutenção da viabilidade e para a germinação *in vitro* daqueles embriões zigóticos que foram criopreservados a desidratação em câmara de fluxo foi necessária, visto que estes não sobreviveram à exposição direta (Tempo 0) ao nitrogênio líquido. Nessas condições, a análise estatística não revelou diferenças significativas entre os tempos de desidratação testados, devido ao alto coeficiente de variação encontrado e a baixa média encontrada. Contudo, embriões zigóticos criopreservados após 4 horas de desidratação apresentaram a maior média de germinação (28,7%) sem diferir estatisticamente daqueles não criopreservados (40,7%) (Figura 2C).

Para a altura das plântulas foi possível observar a interação significativa de todos os fatores testados. Plântulas obtidas a partir de embriões zigóticos encapsulados e não desidratados apresentaram a maior média de altura, sem diferir da altura das plântulas obtidas a partir do controle (sem encapsulamento - dados não apresentados). Embriões zigóticos pré-tratados com sacarose sem a desidratação apresentaram 1,3 cm de altura diferindo estatisticamente daquelas plântulas obtidas de cápsulas não pré-tratadas (Figura 2D).

**FIGURA 1.** Criopreservação de embriões zigóticos de pupunha (*B. gasipaes* Kunth). A – Aspecto do embrião zigótico. B – Embriões zigóticos cultivados em meio de cultura contendo 0,3M de sacarose. C – Embriões zigóticos encapsulados. D – Embriões zigóticos inoculados no meio de cultura após os tratamentos. E – Embriões zigóticos oxidados (seta). F – Desenvolvimento anormal de embriões zigóticos criopreservados (seta). G – Plântulas obtidas a partir de embriões zigóticos criopreservados evidenciando o desenvolvimento radicular (seta). H – Plântulas obtidas a partir de embriões zigóticos não desidratados apresentando desenvolvimento normal do haustório (seta) em comparação com aquelas obtidas a partir de embriões zigóticos criopreservados. I – Plântulas obtidas a partir de embrião zigótico não desidratado (esquerda), desidratados por 4h (meio) e criopreservado (direita). J – Plântulas preparadas para a aclimatização. L – Sistema de aclimatização utilizado, composto por caixa plástica e tampa de vidro. M – Plântulas obtidas a partir de embriões zigóticos criopreservados após doze semanas de aclimatização. Figura A barra=1mm; Figuras D-G barra=3mm; Figuras B, C, H-J, M barra=3cm; Figura L barra=10cm.



Plântulas obtidas a partir de embriões zigóticos desidratados e criopreservados em relação aos não desidratados, evidenciando o menor vigor daquelas plântulas provenientes de embriões zigóticos criopreservados. Entretanto, da mesma forma que foi observado para a percentagem de germinação dos embriões zigóticos, após quatro horas de desidratação, não foi detectada diferença estatística entre os tratamentos (Figura 2D).



**FIGURA 2.** Valores obtidos para a criopreservação de embriões zigóticos de pupunha (*B. gasipaes* Kunth). A – Mudança no teor de água (%), com base no peso fresco, durante a desidratação das cápsulas sem ou com pré-tratamento em 1,0M de sacarose durante 24h. B – Percentagem de oxidação dos embriões zigóticos em função do tempo de desidratação. C – Percentagem de germinação dos embriões zigóticos em função do tempo de desidratação e da criopreservação. D – Altura da parte aérea das plântulas em função dos tratamentos da criopreservação. Letras maiúsculas denotam diferença estatística entre o fator criopreservação e pré-tratamento; e minúsculas do fator tempo, respectivamente pelo teste de Duncan a 95% de significância. (Figura D - Letras em itálico representam mais que um tratamento).

Os aspectos morfológicos das plântulas foram influenciados pelos tratamentos aos quais os embriões zigóticos foram submetidos. Plântulas completas, com o desenvolvimento do haustório foram obtidas em embriões que não foram submetidos à desidratação e à criopreservação. Por outro lado, em plântulas obtidas de embriões zigóticos desidratados o desenvolvimento do haustório foi notadamente menor conforme o tempo de desidratação (Figura

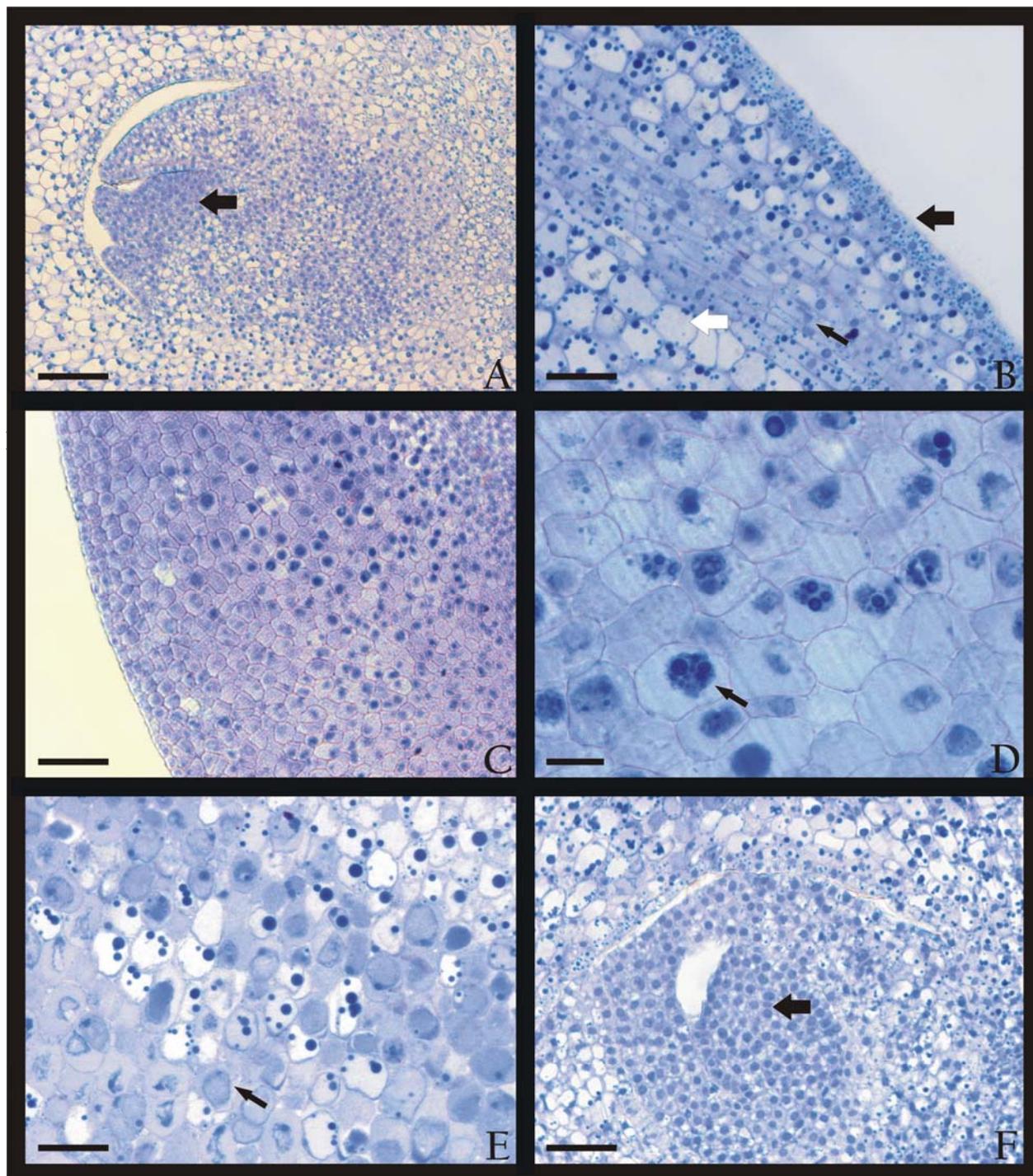
1I), enquanto que naqueles embriões desidratados e criopreservados o haustório não apresentava desenvolvimento (Figura 1H; 1I). Contudo, de forma geral, as plântulas obtidas sempre apresentavam desenvolvimento balanceado de raízes e parte aérea (Figura 1I).

Plântulas aptas à aclimatização (Figura 1J) foram acondicionadas em caixas plásticas fechadas com uma lâmina de vidro (Figura 1L). Após doze semanas de aclimatização as plântulas apresentaram  $41,4 \pm 9,3\%$  e  $87,5 \pm 3,7\%$  de sobrevivência para aquelas plântulas provenientes de embriões zigóticos criopreservados e não criopreservados, respectivamente, sendo então transferidas para casa de vegetação (Figura 1M). Apesar de não ter sido avaliado sistematicamente, neste estudo foi possível observar que plântulas menores que 6 cm de altura apresentaram baixa capacidade de sobrevivência após três semanas de aclimatização.

Análises histoquímicas foram conduzidas para elucidar os aspectos relacionados com a criopreservação de embriões zigóticos de pupunha. Essas análises revelaram que embriões zigóticos de pupunha são formados por diferentes tipos celulares, compondo o meristema apical, as células da lâmina cotiledonar, o procâmbio e a protoderme. Secções longitudinais de embriões zigóticos não evidenciaram a presença de radícula diferenciada (Figura 3A). O meristema apical era formado por células pequenas, com alta relação núcleo:citoplasma e citoplasma denso (Figura 3A). As células da lâmina cotiledonar apresentaram-se vacuoladas, com parede celular delgada e com presença de corpos protéicos bem delimitados, contudo em menor quantidade em relação àquelas observadas na protoderme (Figura 3B). Por sua vez, as células alongadas e com presença de poucos corpos protéicos (Figura 3B) compõem as células do procâmbio.

Quando esses embriões zigóticos contendo elevado teor de água foram submetidos à criopreservação, as análises histoquímicas revelaram alterações no perfil protéico das células. Aquelas células da lâmina cotiledonar apresentaram uma diminuição na quantidade de corpos protéicos (Figura 3C), e estes não se apresentavam de forma delimitada (Figura 3D), possivelmente devido à formação de cristais de gelo que causaram a ruptura das membranas celulares. Embriões zigóticos que foram desidratados durante quatro horas não apresentavam o desenvolvimento normal do haustório, sendo possível observar que neste tecido, várias células apresentavam uma contração citoplasmática (Figura 3E) devido a desidratação excessiva, podendo ser responsável pela morte dessas células. Por outro lado, as células do domo apical após o processo de desidratação e criopreservação apresentavam corpos protéicos bem delineados, sem contração citoplasmática (Figura 3F) e de forma muito similar àquelas não criopreservadas, garantido a sobrevivência desse tipo celular.

**FIGURA 3.** Análises histológicas de embriões zigóticos de pupunha (*B. gasipaes* Kunth) submetidos à desidratação e à criopreservação. A – Secção longitudinal evidenciando a região do meristema apical do embrião zigótico (seta). Note ausência de radícula diferenciada. B – Secção longitudinal mostrando células da protoderme (seta larga escura), do procambio (seta estreita escura) e da lâmina cotiledonar (seta larga clara). C – Secção longitudinal de embrião zigótico criopreservado sem desidratação. D – Secção longitudinal da lâmina cotiledonar de embrião zigótico criopreservado não desidratado. Note a perda de compartimentalização e degradação do conteúdo celular (Seta). E – Secção longitudinal da lâmina cotiledonar de embrião zigótico desidratado. Note a contração do citoplasma (seta). F – Secção longitudinal da região do meristema apical do embrião zigótico desidratado e criopreservados (Seta). Figuras A e C, barra=200 $\mu$ m; Figuras B, E e F barra=100 $\mu$ m; Figura D, barra=20 $\mu$ m.



## 6 DISCUSSÃO

O presente trabalho foi baseado na técnica de encapsulamento e desidratação com pré-tratamento em solução de sacarose anterior a desidratação das cápsulas em câmara de fluxo. Estas cápsulas, da mesma forma, continham sacarose e glicerol, substâncias que apresentam alta capacidade de osmoproteção. Contudo, em ensaios preliminares, a germinação dos embriões zigóticos de pupunha não foi observada a menos que esses fossem removidos da cápsula após a desidratação. O crescimento de meristemas de *Pyrus communis* criopreservados com a utilização dessa técnica também foram observados somente após a remoção das cápsulas (Scottez et al., 1992).

A desidratação é um passo crítico para a manutenção da viabilidade e integridade celular de forma que as células adquiram tolerância ao congelamento e não formem cristais de gelo (Engelmann, 2004). No presente estudo, em cápsulas pré-tratadas ou não, a desidratação destas pela exposição ao fluxo de ar apresentou uma rápida perda de água durante as primeiras horas, seguida de uma desidratação menor e contínua ao longo do tempo. Entretanto, durante a desidratação as amostras apresentaram diminuição de sua viabilidade. Essa cinética de redução do teor de água foi reportada por vários autores (Dereuddre et al., 1991; Jekkel et al., 1998; Wang et al., 2000 e Shatnawi et al., 2004), e todos com redução da viabilidade das amostras não criopreservadas.

Vários estudos utilizando a técnica de encapsulamento-desidratação indicaram que o teor de água ideal observado para a sobrevivência dos explantes à exposição do nitrogênio líquido varia entre 15% e 25% (Jekkel et al., 1998; Martínez et al., 1999). Neste trabalho o ponto de equilíbrio entre a maior percentagem de germinação de embriões zigóticos criopreservados e aqueles não criopreservados foi obtido após quatro horas de desidratação, quando as cápsulas apresentavam 17-20% de teor de água.

A desidratação dos embriões zigóticos, influenciou a germinação e a altura da parte aérea das plântulas de pupunha. Menores médias para essas variáveis foram observadas conforme a diminuição no teor de água das cápsulas, criopreservadas ou não. Reduções na viabilidade e no crescimento devido à desidratação também foram observadas em *C. nucifera* (Assy-Bah & Engelmann, 1992), *Vitis sp.* (Wang et al., 2000) e *V. merrillii* e *H. fosteriana* (Chin et al., 1988). Estes dados sugerem a necessidade de um melhor controle da desidratação e rehidratação dos explantes durante os procedimentos de criopreservação.

No presente estudo a utilização do pré-tratamento contendo 1M de sacarose diminuiu significativamente a germinação dos embriões zigóticos e o crescimento das plântulas. Resultados similares foram observados em *C. nucifera* (Hornung et al., 2001), *Syzygium francissi* (Shatnawi et al., 2004), *Humulus lupulus* (Martínez et al., 1999), *Medicago sativa* (Shibli et al., 2001), *Citrus sp.* (González-Arno et al., 2003) e *Musa spp.* (Panis et al., 1996) indicando que concentração elevada de sacarose causa danos irreversíveis às células vegetais, devido à desidratação elevada dos explantes nessas condições. Os danos causados pela desidratação excessiva das células estão relacionados às alterações na integridade das membranas, a perda da turgidez e a contração irreversível do citoplasma, de forma a comprometer as propriedades estruturais e funcionais das células (Santos, 2000). Por outro lado, explantes pré-tratados com o aumento progressivo da concentração de sacarose apresentam melhor tolerância à dessecação e a criopreservação (Dumet et al., 1993; Martínez et al., 1999), sugerindo um melhor controle da desidratação.

A germinação *in vitro* de embriões zigóticos de pupunha indicou que o haustório apresenta alguma atividade nessas condições, e a altura da parte aérea pode ser correlacionada com o tamanho do haustório (Capítulo II). O fato de as plântulas obtidas a partir de embriões zigóticos desidratados e criopreservados ou não apresentarem menor altura comparativamente àquelas do controle pode ser devido ao desenvolvimento anormal do haustório nessas condições.

A morte do tecido haustorial em função da criopreservação já foi reportada em palmeiras (Chin et al., 1988; Assy-Bah & Engelmann, 1992), contudo, o presente estudo indica que esse tecido, além de não sobreviver à criopreservação é extremamente sensível à desidratação, apresentando crescimento reduzido ou nulo, conforme o tempo de exposição. Tal observação pode explicar também o fato de sementes de pupunha apresentarem o vigor reduzido quando desidratadas (Bovi et al., 2004).

Análises histológicas evidenciaram que as células da região do meristema apical no embrião zigótico são células pequenas, com citoplasma denso e alta relação núcleo:citoplasma (Figura 3A). Em contrapartida, a lâmina cotiledonar é composta por células grandes, vacuoladas, com parede celular delgada e presença de alguns corpos protéicos (Figura 3B). Essa heterogenia celular traz como consequência o fato de que os tratamentos crioprotetores terão efeito benéfico em um ou poucos tipos celulares, em detrimento dos demais, sendo observado que apenas as células da região do meristema apical apresentam condições aparentemente ideais para a sobrevivência.

Para aquelas células da lâmina cotiledonar a desidratação causou danos irreversíveis,

sendo observada a contração permanente do citoplasma (Figura 1E). Vários modelos indicam que células com vacúolos grandes, são intolerantes à desidratação e à criopreservação, e apenas as células com características meristemáticas apresentam capacidade de sobreviver a esses tratamentos (Bagniol et al., 1992; Panis et al., 1996; Helliot et al., 2000). Por outro lado, a permanência de água livre nas células permite a formação de cristais de gelo, resultando na perda da compartimentalização e desintegração do conteúdo celular (Figura 3C, D), sendo o mesmo observado em *Musa sp.* (Helliot et al., 2003) e *Pisum sativum* (Wesley-Smith et al., 1995).

Interessante notar que embriões zigóticos de pupunha não apresentam a radícula diferenciada, característica considerada um tipo de dormência embrionária (Buckeridge et al., 2004). Esta característica pode explicar o desenvolvimento de plântulas com parte aérea e radicular balanceada a partir de embriões criopreservados, visto que a presença de uma radícula diferenciada poderia culminar em um tipo celular intolerante a desidratação e à criopreservação.

O desenvolvimento balanceado das plântulas deve ser levado em consideração para a aclimatização. Plântulas de pupunha obtidas nesse experimento foram aclimatizadas com sucesso, contudo, observações preliminares indicam que aquelas plântulas menores que 7 cm altura apresentam capacidade reduzida de sobreviver à aclimatização. Paranjothy (1984) sugeriu que o tamanho das plântulas antes de sua aclimatização apresentou papel crítico para o sucesso dessa etapa. Plântulas de *Phoenix dactylifera* menores que 10 cm de altura apresentavam menor sobrevivência durante a aclimatização (Tisserat, 1984). Da mesma forma, Tabai (1992) observou que plântulas de *Acrocomia aculeata* menores que 8 cm apresentavam taxa de sobrevivência reduzida.

A técnica de criopreservação pode ser considerada uma alternativa para a conservação de pupunha, complementando as demais técnicas existentes. Para a técnica de criopreservação, a desidratação das cápsulas por quatro horas até atingir 20% de teor de água apresentou os melhores resultados de germinação, similar a resultados obtidos para outras espécies. A partir dos resultados obtidos no presente estudo, um modelo esquemático do protocolo é apresentado na figura 4. A composição da solução de pré-tratamento e a sua intensidade devem ser reavaliadas, pois estes fatores exercem papel fundamental na capacidade de tolerância a desidratação. Da mesma forma, a composição da cápsula deve ser avaliada, visto que embriões zigóticos que permaneceram nestas não apresentaram capacidade de germinar, possivelmente devido ao elevado potencial osmótico. Plântulas foram obtidas a partir de embriões zigóticos criopreservados e aclimatizadas com sucesso.

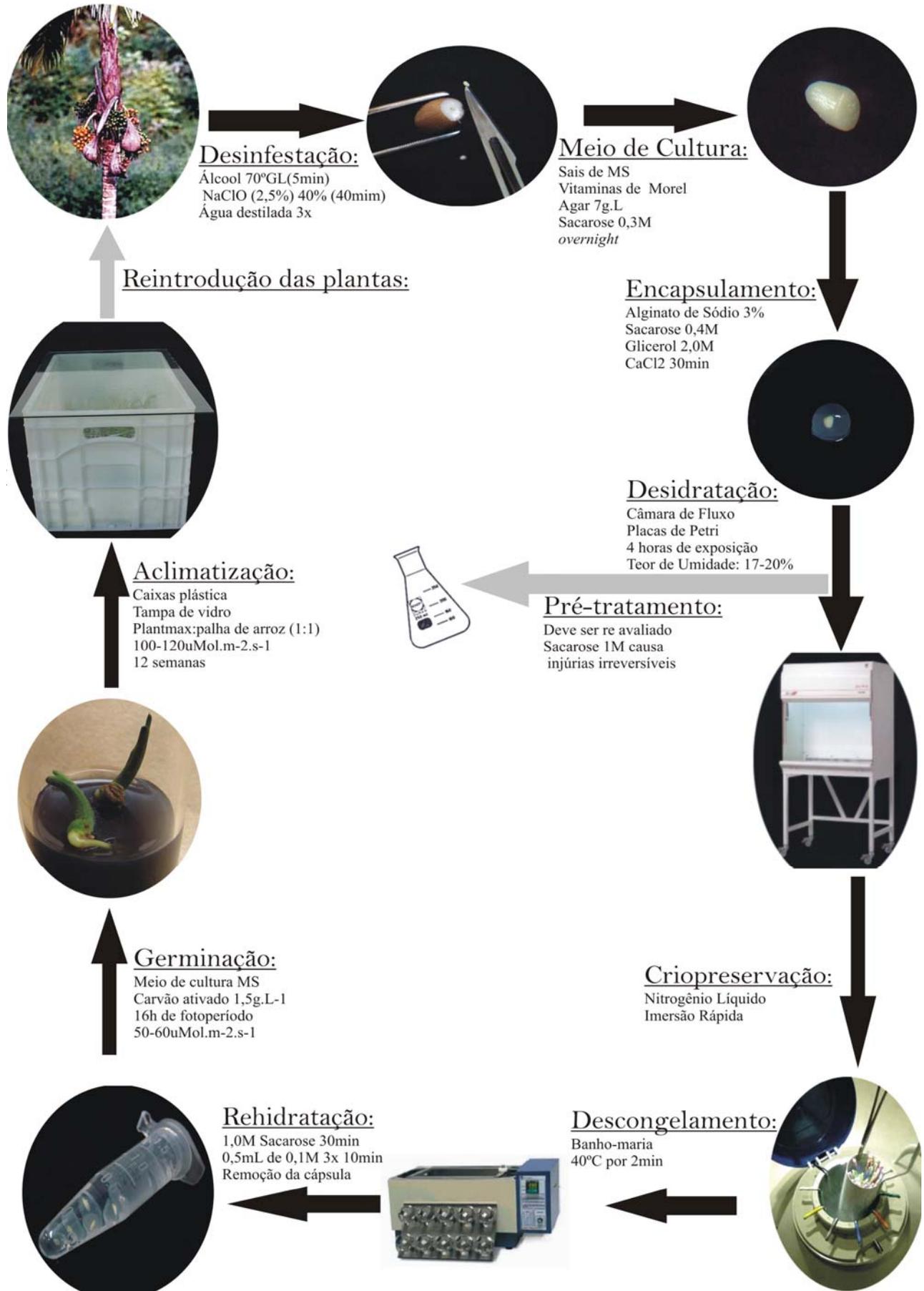
## 7 CONCLUSÕES

Este trabalho apresenta a utilização desta técnica pela primeira vez em pupunha e alguns aspectos ligados à criopreservação de embriões zigóticos desta espécie foram elucidados. A intensidade e a forma de desidratação dos explantes desempenharam papel chave para a sobrevivência desses ao nitrogênio líquido. O não desenvolvimento do haustório foi observado tanto em embriões zigóticos criopreservados quanto naqueles apenas desidratados. Análises histoquímicas realizadas puderam ser relacionadas com as respostas morfológicas observadas, evidenciando que apenas as células com características meristemáticas apresentaram condições ideais para a sobrevivência após a desidratação e à criopreservação.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADIN, A.; WEBER, J.C.; MONTES, C.S.; VIDAURRE, H.; VOSMAN, B.; SMULDERS, M.J.M. Genetic differentiation and trade among populations of peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth) in the Peruvian Amazon – implications for genetic resource management. **Theoretical and Applied Genetics**, v.108(8), p.1564-1573, 2004.
- ASSY-BAH, B.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of mature embryos of coconut (*Cocos nucifera* L.) and subsequent regeneration of plantlets. **Cryo-Letters**, v.13, p.117-126, 1992.
- BAGNIOL, S.; ENGELMANN, F.; MICHAUX-FERRIÈRE, N. Histo-cytological study of apices from *in vitro* plantlets of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) during a cryopreservation process. **Cryo-Letters**, v.13, p.405-412, 1992.
- BAGNIOL, S.; ENGELMANN, F. Effects of pregrowth and freezing conditions on the resistance of meristems of date palm (*Phoenix dactylifera* L. var. Bou Sthammi Noir) to freezing in liquid nitrogen. **Cryo-Letters**, v.12, p. 249-286, 1991.
- BOVI, M.L.A.; MARTINS, C.C.; SPIERING, S.H. Desidratação de sementes de quatro lotes de pupunheira: efeitos sobre a germinação e o vigor. **Horticultura Brasileira**, v.22(1), p.109-112, 2004.
- BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, H. P. dos; TINÉ, M. A. S.; AIDAR, M. P. M. Mobilização de reservas. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (orgs.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004, p.161-185.
- CHIN, H.F.; KRISHNAPILLAY, B.; ALANG, Z.C. Cryopreservation of *Veitchia* and *Howea* palm embryos: non-development of the haustorium. **Cryo-Letters**, v.9, p.372-379, 1988.
- CLEMENT, C.R. Pupunha: Recursos genéticos, pesquisas realizadas e tecnologias disponíveis; 1º. Workshop sobre as Culturas de Cupuaçu e pupunha da Amazônia, 25-29 de Março. CPAA/EMBRAPA, Manaus, AM, **Anais...** p. 33-49, 1997.
- DEREUDDRE, J.; BLADIN, S.; HASSEN, N. Resistance of alginate-coated somatic embryos of carrot (*Daucus carota* L.) to desiccation and freezing in liquid nitrogen: 1. Effects of preculture. **Cryo-Letters**, v.12, p.125-134, 1991.

**FIGURA 4.** Representação esquemática do protocolo proposto para a criopreservação de embriões zigóticos de pupunha. A partir da obtenção de embriões zigóticos estéreis, estes são encapsulados e desidratados em câmara de fluxo durante 4h seguido de congelamento rápido e descongelamento rápido em banho-maria. Após a rehidratação e remoção da cápsula, os embriões são transferidos para meio de cultura e as plântulas regeneradas aclimatizadas. Setas cinzas correspondem a fatores que não foram avaliados ou devem ser reavaliados.



DUMET, D.; ENGELMANN, F.; CHABRILLANGE, N.; DUVAL, Y. Importance of sucrose for the acquisition of tolerance to desiccation and cryopreservation of oil palm somatic embryos. **Cryo-Letters**, v.14, p.243-250, 1993.

ENGELMANN, F. Plant Cryopreservation: Progress and prospects. **In vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, v.40, p.427-433, 2004.

ENGELMANN, F.; DUMET, D.; CHABRILLANGE, N.; ABDELNOUR-ESQUIVEL, A.; ASSY-BAH, B.; DEREUDDRE, J.; DUVAL, Y. Factors affecting the cryopreservation of coffee, coconut and oil palm embryos. **Plant Genetic Resources Newsletter**, n103, p.27-41, 1995.

GONZÁLES-ARNAO, M.T.; JUÁREZ, J.; ORTEGA, C.; NAVARRO, L.; DURAN-VILA, N. Cryopreservation of ovules and somatic embryos of citrus the encapsulation-dehydration technique. **CryoLetters**, v.24, p.85-94, 2003.

GROUT, B.W.W.; SHELTON, K.; PRITCHARD, H.W. Orthodox behaviour of oil palm seed and cryopreservation of the excised embryo for genetic conservation. **Annals of Botany**, v.52, p.381-384, 1983.

HELLIOT, B.; PANIS, B.; POUMAY, Y.; SWENNEN, R.; LEPOIVRE, P.; FRISON, E. Cryopreservation for the elimination of cucumber mosaic and banana streak viruses from banana (*Musa* spp.). **Plant Cell Reports**, v.20, p.1117-1122, 2000.

HELLIOT, B.; SWENNEN, R.; POUMAY, Y.; FRISON, E.; LEPOIVRE, P.; PANIS, B. Ultrastructural changes associated with cryopreservation of banana (*Musa* spp.) highly proliferation meristems. **Plant Cell Reports**, v.21, p.690-698, 2003.

HIRAI, D.; SAKAI, A. Cryopreservation of *in vitro*-grown axillary shoot-tip meristems of mint (*Mentha spicata* L.) by encapsulation vitrification. **Plant Cell Reports**, v.19, p.150-155, 1999.

HORNUNG, R.; DOMAS, R.; LYNCH, P.T. Cryopreservation of plumular explants of coconut (*Cocos nucifera* L.) to support programmes for mass clonal propagation through somatic embryogenesis. **CryoLetters**, v.22, p.211-220, 2001.

ISHIKAWA, K.; HARATA, K.; MII, M.; SAKAI, A.; YOSHIMATSU, K.; SHIMOMURA, K. Cryopreservation of zygotic embryos of a Japanese terrestrial orchid (*Betilla striata*) by vitrification. **Plant Cell Reports**, v.16, p.754-757, 1997.

JEKKEL, Z.; GYULAI, G.; KISS, J.; KISS, E.; HESZKY, L.E. Cryopreservation of horse-chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) somatic embryos using three different freezing methods. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.62, p.193-197, 1998.

MARTÍNEZ, D.; TAMÉS, R.S.; REVILLA, M.A. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot-tips of hop (*Humulus lupulus* L.) using encapsulation/dehydration. **Plant Cell Reports**, v.19, p.59-63, 1999.

MORA-URPÍ, J.; WEBER, J. C.; CLEMENT, C. R. **Peach Palm (*Bactris gasipaes* Kunth) – Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops 20**. Rome: Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/ International Plant Genetic Resources Institute, 1997, 81p.

MOREL, G.; WETMORE, R.H. Tissue culture of monocotyledons. **American Journal of Botany**, v.38, p.138-140, 1951.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiology Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

PANIS, B.; TOTTE, N.; NIMMEN, K.V.; WITHERS, L.A.; SWENNEN, R. Cryopreservation of banana (*Musa* spp.) meristem cultures after preculture on sucrose. **Plant Science**, v.121, p.95-106, 1996.

PARANJOTHY, K. Oil Palm. In: AMMIRATO, P.V.; EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; YAMADA, Y. (eds.) **Handbook of plant cell culture – Crop species** (vol.3). New York: Macmillan Pub. Company, 1984, p.591-605.

RAJA, K.; SELVARAJU, P.; PALANISAMY, V. Desiccation and cryopreservation of recalcitrant arecanut (*Areca cetechu*) embryos. **FAO/IPGRI Plant Genetic Resources Newsletter**, v.133, p.16-18, 2004.

SAKAI, A.; MATSUMOTO, T.; HIRAI, D.; NINO, T. Newly developed encapsulation-dehydration protocol for plant cryopreservation. **CryoLetters**, v.21, p.53-60, 2000.

SANTOS, I.R.I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12(ed. especial), p.70-84, 2000.

SHATNAWI, M.A.; JOHNSON, K.A.; TORPY, F.R. *In vitro* propagation and cryostorage of *Syzygium francissi* (Myrtaceae) by the encapsulation-dehydration method. **In vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, v.40, p. 403-407, 2004.

SHIBLI, R.A.; HAAGENSON, D.M.; CUNNINGHAM, S.M.; BERG, W.K.; VOLENEC, J.J. Cryopreservation of alfafa (*Medicago sativa* L.) cells by encapsulation-dehydration. **Plant Cell Reports**, v.20, p.445-450, 2001.

TABAI, S. A.; **Propagação da palmeira macaúba (*Acrocomia aculeata* Jacq Loddiges) através de métodos *in vitro***. 1992, 121p, Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas), Piracicaba: ESALQ/USP.

TISSERAT, B. Date Palm. In: AMMIRATO, P.V.; EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; YAMADA, Y. **Handbook of plant cell culture – Crop species** (vol.2). New York: Macmillan Pub. Company, 1984, p.505-545.

WANG, Q.; TANNE, E.; ARAV, A.; GAFNY, R. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of grapevine by encapsulation-dehydration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.63, p.41-46, 2000.

WESLEY-SMITH, J.; BERJAK, P.; PAMMENTER, N.W.; VERTUCCI, C.W. Ultrastructural evidence for the effects of freezing in embryogenic axes of *Pisum sativum* L. at various water contents. **Annals of Botany**, v.76, p.59-64, 1995.

VALOIS, A.C.D. Conservação *ex situ* de Recursos Genéticos Vegetais. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C. **Recursos Genéticos e Melhoramento**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001, p.123-148.

SCOTTEZ, C.; CHEVREAU, E.; GODARD, N.; ARNAUD, Y.; DURON, M.; DEREUDDRE, J. Cryopreservation of cold-acclimated shoot tips of pear *in vitro* cultures after encapsulation-dehydration. **Cryobiology**, v.29, p.691-700, 1992.

CAPÍTULO IV – EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM PUPUNHA:

I - Utilização de embriões zigóticos como fonte de explantes

**1 RESUMO**

Embriogênese somática é um processo pelo qual células haplóides ou diplóides regeneram plântulas completas por meio de padrões de histodiferenciação similares àqueles observados para embriões zigóticos. Este processo foi descrito em várias famílias botânicas das angiospermas e gimnospermas, e é considerado um sistema modelo para estudos fisiológicos e morfológicos. Também apresenta várias vantagens sobre as demais técnicas de cultura de tecidos, principalmente devido a capacidade de produzir um grande número de propágulos, e suas aplicações para a conservação e melhoramento dos recursos genéticos vegetais. O objetivo deste trabalho foi elucidar os fatores que afetam a indução e o desenvolvimento de embriões somáticos e a aclimatização de plântulas de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth) para estabelecer um protocolo regenerativo eficiente baseado na embriogênese somática. Embriões zigóticos maduros foram cultivados em meio de cultura MS suplementado com picloram (10-40  $\mu\text{M}$ ) e citocinina 2-iP (0 ou 5  $\mu\text{M}$ ). Após cinco meses de cultura, calos embriogênicos foram induzidos a partir de calos primários. Picloram (10  $\mu\text{M}$ ) foi efetivo em induzir calos embriogênicos em 9,8% dos explantes. Calos primários eram compactos, amarelos e com crescimento não organizado. A utilização de 1  $\mu\text{M}$  de  $\text{AgNO}_3$  incrementou a competência embriogênica dos calos primários e resultou em 27% de indução de calos embriogênicos. Calos embriogênicos apresentaram crescimento organizado, aspecto globular, e coloração branca amarelada. Análises histológicas foram realizadas e evidenciaram que a proliferação celular ocorreu a partir daquelas células sub-epidérmicas adjacentes ao procambio, resultando em calos primários formados por uma zona meristemática a partir da qual embriões somáticos se diferenciaram. Os calos embriogênicos foram mantidos em meio de cultura contendo 2,4-D (40  $\mu\text{M}$ ), 2-iP (10  $\mu\text{M}$ ), Glutamina (1  $\text{g.L}^{-1}$ ), caseína hidrolisada (0,5  $\text{g.L}^{-1}$ ) e carvão ativado (1,5  $\text{g.L}^{-1}$ ). As respostas morfológicas observadas neste meio de cultura foram o desenvolvimento dos embriões somáticos, enraizamento dos calos embriogênicos, perda da capacidade morfogenética e alguns casos de conversão dos embriões somáticos. Os embriões somáticos obtidos foram convertidos em plântulas em um meio de cultura MS com 2-iP (24,6  $\mu\text{M}$ ) e ANA (0,44  $\mu\text{M}$ ). As plântulas foram mantidas em meio de cultura MS com carvão ativado (1,5  $\text{g.L}^{-1}$ ) até que estas alcançassem 6 cm de altura, sendo então aclimatizadas. Após 16 semanas de aclimatização 84,2 $\pm$ 6,4% das plântulas apresentaram sobrevivência.

**Palavras-chaves:** Cultura de tecidos, Micropropagação, Aclimatização, Histologia, Nitrato de prata.

CHAPTER IV - SOMATIC EMBRYOGENESIS OF PEACH-PALM:

I - The use of zygotic embryo as explants source

**2 ABSTRACT**

Somatic embryogenesis is a process by which haploid or diploid cells regenerate complete plants through histodifferentiation patterns resembling zygotic embryogenesis. This process has been described in several angiosperm and gymnosperm families and is regarded as a suitable system for physiological and morphological studies. It also presents several advantages over other tissue culture techniques, mainly due to the capacity to produce large numbers of plants and its applications for conservation of plant genetic resources. The goal of this study was to evaluate the factors that affect induction and development of somatic embryos and plantlet acclimatization of peach-palm (*Bactris gasipaes* Kunth) in order to establish a highly efficient regenerative protocol based on somatic embryogenesis. Mature zygotic embryos were cultured in MS culture medium supplemented with picloram (10-40  $\mu\text{M}$ ) and cytokinin 2-iP (0 or 5  $\mu\text{M}$ ). After five months in culture embryogenic callus arose from primary callus. Picloram (10  $\mu\text{M}$ ) was effective in inducing embryogenic calluses in 9.8% of the explants. Primary calluses were compact, yellow, with non-organized growth. The use of 1  $\mu\text{M}$   $\text{AGNO}_3$  enhanced the embryogenic competence of primary callus, and showed a 27% of embryogenic callus induction rate. Embryogenic calluses had an organized structure, a globular aspect, and were white to yellowish in color. Histological analyses were performed and showed cell proliferation arose from subepidermal cells adjacent to vascular bundles, resulting in primary callus formed by a meristematic zone from where somatic embryos arose. These embryogenic calluses were maintained in culture medium containing 2,4-D (40  $\mu\text{M}$ ), 2-iP (10  $\mu\text{M}$ ), plus Glutamine (1  $\text{g.L}^{-1}$ ), hydrolyzed casein (0.5  $\text{g.L}^{-1}$ ) and activated charcoal (1.5  $\text{g.L}^{-1}$ ). Morphogenetic responses achieved in this medium were the development of somatic embryos, rooting, and loss of embryogenic capacity, and in some cases conversion of somatic embryos to plantlets. Somatic embryos were converted to plantlets on MS medium plus 2-iP (24.6  $\mu\text{M}$ ) and NAA (0.44  $\mu\text{M}$ ). Plantlets were maintained in MS medium with activated charcoal (1.5  $\text{g.L}^{-1}$ ) until they were 6cm tall, and were then acclimatized. After 16 weeks, an  $84.2 \pm 6.4\%$  survival rate was observed.

**Key-Words:** Tissue culture, Micropropagation, Plantlet acclimatization, histology, silver nitrate.

### 3 INTRODUÇÃO

Embriogênese somática é um processo pelo qual células haplóides ou diplóides regeneram plântulas completas, seguindo padrões de histodiferenciação similares aos dos embriões zigóticos (Williams & Maheswaran, 1986). Tem sido sugerido que a transição da célula somática para o estado embriogênico poderia ser mediada pelo estresses impostos pelas condições da cultura *in vitro* (Dudits et al., 1995; Fehér et al., 2003). Esta técnica é descrita como um sistema modelo para estudos fisiológicos e morfológicos (Dodeman et al., 1997). Da mesma forma, a embriogênese somática também apresenta vantagens sobre as demais técnicas de cultura de tecidos, principalmente devido à capacidade de produzir grande número de propágulos e conferir maior estabilidade genética a estes. Adicionalmente, a principal aplicação da embriogênese somática em um programa de melhoramento de plantas perenes está na possibilidade de fixação do ganho genético de plantas selecionadas (Guerra et al., 1999).

A pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth) é uma palmeira caespitosa, domesticada e amplamente distribuída no Neotrópico. Essa espécie apresenta várias possibilidades de uso, e ideótipos foram descritos para produção de frutos e palmito (Mora-Urpí et al., 1997). No entanto, devido ao seu longo ciclo vegetativo, auto-incompatibilidade e inconsistência em suporte financeiro, o melhoramento genético nessa espécie é escasso e pode levar vários anos.

Em pupunha, protocolos regenerativos já foram descritos baseados na organogênese e embriogênese somática (Arias & Huete, 1983; Stein & Stephens, 1991; Almeida & Kerbauy, 1996), porém, o uso de embriões zigóticos como fonte de explantes é pouco descrito nessa espécie, sendo que esses apresentaram respostas superiores em *Euterpe edulis* (Guerra & Handro, 1998) e *Elaeis guineensis* (Teixeira et al., 1993; 1995). Adicionalmente, estudos sobre a embriogênese somática em pupunha foram sugeridos com o objetivo de incrementar a taxa regenerativa (Arias & Huete, 1983).

Dentre os diversos fatores que influenciam as respostas *in vitro*, a influência do etileno na aquisição de competência embriogênica é pouco elucidada e parece ser diferente para cada espécie vegetal. A presença de nitrato de prata, que é considerado um potente inibidor da ação do etileno, incrementou o número de embriões somáticos em *Glycine max* (Santos et al., 1997), *Triticum durum* (Fernandez et al., 1999) e *Coffea canephora* (Fuentes et al., 2000). Por outro lado, em *Theobroma cacao* a presença de íons de prata inibiu completamente a aquisição de capacidade embriogênica (Teixeira et al., 2002). Contudo, em *Cocos nucifera* e *Phoenix dactylifera* a presença de inibidores de etileno apresentaram influência positiva nas respostas

morfogenéticas *in vitro* (Adkins et al., 1998; Al-Khauri & Al-Bahrany, 2001).

O objetivo do presente trabalho foi elucidar os fatores que afetam a indução e o desenvolvimento dos embriões somáticos a partir de embriões zigóticos, e a aclimatização das plântulas para o estabelecimento de um protocolo regenerativo de alta eficácia e frequência por embriogênese somática.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

Todos os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal, do Departamento de Fitotecnia integrado ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina em Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

### **4.1 Material Vegetal**

Frutos foram coletados a partir de plantas de polinização aberta, mantidas no banco de germoplasma do INPA, Manaus-AM, Brasil, cerca de três meses após a polinização. O endocarpo foi removido, a semente propriamente dita foi desinfestada, e os embriões zigóticos foram excisados de forma estéril, conforme descrito para a germinação *in vitro* de embriões zigóticos (Capítulo II).

### **4.2 Meios de cultura e condições de cultivo**

#### *Ensaio A: Efeito do Picloram e do 2-iP*

Embriões zigóticos foram inoculados em meio de cultura basal de MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com 3% de sacarose e vitaminas de Morel (Morel & Wetmore, 1951). O pH do meio de cultura foi ajustado a 5,8 antes da adição de 7,0 g.L<sup>-1</sup> de Ágar (Merse<sup>®</sup>). Com o objetivo de induzir a embriogênese somática, o picloram foi utilizado como uma fonte de auxina em diferentes concentrações (0, 10, 20 ou 40 µM) em interação com a citocinina 2-iP (0 ou 5 µM). O meio de cultura foi autoclavado a 120°C (1 kg.cm<sup>-2</sup>) durante 15 min, e vertido em placas de Petri descartáveis (20x80 mm), contendo aproximadamente 25 ml de meio de cultura em cada placa. Não foi realizado subcultivo até o aparecimento de calos embriogênicos.

Os calos embriogênicos foram mantidos em um meio de cultura de maturação composto pelo meio de cultura basal descrito acima, suplementado com 2,4-D (40 µM), 2-iP (10 µM), carvão ativado (1,5 g.L<sup>-1</sup>), Glutamina (1 g.L<sup>-1</sup>) e caseína hidrolisada (0,5 g.L<sup>-1</sup>) em placas de Petri

(25x100 mm) contendo 30 mL de meio de cultura e com subcultivos realizados a cada quatro semanas. Todas as culturas foram mantidas no escuro em câmara de crescimento com temperatura de 25±2°C.

Para a conversão, os embriões somáticos foram transferidos para meio de cultura basal contendo 2-iP (24,6 µM) e ANA (0,44 µM), cultivados em sala de crescimento a 26±1°C sob 16h de fotoperíodo com intensidade luminosa de 50-60 µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, provida por lâmpadas fluorescentes do tipo branca fria. As plântulas obtidas foram transferidas para o meio de cultura basal suplementado com carvão ativado (1,5 g.L<sup>-1</sup>) até alcançarem mais de 6 cm de altura.

#### *Ensaio B: Efeito do AgNO<sub>3</sub>*

Esse experimento foi realizado com base nos resultados do ensaio A. O ensaio foi realizado empregando o meio de cultura com sais de MS, suplementado com vitaminas de Morel, 10µM de picloram, 3% de sacarose, 500 mg.L<sup>-1</sup> de Glutamina e com pH ajustado para 5,8 antes da adição de 2,5 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel<sup>®</sup>. Foram adicionadas diferentes concentrações de AgNO<sub>3</sub> (0, 1, 5, 10 ou 50 µM) ao meio de cultura descrito acima que foi autoclavado a 120°C (1 kg.cm<sup>-2</sup>) durante 15min, e vertido em placas de Petri (25x100 mm), contendo 30 mL de meio de cultura cada placa.

### **4.3 Análises Morfo-Histológicas e Bioquímicas**

Para elucidar os aspectos histológicos e o perfil protéico dos calos obtidos, embriões zigóticos foram inoculados em meio de cultura com sais de MS, suplementado com vitaminas de Morel, 10 µM de picloram, 3% de sacarose e 500 mg.L<sup>-1</sup> de Glutamina, com pH ajustado para 5,8 antes da adição de 2,5 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel<sup>®</sup>.

Para avaliar o perfil protéico, foram selecionados calos primários com e sem o desenvolvimento de calos embriogênicos e as estruturas embriogênicas formadas. Para avaliar a repetibilidade do perfil protéico, duas amostras de calos primários com e sem capacidade embriogênica foram utilizados.

Para a extração de proteínas foram utilizadas amostras de 200 mg do tecido maceradas em cadinhos com nitrogênio líquido sobre blocos de gelo. Após a obtenção do tecido macerado foi adicionado 200 µL de tampão de extração composto de fosfato de sódio dibásico (50 mM – pH 7,0), β-mercaptoetanol (1,5%), dodecil sulfato de sódio (SDS) (0,5%) e fluoreto de fenilmetilsulfoni (PMSF) (1 mM). Posteriormente, as amostras maceradas foram centrifugadas a 8000 rpm durante 20 min a 0°C. As proteínas totais, presentes no sobrenadante obtido a partir da

centrifugação, foram precipitadas pela adição de dois volumes de álcool etílico absoluto para cada volume de sobrenadante e armazenadas a -3°C durante 15 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 20 min a 0°C, formando o pellet de proteínas com o sobrenadante descartado. As proteínas foram então ressuspensas com 250 µL de solução de fosfato dibásico (50 mM – pH 7,0). A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976) modificado por Read & Northcote (1981), utilizando-se o reagente azul brilhante de Coomassie R-250 (Sigma). Para tanto, 100 µL da solução de fosfato dibásico com as proteínas ressuspensas foi adicionada em 2 mL do reagente de Bradford. A quantificação das proteínas foi realizada a partir da leitura da absorbância em espectrofotômetro a 595 nm, e calculado a partir da curva ajustada com diferentes concentrações (0 a 1000 µg.mL<sup>-1</sup>) de soro albumina bovina.

Após a quantificação, foi adicionado tampão *cracking* contendo 0,2% de SDS, 7,5% de Trizma-HCL (pH 6,8), 0,2% de glicerol, 5% de azul de Bromofenol (0,05%) e 5% de β-mercaptoetanol, sendo então submetida a desnaturação das proteínas em água fervente durante 10 min e armazenadas em freezer a -18°C. Para avaliar o perfil protéico, 3,5 a 4,0 µg de proteínas totais foram carregadas em cada poço e separadas em gel desnaturante de poliacrilamida a 12% com um gel de empilhamento de 4% de acrilamida, segundo a metodologia de Laemmli (1970). Foi utilizado um padrão de peso molecular com bandas entre 6,5 KDa a 205 KDa (Sigma<sup>®</sup> M-4038). Após a eletroforese, o gel foi corado com nitrato de prata, segundo a metodologia de Heukeshoven e Dernick (1985).

Amostras para a realização de estudos histoquímicos foram fixadas em paraformaldeído 2% durante 48h, desidratadas em serie alcoólica (30 a 100°GL) e embebidas em historesina (Leica<sup>®</sup>). Secções de 5 µM de espessura foram obtidas em micrótomo rotatório manual (Slee Technik) distendidas sobre uma gota de água em uma lâmina de vidro e secas rapidamente por calor em bico de Bunsen. Após o preparo e secção das amostras, estas foram submetidas à coloração com azul de Toluidina a 0,5% (pH 1,0) durante 30 a 60 seg, seguidas de lavagem em água corrente até remoção do excesso. Para a determinação de amido foi utilizado o método de PAS com as secções oxidadas em solução aquosa de ácido periódico a 1% durante 20min, lavadas em água corrente por 10 min e, em seguida, coradas com reagente de Shiff por 15 min.

#### **4.4 Aclimatização das plântulas**

Com o objetivo de determinar o efeito do PBZ (paclobutrazol) na aclimatização, plântulas maiores que 6 cm de altura obtidas no ensaio A foram utilizadas. Raízes de plântulas de

pupunha regeneradas *in vitro* foram consideradas inativas (Arias, 1985), desta forma, no presente estudo, as plântulas foram submetidas a uma poda do sistema radicular, para estimular o desenvolvimento de novas raízes, e então lavadas em água corrente para remoção de resíduos de meio de cultura. Posteriormente, as plântulas foram imersas durante 48h em uma solução não estéril composta pelos componentes inorgânicos de MS e suplementada com PBZ (0 ou 5  $\mu\text{M}$ ), com o pH ajustado para 5,8. As plântulas foram então transferidas para o substrato composto por mistura comercial (PlantMax<sup>®</sup> HT – Condutividade elétrica 1,5-2,0) e palha de arroz carbonizada (1:1) em bandeja de poliestireno expandido (Isopor<sup>®</sup>) contendo 72 células com 5x5cm cada. As bandejas foram acondicionadas dentro de caixas de plástico cobertas com uma lâmina de vidro, permitindo a entrada de luz e reduzindo a troca de umidade. Estas plântulas foram mantidas sob um fotoperíodo de 16h de luz com 100-120  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  de intensidade provida por lâmpadas fluorescentes e incandescentes. Abertura gradual da lâmina de vidro foi realizada após quatro e oito semanas, sendo completamente removida após doze semanas do transplante.

#### **4.5 Delineamento estatístico**

O experimento do efeito do Picloram e do 2-iP foi realizado em esquema fatorial 4x2, sendo avaliada quatro concentrações de Picloram (0, 10, 20 ou 40  $\mu\text{M}$ ) e duas de 2-iP (0 ou 5  $\mu\text{M}$ ), conduzido em delineamento de blocos inteiramente casualizados, com quatro blocos. Cada bloco foi constituído de cinco placas de Petri contendo cinco embriões zigóticos por placa. As plantas matrizes foram consideradas como blocos.

O experimento do efeito do nitrato de prata foi realizado avaliando diferentes concentrações de  $\text{AgNO}_3$  (0, 1, 5, 10 ou 50  $\mu\text{M}$ ) conduzido em delineamento inteiramente casualizado, contendo dez placas de Petri com cinco embriões zigóticos em cada placa. A percentagem de calos primários foi avaliada após três meses de cultura e a de calos embriogênico após cinco meses de cultura. Todos os dados foram transformados em  $\sqrt{(x+5)}$  e submetidos à análise de variância (ANOVA) e quando necessário ao teste de separação de médias de Duncan a 95% de significância.

Para a aclimatização de plântulas, o experimento foi conduzido em blocos inteiramente casualizados, com duas repetições contendo 25 plântulas por repetição. Os dados de sobrevivência e número de folhas foram avaliados dois e quatro meses após a aclimatização. Os dados de aclimatização são apresentados como média $\pm$ erro padrão.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Ensaio A: Efeito do Picloram e do 2-iP

A percentagem de calos primários induzidos a partir de embriões zigóticos após três meses de cultivo foi significativamente influenciada ( $p < 0,01$ ) pela concentração de picloram (Tabela 1). Em meio de cultura suplementado com 20  $\mu\text{M}$  de picloram foi observada a formação de calos primários em 78,0% dos explantes, enquanto em 10  $\mu\text{M}$  de picloram foi observado 56,0% de indução de calos primários, sendo significativamente superior à testemunha, porém inferior aos tratamentos de 20  $\mu\text{M}$  e 40  $\mu\text{M}$  de picloram. Ainda para a indução de calos primários, a presença de 2-iP suplementado ao meio de cultura não apresentou influência significativa para essa variável ( $p > 0,05$ ), apresentando 51,9% e 52,6% de calos primários na ausência e na presença dessa substância, respectivamente (Tabela 1).

A indução de calos embriogênicos foi significativamente influenciada pela concentração de picloram utilizada ( $p < 0,01$ ) (Tabela 1). Aos cinco meses após a inoculação o meio de cultura suplementado com 10  $\mu\text{M}$  de picloram resultou na formação de calos embriogênicos em 9,8% dos explantes iniciais. Por outro lado, concentrações maiores de picloram apresentaram um decréscimo na percentagem de indução (Tabela 1). A adição de 2-iP no meio de cultura não apresentou diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) para a percentagem de calos embriogênicos, contudo, resultou em decréscimo na aquisição de competência embriogênica (Tabela 1).

Após a obtenção dos calos embriogênicos, estes foram transferidos para o meio de cultura de maturação. Nestas condições várias respostas foram observadas, incluindo a conversão dos embriões somáticos (Figura 3J), a formação de raízes (Figura 3L) e o desenvolvimento de calos embriogênicos com aspecto friável com presença de estruturas globulares (Figura 3M). Esse tipo de calo embriogênico ocorreu em baixa frequência e após a transferência desses para meio de cultura com a mesma composição, tornavam-se amarelos e compactos (Figura 3N), similar aos calos primários. Ainda nessas condições de cultivo, foram observados o desenvolvimento e a maturação dos embriões somáticos. Contudo, vários estágios de desenvolvimento dos embriões somáticos foram observados, caracterizando um processo de embriogênese somática não sincronizada (Figura 3O).

Embriões somáticos maduros (Figura 3O) foram obtidos com sucesso e isolados em pequenos grupos ou individualmente (Figura 3P). Após duas a três semanas de cultivo nessas condições, os embriões somáticos tornavam-se verdes (Figura 3Q), sendo então convertidos em plântulas com o desenvolvimento de parte aérea e raízes (Figura 3R).

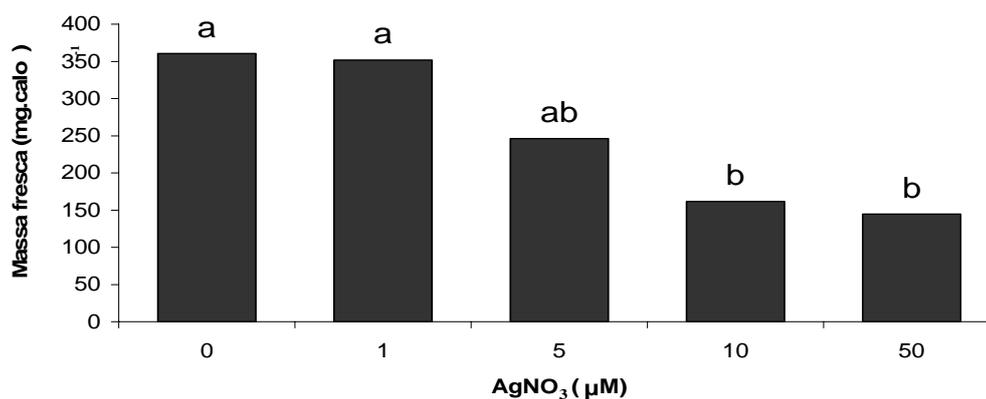
**TABELA 1** - Efeito de diferentes concentrações de Picloram (0; 10; 20 ou 40  $\mu\text{M}$ ) e de 2iP (0 ou 5  $\mu\text{M}$ ) suplementado ao meio de cultura para a percentagem de indução de calos primários e de calos embriogênicos a partir de embriões zigóticos de pupunha (*B. gasipaes* Kunth) e teste *F* para os fatores testados.

Picloram ( $\mu\text{M}$ )	Calos Primários (%)			Calos Embriogênico (%)		
	2-iP ( $\mu\text{M}$ )		Média <sup>1</sup>	2-iP ( $\mu\text{M}$ )		Média <sup>1</sup>
	0	5		0	5	
0	0,0	0,0	0,0 C	0,0	0,0	0,0 C
10	52,9	59,0	56,0 B	10,9	8,7	9,8 A
20	79,0	77,1	78,0 A	8,2	5,3	6,7 AB
40	75,9	74,3	75,1 A	5,7	2,0	3,8 BC
Média <sup>1</sup>	51,9a	52,6a		6,2a	4,0a	
CV <sup>2</sup> (%)	11,39			23,60		
<i>F</i> (Blocos)	5,028**			0,207 <sup>NS</sup>		
<i>F</i> (A: Picloram)	130,53**			6,45**		
<i>F</i> (B: 2-iP)	0,001 <sup>NS</sup>			1,44 <sup>NS</sup>		
<i>F</i> (A x B)	0,225 <sup>NS</sup>			0,235 <sup>NS</sup>		

<sup>1</sup>Médias seguidas por letras distintas, minúsculas nas linhas e maiúsculas na coluna, diferem entre si ao nível de significância de 95%, pelo teste de Duncan. Dados transformados por  $\sqrt{(x+5)}$ ; <sup>2</sup>Coefficiente de variação, expresso em percentagem; <sup>NS</sup> Não Significativo; \* Significativo ( $p < 0,05$ ); \*\* Altamente significativo ( $p < 0,01$ ).

## 5.2 Ensaio B: Efeito do $\text{AgNO}_3$

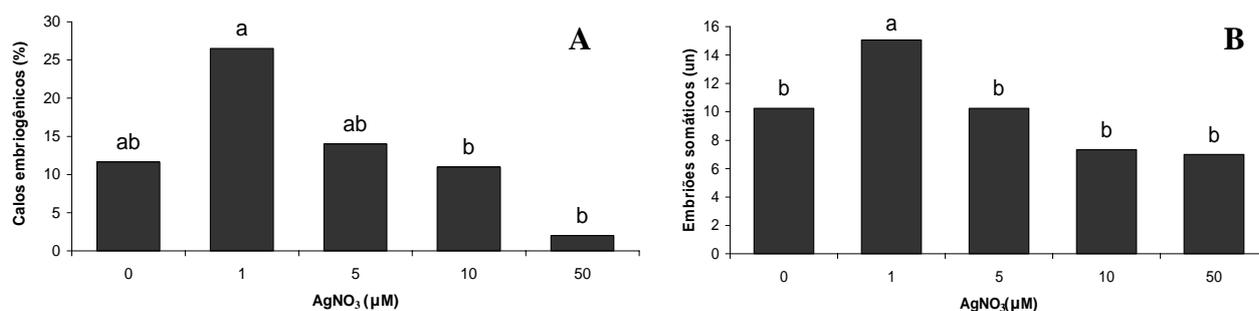
Após cinco meses de cultivo foi avaliada a massa fresca dos calos obtidos. Diferentes concentrações de  $\text{AgNO}_3$  apresentaram efeito negativo significativo ( $p < 0,05$ ) na massa dos calos, contudo, não foi detectada diferença estatística entre a concentração de 1  $\mu\text{M}$  de  $\text{AgNO}_3$  e a testemunha (Figura 1).



**FIGURA 1.** Efeito de diferentes concentrações de  $\text{AgNO}_3$  na massa fresca de calos, obtidos a partir de embriões zigóticos de pupunha (*B. gasipaes* Kunth). Médias seguidas por letras diferentes denotam diferença estatística pelo teste de Duncan a 95% de significância. Dados transformados por  $\sqrt{(x+5)}$ . Coeficiente de variação = 30,2%

A indução de calos primários não foi influenciada pelas diferentes concentrações de  $\text{AgNO}_3$  testadas (dados não apresentados). Por outro lado, a aquisição de competência embriogênica foi significativamente influenciada pela presença de baixas concentrações de nitrato de prata (Figura 2A). Em meio de cultura com ausência de  $\text{AgNO}_3$  foi observada em média a indução de 12% de calos com características embriogênicas, sendo que com a suplementação de  $1 \mu\text{M}$  dessa substância resultou em 27% de indução de calos embriogênicos (Figura 2A).

O número de embriões somáticos por calo embriogênico também foi influenciado pela presença de  $\text{AgNO}_3$  ( $p < 0,01$ ). Na ausência dessa substância foram observados 10 embriões somáticos por calo embriogênico. Esse valor foi significativamente maior em meio de cultura contendo  $1 \mu\text{M}$  de  $\text{AgNO}_3$ , apresentando 15 embriões somáticos por calo embriogênico (Figura 2B).



**FIGURA 2.** Efeito de diferentes concentrações  $\text{AgNO}_3$  na indução de calos com características embriogênicas (A) e no número de embriões somáticos (B) obtidos a partir de embriões zigóticos de pupunha (*B. gasipaes* Kunth) após cinco meses de cultivo. Médias seguidas por letras diferentes denotam diferença estatística pelo teste de Duncan a 95% de significância. Dados transformados por  $\sqrt{(x+5)}$ . Coeficiente de variação Figura A = 48,24%. Figura B = 28,25%

### 5.3 Caracterização Morfo-histológica e Bioquímica

Embriões zigóticos de pupunha (Figura 3A) foram inoculados em meio de cultura contendo  $10 \mu\text{M}$  de picloram como fonte de auxina. Esses embriões zigóticos apresentavam-se oblongos com comprimento entre 1,5 mm a 2 mm, formato cônico, epicótilo oblíquo a lâmina cotiledonar e presença de procambio conectando o cotilédone ao meristema (Figura 3A). Foi possível observar um intumescimento na região do mesocótilo do embrião zigótico (Figura 3B) rompendo a protoderme (Figura 3C) ocorrendo, posteriormente, em todas as regiões do embrião zigótico (Figura 3D) formando o calo primário.

As análises histológicas revelaram o início da divisão celular nos tecidos sub-epidérmicos

(Figura 4B), principalmente naquelas células adjacentes aos feixes vasculares na região do mesocótilo do embrião zigótico (Figura 4C), resultando em uma camada de 3 a 5 células com características meristemáticas, como células pequenas, parede celular delgada e núcleo com reação a coloração de azul de toluidina. Após 30 dias de cultivo, a proliferação celular progrediu por toda a lâmina cotiledonar (Figura 4D) e estas células apresentavam poucos grãos de amido (Figura 4E). Neste período de cultivo, o meristema apical do embrião zigótico não apresentava nenhuma alteração morfológica aparente (Figura 4D). Já após 60 dias de cultivo, o calo primário foi formado em toda a região da lâmina cotiledonar e com início da calogênese na região do meristema (Figura 4F).

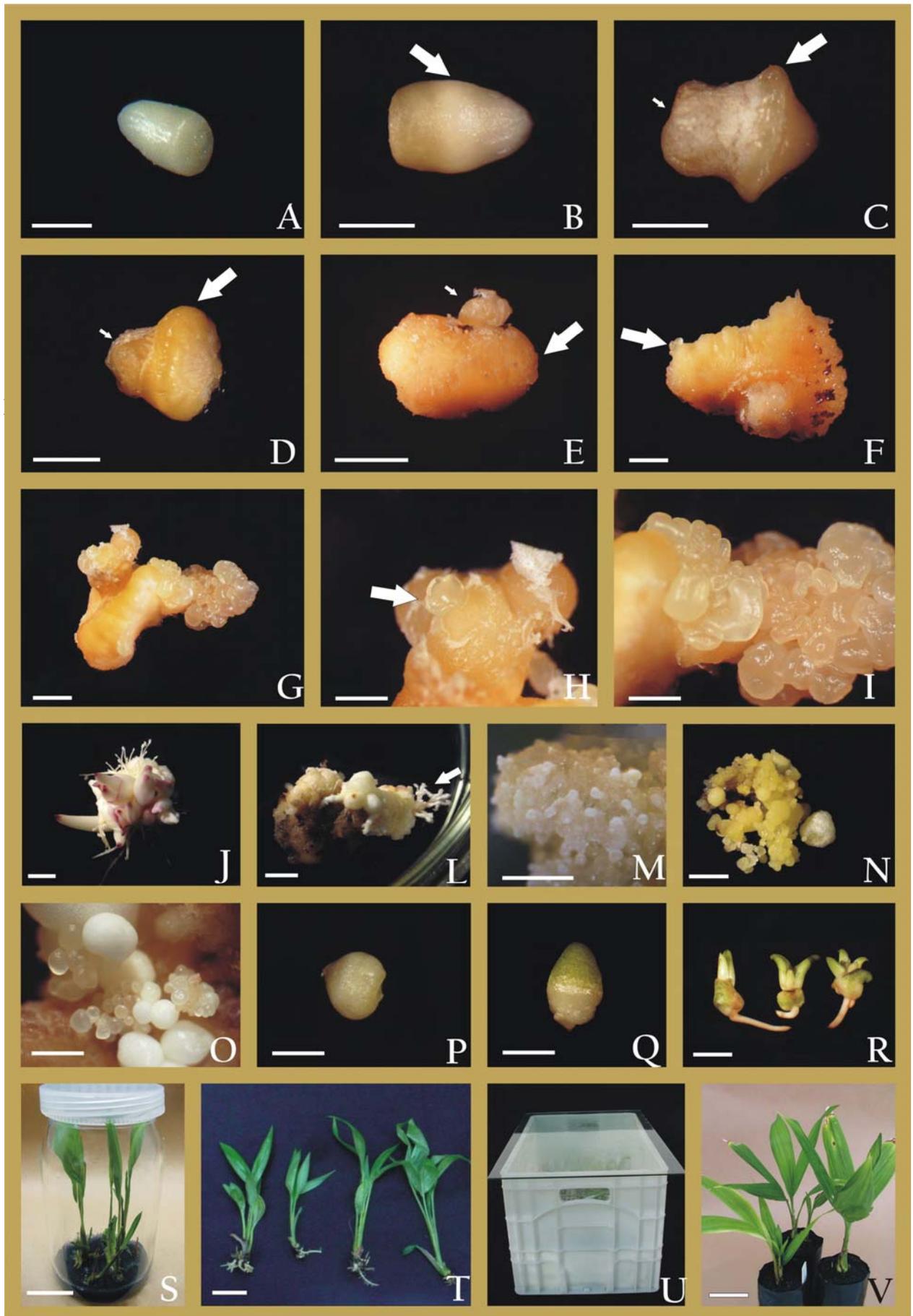
O crescimento dos calos primários foi de forma anelar, assegurado por uma camada específica de células, que formaram uma zona meristemática (Figura 4G). Essa zona meristemática era composta por camada de três a seis células com características meristemáticas e plano de divisão principalmente periclinal (Figura 4H). Já a periferia do calo primário era composta por células maiores e parede celular delgada (Figura 4G; 4H), enquanto a região central do calo era composta por células parenquimáticas, com todos os planos de divisão celular; alguns elementos de vaso diferenciados puderam ser observados (Figura 4I).

Estruturas globulares foram observadas e estas eram formadas primeiramente naqueles calos com origem da região do mesocótilo do embrião zigótico (Figura 3F). Após cinco meses de cultivo a formação dessas estruturas globulares evoluía formando um calo embriogênico compacto (Figura 3G). Nessas condições, também foi possível observar a presença de embriões somáticos naqueles calos com origem da região do meristema (Figura 3H), contudo em menor intensidade em relação àqueles calos originados do mesocótilo (Figura 3I).

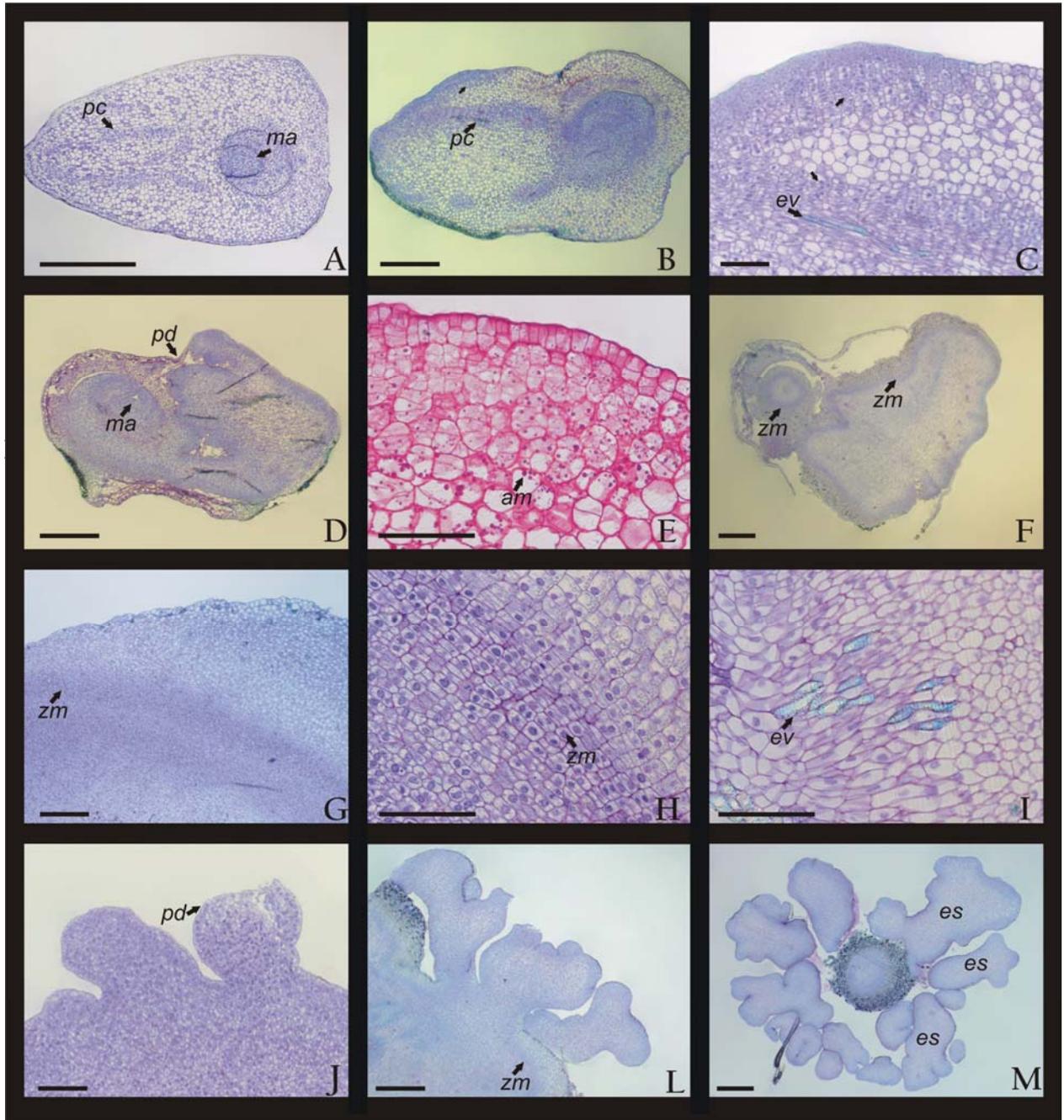
A partir da análise histológica das estruturas globulares, foi observada a presença de uma protoderme delimitada, evidenciando que estas estruturas são embriões somáticos no estágio de desenvolvimento globular (Figura 3J). A origem dos embriões somáticos foi a partir das células da zona meristemática (Figura 3L), sugerindo o padrão de origem multicelular. Embriões somáticos que não apresentavam nenhuma conexão vascular com o tecido matriz foram observados (Figura 3M).

Para a análise bioquímica, não foram detectadas diferenças significativas no perfil protéico dos calos primários com característica embriogênica e dos que não apresentavam capacidade embriogênica (Figura 5). Por outro lado, nos calos embriogênicos nodulares obtidos (Figura 3I) foi observada a presença de duas bandas protéicas de alto peso molecular (Figura 5).

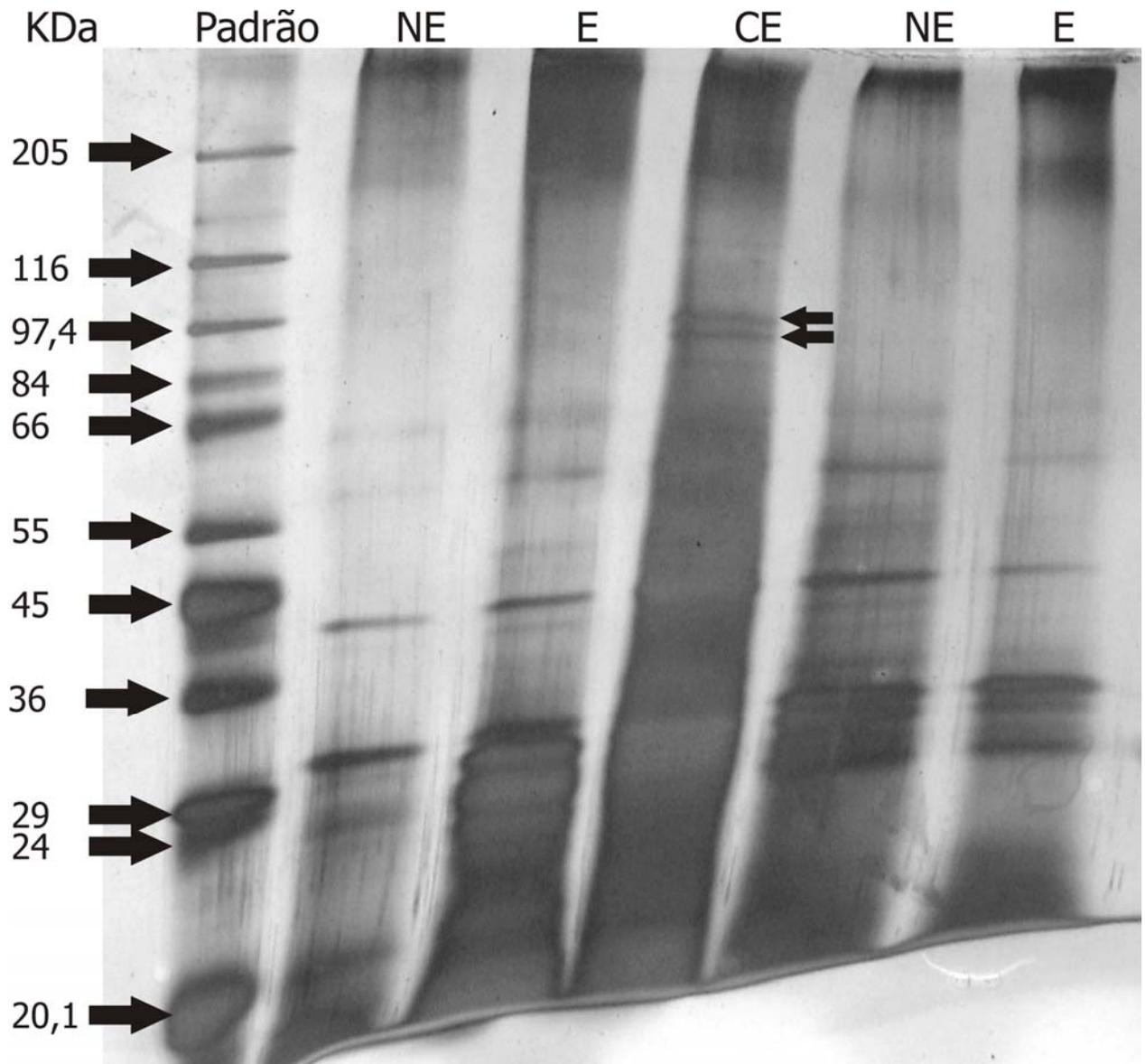
**FIGURA 3.** Embriogênese somática a partir de embriões zigóticos de pupunha (*B. gasipaes*). A – Aspecto do embrião zigótico. B – Intumescimento na região do mesocótilo (seta) do embrião zigótico duas semanas após inoculação. C – Início do desenvolvimento do calo primário na região do mesocótilo do embrião zigótico (seta larga) e intumescimento da região do meristema apical (seta estreita). D – Crescimento do calo primário (seta larga) e início de formação de calo na região do meristema apical (seta estreita) após 60 dias de cultura. E – Calo primário obtido a partir de embriões zigóticos de pupunha, após 90 dias de cultura com origem na região do mesocótilo (seta larga) e do meristema apical (seta estreita). F – Desenvolvimento de estruturas globulares (seta) na superfície do calo primário. G – Calo apresentando o desenvolvimento de estruturas embriogênicas. H - Detalhe de embrião somático (seta) observado no calo primário obtido a partir da região do meristema apical. I – Detalhe do calo embriogênico observado em calo primário obtido a partir da região do mesocótilo. J – Plântulas obtidas a partir da conversão de embriões somáticos em meio de cultura de maturação. L – Desenvolvimento de raízes (seta) em calos embriogênicos de pupunha mantidos em meio de cultura de maturação. M – Calo embriogênico com aspecto friável e desenvolvimento de várias estruturas globulares. N – Perda da capacidade embriogênica dos calos embriogênicos friáveis após subcultivo. O – Maturação e desenvolvimento dos embriões somáticos. P – Embrião somático maduro isolado. Q – Embrião somático durante o processo de conversão. R – Plântulas obtidas a partir de embriões somáticos. S – Plântulas cultivadas em meio de cultura isento de fitorreguladores. T – Plântulas preparadas para a aclimatização. U – Sistema de aclimatização utilizado no presente estudo. V – Plântulas aclimatizadas mantidas em casa de vegetação. Figuras A-C, H-I, M-Q barra=1mm; Figuras D-G, J, L, P barra=2mm; Figuras S e T barra=2,5cm; Figura V barra=5cm.



**FIGURA 4.** Análises histológicas da embriogênese somática a partir de embriões zigóticos de pupunha (*B. gasipaes*). A – Secção longitudinal do embrião zigótico. B – Embrião zigótico após duas semanas de cultivo, notar proliferação celular nos tecidos subepidermicos. C – Detalhe do inicio da proliferação celular (setas) a partir de embriões zigóticos. Notar a presença de elementos de vaso. D – Embrião zigótico após trinta dias de cultivo evidenciando a proliferação celular ao longo de toda a lâmina cotiledonar. E – Detalhe das células em divisão apresentando a presença de grãos de amido. F – Aspecto da formação de calo primário em toda região da lâmina cotiledonar e do meristema apical. G – Calo primário evidenciando a presença de uma zona meristemática. H – Detalhe das células da zona meristemática. I – Detalhe das células no interior dos calos primários de pupunha. Notar a presença de elementos de vasos. J – Embriões somáticos globulares com protoderme delimitada. L – Embriões somáticos alongados. Notar a presença da zona meristemática. M – Secção transversal de um calo embriogênico evidenciando a presença de vários embriões somáticos sem conexão vascular com o tecido matriz. Figuras A, B, D, F, L, M barra=500µm; Figuras C, E, G-J barra=200µm. *pc* – procambio; *ma* – meristema apical; *pd* – protoderme; *am* – amido; *zm* – zona meristemática; *ev* – elementos de vaso; *es* – embriões somáticos.



**FIGURA 5.** Análise do perfil protéico em gel de poliacrilamida-SDS de calos primários de pupunha (*B. gasipaes*) sem competência embriogênica (NE), com competência embriogênica (E) e dos calos embriogênicos propriamente ditos (CE) induzidos em meio de cultura MS suplementado com 10 $\mu$ M de picloram. Padrão de peso molecular (Sigma-Marker<sup>®</sup> 4038).

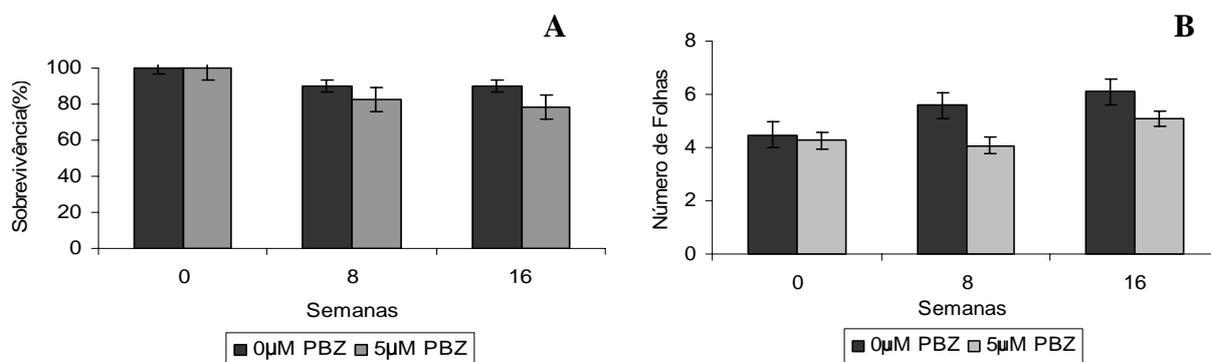


#### 5.4 Aclimatização das Plântulas

Plântulas regeneradas foram selecionadas (Figura 3S-T) e transferidas para substrato, sendo acondicionadas em caixas plásticas fechadas com lâmina de vidro (Figura 3U). Após o período de aclimatização, as plântulas foram transferidas para sacos plásticos contendo o mesmo substrato e para casa de vegetação (Figura 3V).

Para a aclimatização de plântulas de pupunha regeneradas por embriogênese somática, foi observada  $84,2 \pm 6,4\%$  de sobrevivência após 16 semanas de aclimatização (Figura 6A). Contudo, durante esse período de aclimatização as plântulas não apresentaram crescimento significativo em altura (dados não apresentados). Todavia, para as plântulas pré-tratadas com solução de MS sem PBZ a percentagem de sobrevivência não apresentou alterações após oito semanas de aclimatização, indicando que as plântulas já se apresentavam aclimatizadas nesse período (Figura 6A).

Para o número de folhas, a utilização do pré-tratamento com PBZ resultou em menor valor após 16 semanas, com  $6,3 \pm 1,2$  e  $5,3 \pm 1,2$  folhas observadas para plântulas na ausência ou presença de pré-tratamento com  $5 \mu\text{M}$  de PBZ, respectivamente (Figura 6B).



**FIGURA 6.** Efeito do pré-tratamento com PBZ na aclimatização de plântulas de pupunha (*B. gasipaes* Kunth) regeneradas por embriogênese somática. A - Percentagem de sobrevivência. B - Número de folhas. Barras verticais indicam erro padrão da média.

## 6 DISCUSSÃO

Calos embriogênicos foram obtidos a partir de embriões zigóticos maduros de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth) em um meio de cultura suplementado com picloram como fonte de auxina. Esta auxina também foi capaz de induzir competência embriogênica em embriões zigóticos maduros de *E. guineensis* (Teixeira et al., 1995) e foi a fonte de auxina que induziu a maior percentagem de calos embriogênicos de *Areca catechu* (Karun et al., 2004). Resultados anteriores em pupunha também evidenciaram que o picloram incrementou a indução de embriogênese somática em comparação com o 2,4-D (Steinmacher & Guerra, 2003), reforçando os resultados obtidos por Valverde et al. (1987).

No presente estudo, a maior percentagem de indução de calos embriogênicos foi observada em meio de cultura MS suplementado com 10  $\mu\text{M}$  picloram com ausência de 2-iP. O papel da citocinina na embriogênese somática em palmeira não é completamente compreendido. A presença desta substância incrementou a indução de embriogênese somática em *Euterpe edulis* (Guerra & Handro, 1998) e aumentou significativamente a conversão dos embriões somáticos de *E. guineensis* (Aberlenc-Bertossi et al., 1999). No entanto, a utilização de citocinina aumentou a oxidação dos tecidos em *Hyophorbe lagenicaulis* (Sarasan et al., 2002).

Sistemas *in vitro* evidenciaram que as citocininas estão ligadas a diferenciação do meristema apical (Peres & Kerbauy, 1999). Em condições naturais, algumas das propriedades das citocininas foram relacionadas com o aumento na tolerância ao estresse e a inibição da ação da auxina (Barciszewski et al., 2000), e estas propriedades podem, da mesma forma, afetar o metabolismo das plantas *in vitro*. No presente estudo, a utilização de 5  $\mu\text{M}$  de 2-iP para a indução de calos primários não apresentou benefícios ao desenvolvimento do calo, e tal observação já foi descrita para pupunha (Arias & Huete, 1983). No entanto, apesar de não apresentar diferenças significativas, a utilização dessa substância apresentou efeitos negativos para a aquisição de capacidade embriogênica naqueles calos primários. Resultados similares foram obtidos em *Cynodon dactylon* (Chaudhury & Qu, 2000) e *Sorghum bicolor* (Oldach et al., 2001). De acordo com Blake (1983), para palmeiras as auxinas são necessárias para a iniciação dos calos enquanto as citocininas são requeridas para o desenvolvimento do embrião somático. Adicionalmente, concentrações endógenas de reguladores de crescimento desempenham papel chave na aquisição de competência embriogênica (Jiménez, 2001) e em *Cocos nucifera*, entre todos os tecidos avaliados, os embriões zigóticos apresentaram maiores concentrações de citocininas endógenas (Sáenz et al., 2003).

No presente trabalho, após cinco meses de manutenção sem subcultivo, calos embriogênicos se desenvolveram a partir de setores dos calos primários. Em *Cocos nucifera* a utilização de culturas sem subcultivo resultou em maior porcentagem de calos embriogênicos (Chan et al., 1998). Contudo, nestas condições com elevada concentração de auxina e longos períodos de cultura em frascos selados, pode ocorrer o acúmulo de etileno.

O etileno influencia vários aspectos do desenvolvimento e crescimento das plantas, e sua produção parece ser universal em cultura de tecidos vegetais *in vitro* (George, 1993). O íon de prata é um inibidor da ação do etileno, por competir com os sítios de ligação deste gás (Sisler & Serek, 1999). No presente estudo, apesar de não apresentar efeito na indução de calos primários e no crescimento desses calos, baixas concentrações (1  $\mu\text{M}$ ) de nitrato de prata aumentaram significativamente a capacidade embriogênica dos calos primários e o número de embriões somáticos por calo embriogênico, enquanto elevadas concentrações apresentaram efeito negativo na aquisição de capacidade embriogênica. Resultados similares foram obtidos por Adkins et al. (1998) para *C. nucifera*.

Em *Phoenix dactylifera*, a presença de  $\text{AgNO}_3$  promoveu a proliferação celular e o número de embriões somáticos obtidos (Al-Khayri & Al-Bahrany, 2001). Contudo, a concentração ótima desta substância foi influenciada pelo genótipo (Al-Khayri & Al-Bahrany, 2004). Em *Zea mays*, baixas concentrações de  $\text{AgNO}_3$  aumentaram a produção de calos embriogênicos compactos (Huang & Wei, 2004) e friáveis (Vain et al., 1989), enquanto elevadas concentrações também inibiram a formação de calos embriogênicos (Huang & Wei, 2004), da mesma forma que o observado no presente estudo, possivelmente devido ao efeito fitotóxico dos íons de prata.

Análises histológicas evidenciaram que o início da proliferação celular ocorreu na região do mesocótilo dos embriões zigóticos, a partir das células subepidérmicas, principalmente naquelas adjacentes aos feixes vasculares. O mesmo padrão de resposta foi descrito para embriões zigóticos de *E. guineensis* (Nwankwo & Krikorian, 1986; Teixeira, 1989) e *Euterpe edulis* (Guerra & Handro, 1998) e parece seguir o modelo proposto para monocotiledôneas herbáceas (Taylor & Vasil, 1996; Fernandez et al., 1999). Após os primeiros eventos de divisão celular, no presente estudo, foi observada a formação de uma camada de células meristemáticas em toda a região da lâmina cotiledonar e posteriormente na região do meristema. Essa camada de células, denominada de zona meristemática, apresentava padrão de divisão principalmente periclinal. A formação de uma zona meristemática similar à observada no presente estudo foi descrita em calos primários de *C. nucifera* (Dussert et al., 1995; Verdeil et al., 2001; Fernando et

al., 2003), e foram associadas ao desenvolvimento dos calos primários.

Estruturas globulares com presença de protoderme definida foram observadas a partir dos calos primários, caracterizando o primeiro estágio do desenvolvimento dos embriões somáticos. Análises histológicas revelaram que a origem dos embriões somáticos de pupunha foi a partir das células da zona meristemática, seguindo o padrão de origem multicelular. Da mesma forma, em *C. nucifera* a embriogênese somática com origem unicelular (Dussert et al., 1995) e multicelular (Fernando et al., 2003) foi observada a partir desta zona meristemática.

Com o objetivo de elucidar as diferenças entre os calos primários que apresentaram o desenvolvimento de estruturas embriogênicas, daqueles não morfogenéticos, como também das estruturas embriogênicas em si, foi realizada a avaliação do perfil protéico desses por separação em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Neste ensaio, não foram detectadas diferenças protéicas entre os calos primários com e sem competência embriogênica. Por outro lado, nas estruturas embriogênicas foi observada a presença de duas bandas protéicas de alto peso molecular. Em *Saccharum* sp., Guiderdoni et al (1995) encontraram diferenças entre calos embriogênicos e não embriogênicos, sendo observadas duas bandas protéicas de 65 e 67KDa apenas em calos embriogênicos. Esses autores sugeriram que essas sejam proteínas de reserva que são acumuladas nos primeiros estágios de desenvolvimento dos embriões somáticos. Da mesma forma, embriões somáticos de *E. guineensis* acumularam proteínas de reserva com peso molecular variando entre 45KDa e 65KDa (Morcillo et al., 1998). Assim, no presente trabalho, as duas bandas observadas com alto peso molecular podem corresponder a proteínas de reserva específica de embriões e o fato de não ter sido encontrada diferenças entre os calos pode ser devido ao fato de que apenas pequenos agrupamentos de células adquiram competência embriogênica, conforme proposto por Williams & Maheswaran (1986), com pouca alteração no perfil proteico.

Para a maturação os calos embriogênicos obtidos no ensaio A foram transferidos para o meio de cultura contendo baixas concentrações de auxina e fontes orgânicas de nitrogênio. Em *E. guineensis* a presença de fontes orgânicas de nitrogênio foram responsáveis por incrementos na acumulação de proteínas de reserva em embriões somáticos (Morcillo et al., 1999), resultando em melhor qualidade dos mesmos. Da mesma forma, em *C. nucifera* a transferência das culturas para um meio de cultura com concentração reduzida de auxina foi responsável pela obtenção de um maior número de plântulas regeneradas (Fernando & Gamage, 2000).

A maturação dos embriões somáticos foi observada concomitante com a proliferação das culturas embriogênicas (Figura 40), resultando no desenvolvimento não sincronizado dos

embriões somáticos que apresentaram elevada capacidade de conversão. Adicionalmente, calos embriogênicos com aspecto friável foram observados. No entanto, após transferir esses calos friáveis para meio de cultura de mesma composição, estes perderam a capacidade embriogênica.

As características biológicas que levam a formação de calos embriogênicos friáveis e com crescimento rápido não são completamente compreendidas. Em *C. nucifera* esse tipo de calo se desenvolve totalmente de forma espontânea e em baixa frequência (Sandoval et al., 2003), e em *E. guineensis* calos friáveis permitiram o estabelecimento de suspensões celulares, contudo o desenvolvimento destes foi influenciado pelo genótipo (Teixeira et al., 1995). Adicionalmente, culturas de *Pennisetum glaucum* cultivadas por longos períodos desenvolveram maior proporção desses calos embriogênicos friáveis (Lambé et al., 1999). O mesmo foi observado em *E. guineensis* (Teixeira, 1989). Em *Dactylis glomerata*, células do mesófilo foliar que apresentam a divisão celular anticlinal puderam ser consideradas a origem de tais calos friáveis (Vasilenko et al., 2000), a partir dos quais embriões somáticos foram obtidos.

No presente estudo, devido à baixa frequência observada para o desenvolvimento de calos embriogênicos com aspecto friável, não foi permitido avaliar os fatores ligados ao seu desenvolvimento. Adicionalmente, após a transferência dos calos friáveis para meio de cultura de mesma composição, estes se tornavam compactos e perdiam a capacidade morfogênica. Resultados similares foram obtidos por Teixeira (1989) em calos embriogênicos friáveis de *E. guineensis*, sendo associados a presença de carvão ativado no meio de cultura. O carvão ativado tem a propriedade de adsorver os compostos orgânicos e inorgânicos do meio de cultura (Pan & Staden, 1998). Alterações drásticas na disponibilidade de 2,4-D ocorrem em função da presença de carvão ativado no meio de cultura (Ebert & Taylor, 1990), da mesma forma que essa substância tem a capacidade de alterar a concentração endógena de vários reguladores de crescimento (Andrekas et al., 2002). Estes fatores podem ter contribuído para perda da competência embriogênica, por diminuir a disponibilidade de auxina no meio de cultura e alterar as interações dos reguladores endógenos dos calos embriogênicos friáveis de pupunha.

A conversão de embriões somáticos de palmeiras parece ser positivamente influenciada pela presença de citocininas no meio de cultura (Aberlenc-Bertossi et al., 1999; Karun et al., 2004). No presente trabalho, os embriões somáticos de pupunha foram transferidos para o meio de cultura de conversão, conforme proposto por Guerra & Handro (1998) para conversão de embriões somáticos de *E. edulis*, resultando em plântulas com desenvolvimento balanceado de parte aérea e raízes, que puderam ser submetidas a aclimatização.

A aclimatização de plântulas de pupunha foi considerada difícil principalmente devido à

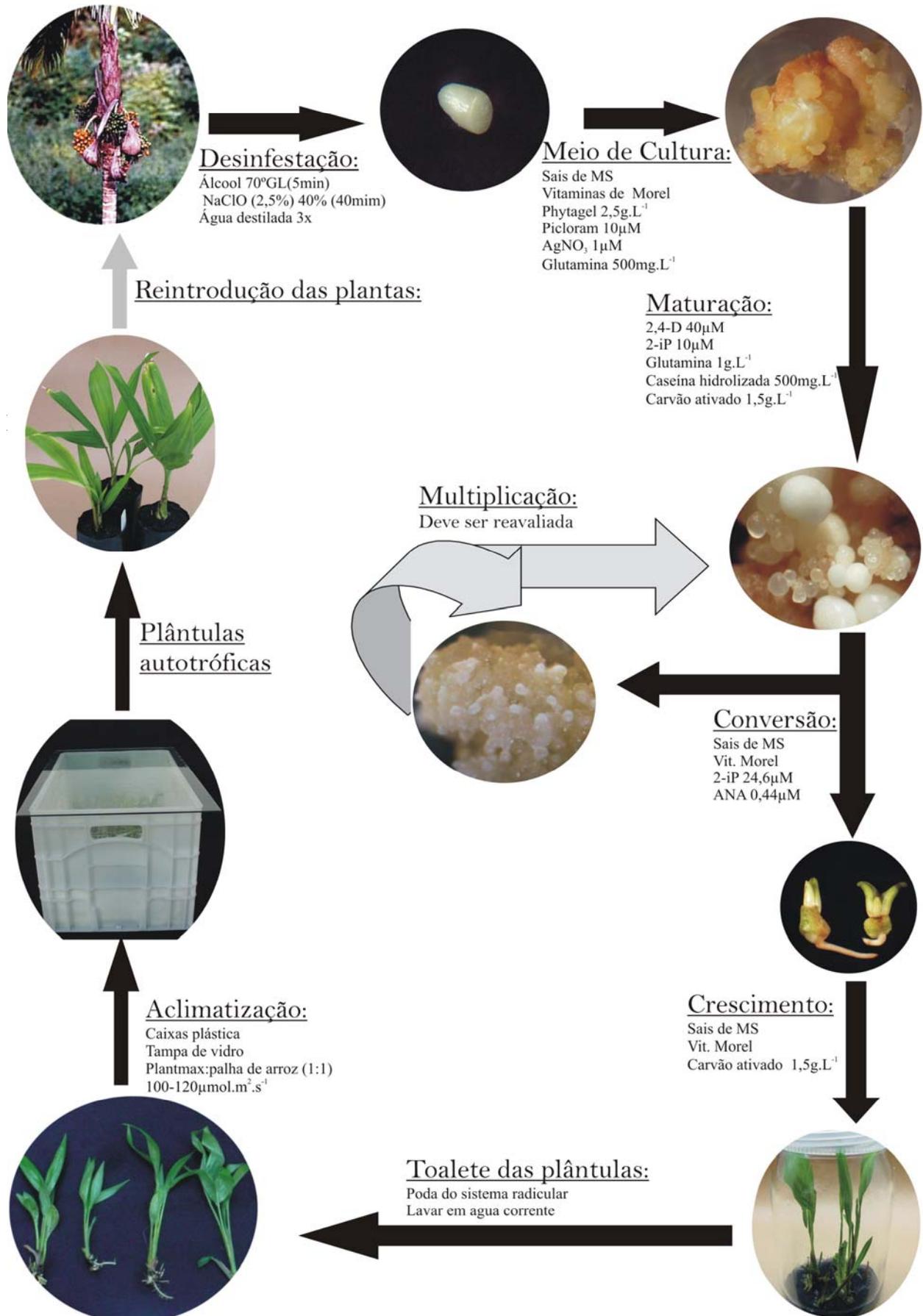
inatividade do sistema radicular das plântulas regeneradas (Arias, 1985). Valverde et al. (1987) descreveram um sistema para a aclimatização de plântulas desta espécie, mantendo-as em condições estéreis com vermiculita. No presente estudo, um sistema de aclimatização otimizado foi descrito. A utilização de PBZ, um retardante de crescimento derivativo de triazóis, é sugerida para incrementar a resistência das plântulas durante a aclimatização (Hazarika, 2003). Adicionalmente, Sarasan et al. (2002) sugerem a utilização dessa substância para aumentar a percentagem de sobrevivência de plântulas de palmeiras que apresentam dificuldades durante a aclimatização. No entanto, com o sistema apresentado, uma elevada percentagem de sobrevivência foi observada conforme descrita por Valverde et al. (1987), sem o pré-tratamento com PBZ como também sem a utilização de condições estéreis anteriores, possivelmente devido ao elevado teor de água do ambiente no qual as plântulas foram mantidas. Entretanto, esse sistema ainda requer otimizações, pois durante o período avaliado as plântulas apresentaram a emissão de novas folhas, porém com crescimento lento.

Os padrões de respostas *in vitro* de embriões zigótico como fonte de explante foram semelhantes ao observado para embriogênese somática em *Elaies guineensis* descrita por Teixeira (1989). O desenvolvimento de embriões somáticos seguiu o modelo indireto, intermediado pela formação de calos primários, dessa forma a ocorrência de variação somaclonal não pode ser descartada. Os embriões somáticos durante o tratamento de maturação apresentaram desenvolvimento dessincronizado. Um protocolo completo para a embriogênese somática de pupunha, a partir de embriões zigóticos foi desenvolvido (Figura 7).

## **7 CONCLUSÕES**

O principal fator ligado a esse processo foi a concentração e o balanço dos reguladores de crescimento utilizados. A utilização de  $\text{AgNO}_3$  aumentou a aquisição de competência embriogênica. Análises histológicas confirmaram que a regeneração de plântulas ocorreu via embriogênese somática. A indução de calos embriogênicos friáveis foi observada em baixa frequência e a sua manutenção e multiplicação não foi realizada com sucesso. A indução e a manutenção destes calos embriogênicos de aspecto friável apresenta-se como uma estratégia atrativa para o estabelecimento de processos de multiplicação clonal massal de pupunha baseado na embriogênese somática. As plântulas regeneradas foram aclimatizadas com sucesso em ambiente com elevada umidade, o que pode estar relacionada ao sucesso dessa etapa. Análises histológicas revelaram um processo de indução de embriogênese somática indireto, com origem multicelular dos embriões somáticos.

**FIGURA 7.** Representação esquemática do protocolo proposto para a regeneração de plântulas de pupunha a partir de embriões zigóticos maduros como fonte de explantes. Após a obtenção dos embriões zigóticos estes foram transferidos para meio de cultura contendo 10 $\mu$ M de picloram e 1 $\mu$ M de AgNO<sub>3</sub> até a indução de calos embriogênicos. Estes calos embriogênicos foram transferidos para meio de cultura de maturação e os embriões somáticos para a conversão, obtendo-se as plântulas, que foram aclimatizadas com sucesso para condições autotróficas. Foi observado o desenvolvimento de calos embriogênicos com aspecto friável, contudo não foi obtido sucesso em sua manutenção e multiplicação. Setas cinzas correspondem a fatores não avaliados ou que devem ser reavaliados.



## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABERLENC-BERTOSI, F.; NOIROT, M.; DUVAL, Y. BA enhances the germination of oil palm somatic embryos derived from embryogenic suspension cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.56, p.53-57, 1999.
- ADKINS, S.W.; SAMOSIR, Y.M.; ERNAWATTI, A.; DREW, R.A. Control of ethylene and use of polyamines can optimize the conditions for somatic embryogenesis in coconut (*Cocos nucifera* L.) and papaya (*Carica papaya* L.). **Acta Horticulturae**, v.461, p.459-466, 1998.
- AL-KHAYRI, J.M.; AL-BAHRANY, A.M. Genotype-dependent *in vitro* response of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars to silver nitrate. **Scientia Horticulturae**, v.99, p.153-162, 2004.
- AL-KHAYRI, J.M.; AL-BAHRANY, A.M. Silver nitrate and 2-isopentyladenina promote somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.). **Scientia Horticulturae**, v.89, p.291-298, 2001.
- ALMEIDA, M.; KERBAUY, G.B. Micropropagation of *Bactris gasipaes* (Palmae) through flower bud culture. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.8(3), p.215-217, 1996.
- ANDREKAS, P.V.; LABEL, P.; LELU, M.A. Charcoal affects early development and hormonal concentrations of somatic embryos of hybrid larch. **Tree Physiology**, v.22, p.431-434, 2002.
- ARIAS, O. Propagación vegetativa por cultivo de tejidos del pejibaye (*Bactris gasipaes* H.B.K.). **Asbana**, v.24(9), p.24-27, 1985.
- ARIAS, O.; HUETE, F. Propagación vegetativa *in vitro* de pejibaye (*Bactris gasipaes* H.B.K.). **Turrialba**, v.33(2), p.103-108, 1983.
- BARCISZEWSKI, J.; SIBOSKA, G.; RATTAN, I.S.S.; CLARK, B.F.C. Occurrence, biosynthesis and properties of kinetin ( $N^6$ -furfuryladenine). **Plant Growth Regulation**, v.32, p.257-265, 2000.
- BLAKE, J. Tissue culture propagation of coconut, date palm and oil palm. In.: DODDS, J.H. (ed.) **Tissue Culture of Trees**. Westport, Connecticut: Avi Publishing Company, 1983, p.29-50.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- CHAN, J.L.; SAÉNZ, L.; TALAVERA, C.; HORNUNG, R.; ROBERT, M.; OROPEZA, C. Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**, v.17, p.515-521, 1998.
- CHAUDHURY, A.; QU, R. Somatic embryogenesis and plant regeneration of turf-type bermudagrass: Effect of 6-benzyladenine in callus induction medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.60, p.113-120, 2000.
- DODEMAN, V.L.; DUCREUX, G.; KREIS, M. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. **Journal of Experimental Botany**, v.48(313), p.1493-1509, 1997.
- DUDITS, D.; GYÖRGYÉY, J.; BÖRGE, L.; BAKÓ, L. Molecular biology of somatic embryogenesis. In: T.A. THORPE (ed.) **In vitro Somatic Embryogenesis**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1995, p.267-308.

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

EBERT, A.; TAYLOR, H.F. Assessment of the changes of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentrations in plant tissue culture media in the presence of activated charcoal. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.20, p.165-172, 1990.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T.P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.74, p.201-228, 2003.

FERNANDEZ, S.; MICHAUX-FERRIÈRE, N.; COUMANS, M. The embryogenic response of immature embryo culture of durum wheat (*Triticum durum* Desf.): Histology and improvement by AgNO<sub>3</sub>. **Plant Growth Regulation**, v.28, 147-155, 1999.

FERNANDO, S.C.; GAMAGE, C.K.A. Absisic acid induced somatic embryogenesis in immature embryo explants of coconut (*Cocos nucifera* L.). **Plant Science**, v.151, p. 193-198, 2000.

FERNANDO, S.C.; VERDEIL, J.L.; HOCHER, V.; WEERAKOON, L.K.; HIRIMBUREGAMA, K. Histological analysis of plant regeneration from plumule explants of *Cocos nucifera*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.72, p.281-284, 2003.

FUENTES, S.R.L.; CALHEIROS, M.B.P.; MANETTI-FILHO, J.; VIEIRA, L.G.E. The effects of silver nitrate and different carbohydrate sources on somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 60, p.5-13, 2000.

GEORGE, E.F. **Plant Propagation by Tissue Culture**. 2<sup>o</sup> Ed, Edington: Ed. Exegetic Limited, 1993. 574p.

GUERRA, M.P.; HANDRO, W. Somatic embryogenesis and plant regeneration in different organs of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae): Control and structural features. **Journal of Plant Research**, v. 111, p.65-71, 1998.

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

GUIDERDONI, E.; MEROT, B.; EKSMTRAMAGE, T.; PAULET, F.; FELDMANN, P.; GLASZMANN, J.C. Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum* Species). In: BAJAJ, Y.P.S. (ed.). **Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol 31, Somatic Embryogenesis and Synthetic Seeds II**, New York: Springer-Verlag, 1995, p. 93-113.

HAZARIKA, B.N. Acclimatization of tissue-cultured plants. **Current Science**, v.85(12), p.1704-1712, 2003.

HEUKESHOVEN, J.; DERNICK, R. Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. **Electrophoresis**, v.6, p.103-112, 1985.

HUANG, H.Q.; WEI, Z.M. High-frequency plant regeneration through callus initiation from mature embryos of maize (*Zea mays* L.). **Plant Cell Reports**, v.22, p.793-800, 2004.

JIMÉNEZ, V.M. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.13(2), p196-223, 2001.

KARUN, A.; SIRIL, E.A.; RADHA, A.; PARTHASARATHY, V.A. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from leaf and inflorescence explants of arecanut (*Areca catechu* L.). **Current Science**, v.86(12), p.1623-1628, 2004.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

LAMBÉ, P.; MUTAMBEL, H.S.N.; DELTOUR, R.; DINANT, M. Somatic embryogenesis in pearl-millet (*Pennisetum glaucum*): Strategies to reduce genotype limitation and to maintain long-term totipotency. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.55, p.23-29, 1999.

MORA-URPÍ, J.; WEBER, J.C.; CLEMENT, C.R. **Peach-palm (Bactris gasipaes Kunth)** – Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. Rome: Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research and International Plant Genetic Resources Institute, 1997, 81p.

MORCILLO, F.; ABERLEC-BERTOSSI, F.; HAMON, S.; DUVAL, Y. Accumulation of storage protein and 7S globulin during zygotic and somatic embryo development in *Elaeis guineensis*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.36(7), p.509-514, 1998.

MORCILLO, F.; ABERLEC-BERTOSSI, F.; NOIROT, M.; HAMON, S.; DUVAL, Y. Differential effects of glutamine and arginine on 7S globulin accumulation during the maturation of oil palm somatic embryos. **Plant Cell Reports**, v.18, p.868-872, 1999.

MOREL, G.; WETMORE, R.H. Tissue culture of monocotyledons. **American Journal of Botany**, v.38, p.138-140, 1951.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiology Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

NWANKWO, B.A.; KRIKORIAN, A.D. Morphogenetic potential of embryo and seedlings-derived callus of *Elaeis guineensis* Jacq. Var. *psifera* Becc. **Annals of Botany**, v.51, p.65-76, 1986.

OLDACH, K.H.; MORGENSTERN, A.; ROTHER, S.; GIRGU, M.; O’KENNEDY, M.; LÖRZ, H. Efficient *in vitro* plant regeneration from immature zygotic embryos of pearl millet [*Pennisetum glaucum* (L.)R.Br.] and *Sorghum bicolor* (L.) Moench. **Plant Cell Reports**, v.20, p.416-421, 2001.

PAN, M.J.; van STADEN, J. Use of charcoal in *in vitro* culture – A review. **Plant Growth Regulation**, v.26, p.155-163, 1998.

PERES, L.E.P.; KERBAUY, G.B. High cytokinin accumulation following root tip excision changes the endogenous auxin-to-cytokinin ratio during root-to-shoot conversion in *Catsetum fimbriatum* Lind (Orchidaceae). **Plant Cell Reports**, v.18, p.1002-1006, 1999.

READ, S.M.; NORTHCOTE, D.H. Minimization of variation in the response to different proteins of the coomassie blue G dye-binding assay for protein. **Analytical Biochemistry**, v.116, p.53-64, 1981.

SÁENZ, L.; JONES, L.H.; OROPEZA, C.; VLÁČIL, D.; STRNAD, M. Endogenous isoprenoid and aromatic cytokinins in different plant parts of *Cocos nucifera* (L.). **Plant Growth Regulation**, v.39(3), p.205-215, 2003.

SANDOVAL, A.; HOCHER, V.; VERDEIL, J. Flow cytometric analysis of the cell cycle in different coconut palm (*Cocos nucifera* L.) tissues cultured *in vitro*. **Plant Cell Reports**, v.22, p.25-31, 2003.

SANTOS, K.G.B.; MUNDSTOCK, E.; BODANESE-ZANETTI, M.H. Genotype-specific normalization of soybean somatic embryogenesis through the use of an ethylene inhibitor. **Plant Cell Reports**, v.16, p.859-864, 1997.

- SARASAN, V.; ROMASAY, M.M.; ROBERTS, A.V. *In vitro* germination and induction of direct somatic embryogenesis in 'Bottle palm' [*Hyophorbe lagenicaulis* (L.Bailey) H.E.Moore], a critically endangered Mauritian palm. **Plant Cell Reports**, v.20, p.1107-1111, 2002.
- SISLER, E.C.; SEREK, M. Compounds controlling the ethylene receptor. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v.40, p1-7, 1999.
- STEIN, M.; STEPHENS, C. Effect of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid and activated charcoal on somatic embryogenesis of *Bactris gasipaes* H.B.K. **Turrialba**, v.41(2), p.196-201, 1991.
- STEINMACHER, D.A.; GUERRA, M.P. Embriogênese somática como ferramenta para o melhoramento e a conservação da pupunha. In.: II Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, Porto Seguro-Ba, **Resumos...**, CD-ROOM. 2003.
- TAYLOR, M.G.; VASIL, I.K. The ultrastructure of somatic embryo development in pearl-millet (*Pennisetum glaucum*, Poaceae). **American Journal of Botany**, v.83, p.28-44, 1996.
- TEIXEIRA, J. B. **Development of *in vitro* techniques of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.)**, PhD thesis, New Jersey: State University of New Jersey, 1989, 161p.
- TEIXEIRA, J. B.; SÖNDAHL, M. R.; KIBRY, E. G. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of oil palm. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.34, p.227-233, 1993.
- TEIXEIRA, J.B.; MARBACH, P.A.S.; SANTOS, M.O. Otimização da metodologia de embriogênese somática visando a propagação clonal de genótipos elite de cacau (*Theobroma cacao* L.). **Série Documentos Embrapa No. 79**, Brasília: SPI/Embrapa, 2002. 33p.
- TEIXEIRA, J.B.; SÖNDAHL, M.R.; NAKAMURA, T.; KIRBY, E.G. Establishment of oil palm cell suspensions and plant regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.40, p.105-111, 1995.
- VAIN, P.; YEAN, H.; FLAMENT, P. Enhancement of production and regeneration of embryogenic type II callus in *Zea mays* L. by AgNO<sub>3</sub>. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.18, p.143-151, 1989.
- VALVERDE, R.; ARIAS, O.; THORPE, T.A. Picloram-induced somatic embryogenesis in pejobaye palm (*Bactris gasipaes* H.B.K.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.10(2), p.149-156, 1987.
- VASILENKO, A.; MCDANIEL, J.K.; CONGER, B.V. Ultrastructural analyses of somatic embryo initiation, development and polarity establishment from mesophyll cell of *Dactylis glomerata*. **In vitro Cellular and Development Biology – Plant**, v.36, p.51-56, 2000.
- VERDEIL, J.L.; HOCHER, V.; HUET, C.; GROSDEMANGE, F.; ESCOUTE, J.; FERRIÈRE, N.; NICOLE, M. Ultrastructural changes in coconut calli associated with the acquisition of embryogenic competence. **Annals of Botany**, v.88, p.9-18, 2001.
- WILLIAMS, E.G.; MAHESWARAN, G. Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany**, v.57, p.43-462, 1986.

CAPÍTULO IV - EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM PUPUNHA:

II - Utilização de inflorescências como fonte de explantes

**1 RESUMO**

Para a propagação clonal de genótipos selecionados, é necessário o desenvolvimento de protocolos regenerativos a partir de explantes obtidos de plantas adultas. Em cultura de tecidos de monocotiledôneas é imprescindível que estes explantes sejam compostos por células meristemáticas, e dentre as várias técnicas de cultura de tecidos, a embriogênese somática é tida como a melhor rota morfogênica para a regeneração de plântulas. Em pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth), a cultura de tecidos é tida como a melhor técnica para a propagação clonal de plantas selecionadas, assim como para sua conservação; dessa forma inflorescências compõem uma importante fonte de explantes para a micropropagação dessa espécie. O presente trabalho objetivou determinar os principais fatores envolvidos na aquisição da competência embriogênica e na regeneração de plântulas de pupunha a partir de inflorescências jovens, visando o estabelecimento de um protocolo regenerativo baseado na embriogênese somática. Dentre os vários fatores testados, a fonte de auxina e sua concentração apresentaram maior influência para as respostas *in vitro*. De uma forma geral, maiores porcentagens de oxidação foram encontradas em explantes cultivados na ausência de auxina ou quando o 2,4-D foi empregado como fonte dessa substância. A progressão do meristema floral para a formação dos botões florais também foi observada em maior frequência nos meios de cultura isentos de reguladores de crescimento ou na presença de baixa concentração desses, independente da fonte. Para reverter a determinação floral e induzir capacidade embriogênica, a utilização de auxinas fortes foi necessária. Neste caso o uso de 300 µM de picloram suplementado ao meio de cultura promoveu a indução de calos com características embriogênicas em 10±1,3% dos explantes. Após a obtenção dos calos embriogênicos, estes foram transferidos para meio de cultura para a maturação dos embriões somáticos, sendo possível observar 25,8±1,6 destes por calo embriogênico. Os embriões somáticos apresentaram 70,3±2,9% de conversão, obtendo plântulas com desenvolvimento balanceado de parte aérea e raiz.

**Palavras-chaves:** Cultura de tecidos, picloram, conservação genética, explante.

CHAPTER IV - SOMATIC EMBRYOGENESIS OF PEACH-PALM:

II - The use of inflorescence as explants source

**2 ABSTRACT**

For clonally propagation of selected genotypes, development of regenerative protocols with explants obtained from mature plants is necessary. In monocot tissue culture the use of meristematic explants is necessary, and from several tissue culture techniques, somatic embryogenesis is considered a improved pathway for plantlet regeneration. Tissue culture is considered the better alternative for peach-palm (*Bactris gasipaes* Kunth) improvement and conservation, thus inflorescence compost an important explant source for micropropagation of this specie. The present study aimed at determinate the factors that influence the acquisition of somatic embryogenesis competence, for the establishment of a regenerative protocol through somatic embryogenesis. Among several tested factors the auxin source e its concentration showed higher influence to *in vitro* responses. High oxidation rates were observed in explants maintained on culture medium devoid of auxin or when 2.4-D was used as auxin source. The progression of floral meristem to flower bud development was also observed at higher frequency on culture medium devoid of growth regulators or when low concentration of auxin was supplemented of all auxin sources. To induce somatic embryogenesis the use of stronger auxin source were necessary. In this case, 300  $\mu\text{M}$  of picloram supplemented to culture medium showed somatic embryogenesis induction rate of  $10\pm 1.3\%$  of explants. Embryogenic calluses were transferred to maturation culture medium and showed  $25.8\pm 1.6$  somatic embryos per embryogenic callus. Somatic embryos showed  $70.3\pm 2.9\%$  of conversion rate, and plantlets with balanced shoot and root development were obtained.

**Key-Words:** Tissue culture, picloram, genetic conservation, explant.

### 3 INTRODUÇÃO

A pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth) é uma palmeira da família Arecaceae e apresenta aptidão para a produção de frutos e palmito. A composição dos frutos faz destes uma excelente fonte alimentícia, com elevada quantidade de amido, e presença de lipídios, de caroteno e de todos os aminoácidos essenciais. O palmito dessa espécie apresenta baixa atividade de enzimas peroxidase e polifenoloxidase, o que possibilita a comercialização *in natura* do mesmo, abrindo novos nichos de mercado (Mora-Urpí et al., 1997).

Para essa espécie, a cultura de tecidos é tida como a melhor técnica para a propagação clonal de plantas selecionadas, assim como para sua conservação (Mora-Urpí et al., 1997). Contudo, para a propagação clonal de genótipos selecionados, é necessário o desenvolvimento de protocolos regenerativos a partir de explantes de plantas adultas. Para o sucesso da técnica de embriogênese somática em monocotiledôneas, é imprescindível a utilização de explantes contendo células meristemáticas (Vasil, 1987). Neste sentido, em plantas adultas de palmeiras, as inflorescências constituem uma importante fonte de explantes, apresentando como vantagens o fato de que a obtenção de inflorescências não emitidas pode ser realizada sem maiores danos a planta matriz (Verdeil et al., 1994).

Protocolos utilizando essa fonte de explante já foram descritos para várias espécies da família Arecaceae, entre elas *Elaeis guineensis* (Teixeira et al., 1994), *Euterpe edulis* (Guerra & Handro, 1998) *Cocos nucifera* (Verdeil et al., 1994) e *Areca catechu* (Karun et al., 2004). Em pupunha, Arias (1985) não observou respostas morfogênicas em inflorescências dessa espécie, contudo, a utilização deste explante com sucesso foi descrita por Almeida & Kerbauy (1996). No entanto, esses autores observaram que a regeneração de plantas desta espécie ocorria via organogênese e em baixa frequência.

Para palmeiras, trabalhos clássicos indicam que a embriogênese somática é a principal rota morfogenética para a regeneração de plantas (Blake, 1983) e em pupunha essa técnica é sugerida para incrementar a taxa regenerativa (Arias & Huete, 1983).

O presente trabalho objetivou determinar os principais fatores envolvidos na aquisição da competência embriogênica e na regeneração de plântulas de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth), a partir de inflorescências jovens, visando o estabelecimento de um protocolo regenerativo baseado na embriogênese somática.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Material Vegetal**

Inflorescências jovens ainda não emitidas, de duas progênes meio-irmãs da população Yurimáguas, foram coletadas em matrizes mantidas no banco de germoplasma do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia – INPA, Manaus, AM.

A desinfestação das inflorescências foi realizada retirando a espata externa, com posterior imersão em álcool 70°GL durante 5 min e expostas ao fluxo por 10 min. Posteriormente, a espata interna foi removida e as inflorescências tiveram suas ráquulas separadas.

Para avaliar o efeito do estágio de desenvolvimento das inflorescências, estas foram classificadas como *Infl1*, *Infl2* e *Infl3* cujas espatas externas encontravam-se entre 5-8 cm; 8-12 cm e 12-16 cm, respectivamente. As ráquulas obtidas dessas foram divididas em secções transversais de 1 a 2 mm e imediatamente inoculadas em meio de cultura. Inflorescências que apresentam essas classes de tamanho são normalmente formadas na axila das folhas numeradas entre 15 a 10; 9 a 6 e 5 a 2, respectivamente, sendo a folha de nº1 a folha mais desenvolvida na planta (Clement, 1986).

### **4.2 Meios de cultura e condições de cultivo**

O efeito do pré-tratamento com um choque de auxina foi testado, utilizando o meio de cultura basal descrito acima suplementado com 200  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, sem a adição do agente geleificante. Neste tratamento, as inflorescências permaneceram durante 30 dias em tubos de ensaio (150x25 mm), contendo 25 mL do meio de cultura líquido.

Após a utilização ou não do pré-tratamento, os explantes foram inoculados em meio de cultura basal composto por sais de Murashige & Skoog (1962) adicionado de vitaminas de Morel & Wetmore (1951), suplementado com 3% de sacarose, 500  $\text{mg.L}^{-1}$  de Glutamina, 1,5  $\text{g.L}^{-1}$  de carvão ativado e 2,5  $\text{g.L}^{-1}$  de Phytigel<sup>®</sup>. Para avaliar as respostas morfológicas elicitadas por diferentes fontes de análogos de auxina empregou-se o 2,4-D, o picloram e o dicamba em concentrações de 0, 150, 300 e 600  $\mu\text{M}$ , suplementado ao meio de cultura basal. Após 32 semanas de incubação, foram avaliadas diferentes variáveis que incluíram a percentagem de oxidação dos explantes, do desenvolvimento do botão floral, da proliferação celular e de indução de calos embriogênicos.

Os calos embriogênicos foram transferidos para meio de cultura basal suplementado com

1 g.L<sup>-1</sup> de Glutamina, 500 mg.L<sup>-1</sup> de caseína hidrolisada, 40 µM de 2,4-D e 10 µM de 2-iP, para a maturação dos embriões somáticos. As culturas permaneceram nesse meio de cultura por oito semanas, tendo um subcultivo com intervalo de quatro semanas.

Para a conversão dos embriões somáticos, embriões somáticos maduros foram selecionados e transferidos para meio de cultura basal sem carvão ativado, suplementado com 24,5 µM de 2-iP e 0,44 µM de ANA. Após quatro semanas, os embriões somáticos foram transferidos para meio de cultura MS, adicionado de vitaminas de Morel, isento de reguladores de crescimento, suplementado com 1,5 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado e geleificado com 7,0 g.L<sup>-1</sup> de Agar (Merse®). As plântulas obtidas nessa condição foram, então, transferidas para frascos com capacidade de 300 mL, contendo 30 mL do mesmo meio de cultura por frasco.

Em todos os meios de cultura o pH foi ajustado para 5,8 antes da adição do agente geleificante e autoclavados durante 15 min à 121°C e 1 kgf.cm<sup>-2</sup>. Para a indução de embriogênese somática aproximadamente 25 mL do meio de cultura foi dispensado em placas de Petri descartáveis (Ø80 mm). Para a maturação e conversão, 30 mL do meio de cultura foi vertido em placas de Petri (Ø100 mm). Para a indução e formação dos embriões somáticos todas as culturas foram incubadas no escuro em sala de crescimento à 26±1°C, já para a conversão e crescimento das plântulas, essas culturas foram mantidas em sala de crescimento à 26±1°C sob fotoperíodo de 16h com intensidade luminosa de 50-60 µMol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>.

### **4.3 Delineamento estatístico**

O presente estudo foi conduzido em delineamento inteiramente casualizados, com oito a doze placas de Petri por tratamento, contendo uma ráquila por placa. Para facilitar a apresentação e discussão dos dados os fatores foram agrupados em contrastes de [Fonte X Concentração de Auxina] e outro de [Tamanho da Inflorescência X Pré-tratamento]. Os dados são apresentados como média±erro padrão para as diferentes variáveis avaliadas. Esse procedimento de apresentação de resultados permite comparações independentes a partir de delineamentos complexos, da mesma forma que indica a variação dentro dos tratamentos (Compton, 1994).

## **5 RESULTADOS**

As inflorescências de pupunha são formadas nas axilas das folhas (Figura 1A) e apresentam-se protegidas por duas espatas. Inflorescências não emitidas (Figura 1B) tiveram suas espatas desinfetadas e removidas (Figura 1C) e pequenos segmentos transversais (1-2 mm)

das ráquulas foram utilizados como fonte de explante (Figura 1D). Após 32 semanas de cultivo, diferentes padrões morfogenéticos foram observados, incluindo a oxidação dos explantes (Figura 1E), o desenvolvimento do botão floral (Figura 1F), a proliferação celular (Figura 1G) e a de calos embriogênicos. Esses calos embriogênicos foram caracterizados pela presença de estruturas nodulares ou globulares, podendo ambas ocorrer em um mesmo calo embriogênico (Figura 1H).

De maneira geral, maiores percentagens de oxidação foram encontradas em explantes cultivados na ausência de auxina ou quando o 2,4-D foi empregado em baixas concentrações (Tabela 1). Da mesma forma, a progressão do meristema floral para a formação dos botões florais também foi observada em maior frequência nos meios de cultura isentos de auxina ou na presença de baixa concentração dessa substância. De fato, a presença de 150  $\mu\text{M}$  de auxina, independente da fonte, estimulou o desenvolvimento dessas estruturas (Tabela 1). Adicionalmente, apesar da suplementação de 300  $\mu\text{M}$  de 2,4-D ao meio de cultura, 58,8 $\pm$ 5,1% dos explantes apresentavam o desenvolvimento dos botões florais (Tabela 1).

A proliferação celular representa aqueles explantes que sobreviveram ao período do cultivo e apresentaram crescimento indeterminado (Figura 1G). Essa resposta morfogenética foi observada em maior frequência em explantes mantidos em meio de cultura suplementado com elevadas concentrações de auxinas, porém, a fonte de auxina também influenciou essa resposta. Na presença de 600  $\mu\text{M}$  de 2,4-D 60,6 $\pm$ 4,9% dos explantes apresentaram a proliferação celular, enquanto que na presença de 300  $\mu\text{M}$  de picloram ou dicamba essa característica foi observada, respectivamente, em 68,8 $\pm$ 4,8% e 72,1 $\pm$ 4,6% dos explantes (Tabela 1).

No presente estudo, 300  $\mu\text{M}$  de picloram foi capaz de induzir calos com características embriogênicas em 10 $\pm$ 1,3% dos explantes (Tabela 1). Por outro lado, em 150  $\mu\text{M}$  de picloram 1,6 $\pm$ 1,5% apresentaram calos com essa resposta morfogenética. Já em 150  $\mu\text{M}$  de dicamba ou 150  $\mu\text{M}$  e 300  $\mu\text{M}$  de 2,4-D não foi observada esta resposta. Da mesma forma, maiores concentrações de auxinas apresentaram efeito negativo para a aquisição de competência embriogênica (Tabela 1).

Apesar de diferentes fontes e concentrações de auxina apresentaram maior influência nas respostas morfogenéticas observadas, a utilização do pré-tratamento com um choque auxínico e de diferentes estágios de desenvolvimento das inflorescências evidenciaram diferentes padrões de respostas (Tabela 2).

A avaliação da percentagem de explantes que apresentaram o desenvolvimento de botão floral pode ser definida como a incapacidade das condições de cultivo e do estágio de

desenvolvimento do explante em reverter a sua determinação celular. No presente trabalho, essa variável pode ser relacionada com o estágio de desenvolvimento das inflorescências em interação com a utilização do pré-tratamento (Tabela 2).

**TABELA 1** - Efeito de diferentes fontes e concentrações de auxina suplementadas ao meio de cultura para as respostas morfológicas (média±erro padrão) de inflorescências não-emitidas de pupunha (*B. gasipaes* Kunth).

Auxina	Concentração (µM)	Respostas Morfológicas (%) <sup>1</sup>				
		Sem Resposta	Oxidação	Botão Floral	Proliferação	Calo Embriogênico
Ausência	0	8,0±4,4	55,0±6,7	36,9±6,3	0	0
2,4-D	150	7,5±4,7	38,0±5,1	53,9±5,1	0,4±4,7	0
	300	9,4±4,7	30,4±5,1	58,8±5,1	1,2±4,7	0
	600	5,8±4,8	14,9±5,3	17,7±5,3	60,6±4,9	0,8±1,3
Picloram	150	9,2±5,2	13,0±5,7	46,9±5,7	29,1±5,3	1,6±1,5
	300	6,8±4,7	10,4±5,2	3,8±5,2	68,8±4,8	10,0±1,3
	600	7,0±4,7	6,9±5,1	1,6±5,1	83±4,7	0,43±1,3
Dicamba	150	7,6±5,0	17,3±5,5	56,7±5,5	18,2±5,1	0
	300	7,5±4,5	7,2±4,9	7,5±4,9	72,1±4,6	5,6±1,3
	600	7,3±4,7	19,0±5,2	0	72,6±4,8	0,8±1,3
CV(%)		53,0	44,7	38,6	38,0	267,8
F (A: Auxina)		0,38 <sup>ns</sup>	3,75*	11,07**	32,34**	5,03**
F (B: Concentração)		0,215 <sup>ns</sup>	29,42**	54,84**	104,74**	8,74**
F(AxB)		0,968 <sup>ns</sup>	3,81*	11,52**	14,26**	3,16**

<sup>1</sup> Valores expressos em média±erro padrão. Médias obtidas a partir do agrupamento dos valores entre o pré-tratamento e o tamanho das inflorescências. Para cálculo do teste F os dados foram transformados em  $\sqrt{(x+5)}$ ; <sup>NS</sup> Não Significativo; \* Significativo (p<0,05); \*\* Altamente significativo (p<0,01).

Após o pré-tratamento dos explantes o desenvolvimento de botões florais foi reduzido em todos os estágios de desenvolvimento das inflorescências testados. Inflorescências nos estágios iniciais de desenvolvimento (*Infl1*) apresentaram 35,1±3,5% e 10,9±4,3% dos explantes com estruturas florais, para aquelas com ausência ou presença do pré-tratamento (Tabela 2). Apesar de diminuir a percentagem de explantes com o desenvolvimento de botão floral, em inflorescências pré-tratadas o gradiente de resposta em relação ao estágio de desenvolvimento do explante foi mais pronunciado, sendo possível observar 31,0±6,3% dos explantes provenientes da classe *Infl3* com o desenvolvimento de estruturas florais em comparação com 10,9±4,3% das *Infl1*(Tabela 2).

O pré-tratamento dos explantes em meio líquido, aumentou significativamente a aquisição de competência embriogenética, sendo que em inflorescências da classe *Infl1* (5-8 cm) a indução de calos embriogênicos apresentou a maior média observando 4,8±0,9% e 1,8±0,8% dos explantes pré-tratados ou não, respectivamente (Tabela 2). Por outro lado, esse pré-

tratamento incrementou a porcentagem de oxidação e durante o período avaliado 40,7±2,0% dos explantes provenientes de inflorescências *Infl2* não apresentavam respostas morfogênicas (Tabela 2).

Após a obtenção dos calos embriogênicos, estes foram transferidos para meio de cultura de maturação, sendo possível observar 25,8±1,6 embriões somáticos/calos embriogênicos. Posteriormente, para a conversão estes foram isolados em pequenos agrupamentos e transferidos para um meio de cultura suplementado com 20 µM de 2-iP durante quatro semanas. Após a transferência dos embriões somáticos para meio de cultura isento de reguladores de crescimento, esses apresentaram 70,3±2,9% de conversão, obtendo plântulas com desenvolvimento balanceado de parte aérea e raiz (Figura 1I), que posteriormente foram transferidas para frascos, onde o desenvolvimento completo dessas plântulas foi observado (Figura 1J).

**TABELA 2** - Efeito de diferentes estágios de desenvolvimento (*Infl1* - 5-8 cm; *Infl2* - 8-12 cm; *Infl3* - 12-16 cm) e do pré-tratamento em meio de cultura contendo 200 µM de 2,4-D durante 30 dias nas respostas morfogênicas de inflorescências não-emitidas de pupunha (*B. gasipaes* Kunth) e teste *F* para estes fatores e sua interação.

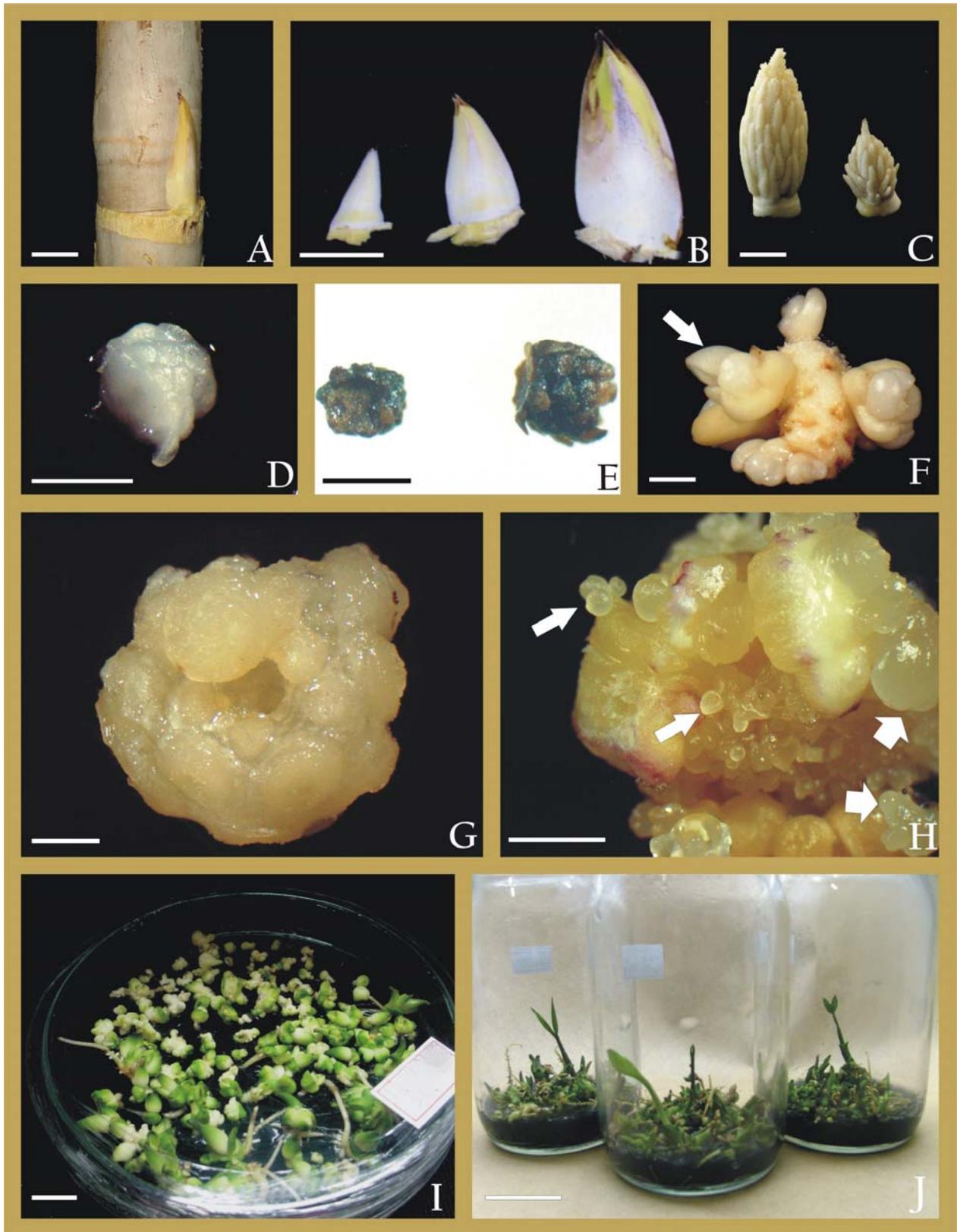
Pré-Tratamento (dias)	Classe de Tamanho	Respostas Morfológicas (%) <sup>1</sup>				
		Sem Resposta	Oxidação	Botão Floral	Proliferação	Calo Embriogênico
0	<i>Infl1</i>	0,0	16,5±3,0	35,1±3,5	46,4±4,2	1,8±0,8
	<i>Infl2</i>	0,7±5,0	7,2±6,9	47,7±8,3	44,2±9,8	0,0
	<i>Infl3</i>	0,0	8,0±4,6	44,0±5,5	47,3±6,5	0,5±1,2
30	<i>Infl1</i>	1,8±2,6	44,1±3,6	10,9±4,3	38,2±5,1	4,8±0,9
	<i>Infl2</i>	40,7±2,0	25,1±4,0	13,8±4,7	19,6±5,6	0,5±1,0
	<i>Infl3</i>	0	7,9±5,3	31±6,3	58,3±7,5	2,1±1,4
<i>F</i> (C: Pré-Tratamento)		34,19**	20,64**	11,61**	4,18*	5,16*
<i>F</i> (D: Tamanho)		20,03**	27,16**	61,56**	1,82 <sup>ns</sup>	8,46*
<i>F</i> (CxD)		15,5**	12,24**	3,19*	10,30**	0,07 <sup>ns</sup>

<sup>1</sup> Valores expressos em média±erro padrão. Médias obtidas a partir do agrupamento dos valores entre a fonte e a concentração de auxina. Para cálculo do Teste *F* os dados foram transformados em  $\sqrt{(x+5)}$ ; <sup>NS</sup> Não Significativo; \* Significativo (p<0,05); \*\* Altamente significativo (p<0,01).

## 6 DISCUSSÃO

O presente trabalho descreve a indução da embriogênese somática e a regeneração de plântulas de pupunha a partir de inflorescências em diferentes estágios de desenvolvimento (Figura 1B, C). Em vários trabalhos, inflorescências não emitidas de palmeiras apresentam um elevado grau de determinação, ou seja, há uma forte canalização para a formação de estruturas

**FIGURA 1.** Embriogênese somática e regeneração de plântulas a partir de inflorescências de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth). A – Formação da inflorescência na axila da folha. B – Diferentes estágios de inflorescência testados. C – Aspecto das inflorescências. D – Explante inicial de secção transversal da ráquila. E – Explantes completamente oxidados. F – Formação de botões florais *in vitro* (seta). G – Aspecto dos explantes que apresentaram proliferação celular. H – Aspecto de um calo embriogênico contendo embriões somáticos (seta estreita) e estruturas nodulares (seta larga). I – Plântulas obtidas a partir da conversão dos embriões somáticos. J – Plântulas completas em frascos. Figuras A e B barra=5cm; Figuras C e I barra=1cm; Figuras D, E e F barra=1mm; Figuras G e H barra=2,5mm; Figura J barra=2,5cm.



florais (Teixeira et al., 1994; Guerra & Handro, 1998; Verdeil et al., 1994), característica do desenvolvimento fechado (Kerbaudy, 1999). Tal comportamento pode em parte ser explicado pela expressão gênica diferencial, que em angiospermas ocorre entre o meristema e os primórdios foliares, de forma que as células do meristema são mantidas na condição de indiferenciada, e aquelas dos primórdios permaneçam no estado diferenciado (Fletcher, 2002).

Apesar de o desenvolvimento de estruturais florais em condições *in vitro* já ter sido descrito em pupunha (Almeida & Kerbaudy, 1996), o presente trabalho evidenciou que esta resposta morfogenética é estimulada em condições de baixas concentrações de auxina, ou mesmo na presença de elevadas concentrações de 2,4-D. Resultados similares foram obtidos em *E. guineensis* na qual a presença de 2,4-D estimulou o crescimento e o desenvolvimento de estruturais florais, e a ausência deste regulador de crescimento ou a sua presença em baixas concentrações provocou a oxidação e a morte dos explantes (Teixeira et al., 1994).

Trabalhos realizados em *E. guineensis* encontram genes ligados ao florescimento, com a expressão diferencial e específica no tecido, como também genes específicos a cada estágio do desenvolvimento da inflorescência (Singh & Cheah, 2000), sustentando a hipótese de que, dependendo do estágio de desenvolvimento da inflorescência, sua expressão gênica é canalizada a uma única rota morfogenética.

Para a indução de calos com características embriogênicas a partir de inflorescências de pupunha, o picloram se mostrou como a melhor fonte de auxina. Esses dados reforçam os resultados observados em meristemas apicais (Valverde et al., 1987) e embriões zigóticos como fontes de explantes de pupunha (Steinmacher & Guerra, 2003; Capítulo IV.I), nos quais o picloram incrementou a indução de embriogênese somática. Adicionalmente, Barro et al. (1999) encontraram que, em comparação com o 2,4-D, o picloram suplementado ao meio de cultura foi mais eficiente para a indução de embriogênese somática em inflorescências de *T. aestivum* e do híbrido (*T. durum* x *Hordeum chilense*). E ainda, em *Paspalum scrobiculatum* a utilização do picloram aumentou o número de plântulas regeneradas (Kaur & Kothri, 2004).

No presente estudo, a concentração ótima para a indução de embriogênese somática foi de 300  $\mu$ M de picloram, sendo que em concentrações superiores a competência embriogênica foi reduzida. Concentrações elevadas de auxina podem inibir completamente a expressão da embriogênese somática (Guerra et al., 1999) e resultados similares foram observados ocorrer em embriões zigóticos de pupunha como fonte de explante (Capítulo IV.I) como também em inflorescências de *T. aestivum* (Barro et al., 1999).

Guerra & Handro (1998) sugeriram a utilização de um meio de cultura líquido, antes da

transferência para o meio de cultura de indução à embriogênese somática, para diminuir a oxidação e aumentar a capacidade embriogênica de inflorescências de *E. edulis*. Já em *P. scrobiculatum* o pré-tratamento com 2,4-D foi essencial para a indução de embriogênese somática a partir de embriões zigóticos (Vikrant & Rashid, 2003). Também em embriões zigóticos de *E. guineensis* a utilização de um pré-tratamento com elevadas concentrações de 2,4-D foi benéfico à indução de calos primários (Teixeira, 1989).

No presente estudo o pré-tratamento foi realizado em meio de cultura com 200  $\mu\text{M}$  de 2,4-D durante um período de 30 dias. Durante esse período foi observado apenas um leve intumescimento das ráquias. Contudo, o mesmo resultou na diminuição da formação de botões florais, da mesma forma que incrementou a indução de embriogênese somática. Estudos em *C. nucifera* sugerem que aquisição de competência embriogênica foi obtida quando calos primários foram transferidos para outro meio de cultura contendo maiores concentrações de 2,4-D (Verdeil et al., 1994), o que pode ser relacionado com o efeito benéfico do pré-tratamento realizado. Da mesma forma, Nhut et al. (2000) sugeriram o uso de pré-tratamento para incrementar a aquisição de competência embriogênica em explantes provenientes de plântulas de arroz. Os autores postularam que esse pré-tratamento alterou o balanço endógeno de reguladores de crescimento. Adicionalmente, este pré-tratamento poderia atuar como uma fonte de estresse incrementando o metabolismo celular (Fehér et al., 2003), ativar a divisão em células específicas do tecido (Teixeira, 1989) ou então estar relacionado a diferentes sítios de ação entre as diferentes moléculas de análogos de auxina.

Os resultados obtidos no presente trabalho indicam um gradiente de resposta para a formação de botões florais e principalmente para a indução de embriogênese somática. Inflorescências em estágios iniciais do desenvolvimento apresentaram maior competência para a embriogênese somática, já inflorescências mais desenvolvidas apresentaram maiores médias para a formação de botões florais. Esse gradiente de resposta tem sido descrito em outros modelos, sendo que a obtenção de calos com características embriogênicas em *Triticum durum* foi inversamente proporcional ao tamanho da inflorescência (Benkirane et al., 2000). Similarmente, em *Pennisetum americanum* Botti & Vasil (1989) descreveram que esta rota morfogenética somente foi observada em inflorescências menores que 2,5 cm. Em *E. edulis*, Guerra & Handro (1998) citaram que embriogênese somática foi observada em inflorescências em estágios iniciais do desenvolvimento. Os autores ainda relataram que inflorescências em estágios de desenvolvimento mais avançado apresentaram apenas intensa oxidação e desenvolvimento de estruturais florais. Já em *A. catechu* inflorescências entre 8 e 12 cm produziram maiores médias

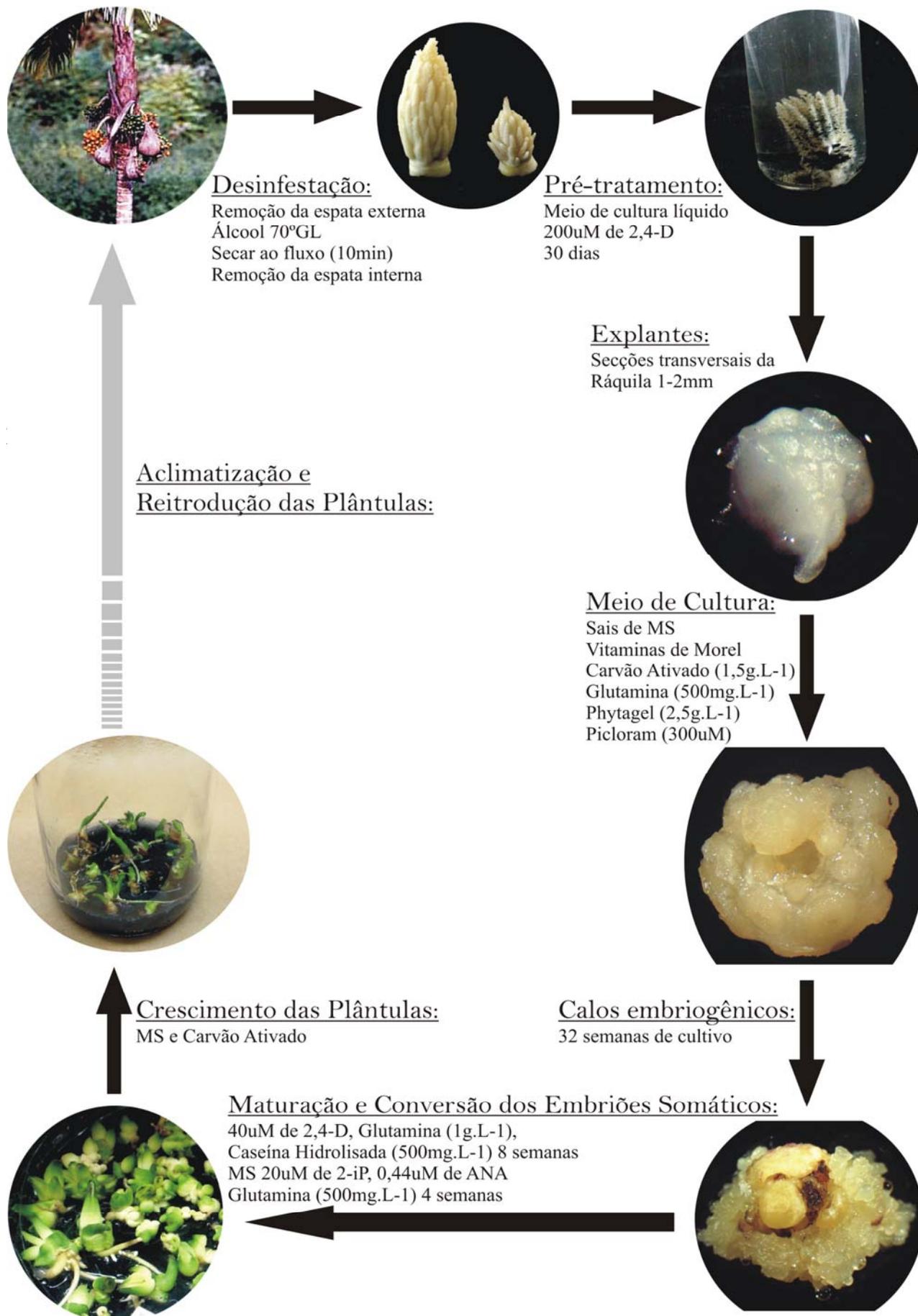
de calos, ao contrário de inflorescências maiores que 16 cm (Karun et al., 2004). O mesmo padrão de resposta foi observado em *C. nucifera*, sendo que inflorescências cujas espatas apresentavam 10 cm (menor tamanho avaliado) apresentaram maiores médias de formação de calos embriogênicos (Verdeil et al., 1994).

Os calos com características embriogênicas foram transferidos para meios de cultura suplementados com baixas concentrações de auxina e com a presença de nitrogênio na forma reduzida. As culturas permaneceram nessa condição durante oito semanas, com o objetivo de alcançar a maturação dos embriões somáticos. Em *E. guineensis* a presença de fontes orgânicas de nitrogênio foram responsáveis por incrementos na acumulação de proteínas de reserva em embriões somáticos (Morcillo et al., 1999), resultando em melhor qualidade dos mesmos. Da mesma forma, em *C. nucifera* a transferência das culturas para um meio de cultura com concentração reduzida de auxina foi responsável pela obtenção de um maior número de plântulas regeneradas (Fernando & Gamage, 2000).

Após a obtenção de embriões somáticos maduros, estes foram transferidos para meios de cultura suplementados com 2-iP. Em modelos *in vitro* a citocinina está ligada à formação do meristema apical (Peres & Kerbauy, 1999) e em palmeiras essa substância foi utilizada com sucesso para a conversão de embriões somáticos (Guerra & Handro, 1998; Aberlenc-Bertossi et al., 1999; Karun et al., 2004). Contudo, no presente estudo a regeneração de plântulas a partir de calos embriogênicos com aspecto nodular não foi observada. Tal fenômeno já foi observado em calos embriogênicos de *E. guineensis* obtidos a partir de embriões zigóticos como fonte de explante (Teixeira et al., 1993), e pode estar ligado a problemas de formação do embrião devido ao longo período de cultura em presença de auxina. Sabe-se que a presença dessa substância no meio de cultura durante a ontogênese do embrião somático, impede que o mesmo polarize apresentando desenvolvimento irregular (Yeung, 1995), podendo ser a origem dos calos embriogênicos nodular.

Em termos de protocolo regenerativo, as inflorescências compõem uma importante fonte de explantes por possibilitarem a clonagem de plantas adultas. Devido a presença das espatas, estes explantes estão em condições supostamente estéreis, facilitando a desinfestação sem prejudicar o explante. Conforme descrito em outros trabalhos com palmeiras, a indução de calos embriogênicos delonga bastante tempo, entretanto é obtido um grande número de regenerantes. Por fim, as plantas regeneradas devem ser submetidas a testes de campo. Com base nestes resultados um protocolo é sugerido (Figura 2).

**FIGURA 2.** Representação esquemática do protocolo proposto para a regeneração de plântulas de pupunha a partir de inflorescências não emitidas como fonte de explantes. Após a obtenção das inflorescências estéreis estas são transferidas para meio de cultura contendo 200  $\mu\text{M}$  de 2,4-D durante trinta dias. Após esse período os explantes com 1 mm são transferidos para meio de cultura contendo 300  $\mu\text{M}$  de Picloram até o desenvolvimento de calos embriogênicos, que são transferidos para meio de maturação e conversão dos embriões somáticos, obtendo-se as plântulas. Seta cinza corresponde a fatores não avaliados.



## 7 CONCLUSÕES

O presente trabalho descreve pela primeira vez os principais fatores envolvidos na embriogênese somática e na regeneração de plantas a partir dessa rota morfogênica utilizando inflorescências jovens não emitidas de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth) como fonte de explantes. A fonte e a concentração da auxina utilizada desempenharam papel chave neste processo. Da mesma forma, a utilização de inflorescências em estágios iniciais do desenvolvimento juntamente com pré-tratamento em meio de cultura contendo 200 µM de 2,4-D incrementou tal resultado. Entretanto, estudos mais detalhados devem ser realizados visando elucidar a ontogênese do processo, avaliar o efeito do genótipo, como também incrementar regeneração de plantas a partir de calos embriogênicos com aspecto nodular.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABERLENC-BERTOSI, F.; NOIROT, M.; DUVAL, Y. BA enhances the germination of oil palm somatic embryos derived from embryogenic suspension cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.56, p.53-57, 1999.
- ALMEIDA, M.; KERBAUY, G.B. Micropropagation of *Bactris gasipaes* (Palmae) through flower bud culture. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 8(3), p. 215-217, 1996.
- ARIAS, O.M. Propagacion vegetative por cultivo de tejidos del pejibaye (*Bactris gasipaes* H.B.K.). **ASBANA**, v.24(9), p.24-27, 1985.
- ARIAS, O.M.; HUETE, F.V. Propagacion vegetativa *in vitro* de pejibaye (*Bactris gasipaes* H.B.K.). **TURRIALBA**, v.33(2), p.103-108, 1983.
- BARRO, F.; MARTIN, A.; LAZZERI, P.A.; BARCELÓ, P. Medium optimization for efficient somatic embryogenesis and plant regeneration from immature inflorescence and immature scutella of elite cultivar of wheat, barley and tritordeum. **Euphytica**, v.108, p.161-167, 1999.
- BENKIRANE, H.; SABOUNJI; CHLYAH, A.; CHLYAH, H. Somatic embryogenesis and plant regeneration from fragments of immature inflorescences and coleoptiles of durum wheat. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, V.61, p.107-113, 2000.
- BLAKE, J. Tissue culture propagation of coconut, date palm and oil palm. In.: DODDS, J.H. (ed.) **Tissue Culture of Trees**. Westport, Connecticut: Avi Publishing Company, 1983, p.29-50.
- BOTTI, C.; VASIL, I. Ontogeny of somatic embryos of *Pennisetum americanum*. II. In cultured immature inflorescences. **Canadian Journal of Botany**, v.62, p.1629-1635, 1989.
- CLEMENT, C.R. Preliminary observation on the developmental curve of pejibaye (*Bactris gasipaes* H.B.K.) inflorescences. **Revista de Biologia Tropical**, v.35(1), p.151-153, 1987.

COMPTON, M.E. Statistical methods suitable for the analysis of plant tissue culture data. **Plant Cell, Tissue and Organ culture**, v.37, p.217-242, 1994.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T.P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.74, p.201-228, 2003.

FERNANDO, S.C.; GAMAGE, C.K.A. Absisic acid induced somatic embryogenesis in immature embryo explants of coconut (*Cocos nucifera* L.). **Plant Science**, v.151, p. 193-198, 2000.

FLETCHER, J.C. Coordination of cell fate decisions and cell proliferation in the shoot apical meristem of angiosperm plants. **BioEssays**, v.24, p.27-37, 2002.

GUERRA, M.P.; HANDRO, W. Somatic embryogenesis and plant regeneration in different organs of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae): Control and structural features. **Journal of Plant Research**, v.111, p. 65-71, 1998.

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

KARUN, A.; SIRIL, E.A.; RADHA, A.; PARTHASARATHY, V.A. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from leaf and inflorescence explants of arecanut (*Areca catechu* L.). **Current Science**, v.86(12), p.1623-1628, 2004.

KAUR, P.; KOTHARI, S.L. *In vitro* culture of kodo millet: Influence of 2,4-D and picloram in combination with kinetic on callus initiation and regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.77, p.73-79, 2004.

KERBAUY, G.B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos. In: Torres, A.C., Caldas, L.S., Buso, J.A. (eds). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. v.2. Brasília: SPI/Embrapa, 1999, p.519-531.

LAXMI, G.V; GIRI, C.C. Plant regeneration via organogenesis from shoot base-derived callus of *Arachis stenosperma* and *A. villosa*. **Current Science**, v.85(11), p.1624-1629, 2003.

MORA-URPÍ, J.; WEBER, J.C.; CLEMENT, C.R. **Peach-palm (Bactris gasipaes Kunth)** – Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. Rome: Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research and International Plant Genetic Resources Institute, 1997, 81p.

MORCILLO, F.; ABERLEC-BERTOSSI, F.; NOIROT, M.; HAMON, S.; DUVAL, Y. Differential effects of glutamine and arginine on 7S globulin accumulation during the maturation of oil palm somatic embryos. **Plant Cell Reports**, v.18, p.868-872, 1999.

MOREL, G.; WETMORE, R.H. Tissue culture of monocotyledons. **American Journal of Botany**. v.38, p.138-140, 1951.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiology Plantarum**, v.15, p. 473-497, 1962.

NHUT, T.D.; LE, B.V.; VAN, K.T.T. Somatic embryogenesis and direct shoot regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) using thin cell layer culture of apical meristematic tissue. **Journal of Plant Physiology**, v.157, p.559-565, 2000.

PERES, L.E.P.; KERBAUY, G.B. High cytokinin accumulation following root tip excision changes the endogenous auxin-to-cytokinin ratio during root-to-shoot conversion in *Catsetum fimbriatum* Lind (Orchidaceae). **Plant Cell Reports**, v.18, p.1002-1006, 1999.

SINGH, R.; CHEAH, S.C. Differential gene expression during flowering in the oil palm (*Elaeis guineensis*). **Plant Cell Reports**, v.19, p.804-809, 2000.

STEINMACHER, D.A.; GUERRA, M.P. Embriogênese somática como ferramenta para o melhoramento e a conservação da pupunha. In: II Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, Porto Seguro-Ba, **Resumos...**, CD-ROOM, 2003.

TEIXEIRA, J. B. **Development of *in vitro* techniques of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.)**. PhD thesis, New Jersey: State University of New Jersey, 1989, 161p.

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

TEIXEIRA, J.B.; SÖNDAHL, M.R.; KIRBY, E.G. Somatic embryogenesis from immature inflorescence of oil palm. **Plant Cell Reports**, v.13(5), p. 247-250, 1994.

VALVERDE, R.; ARIAS, O.; THORPE, T.A. Picloram-induced somatic embryogenesis in pejobaye palm (*Bactris gasipaes* H.B.K.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.10(2), p.149-156, 1987.

VASIL, I.K. Developing cell tissue culture systems for the improvement of cereal and grass crops. **Journal of Plant Physiology**, v.128, p.193:218, 1987.

VERDEIL, J.L.; HUET, C.; GROSDÉMANGE, F.; BUFFARD-MOREL, J. Plant regeneration from cultured immature inflorescence of coconut (*Cocos nucifera* L.): evidence for somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**, v.13, p.218-221, 1994.

VIKRANT; RASHID, C. Somatic embryogenesis or shoot formation following high 2,4-D pulse-treatment of mature embryos of *Paspalum scrobiculatum*. **Biologia Plantarum**, v.46(2), p.297-300, 2003

YEUNG, E.C. Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. In: THORPE, T.A.(ed.) ***In vitro* embryogenesis in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Pub., 1995, p.205-247.

## CAPÍTULO IV - EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM PUPUNHA:

## III - Aplicação da metodologia de TCL

## 1 RESUMO

O desenvolvimento de protocolos regenerativos baseados na cultura *in vitro* resulta em aplicações diretas para a multiplicação massal de plantas selecionadas, da mesma forma que pode ser inserido em programas de melhoramento genético e de conservação de plantas de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth). Dentre os vários fatores que afetam as respostas morfogênicas, a fonte e o tamanho dos explantes podem ser considerados elementos chaves para o sucesso da técnica. A metodologia de TCL (*Thin Cell Layer*) consiste na utilização de explantes com tamanho reduzido, e tem apresentado resultados superiores em vários estudos de cultura *in vitro*. Com o objetivo de definir um procedimento eficiente para a embriogênese somática e regeneração de plântulas a partir de bainhas foliares de pupunha foi avaliada a metodologia de TCL associada a diferentes concentrações de picloram. Secções transversais (0,7 a 1 mm) de plântulas mantidas *in vitro* foram utilizadas como fonte de explantes. As respostas morfogênicas foram avaliadas em função da posição original do explante em interação com diferentes concentrações de picloram (0 a 600  $\mu\text{M}$ ) adicionado ao meio de cultura MS com 1,5  $\text{g.L}^{-1}$  de carvão ativado. A indução de calos primários foi avaliada três meses após a inoculação. A região do meristema apical apresentou 82,6% a 97,2% de calos primários em meio de cultura suplementado com 150  $\mu\text{M}$  e 600  $\mu\text{M}$  de picloram, sem diferir entre si. Explantes provenientes dos tecidos subapicais apresentaram maior calogênese em meio de cultura suplementado com 300  $\mu\text{M}$  de picloram, enquanto que essa resposta morfogênica a partir de explantes de bainhas foliares apresentou maior calogênese com 600  $\mu\text{M}$  de picloram. A percentagem de calos embriogênicos foi avaliada cinco meses após a inoculação, sem subcultivo. Observou-se o mesmo padrão de resposta para a formação de calos primários, sendo que a região do meristema apical apresentou 43,0% e 17,0% de calos embriogênicos, respectivamente, em meio de cultura suplementado com 300  $\mu\text{M}$  e 600  $\mu\text{M}$  de picloram. Por outro lado, a indução de calos embriogênicos a partir de explantes das camadas histogênicas distal acima do meristema apical somente foi observada em meio de cultura com 600  $\mu\text{M}$  de picloram. Após a maturação, os embriões somáticos apresentaram 45,0 $\pm$ 3,4% de conversão, resultando em plântulas aptas à aclimatização. Estudos histológicos revelaram que os primeiros eventos de divisão celular ocorreram em células adjacentes aos feixes vasculares.

**Palavras-chaves:** *Thin Cell Layer*, Histologia, Picloram, Regeneração de plantas.

## CHAPTER IV - SOMATIC EMBRYOGENESIS OF PEACH-PALM:

## IV - Application of the TCL methodology

**2 ABSTRACT**

The development of *in vitro* regenerative protocols has direct applications for mass propagation of selected plants as well as in breeding and conservation programs of peach-palm (*Bactris gasipaes* Kunth). Among the factors that affect morphogenetic response, the explant source and size play key roles in the *in vitro* morphogenic responses. The TCL (*Thin Cell Layer*) technique consists in the utilization of very small explants and showed enhanced results for several *in vitro* culture systems. Aiming to define an efficient procedure for somatic embryogenesis and plantlet regeneration of peach-palm the TCL technique associated with different picloram concentrations was evaluated. Transvers sections (0.7 to 1 mm) from *in vitro* cultured plantlets were used as explants. Morphogenetic responses were evaluated in response to explant positions on the leaf interacting with different picloram concentrations (0 to 600  $\mu\text{M}$ ) in MS culture medium with 1.5 g.L<sup>-1</sup> of activated charcoal. Primary callus induction was evaluated three months after inoculation, showing 82.6% to 97.2% induction from the shoot meristem in culture media supplemented with 150  $\mu\text{M}$  and 600  $\mu\text{M}$  of picloram respectively. Explants from sub apical tissues showed high callogenesis responses with 300  $\mu\text{M}$  picloram, while the leaf sheath showed high induction rate with 600  $\mu\text{M}$  picloram. Embryogenic callus rate was evaluated five months after culture. Shoot meristem's showed 43.0% and 17.0% of embryogenic callus induction with 300 and 600  $\mu\text{M}$  picloram, respectively. Embryogenic callus induction in explants from histogenic layers upper to shoot meristems was observed only with 600  $\mu\text{M}$  picloram. After maturation, somatic embryos showed 45.0 $\pm$ 3.4% conversion, resulting into plantlets ready for acclimatization. Histological studies revealed that the first cellular division events occurred in cells adjacent to vascular bundles.

**Key-Words:** *Thin cell layer*, Histology, Picloram, Plantlet regeneration.

### 3 INTRODUÇÃO

Para a pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth), o desenvolvimento de um protocolo regenerativo baseado na cultura *in vitro* resulta em aplicações diretas para a multiplicação massal de plantas selecionadas, da mesma forma que pode ser inserido em programas de melhoramento genético e de conservação (Clement & Arkcoll, 1991; Mora-Urpí et al., 1997). A regeneração *in vitro* de plântulas desta espécie foi descrita pela primeira vez por Huete & Arias (1981) a partir da organogênese indireta e, posteriormente, por organogênese direta (Pinedo, 1987; Almeida & Kerbauy, 1996) e embriogênese somática (Stein & Stephens, 1991; Valverde et al., 1987). Contudo, a regeneração de plântulas nestes trabalhos ocorreu em baixa frequência e de forma inconsistente, sugerindo a necessidade de otimização dos protocolos de embriogênese somática (Arias & Huete, 1983).

A embriogênese somática é baseada na totipotencialidade das células vegetais e consiste na formação de estruturas bipolares sem conexão vascular com o tecido matriz, com o padrão de desenvolvimento similar ao observado em embriões zigóticos (Dodeman et al., 1997). Essa rota morfogenética é influenciada por vários fatores impostos pelas condições *in vitro* (Guerra et al., 1999). Dentre esses fatores, a fonte de explante e o estágio de desenvolvimento destes tecidos são considerados os elementos chaves para a alteração da competência celular (Merkle et al., 1995). Da mesma forma, o tamanho destes explantes apresenta influência na capacidade morfogênica (Benkirane et al., 2000; Delporte et al., 2001), possivelmente devido ao estabelecimento dos domínios simplástos<sup>3</sup> nesses tecidos (Bouget et al., 1998; Haywood et al., 2002), mantendo o crescimento coordenado das células e tecidos (Wu et al., 2002; Roberts & Oparka, 2003).

O emprego de explantes obtidos a partir de uma fina camada de células apresenta-se como uma alternativa por romper esses domínios de comunicação intercelular. Visando romper esses domínios, foi desenvolvida uma técnica denominada de TCL (*Thin Cell Layer*), que consiste na utilização de explantes de tamanho reduzido (Tran Thanh Van & Lê, 2000). O emprego desta técnica foi reportado pela primeira vez em *Nicotiana tabacum* (Tran Thanh Van et al., 1974) e posteriormente foi aplicada com sucesso para várias espécies vegetais (Tran Thanh Van & Lê, 2000), incluindo *Digitaria sanguinalis* (Van Le et al., 1997), *Oryza sativa* (Nhut et al., 2000), *E. guineensis* (Teixeira et al., 1994) e *C. nucifera* (Samosir et al., 1998).

---

<sup>3</sup> Domínio simplasto, segundo Roberts & Oparka (2003) pode ser definido como uma comunicação contínua entre as células de um determinado grupo funcional, permitindo o movimento de moléculas através dos plasmodesmata, coordenando a mitose, a morfogênese e o desenvolvimento das plantas. Ex.: Células da epiderme de um determinado órgão da planta.

Com o objetivo de definir um procedimento eficiente para a embriogênese somática e regeneração de plântulas a partir de bainhas foliares de pupunha foi avaliada a técnica de TCL (*Thin Cell Layer*) associada a diferentes concentrações de picloram.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Material Vegetal**

Para a realização deste experimento, plântulas foram obtidas a partir da germinação *in vitro* de embriões zigóticos de pupunha provenientes de sementes de plantas mantidas no banco de germoplasma do INPA – Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia – e submetidas aos mesmos tratamentos de desinfestação descritos anteriormente (Capítulo II). Embriões zigóticos obtidos em condições assépticas foram inoculados em meio de cultura constituído pelos sais de MS suplementado com 1,5 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado, definido a partir dos resultados obtidos nos testes anteriores (Capítulo II). As culturas foram mantidas em sala de crescimento à temperatura de 26±1°C e fotoperíodo de 16h com intensidade luminosa de 50-60 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, até as plântulas atingirem 5 a 8 cm de altura, sendo então selecionadas para o presente estudo.

As plântulas obtidas tiveram suas folhas, raízes e haustório removidos para obter os explantes compostos por tecidos subapicais, meristema apical, primórdios e bainhas foliares. Adicionalmente, bainhas foliares externas e clorofiladas foram removidas. Para a obtenção de explantes propriamente dito, foram realizadas secções transversais com 0,7 a 1 mm de espessura obtendo diferentes camadas histogênicas de forma que algumas camadas fossem compostas apenas por tecidos subapical, por bainhas foliares e meristema apical, e diferentes estágios de desenvolvimento foliar. Foram inoculadas 13 secções transversais provenientes de uma plântula, em cada placa de Petri. O lado proximal de cada secção foi mantido em contato com o meio de cultura, mantendo a orientação original da secção em relação à plântula.

Adicionalmente, a posição original dos explantes foi mantida para avaliar a influência desta variável nas respostas morfogênicas. Dessa forma, os explantes obtidos a partir da região do meristema apical foram denominados de 0, e as camadas acima no sentido distal foram denominadas seqüencialmente entre 1 e 8. As camadas obtidas abaixo da região do meristema apical, compostas basicamente por tecidos subapicais, foram denominadas seqüencialmente de -1 a -4 (Figura 1).

**FIGURA 1.** Modelo esquemático para a obtenção de explantes a partir de plântulas de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth) cultivadas *in vitro* (barra = 1,75 cm). Explantes obtidos acima da região do meristema apical, no sentido distal, foram numerados entre 1 a 8, enquanto os explantes obtidos abaixo da região do meristema apical também no sentido distal, foram denominados de -1 a -4. A região do meristema foi considerada como 0 (barra = 3 mm).



## **4.2 Meios de cultura e condições de cultivo**

Após a obtenção dos explantes, estes foram imediatamente inoculados em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com vitaminas de Morel e Wetmore (1951), 500 mg.L<sup>-1</sup> de Glutamina, 1,5 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado e 2,5 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel<sup>®</sup>. O picloram em diferentes concentrações (0, 150, 300 ou 600 µM) foi suplementado ao meio de cultura para avaliar o efeito deste na indução de embriogênese somática. Não foram realizados subcultivos até a obtenção de calos com características embriogênicas.

Para a maturação e conversão dos embriões somáticos, estes foram submetidos aos mesmos tratamentos descritos para a maturação e conversão de embriões somáticos obtidos a partir da inflorescência como fonte de explantes (Capítulo IV.II).

Em todos os meios de cultura o pH foi ajustado para 5,8 antes da adição do agente gelificante e autoclavados à 121°C e 1kgf.cm<sup>-2</sup> durante 15min e posteriormente transferidos para placas de Petri, com aproximadamente 30 mL de meio de cultura por placa. Para a indução e formação dos embriões somáticos, todas as culturas foram incubadas no escuro em sala de crescimento a 26±1°C.

Para a conversão e o crescimento das plântulas, essas culturas foram mantidas em sala de crescimento à 26±1°C sob fotoperíodo de 16h com intensidade luminosa de 50-60 µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> provida por lâmpadas fluorescentes branca fria.

## **4.3 Aspectos histológicos**

Para elucidar os aspectos morfológicos relacionados com o processo de embriogênese somática a partir de bainhas foliares, análise histológicas foram conduzidas. Para tanto, dois procedimentos foram utilizados. O primeiro constituiu-se de secções de tecidos fresco, para avaliar os aspectos morfológicos anteriores ao processo de cultura *in vitro*. O segundo procedimento foi realizado a partir de amostras coletadas ao longo do tempo em condições de indução até a embriogênese somática. As amostras foram fixadas em paraformaldeído 2% durante 48h, desidratadas em serie alcoólica (30 a 100°GL) e embebidas em historesina (Leica<sup>®</sup>). Secções de 5-7 µM de espessura foram obtidas em micrótomo rotatório manual (Slee Technik), distendidas sobre uma gota de água em lâmina de vidro e secas rapidamente por calor em bico de Bunsen. Após o preparo e secção das amostras, foram submetidas à coloração com azul de Toluidina a 0,5% (pH 1,0) durante 30 a 60 seg, seguida de lavagem em água corrente até remoção do excesso.

#### 4.4 Delineamento estatístico

O presente estudo avaliou diferentes concentrações de picloram (0, 150, 300 ou 600  $\mu\text{M}$ ) e o efeito da posição inicial do explante nas diferentes camadas histogênicas na formação de calos e na aquisição de competência embriogênica. Dessa forma, o experimento foi delineado em esquema fatorial 4x13 (concentração de picloram X camada histogênica) e conduzido em blocos casualizados com cinco blocos. Cada bloco foi constituído de quatro placas de Petri. Cada placa continha todas as camadas histogênicas provenientes de uma única plântula.

Após três e cinco meses foram avaliadas, respectivamente, a percentagem de formação de calos e a percentagem de calos com estruturas embriogênicas. Os dados transformados em  $\sqrt{(x+5)}$  foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, quando necessário, ao teste de separação de médias de Duncan a 95% de significância.

Após oito semanas em meio de cultura isento de fitorreguladores, foi avaliada a percentagem de conversão dos embriões somáticos em plântulas. Os dados de conversão dos embriões foram apresentados em média  $\pm$  erro padrão.

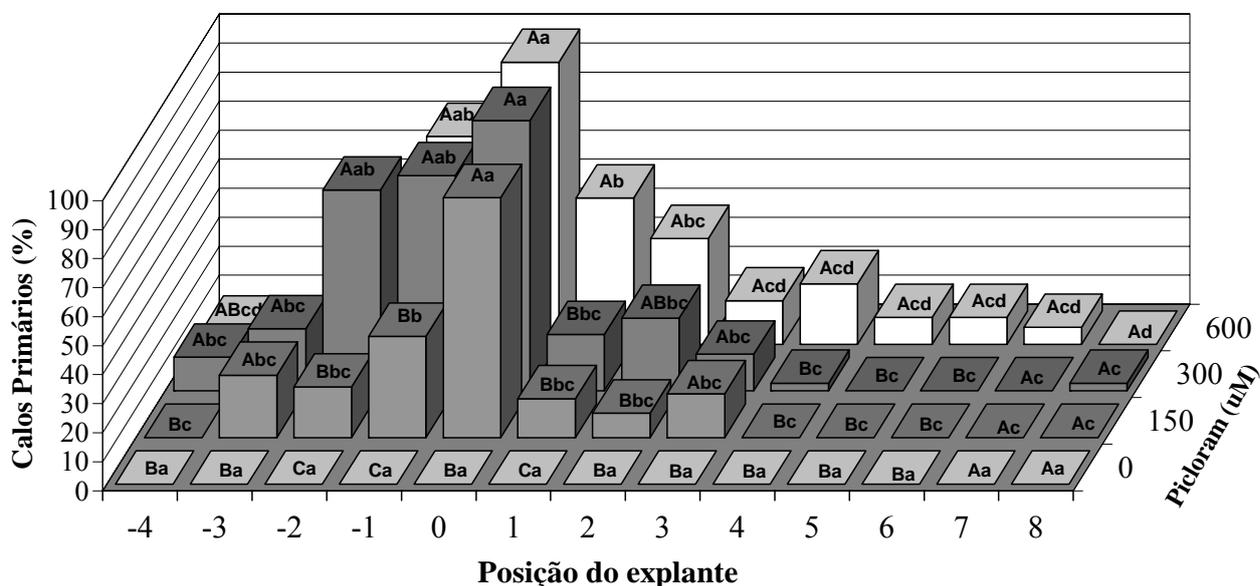
### 5 RESULTADOS

Ensaio preliminares foram conduzidos para avaliar as respostas morfogenéticas de segmentos (aprox. 1 cm) de bainhas foliares de pupunha inoculadas *in vitro*. Nestes ensaios, foi possível observar que explantes mantidos em meio de cultura sem carvão ativado apresentavam intensa oxidação (Figura 4A). Por outro lado, quando esses explantes foram cultivados em meio de cultura suplementado com carvão ativado e 450 $\mu\text{M}$  de 2,4-D nenhuma resposta morfogenética foi observada (Figura 4B). A partir destes resultados foi desenvolvido o presente estudo aplicando a metodologia de tTCL – *transversal Thin Cell Layer* – a partir de plântulas de pupunha germinadas *in vitro*, obtendo em média 13 explantes por plântula (Figura 4C).

A formação de calos primários (Figura 4D-E) foi significativamente maior naqueles explantes provenientes da região do meristema cultivados em meios de cultura suplementado com picloram (Figura 2). Em meio de cultura ausente de picloram, alguns explantes apresentavam o desenvolvimento do meristema e emissão de raízes a partir de tecidos subapicais, contudo, nenhuma calogênese foi observada e a maioria dos explantes apresentava intensa oxidação após quatro semanas de cultivo.

Os explantes da camada 0, correspondendo a região do meristema apical, apresentaram maior percentagem de indução calogênica, variando de 82,6% a 97,2% em resposta ao meio de

cultura suplementado com 150  $\mu\text{M}$  e 600  $\mu\text{M}$  de picloram respectivamente, diferindo apenas da ausência desta substância no meio de cultura (Figura 2). Para explantes provenientes das camadas histogênicas distal acima (1 a 8) a indução de calos primários foi significativamente maior em meio de cultura suplementado com 600  $\mu\text{M}$  de picloram. Esses explantes não apresentaram ou então apresentaram baixas respostas morfogênicas em meio de cultura suplementado com 150 $\mu\text{M}$  ou 300 $\mu\text{M}$  de picloram. Por outro lado, explantes denominado -1, provenientes dos tecidos subapicais apresentaram intensa formação de calos primários em meio de cultura suplementado com 300 $\mu\text{M}$  e 600 $\mu\text{M}$  de picloram, com 74,2% e 71,6% respectivamente, sem diferir estatisticamente entre si, porém diferindo da presença de 150 $\mu\text{M}$  de picloram que apresentou 34,8% de calos primários (Figura 2).



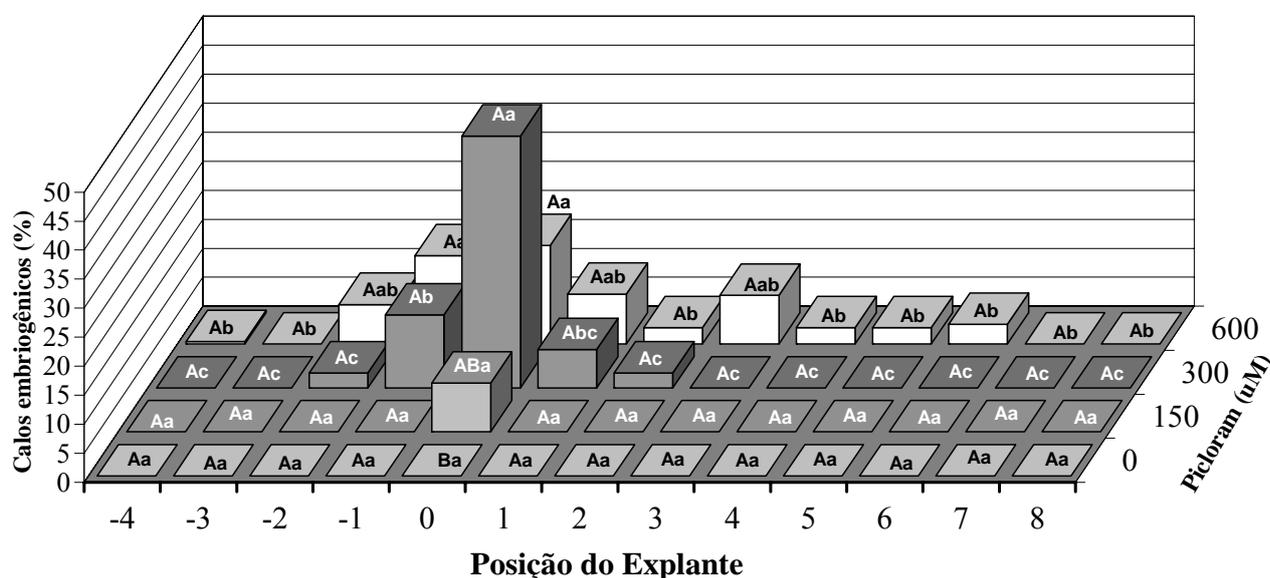
**FIGURA 2.** Efeito de diferentes posições do explante (-4 a 8) e de diferentes concentrações de picloram para a percentagem de indução de calos primários após três meses de cultivo em explantes obtidos a partir de plântulas de pupunha (*B. gasipaes* Kunth) cultivadas *in vitro*. Médias seguidas por letras diferentes, minúsculas dentro de dose e maiúscula dentro da camada, denotam diferença estatística pelo teste de Duncan a 95% de significância. Dados transformados para  $\sqrt{(x+5)}$ . Coeficiente de variação = 33,2%

A avaliação de calos primários com competência embriogênica foi realizada cinco meses após a inoculação. Foram considerados calos embriogênicos aqueles que apresentaram o desenvolvimento de estruturas embriogênicas (Figura 4G-L). Foi possível observar que o desenvolvimento de calos embriogênicos seguiu o mesmo padrão de resposta para a formação de calos primários (Figuras 2 e 3).

Em meio de cultura suplementado com 300 $\mu\text{M}$  de picloram explantes provenientes da região do meristema apical apresentaram 43,0% de calos embriogênicos (Figura 3), diminuindo

para 17,0% de calos embriogênicos na presença de 600µM de picloram. O desenvolvimento de calos com características embriogênicas foi observado nas camadas histogênicas entre 1 e 7 em meio de cultura contendo 600µM de picloram (Figura 3)

Após a obtenção dos calos embriogênicos, estes foram transferidos para meio de cultura de maturação dos embriões somáticos durante oito semanas (Figura 4L). Após esse período os embriões somáticos maduros foram selecionados e transferidos para meio de cultura de conversão durante quatro semanas, seguido de meio de cultura isento de reguladores de crescimento. Após oito semanas nesta condição, os embriões somáticos apresentaram 45,0±3,4% de conversão em plântulas (Figura 4M). As plântulas foram transferidas para frascos de cultura contendo o mesmo meio de cultura e obtendo-se plântulas completas (Figura 4N).



**FIGURA 3.** Efeito de diferentes posições do explante (-4 a 8) e de diferentes concentrações de picloram para a percentagem de indução de calos embriogênicos após cinco meses de cultivo em explantes obtidos a partir de plântulas de pupunha (*B. gasipaes* Kunth) cultivadas *in vitro*. Médias seguidas por letras diferentes, minúsculas dentro de dose e maiúscula dentro da camada, denotam diferença estatística pelo teste de Duncan a 95% de significância. Dados transformados para  $\sqrt{(x+5)}$ . Coeficiente de variação = 28,7%

### 5.1 Aspectos Morfo-histológicos

Explantes (Figura 4C) obtidos a partir de secções transversais de plântulas de pupunha mantidas *in vitro* foram utilizados para indução de embriogênese somática. Após uma semana de cultivo, foi possível observar um intumescimento dos explantes (Figura 4D). Para aqueles explantes obtidos a partir de bainhas foliares observou-se que as bainhas externas apresentavam baixa resposta morfogênética enquanto que as bainhas e primórdios foliares internos

apresentavam desenvolvimento de calos primários (Figura 4E). Para explantes obtidos da região do meristema apical, após o intumescimento foi possível notar que a proliferação dos calos primários ocorria a partir dos tecidos adjacentes ao meristema apical, e não do meristema apical propriamente dito (Figura 4F). Os calos primários se apresentaram com aspecto compacto e coloração amarela escura (Figura 4E-F).

No presente estudo, foram considerados calos embriogênicos aqueles calos primários que apresentavam a formação de estruturas embriogênicas. Para calos primários obtidos a partir de tecidos subapicais (-1 e -2) as estruturas embriogênicas formadas apresentavam-se com aspecto nodular, coloração amarela clara a branca (Figura 4G) e ao longo do cultivo progrediam formando várias estruturas embriogênicas (Figura 4H). Para explantes obtidos a partir da posição 0, o meristema apical apresentava o padrão de desenvolvimento normal, contudo, estruturas embriogênicas foram obtidas a partir dos calos formados nos tecidos adjacentes ao meristema apical (Figura 4I). Para explantes obtidos a partir de bainhas foliares (1-8) a formação de estruturas embriogênicas com aspecto nodular foi observada em calos primários, mas nestes calos primários a formação de embriões somáticos com estrutura delimitada foi observada em maior frequência (Figura 4J).

Os calos embriogênicos foram transferidos para meio de cultura de maturação e nestas condições foi observada a progressão do desenvolvimento dos embriões somáticos (Figura 4L) que puderam ser isolados e convertidos (Figura 4M), obtendo-se plântulas completas aptas à aclimatização (Figura 4N).

Análises histológicas revelaram que a pupunha apresenta a anatomia simples de monocotiledôneas, com mesófilo foliar composto por células parenquimáticas, isodiamétricas e presença de feixes vasculares distribuídos em toda a estrutura intercalada com feixes de fibras (Figura 5A). As bainhas foliares apresentaram a epiderme delimitada, e o feixe vascular com disposição colateral, com o xilema voltado para o lado adaxial e com o floema para o lado abaxial e presença de feixes de fibras isolados (Figura 5B).

Os primeiros eventos de divisão celular a partir de explantes de bainha foliar foram observados a partir de células adjacentes ao feixe vascular, ocorrendo simultaneamente em várias regiões do feixe (Figura 5C). Após trinta dias de cultivo foi possível observar o desenvolvimento de calos primários que apresentavam crescimento radial, rompendo a epiderme dos explantes (Figura 5D). Estes calos primários apresentaram a formação de uma zona meristemática (Figura 5E) similar àquela observada para calos obtidos a partir de embriões zigóticos (Capítulo IV.I).

Após um período de cinco meses de cultivo, foi observado o desenvolvimento de

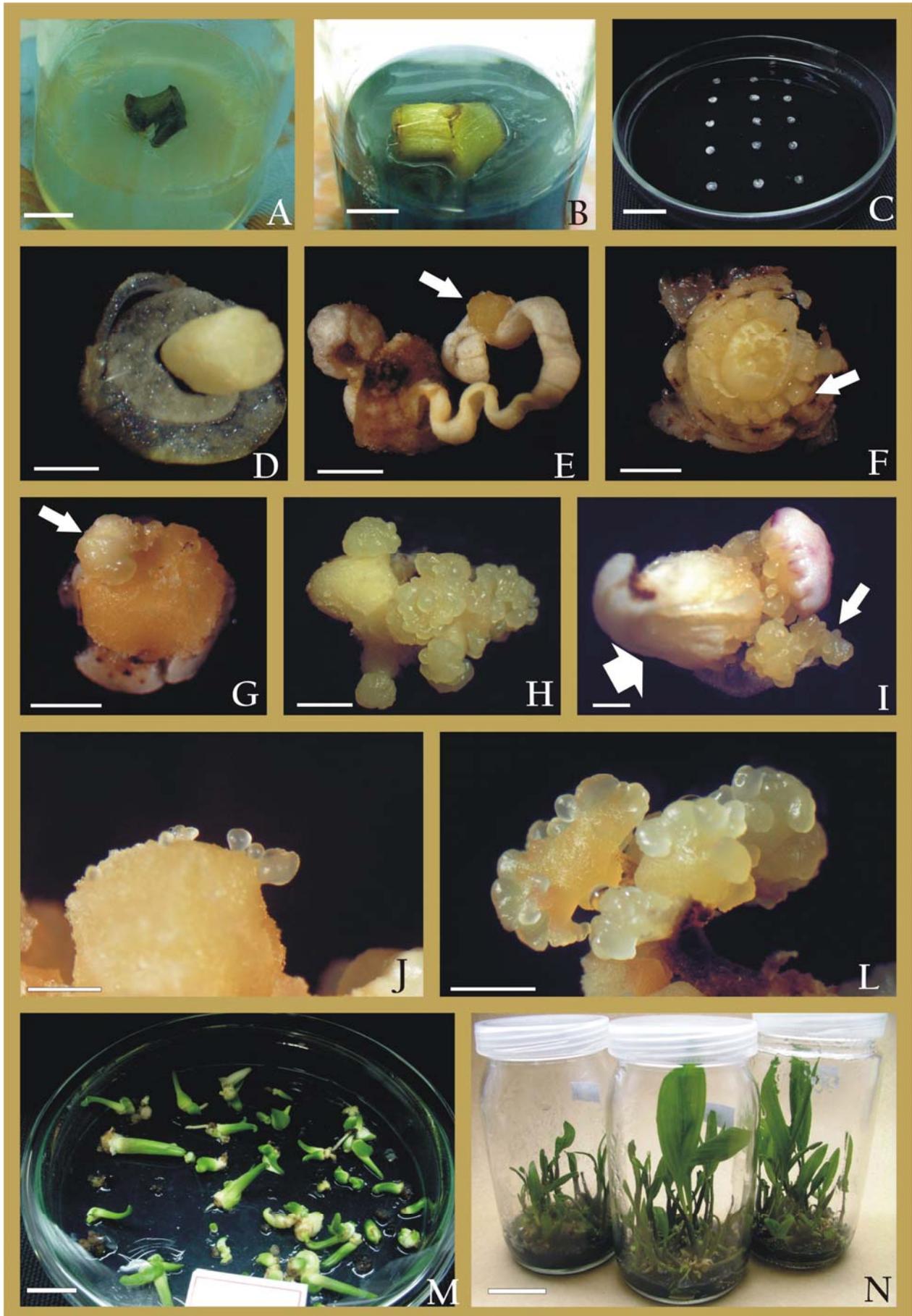
embriões somáticos a partir dos calos primários. Estes embriões somáticos apresentavam protoderme bem definida e indícios de polarização (Figura 5F), originado das células meristemáticas que formam a zona meristemática dos calos primários. Após a transferência destes calos embriogênicos para meio de cultura de maturação, algumas células da periferia do calo primário expressavam a sua capacidade embriogênica, formando embriões somáticos caracterizados pela formação de protoderme e procambio (Figura 5G), entretanto essa resposta ocorreu em baixa frequência. Por outro lado, os embriões somáticos já formados apresentaram desenvolvimento e a polarização completa destes evidenciado pela presença do procambio (Figura 5H).

## 6 DISCUSSÃO

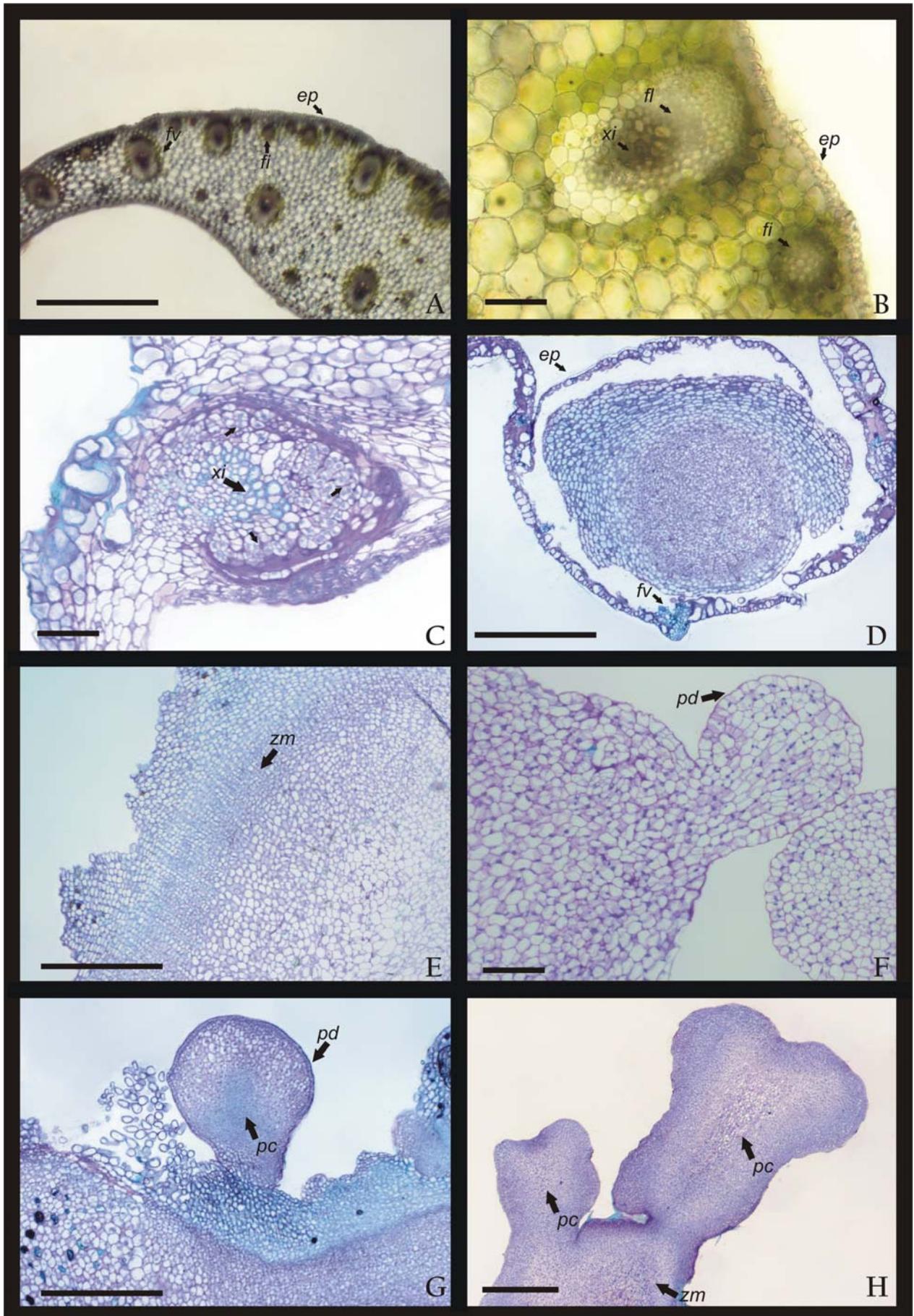
O presente trabalho descreve a utilização da metodologia de TCL (*Thin Cell Layer*) para a indução de embriogênese somática e regeneração de plântulas de pupunha. Com base em ensaios preliminares, evidenciou-se que o tamanho do explante apresenta um papel importante para a reentrada do ciclo mitótico das células e para a formação de calos embriogênicos. Da mesma forma, explantes de tamanho reduzido apresentaram maior capacidade de respostas morfogenéticas em *Triticum durum* (Benkirane et al., 2000) e de *T. sativum* (Delporte et al., 2001).

Benkirane et al. (2000) propuseram que explantes maiores mantêm as interações normais dos tecidos em comparação a explantes menores e tal interação tende a inibir a divisão celular. Tran Thanh Van & Lê (2000) também citam que explantes de tamanho reduzido podem apresentar a síntese de novos constituintes de parede celular e liberar oligossacarídeos devido ao seccionamento, e estes constituintes podem atuar como sinais para a reentrada no ciclo mitótico. Adicionalmente, explantes com tamanho reduzido podem apresentar maior superfície específica em contato com o meio de cultura, da mesma forma que o seccionamento em si pode ser considerado uma fonte de estresse, aumentando o metabolismo das células vegetais (Fehér et al., 2003).

**FIGURA 4.** Embriogênese somática em explantes obtidos a partir de plântulas de pupunha (*B. gasipaes*) mantidas *in vitro*. A – Ensaio inicial na ausência de carvão ativado. B – Ensaio inicial na presença de carvão ativado. C – Aspecto geral dos explantes obtidos. D – Desenvolvimento dos explantes no após três semanas de cultivo. E – Formação de calo primário a partir de secção transversal de bainha foliar. F – Aspecto da calogênese (seta) em explante proveniente da região do meristema apical. G – Aspecto do calo primário obtido a partir de explantes da região subapical, apresentando início da formação de estruturas embriogênicas (seta). H – Calos embriogênicos obtidos a partir de tecidos subapicais. I – Calo embriogênico obtido a partir de tecidos da região do meristema apical. Notar o desenvolvimento do meristema (Seta larga) e dos calos embriogênicos nos tecidos adjacentes (Seta estreita). J – Aspecto do calo primário evidenciando o desenvolvimento de embriões somáticos. L – Calos embriogênicos em meio de maturação evidenciando o desenvolvimento dos embriões somáticos. M – Plântulas regeneradas a partir da conversão dos embriões somáticos. N – Plântulas completas aptas à aclimatização. Figura A-C; M barra=1cm; Figuras D-I, L barra=2,5mm; Figura J barra=1mm; Figura N barra=2,5cm.



**FIGURA 5.** Análises histológicas da embriogênese somática em explantes obtidos a partir de plântulas de pupunha (*B. gasipaes*) mantidas *in vitro*. A – Secção transversal da bainha foliar de pupunha. Notar a presença de feixes vasculares e de fibras. B – Detalhe de uma secção transversal de uma bainha foliar. C – Primeiros eventos de divisão celular (setas pequenas) observado a partir de células adjacentes ao feixe vascular. D – Formação do calo primário, rompendo a epiderme da folha. Notar a presença do feixe vascular. E – Detalhe de uma secção transversal de um calo primário evidenciando a presença de uma zona meristemática. F – Secção longitudinal de um embrião somático evidenciando a protoderme e sinais de polarização. G – Secção longitudinal de um embrião somático originado no meio de cultura de maturação, com presença de protoderme definida e procambio. H – Embriões somáticos maduros obtidos, evidenciando a presença de procambio e sem conexão vascular com o tecido matriz. Figura A, D, E, G, H barra=500µm; Figuras B, C, F barra=200µm. *ep* - epiderme; *fv* - feixe vascular; *fi* - feixe de fibras; *xi* - xilema; *flo* - floema; *zm* - zona meristemática; *pd* - protoderme; *pc* - procambio.



A utilização de picloram como análogo de auxina tem sido descrita com sucesso para a indução de embriogênese somática em várias espécies (Barro et al., 1999; Groll et al., 2001; Kaur & Kothari, 2004). Em pupunha essa substância já foi descrita por apresentar melhores resultados para a indução de embriogênese somática em meristemas apicais (Valverde et al., 1987) e nos ensaios realizados com outras fontes de explantes (Capítulo IV – I e II), sendo confirmado no presente estudo como uma fonte de auxina capaz de desencadear respostas morfogenéticas para a divisão celular e para a embriogênese somática em vários explantes.

Para a formação de calos primários, o presente estudo evidenciou que a posição do explante e a concentração de picloram tiveram papel fundamental na capacidade de respostas morfogenética, visto que em meio de cultura suplementado com 150  $\mu\text{M}$  e 300  $\mu\text{M}$  de picloram a maior formação de calos primários foi observada entre os explantes denominados -2 a 3, enquanto em meio de cultura suplementado com 600  $\mu\text{M}$  dessa substância a formação de calos primários foi observada em frequência estatisticamente superior entre os explantes provenientes das posições 1 a 6. Adicionalmente ao gradiente vertical evidenciado, foi possível observar nesses explantes a existência de um gradiente horizontal de repostas, pois as respostas morfogenéticas ocorriam a partir de tecidos (bainhas foliares ou primórdios foliares) mais internos ao explante (Figura 4D; E).

A posição do explante apresentou papel fundamental na aquisição de competência embriogênica em *Coffea arabica* (Quiroz-Figueroa et al., 2002), *Dactylis glomerata* (Somleva et al., 2000; Alexandrova & Conger, 2002) e *Avena sativa* (Nuutila et al., 2002). Isto sugere que os aspectos fisiológico e morfológico dos explantes, como também os componentes do meio de cultura, determinam as respostas morfológicas sustentado em três pontos básicos da biologia celular: a quantidade de regulador de crescimento, o número e afinidade dos receptores para este regulador de crescimento, e a concentração endógena de outras substâncias reguladoras do crescimento (Guerra et al., 1999; Trewavas, 2000).

O meristema apical de plantas apresenta propriedades homeostáticas (Kerbauy, 1999), e em pupunha este órgão parece apresentar uma intensa estabilidade para o seu crescimento, sendo observado que este se mantém dormente durante os primeiros dias de cultura para a indução de embriogênese somática a partir de embriões zigóticos (Capítulo IV.I) e os meristemas florais apresentam a sua rota de desenvolvimento determinada para a formação de órgãos florais (Capítulo IV.II). No presente estudo, foi possível observar que explantes oriundos da região meristemática apresentavam rápido desenvolvimento de calos primários, contudo a partir de tecidos adjacentes ao meristema apical e não dessa estrutura propriamente dita (Figura 4F).

No presente trabalho, a formação de calos embriogênicos a partir de calos formados em explantes provenientes da região do meristema foi maior em meio de cultura suplementado com 300 $\mu$ M de picloram, apresentando efeito negativo em concentrações superiores (600 $\mu$ M) dessa substância, da mesma forma que observado em estudos anteriores (Capítulo IV.II). Por outro lado, foi interessante notar que a formação de calos embriogênicos seguiu o mesmo padrão de desenvolvimento dos calos primários, sugerindo que a capacidade morfogênica destes explantes foi governada pela capacidade de reentrada no ciclo mitótico das células. Neste sentido, resultados em *C. nucifera* sugeriram que a recalcitrância *in vitro* observada foi ligada ao bloqueio observado no ciclo mitótico, culminando na oxidação dos tecidos (Sandoval et al., 2003), fato que pode ser considerado como um dos fatores limitantes para a multiplicação *in vitro* de palmeiras.

Análises histológicas revelaram que os primeiros eventos de divisão celular ocorreram naquelas células adjacentes aos feixes vasculares do explante, formando calos primários que apresentavam crescimento anelar com a presença de uma zona meristemática composta por um pequeno grupo de células. Em palmeiras, células adjacentes aos feixes vasculares apresentam alta capacidade para a proliferação celular. Trabalhos com *C. nucifera* (Fernando et al., 2003), *Elaeis guineensis* (Teixeira, 1989), *Euterpe edulis* (Guerra & Handro, 1998) ou ainda em embriões zigóticos de *B. gasipaes* (Capítulo IV.I) evidenciaram que os primeiros eventos de divisão celular também ocorreram a partir de células adjacentes aos feixes vasculares, dando origem a calos primários ou nódulos meristemáticos cuja descrição é similar aos calos primários observados no presente estudo. A partir dos calos primários, os embriões somáticos eram formados a partir da zona meristemática, caracterizando assim o modelo indireto e com possível origem multicelular. Estes embriões somáticos apresentavam protoderme delimitada e sinais de polarização, caracterizando os primeiros estágios do desenvolvimento dos embriões somáticos. Em *C. nucifera* o mesmo padrão foi observado, contudo estudos sugerem a ocorrência de uma fragmentação e desorganização da zona meristemática antes da formação dos embriões somáticos que podem apresentar origem uni ou multicelular (Fernando et al., 2003; Verdeil et al., 1994; Dussert et al., 1995). No presente estudo, a descontinuidade da zona meristemática não foi observada, no entanto, estudos mais detalhados devem ser realizados para elucidar melhor a transição de células somáticas presentes nos calos primários para células embriogênicas que potencialmente irão formar os embriões somáticos.

Após a obtenção de calos com competência embriogênica, estes foram transferidos para meio de cultura de maturação. Nestas condições novos embriões somáticos eram formados em

baixa frequência a partir de células da periferia dos calos, entretanto os embriões somáticos formados anteriormente apresentavam desenvolvimento e polarização, com a formação do procambio. Estes embriões somáticos foram convertidos com sucesso possibilitando a obtenção de plântulas aptas à aclimatização.

## 7 CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstrou a regeneração de plântulas de pupunha por embriogênese somática em explantes obtidos a partir de plântulas mantidas *in vitro*, utilizando a metodologia de *Thin Cell Layer (TCL)*. Esta técnica parece ser bastante promissora, dado a facilidade de obtenção de explantes com características similares a partir de plântulas adultas, contudo estudos avaliando o efeito do genótipo devem ser conduzidos. No presente estudo a indução de embriogênese somática seguiu um modelo indireto. Um gradiente de resposta vertical e horizontal foi observado, da mesma forma que explantes mais desenvolvidos necessitaram de maior concentração de picloram para a indução de calos primários e embriogênicos. Análises histológicas evidenciaram que os primeiros eventos de divisão celular ocorreram em células adjacentes aos feixes vasculares e que a regeneração de plântulas ocorreu exclusivamente por embriogênese somática, resultando em plântulas com desenvolvimento de parte aérea e sistema radicular.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDROVA, K.S.; CONGER, B.V. Isolation of two somatic embryogenesis-related genes from orchardgrass (*Dactylis glomerata*). **Plant Science**, v.162, p.301-307, 2002.
- ALMEIDA, M.; KERBAUY, G.B. Micropropagation of *Bactris gasipaes* (Palmae) through flower bud culture. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 8(3), p. 215-217, 1996.
- ARIAS, O.; HUETE, F. Propagación vegetativa *in vitro* de pejibaye (*Bactris gasipaes* H.B.K.). **Turrialba**, v.33(2), p.103-108, 1983.
- BARRO, F.; MARTIN, A.; LAZZERI, P.A.; BARCELÓ, P. Medium optimization for efficient somatic embryogenesis and plant regeneration from immature inflorescence and immature scutella of elite cultivar of wheat, barley and tritordeum. **Euphytica**, v.108, p.161-167, 1999.
- BENKIRANE, H.; SABOUNJI, K.; CHLYAH, A.; CHLYAH, H. Somatic embryogenesis and plant regeneration from fragments of immature inflorescence and coleoptiles of durum wheat. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.61, p.107-113, 2000.
- BOUGET, F.Y.; BERGER, F.; BROWNIEE, C. Position dependent control of cell fate in the *Fucus* embryo: role of intercellular communication. **Development**, v125, p.1999-2008, 1998.

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(7), p.293-299, 1991.

DELPORTE, F.; MOSTADE, O.; JACQUEMIN, J.M. Plant regeneration through callus initiation from thin mature embryo fragments of wheat. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.67, p.73-80, 2001.

DODEMAN, V.L.; DUCREUX, G.; KREIS, M. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. **Journal of Experimental Botany**, v.48(313), p.1493-1509, 1997.

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

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T.P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.74, p.201-228, 2003.

FERNANDO, S.C.; VERDEIL, J.L.; HOCHER, V.; WEERAKOON, L.K.; HIRIMBUREGAMA, K. Histological analysis of plant regeneration from plumule explants of *Cocos nucifera*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.72, p.281-284, 2003.

GROLL, J.; MYCOCK, D.J.; GRAY, V.M.; LAMINSKI, S. Secondary somatic embryogenesis of cassava on picloram supplemented media. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.65, p.201-210, 2001.

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

GUERRA, M.P.; HANDRO, W. Somatic embryogenesis and plant regeneration in different organs of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae): Control and structural features. **Journal of Plant Research**, v. 111, p.65-71, 1998.

HAYWOOD, V.; KRAGLER, F. LUCAS, W.J. Plasmodesmata: Pathways for protein and ribonucleoprotein signaling. **The Plant Cell**, Supplement, p.303-325, 2002.

HUETE, V.F.; ARIAS, M.O. Propagación vegetativa del pejibaye. **ASBANA**, v.5(14), p.10-13, 1981.

KAUR, P.; KOTHARI, S.L. *In vitro* culture of kodo millet: Influence of 2,4-D and picloram in combination with kinetic on callus initiation and regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.77, p.73-79, 2004.

KERBAUY, G.B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S.; Buso, J.A. (eds) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. v.2. Brasília: SPI/Embrapa, 1999, p.519-531.

MERKLE, S.A.; PARROTT, W.A.; FLINN, B.S. Morphogenetic aspects of somatic embryogenesis. In: Thorpe, T.A. (ed.) **In vitro embryogenesis in plants**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1995, p.155-203.

MORA-URPÍ, J.; WEBER, J. C; CLEMENT, C. R. **Peach Palm (*Bactris gasipaes* Kunth) – Promoting the conservation and use of undrutilized and neglected crops 20**. Rome: Institute

of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatrsleben/ International Plant Genetic Resources Institute, 1997, 81p.

MOREL, G.; WETMORE, R.H. Tissue culture of monocotyledons. **American Journal of Botany**, v.38, p.138-140, 1951.

MURASHIGE, T; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiology Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

NHUT, T.D.; LE, B.V.; VAN, K.T.T. Somatic embryogenesis and direct shoot regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) using thin cell layer culture of apical meristematic tissue. **Journal of Plant Physiology**, v.157, p.559-565, 2000.

NUUTILA, A.M.; VILLIGER, C.; OKSMAN-CALDENTY, K.M. Embryogenesis and regeneration of green plantlets from oat (*Avena sativa* L.) leaf-base segments: influence of nitrogen balance, sugar and auxin. **Plant Cell Reports**, v.20, p.1156-1161, 2002.

PINEDO, P.M.H. **Organogenesis directa em ápices caulinares de pejibaye (*Bactris gasipaes* H.B.K.)**. 1987, 110p, Magister Tesis, Turrialba: Costa Rica.

QUIROZ-FIGUEROA, F.R.; FUENTES-CERDA, C.F.J.; ROJAS-HERRERA, R.; LOYOLA-VARGAS, V.M. Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. **Plant Cell Reports**, v.20, p.1141-1149, 2002.

ROBERTS, A.G.; OPARKA, K.J. Plasmodesmata and the control of symplastic transport. **Plant, Cell and Environment**, v.26, p.103-124, 2003.

SAMOSIR, Y.M.S.; GODWIN, I.D.; ADKINS, S.W. An improved protocol for somatic embryogenesis in coconut (*Cocos nucifera* L.). **Acta Horticulturae**, v.461, p.467-474, 1998.

SANDOVAL, A.; HOCHER, V.; VERDEIL, J.L. Flow cytometric analysis of the cycle in different coconut palm (*Cocos nucifera* L.) tissues cultured *in vitro*. **Plant Cell Reports**, v.22, p.25-31, 2003.

SOMLEVA, M.N.; SCHMIDT, E.D.L.; de VRIES, S.C. Embryogenic cells in *Dactylis glomerata* (Poaceae) explants identified by cell tracking and SERK expression. **Plant Cell Reports**, v.19, p.718-726, 2000.

STEIN, M.; STEPHENS, C. Effect of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid and activated charcoal on somatic embryogenesis of *Bactris gasipaes* H.B.K. **Turrialba**, v.41(2), p.196-201, 1991.

TEIXEIRA, J. B. **Development of *in vitro* techniques of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.)**. 1989, 161p, PhD thesis, New Jersey: State University of New Jersey.

TEIXEIRA, J.B., SÖNDAHL, M.R., KIRBY, E.G. Somatic embryogenesis from immature inflorescence of oil palm. **Plant Cell Reports**, v.13(5), p. 247-250, 1994.

TRAN THAN VAN, K.; LÊ, B.V. Current status of thin cell layer method for the induction of organogenesis or somatic embryogenesis in woody trees. In: JAIN, S.M.; GUPTA, P.K.; NEWTON, R.J. (eds.) **Somatic Embryogenesis in Woody Plants**, v.6. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000, p.51-92.

TRAN THANH VAN, K.; DIEN, N.T.; CHLYAH, A. Regulation of organogenesis in small explants of superficial tissue of *Nicotiana tabacum* L. **Planta**, v.119, p.145-149, 1974.

TREWAVAS, A. Signal perception and transduction. In.: BUCHANAN, B.; JONES, R. (ed.) **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. USA: American Society of Plant Physiologists, 2000, p.930-987.

VALVERDE, R.; ARIAS, O.; THORPE, T.A. Picloram-induced somatic embryogenesis in pejobaye palm (*Bactris gasipaes* H.B.K.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.10(2), p.149-156, 1987.

VAN LE, B.; THAO, D.M.N.; GENDY, C.; VIDAL, J.; TRAN THANH VAN. Somatic embryogenesis on Thin Cell Layers of a C<sub>4</sub> species, *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.49, p.201-208, 1997.

VERDEIL, J.L.; HUET, C.; GROSDÉMANGE, F.; BUFFARD-MOREL, J. Plant regeneration from cultured immature inflorescence of coconut (*Cocos nucifera* L.): evidence for somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**, v.13, p.218-221, 1994.

WU, X.; WEIGEL, D.; WIGGE, P.A. Signaling in plants by intercellular RNA and protein movement. **Genes & Development**, v.16, p.151-158, 2002.

## CONSIDERAÇÕES FINAS E PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente trabalho gerou informações relevantes para o desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas para a conservação e melhoramento genético da pupunha. Para a germinação *in vitro* de embriões zigóticos, foi evidenciado que a utilização de meio de cultura com composição mais complexa e a presença de carvão ativado resultaram em efeitos benéficos para a germinação dos embriões zigóticos e desenvolvimento das plântulas. O desenvolvimento do haustório influenciou o desenvolvimento das plântulas, contudo estudos mais aprofundados são necessários, como por exemplo, a determinação e a quantificação de compostos de reserva nesta estrutura ao longo do período de cultivo.

O protocolo de criopreservação utilizando a técnica de encapsulamento-desidratação proposto no presente estudo é um resultado inédito e pode representar uma nova estratégia para a conservação de germoplasma de pupunha por longo período. A desidratação pareceu exercer maior influência que a criopreservação para as variáveis avaliadas, da mesma forma que devido aos diversos tipos celulares que compõem o embrião zigóticos, apenas células da região do meristema apical sobreviveram. Para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na desidratação e criopreservação dos embriões zigóticos análises histológicas por microscopia de transmissão como também análises bioquímicas associadas às respostas devem ser realizadas, particularmente através da quantificação de substâncias relacionadas ao estresse e a desidratação, como a proteínas específicas e as deidrinhas.

De maneira geral, as palmeiras têm sido consideradas recalcitrantes às condições impostas pela cultura *in vitro*, contudo o presente trabalho evidenciou que através da otimização das condições de cultivo, como balanço entre fitorreguladores, a adição de nitrato de prata e a fonte de explantes podem incrementar as respostas morfogenéticas. Apesar de não ter considerado o efeito do genótipo, vários modelos reportam que esse fator pode governar as respostas morfogenéticas dos explantes. Neste sentido, a partir das condições otimizadas novos trabalhos devem ser conduzidos avaliando o papel do genótipo na embriogênese somática desta espécie, possibilitando inclusive a buscas de marcadores moleculares para essa característica.

A embriogênese somática no presente estudo foi obtida a partir de diferentes fontes de explantes, possibilitando a utilização dessa técnica com diferentes estratégias. A utilização de embriões zigóticos como fonte de explantes apresenta-se como uma alternativa para a conservação de germoplasma visto que este apresenta segregação. Por outro lado, a utilização de inflorescências não-emitidas como fonte de explantes pode ser utilizada para o melhoramento

genético ou propagação massal de plantas selecionadas com elevado ganho genético. Contudo, os embriões zigóticos obtidos a partir de cruzamentos específicos compõem uma excelente fonte de explante para o melhoramento genético. Da mesma forma, a propagação clonal a partir de inflorescências como explante pode ser utilizada para a obtenção de replicatas destinadas à conservação. E por fim, a utilização de bainhas foliares e meristema apical associada à técnica de TCL apresentou respostas superiores para a indução de embriogênese somática, e apesar de no presente estudo estes explantes serem obtidos de embriões zigóticos germinados *in vitro*, a obtenção destes é possível a partir de plantas adultas.

Para a multiplicação massal de pupunha, a utilização de suspensões celulares representa uma boa alternativa e para tanto, a manutenção de calos embriogênicos com aspecto friável e de crescimento rápido faz-se necessária. Este tipo de calo embriogênico foi observado no presente estudo, entretanto os ensaios realizados para a sua manutenção não foram efetivos. Dessa forma, as condições de cultivo específicas para estes calos devem ser avaliadas, possibilitando o estabelecimento de protocolos de embriogênese somática de alta frequência com desenvolvimento sincronizado. Estes protocolos podem então ser aliados à técnica de criopreservação mantendo a competência embriogênica destas células e compor uma ferramenta adicional para o melhoramento e conservação da espécie.

E por fim, a etapa de aclimatização deve ser otimizada visando a retomada de crescimento das plântulas durante esse processo utilizando, por exemplo, a inoculação de fungos micorrízicos e avaliando os aspectos relacionados à fotossíntese das plântulas.