

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E ISOLAMENTO DE
PROTOPLASTOS DE PEQUIZEIRO**

CRISTIANO MARTINOTTO

2007

CRISTIANO MARTINOTTO

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E ISOLAMENTO DE
PROTOPLASTOS DE PEQUIZEIRO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de “Doutor”.

Orientador:
Prof. Renato Paiva, PhD.

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2007

**Ficha Catalográfica preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Martinotto, Cristiano.

Embriogênese somática e isolamento de protoplastos de pequi
/ Cristiano Martinotto. - Lavras: UFLA, 2007.

106 p.: il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2007.

Orientador: Renato Paiva

Bibliografia.

1. Embriogênese somática. 2. Protoplastos. 3. Cultura de tecidos.
4. Cerrado. 5. *Caryocar brasiliense*. I. Universidade Federal de
Lavras. II. Título.

CDD – 583.16604162

CRISTIANO MARTINOTTO

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E ISOLAMENTO DE
PROTOPLASTOS DE PEQUIZEIRO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de “Doutor”.

Aprovada em 30 de novembro de 2007.

Prof. Dr. Amauri Alves de Alvarenga	UFLA
Prof. Dr. Antônio Paulino da Costa Netto	UEMG
Prof. Dr. Breno Régis Santos	UNIPAC
Prof ^ª . Dra. Patrícia Duarte de Oliveira Paiva	UFLA

Prof. Renato Paiva, PhD
DBI/UFLA (Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2007

A Deus.

Aos meus pais, Valentim Martinotto e Maria Ondina dos Santos Martinotto,

DEDICO

"Há pessoas que desejam saber só por saber, e isso é curiosidade; outras, para alcançarem fama, e isso é vaidade; outras, para enriquecerem com a sua ciência, e isso é um negócio torpe; outras, para serem edificadas, e isso é prudência; outras, para edificarem os outros, e isso é caridade."

(São Tomás de Aquino)

Aos meus irmãos: Davi, Fernando, Graziela e familiares.

A minha namorada, Nádia.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela presença constante em minha vida, nunca me desamparando nos momentos difíceis.

Aos meus pais, por todo o amor e esforço para que eu chegasse até aqui, e a meus irmãos, Fernando, Davi e Graziela, por todo o apoio, torcida e carinho.

A minha namorada, Nádia, por toda a compreensão, partilha, apoio e carinho.

Ao Prof. Renato Paiva, PhD, pela amizade, exemplo profissional, incentivo e orientação na condução dos trabalhos.

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade de realização do doutorado e ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

Aos professores Dr. Evaristo Mauro de Castro, Dr. Eduardo Alves e a Helô, pela amizade, preciosa ajuda e sugestões na área de anatomia vegetal e microscopia eletrônica.

Ao Prof. Dr. Wagner Campos Otoni e a UFV, pela amizade e auxílio nos trabalhos com isolamento de protoplastos.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, pela amizade, auxílio e conhecimentos transmitidos.

Aos funcionários do Setor de Fisiologia: Tina, Stephania, Lena, Izonel, Evaristo, Tanhan, Joel, Odorêncio e Barrinha.

A todos os colegas de curso, em especial Breno, Raírys, Sidnei, Jessé, Peterson, Diogo, Luciano, Marcelo Padovani, Fernanda, Daiane, Milene, Cleilton, Vanessa, Carlos Vinícios, Morbeck e João Paulo, pela convivência agradável e apoio nos momentos difíceis.

À amiga Fran, pelo apoio, acolhida e agradável companhia nos momentos de descontração.

Ao Sandrão e à Lenise, por todo o carinho, apoio e votos de sucesso.

Ao 'seu' Tadeu, dona Carminha e família, pela amizade e acolhida.

Aos alunos de iniciação científica e estagiários: Marcelo Rodrigues (mano), Humberto, Gabriela e Eduardo, pela amizade, disposição e valiosa ajuda na montagem dos experimentos, coleta de dados e análises laboratoriais.

Aos amigos do GPP São Benedito, GOU e Comunidade Nossa Senhora. das Mercês, pelo apoio e votos de sucesso durante minha caminhada nos estudos e na fé.

A todos que não foram citados e que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a conclusão de mais esta etapa de minha vida.

BIOGRAFIA

CRISTIANO MARTINOTTO, filho de Valentim Martinotto e Maria Ondina dos Santos Martinotto, nasceu dia 15 de fevereiro de 1977, em Porto Alegre, RS. Ingressou no curso de Agronomia da Universidade Federal de Mato Grosso em 1997, concluindo-o em 2002. Desde o início, como bolsista de iniciação científica (CNPq- PIBIC), participou de atividades de pesquisa com sistemas agroflorestais utilizando espécies de uso múltiplo do Cerrado e propagação destas espécies, sob a orientação do Dr. Ivo Pereira de Camargo (*in memoriam*). Posteriormente, trabalhou no levantamento do uso de pesticidas no estado de Mato Grosso, orientado pela Dra. Oscarlina Lúcia dos Santos Weber e no cultivo *in vitro* de espécies nativas do Cerrado, sob orientação do Dr. Jeferson Luiz Dallabona Dombroski. Ingressou em 2002 no Mestrado em Agronomia - Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras, sob a orientação do Prof. Renato Paiva, PhD, concluindo-o em 2004. Ingressou no mesmo ano no Doutorado em Agronomia - Fisiologia Vegetal na mesma instituição de ensino, sob orientação do mesmo professor, concluindo-o em 2007 com a presente tese.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	i
ABSTRACT.....	ii
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1 INTRODUÇÃO.....	2
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 O Cerrado.....	3
2.2 O pequiheiro.....	4
2.3 Usos da espécie.....	5
2.4 Propagação do pequiheiro.....	7
2.5 Cultura de tecidos.....	8
2.6 Cultivo em meio líquido.....	11
2.7 Embriogênese somática.....	12
2.8 Isolamento de protoplastos.....	14
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	17
CAPÍTULO II - EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E ANÁLISE ULTRA-ESTRUTURAL DE CALOS DE PEQUIZEIRO.....	27
RESUMO.....	28
ABSTRACT.....	29
1 INTRODUÇÃO.....	30
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
2.1 Material vegetal.....	33
2.2 Efeito da interação entre 2,4-D e sacarose na indução de calos embriogênicos em embriões zigóticos imaturos de pequiheiro.....	33

2.3 Efeito da interação entre 2,4-d e sacarose na indução de calos embriogênicos em subcultivo.....	34
2.4 Efeito do ácido abscísico (ABA) na indução de embriões somáticos em pequiizeiro.....	35
2.5 Efeito da interação entre 2,4-D e 2-iP na indução de calos embriogênicos em embriões zigóticos de pequiizeiro	35
2.6 Análise morfológica e ultra-estrutural de calos de pequiizeiro.....	36
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
3.1 Efeito da interação entre 2,4-D e sacarose na indução de calos embriogênicos em embriões zigóticos imaturos de pequiizeiro.....	37
3.2 Efeito da interação entre 2,4-D e sacarose na indução de calos embriogênicos em subcultivo.....	40
3.3 Efeito do ácido abscísico (ABA) na indução de embriões somáticos em pequiizeiro.....	44
3.4 Efeito da interação entre 2,4-D e 2-iP na indução de calos embriogênicos em embriões zigóticos de pequiizeiro	44
3.5 Análise morfológica e ultra-estrutural de calos de pequiizeiro.....	45
4 CONCLUSÕES.....	47
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
CAPÍTULO III - ISOLAMENTO DE PROTOPLASTOS DE TECIDO FOLIAR DE PEQUIZEIRO OBTIDO <i>IN VITRO</i>.....	51
RESUMO.....	52
ABSTRACT.....	53
1 INTRODUÇÃO.....	54
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	55
2.1 Material vegetal.....	55
2.2 Avaliação de combinações enzimáticas e tempo de incubação no isolamento de protoplastos.....	56

2.2.1 Purificação.....	57
2.3 Efeito de diferentes concentrações de manitol no isolamento de protoplastos de tecido foliar <i>in vitro</i>	58
2.4 Efeito do sistema de incubação estacionário ou em rotação orbital na eficiência do isolamento de protoplastos de tecido foliar.....	59
2.5 Avaliação de diferentes concentrações de manitol na viabilidade de protoplastos.....	60
2.6 Avaliação dos diâmetros de protoplastos isolados de tecido foliar.....	61
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
3.1 Avaliação de combinações enzimáticas e tempo de incubação no isolamento de protoplastos.....	61
3.2 Efeito de diferentes concentrações de manitol no isolamento de protoplastos de tecido foliar <i>in vitro</i>	64
3.3 Efeito do sistema de incubação estacionário ou rotação orbital na eficiência do isolamento de protoplastos de tecido foliar.....	66
3.4 Avaliação de diferentes concentrações de manitol na viabilidade de protoplastos.....	67
3.5 Avaliação dos diâmetros de protoplastos isolados de tecido foliar.....	68
4 CONCLUSÕES.....	70
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
CAPÍTULO IV - CULTIVO IN VITRO DE PEQUIZEIRO (<i>Caryocar brasiliense</i> CAMB.).....	73
RESUMO.....	74
ABSTRACT.....	75
1 INTRODUÇÃO.....	76
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	77
2.1 Material vegetal.....	78
2.2 Efeito do meio líquido e sólido no cultivo <i>in vitro</i> de pequizeiro.....	78

2.2.1 Estudo anatômico foliar.....	78
2.3 Efeito da luminosidade no cultivo <i>in vitro</i> de pequiizeiro.....	79
2.4 Efeito da interação BAP e ANA no cultivo <i>in vitro</i> de pequiizeiro	80
2.5 Efeito da interação cinetina e picloran no cultivo <i>in vitro</i> de pequiizeiro.....	80
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	81
3.1 Efeito do meio líquido e sólido no cultivo <i>in vitro</i> de pequiizeiro.....	81
3.1.1 Estudo anatômico foliar.....	83
3.2 Efeito da luminosidade no cultivo <i>in vitro</i> de pequiizeiro.....	84
3.3 Efeito da interação BAP e ANA no cultivo <i>in vitro</i> de pequiizeiro.....	86
3.4 Efeito da interação cinetina e picloran no cultivo <i>in vitro</i> de pequiizeiro.....	92
4 CONCLUSÕES.....	95
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95
ANEXOS.....	98

RESUMO GERAL

MARTINOTTO, Cristiano. **Embriogênese somática e isolamento de protoplastos de pequizeiro**. 2007. 106 p. Tese (Doutorado em Agronomia - Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

O pequizeiro é uma das espécies frutíferas nativas do Cerrado de maior potencial econômico e ecológico e de grande importância social. Nas últimas décadas, grandes extensões de terra no Cerrado têm sido incorporadas ao sistema agrícola. Este fato, aliado à baixa taxa de regeneração natural, tem levado ao declínio de populações naturais da espécie. Em vista disso, estudos de técnicas de propagação para a produção de mudas visando ao plantio racional da espécie e recuperação de áreas degradadas tornam-se necessários. O presente trabalho foi realizado com o objetivo de estudar o cultivo *in vitro* do pequizeiro por calogênese, organogênese, embriogênese somática e isolamento de protoplastos. Foram testadas, para indução de embriões somáticos e calos embriogênicos, combinações de concentrações de 2,4-D x sacarose e 2,4-D x 2-iP. Para o desenvolvimento de embriões foi testado o ABA. Quanto ao isolamento de protoplastos, foram testadas duas soluções enzimáticas, tempo de incubação, concentrações de manitol e sistema de incubação (estacionário e agitação orbital). Para o cultivo *in vitro* foram testadas combinações de concentrações de BAP x ANA e de cinetina x picloran. Foi testado também o cultivo em meio líquido e sólido e na presença e ausência de luz. De acordo com os resultados, obtiveram-se embriões e calos embriogênicos aos 45 dias de cultivo e de calos embriogênicos em subcultivo aos 45 dias com o uso de 60 g L⁻¹ de sacarose em meio MS. Obtiveram-se 18,32 x 10⁵ ± 1,18 protoplastos por grama de massa fresca de tecido foliar obtido *in vitro*, com diâmetro médio de 25,19 ± 4,75 µm. Utilizou-se solução enzimática composta por 1% (p/v) Cellulase “Onozuca R-10” (Yakult Honsha) + 0,2% (p/v) de “Macerozyme R10” (Yakult Honsha) + 0,1% (p/v) de Driselase (Sigma London Chemical Co Ltda) + 5 mM de MES, em meio CPW a 0,6M de manitol em incubação por 10 horas em sistema estacionário, com 96,7% de protoplastos viáveis. No cultivo *in vitro*, obtiveram-se maiores médias para número de folhas (3,74), tamanho médio das três maiores brotações (9,45 mm), massa fresca (1,23 g) e massa seca (0,15 g) utilizando cultivo em meio líquido. Folhas obtidas do cultivo em meio sólido apresentaram maior espessura. Brotações na ausência de luz apresentaram maior comprimento médio. Maior número e tamanho de brotações (13,3 e 22,94mm) foram obtidos com 0/1 e 0/0,5 de ANA/BAP, respectivamente. Maior número e tamanho da maior raiz (28,07 e 29,07 mm), foi obtido com 1/0 mg L⁻¹ de ANA/BAP.

Comitê Orientador: Dr. Renato Paiva - UFLA (Orientador); Dra. Patrícia Duarte de Oliveira Paiva (Co-orientadora); Dr. Breno Regis Santos (Co-orientador).

ABSTRACT

MARTINOTTO, Cristiano. Somatic embryogenesis and protoplast isolation of *Caryocar brasiliense* CAMB. 2007, 106 p. Doctorate thesis in Agronomy, Plant Physiology. Universidade Federal de Lavras-Lavras-MG.

The *Caryocar brasiliense* is one of the native fruit species from Cerrado with higher economical, ecological and social importance. In the last decades, large land extensions in the “Cerrado” has been used for agricultural system. This fact associated with a natural low regeneration rate has caused the reduction in natural populations of the species. Based on these facts, it is important to optimize the propagation technique for seedling production in order to regulate the production of the species and use it to recover degraded areas. The objective of the present work was to study aspects of the *in vitro* cultivation of *Caryocar brasiliense* through calogenesis, organogenesis, somatic embryogenesis and isolation of protoplast. For the induction of somatic embryos and embryogenic calli, combinations of different concentrations of 2,4-D x sucrose and 2,4-D x 2-iP were tested. For embryo development, ABA was tested. For protoplast isolation, two enzymatic solutions, incubation time, manitol concentration and incubation system (stationary and orbital agitation) were tested. For the *in vitro* cultivation, combinations of BAP x ANA and cinetina x picloran were evaluated. It was also tested, the effect of the cultivation in liquid and solid medium in the absence or presence of light. The results demonstrated that embryos and embryogenic callus can be obtained with 45 days of cultivation as well as embryogenic callus in sub cultivation at 45 days in MS medium supplemented with 60 g L⁻¹ sucrose. 18.32 x 10⁵ ± 1.18 protoplasts were obtained per gram of *in vitro* leaf tissue fresh mass with an average diameter of 25.19 ± 4.75 µm. 96% of viable protoplasts were obtained using the enzymatic solution composed by 1% (p/v) Cellulase “Onozuca R-10” (Yakult Honsha) + 0.2% (p/v) “Macerozyme R10” (Yakult Honsha) + 0.1% (p/v) Driselase (Sigma London Chemical Co Ltda) + 5 mM MES in CPW medium and maintained in incubation for 10 hours in stationary system. The *in vitro* cultivation promoted the highest leaf number average (3.74), length average of the three largest shoots (94.5 mm), fresh mass (1.23 g) and dry mass (0.15 g) using cultivation in liquid medium. Leaves obtained in solid medium showed higher thickness. Shoots grown in the absence of light presented higher average length. Higher number and size of shoot (13.3 and 22.94 mm) were obtained with 0/1; 0/0.5 NAA/BAP, respectively. Higher number and higher root size (28.07 and 29.07 mm) were obtained with 1/0 mg L⁻¹ NAA/BAP.

Guidance committee: Renato Paiva, PhD (Adviser); Dra. Patrícia Duarte de Oliveira Paiva (Co-adviser); Dr. Breno Regis Santos (Co-adviser).

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

O Cerrado brasileiro é considerado um dos biomas mais ricos em biodiversidade do planeta, apresentando inúmeras espécies endêmicas (Myers et al., 2000). Apesar de apresentar fauna e flora riquíssimas, esse bioma vem sendo intensivamente degradado, sucumbindo ao avanço de desmatamentos e queimadas, dando lugar à pecuária extensiva, a grandes monoculturas, como a soja e o milho e a culturas para a produção de biocombustíveis, causando o empobrecimento biológico.

A flora do Cerrado apresenta diversas espécies frutíferas com grande potencial econômico, ecológico e social. Tal fato tem despertado o interesse da comunidade científica a respeito das técnicas de domesticação e inclusão destas em cultivos racionais. Dessa forma, a diminuição de pressão de coleta em populações nativas, por meio de alternativas ao extrativismo, concorre para a conservação de sua flora e a preservação de espécies ameaçadas.

Algumas dessas espécies frutíferas apresentam problemas quanto à propagação. Entre elas, destaca-se o pequi, que tem grande potencial como planta frutífera, cujos frutos oleaginosos, ricos em precursores da vitamina A, são muito apreciados pela população local e pela fauna, além de possuir madeira de alta qualidade. Suas sementes apresentam dois mecanismos de dormência, sendo um causado pelo impedimento físico do endocarpo rígido e o outro pela dormência do próprio embrião (Dombroski et al., 1998). Ainda, suas sementes perdem rapidamente a viabilidade.

Assim, tornam-se necessários estudos para a inclusão desta espécie em sistemas produtivos, a fim de implantar cultivos racionais, solucionando problemas de produção que afetam a comercialização do produto e a conservação da espécie.

Técnicas biotecnológicas, como a cultura de tecidos, têm desempenhado

função importante no que diz respeito a estudos de espécies nativas, tanto auxiliando no melhoramento quanto contornando problemas de propagação destas, viabilizando cultivos racionais em curto espaço de tempo.

O presente trabalho teve por objetivo estudar o cultivo *in vitro* do pequi por meio da calogênese, organogênese, embriogênese somática e isolamento de protoplastos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O Cerrado

O Cerrado brasileiro constitui um bioma caracterizado por apresentar grande biodiversidade vegetal, sendo muitas espécies endêmicas, o que o torna uma das savanas mais ricas do mundo. Ocupa cerca de 23 % (2.000.000 km²) do território nacional, ficando atrás apenas da Floresta Amazônica. Sua distribuição abrange os estados de Goiás, Tocantins, Distrito Federal e parte dos estados da Bahia, Ceará, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Piauí, Rondônia e São Paulo. Contudo, pode ser encontrado em pequenas áreas isoladas nos estados do Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia e Paraná (Ribeiro & Walter, 1998).

O Cerrado é considerado um dos 25 “hotspots” (áreas mundiais de concentração de biodiversidade) de espécies vegetais e de vertebrados ameaçados (Myers et al., 2000). Apenas 0,5% da sua área total está protegida por unidades de conservação de uso restrito (Bruck et al., 1995) e 3,6% dela é protegida por alguma categoria de unidade de conservação (Dias, 1990).

Segundo Felfili et al. (2002), cerca de 37% da cobertura vegetal original do Cerrado já foi devastada. Klink et al. (1995) relatam que a degradação do Cerrado pode influenciar no clima da região, uma vez que apresenta, potencialmente, grande assimilação e acúmulo de carbono, tanto em parte aérea

quanto em raízes. Os reservatórios de carbono podem ser substancialmente alterados por causa da grande abrangência geográfica das modificações que se processam neste bioma. Modelos ecológicos de predição de alterações climáticas mostram que a substituição da vegetação nativa por monoculturas de pastagens plantadas pode levar ao declínio da precipitação e ao aumento da frequência de veranicos no Brasil Central (Hoffmann & Jackson 2000).

Para Pozo (1997), o manejo adequado do Cerrado pode gerar mão-de-obra permanente para um grande número de pessoas e fornecer matéria-prima para a indústria, conciliando a preservação da biodiversidade e garantindo a conservação de espécies nativas, bem como a manutenção da qualidade da água. O mesmo autor, em estudos realizados em comunidades do Norte de Minas Gerais, observou que a exploração da vegetação do Cerrado ocorre de forma extrativista.

Dessa forma, estudos de propagação de espécies nativas, como o pequizeiro, são importantes por gerarem tecnologias para a sua conservação e produção.

2.2 O pequizeiro

O pequizeiro (*Caryocar brasiliense* CAMB.) é uma espécie arbórea nativa do Cerrado pertencente à classe Magnoliopsida (Dicotyledonae), ordem Guttiferales, família Caryocaraceae e ao gênero *Caryocar* L. (Ferri, 1969). Popularmente, também é conhecido por piqui, piquiá-bravo, pequi, amêndoa-de-espinho, grão-de-cavalo, pequiá, pequia-pedra pequerim, suari e piquiá (Lorenzi, 2000). O nome pequi se origina da palavra tupi *pyqui*, em que *py* = casca e *qui* = espinho (Almeida & Silva, 1994).

É uma planta xerófila, heliófila, semidecídua, característica do Cerrado. Em sua área de dispersão, ocorre, geralmente, em agrupamentos mais ou menos densos em determinados pontos e faltando em muitos outros. Ocorre tanto em

formações primárias quanto em secundárias e pioneiras (Lorenzi, 2000).

O pequiizeiro ocorre no cerradão distrófico e mesotrófico, cerrado denso, cerrado *strictu sensu* e cerrado ralo, nos estados da Bahia, Ceará, Distrito Federal, Goiás, Maranhão, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Minas Gerais, Piauí, Rio de Janeiro, São Paulo e Tocantins (Almeida & Silva, 1994).

As plantas apresentam porte médio, com 7 metros de altura, podendo chegar aos 10 metros. Seu tronco mede de 30 a 40 cm de diâmetro e sua madeira tem coloração amarelo-parda com alburno bege-escuro (Donadio et al., 2002).

Suas plantas florescem durante os meses de setembro a novembro e a maturação dos frutos inicia-se em meados de novembro, prolongando-se até início de fevereiro (Lorenzi, 2000). Pelo menos cinco espécies de morcego foram catalogadas como polinizadoras potenciais (Gribel & Hay, 1993).

2.3 Usos da espécie

O pequiizeiro destaca-se na flora do Cerrado por ser uma das espécies mais conhecidas e apreciadas por populações do Brasil Central. É utilizado como alimento, sendo o pirênio com a polpa cozido com arroz, feijão, galinha ou batido com leite; também é utilizado no preparo de doces, de licor e para a extração de manteiga. Seu consumo complementa a dieta de populações locais devido à riqueza nutricional de seus frutos (Almeida & Silva, 1994; Almeida et al., 1998; Lorenzi, 2000; Santos et al., 2005). Em adição, seus frutos também garantem fonte alternativa de renda à população regional que, por meio do extrativismo, comercializam seus frutos às margens de rodovias, em feiras e em mercados locais.

A casca do pequiizeiro e as suas folhas são tintoriais, fornecendo tinta amarelo-castanho, bastante empregada pelos tecelões de Minas Gerais. Sua casca também é utilizada em curtume (Brandão et al., 2002; Donadio et al., 2002).

A madeira é de ótima qualidade, tem alta resistência (Almeida & Silva, 1994), é moderadamente pesada, macia e de boa durabilidade natural (Lorenzi, 2000), utilizada como moirões e lenha, considerada própria para xilografia, construção civil e naval, dormentes, fabricação de móveis e fonte de carvão para siderurgia (Ribeiro, 1996).

Pela beleza de sua copa e suas flores alvas, que atraem insetos como abelhas, a planta é considerada ornamental e melífera (Almeida et al., 1998).

O fruto oleaginoso, por apresentar grande quantidade de lipídeos, permitiu que o pequizeiro fosse incluído entre as espécies para estudo de produção de biodiesel, apresentando resultados relevantes em testes laboratoriais. Porém, pelo caráter extrativista de sua produção, sua utilização de imediato não é viável (Bilich & Silva, 2006). Segundo estudos realizados por Ferreira et al. (1988), sua polpa apresenta 61,79 g/100g de teor de óleo e a amêndoa, 42,20 g/100g de polpa.

Segundo Donadio et al. (2002), o óleo de sua amêndoa apresenta quantidades consideráveis de ácido linoléico. Seu óleo é utilizado na medicina popular para sanar problemas oftalmológicos relacionados à deficiência de vitamina A, uma vez que seu fruto apresenta altíssimo teor de carotenóides (Brandão et al., 2002; Ribeiro, 1996). Suas folhas, por serem adstringentes, são utilizadas para a elaboração de chá com propriedades reguladoras do fluxo menstrual e estimulação da secreção da biliar (Brandão et al., 1992). Por ser rico em ácido oléico, um componente natural da emulsão epicutânea e betacaroteno, os quais absorvem os raios ultravioleta nocivos à saúde, pode ser usado em cremes e loções protetoras, evitando produção de radicais livres no organismo por ação da radiação solar (Paula-Junior, 2004).

Os frutos são consumidos por várias espécies da fauna, auxiliando sua disseminação (Lorenzi, 2000) e indicando ser uma espécie adequada para programas de reflorestamento e recuperação de áreas degradadas do Cerrado.

2.4 Propagação do pequi

Diversos estudos têm demonstrado que a propagação sexuada do pequi é complexa e inviável em larga escala devido a características da própria semente, como a dormência, o que provoca uma germinação lenta e irregular (Araújo, 1994; Miranda et al., 1988; Dombroski et al., 1998).

Segundo Miranda et al. (1988), as sementes, quando plantadas em condições ideais de temperatura e umidade, iniciavam sua germinação a partir de um mês, podendo se estender até os 11 meses do plantio. Dombroski et al. (1998), testando níveis de escarificação e efeito de diferentes concentrações de GA₃, verificaram que a germinação pode se estender até os 56 dias após o plantio, indicando um efeito benéfico de reguladores sobre a germinação. Melo (1987) e Miranda et al. (1988), trabalhando com diferentes temperaturas em pré-tratamento, obtiveram resultados semelhantes de germinação de sementes com 36% (4°C, por 24 horas, em pirenos sem espinhos) e 30% (2°C, por 24 horas), respectivamente. Sá et al. (1994) verificaram que a maior germinação de sementes de pequi ocorre aos nove meses após a semeadura.

Oliveira (2002) verificou problemas na conservação da viabilidade de sementes de pequi, as quais, em um período de quatro meses de armazenamento, apresentaram queda na porcentagem de germinação em sementes frescas de 70% para 19%, demonstrando a ocorrência de certo grau de recalcitrância.

Outro problema enfrentado pela propagação sexuada é a elevada susceptibilidade à contaminação fúngica das sementes. Esse aspecto foi verificado por Barradas (1972) e comprovado por Oliveira (2002), que obtiveram sensível aumento na porcentagem de germinação com a utilização de pré-tratamento antifúngico das sementes (3 mL kg⁻¹ de carbendazim+250 mg L⁻¹ de thiram).

Neste contexto, a propagação da espécie por via sexuada apresenta-se

inviável à produção massal de mudas, dificultando o trabalho em viveiros, aumentando o custo de produção das mudas e, principalmente, dificultando o planejamento dos plantios definitivos.

Com relação à propagação assexuada, técnicas de enxertia têm sido utilizadas. Pereira et al. (2001) e Pereira et al. (2002a) obtiveram, por enxertia de garfagem, 60% de índice de pegamento e, em borbulhia de placa sem lenho e com janela aberta, em torno de 90%. Silva & Fonseca (1991) e Silva et al. (2001) relataram resultados superiores a estes por enxertia por garfagem, obtendo mais de 90% de pegamento. Segundo Pereira et al. (2002b), em trabalhos recentes desenvolvidos pela Embrapa atingiram-se resultados acima de 95% de índice de pegamento com enxertia por borbulhia.

Técnicas de enxertia proporcionam produção de mudas com características da planta-mãe, originando plantios uniformes quanto a desenvolvimento, precocidade, produção e qualidade dos frutos, permitindo a seleção de plantas matrizes elite de características altamente desejáveis. Porém, para que esta técnica tenha sucesso, é necessária a obtenção eficiente de porta-enxertos, deparando-se, novamente, com problemas de germinação apresentados pela espécie. Técnicas de cultura de tecidos, neste caso, podem ser úteis, uma vez que, em um curto intervalo de tempo, podem produzir mudas em larga escala, idênticas à planta matriz e livre de patógenos.

2.5 Cultura de tecidos

A cultura de tecidos vegetais refere-se às técnicas de cultura em meio nutritivo, em condições assépticas, de células, tecidos ou órgãos de plantas, sob condições controladas de luminosidade e temperatura (Torres et al., 2000).

De acordo com Souza et al. (2006), o emprego racional de técnicas de cultura de tecidos pode tanto propiciar a produção comercial contínua de grande número de plantas de alta qualidade e com fidelidade genética mantida, aspectos

fundamentais para a conservação *in vitro* de germoplasma, como gerar variabilidade, tão importante para o melhoramento genético.

Tais técnicas vêm sendo amplamente aplicadas na recuperação de plantas livres de vírus e outros agentes causadores de doenças, na conservação e no intercâmbio de germoplasma *in vitro*, micropropagação rápida de genótipos elites, produção de haplóides, transformação genética de plantas e propagação comercial de plantas com potencial econômico, dentre outras (Torres et al., 2000).

A cultura de tecidos de plantas baseia-se no princípio da totipotência celular, característica de células vegetais que, segundo Taiz & Zeiger (2004), é definida como a capacidade que células vegetais nucleadas possuem de reterem informação genética para se desdiferenciar e serem potencialmente capazes de dar origem a uma planta completa.

Mantell et al. (1994) relatam que tecidos somáticos de uma planta são, essencialmente, os produtos de divisões mitóticas, em que cada célula dentro do organismo pode regenerar novas réplicas do mesmo organismo, desde que condições apropriadas sejam fornecidas. Essas condições incluem o fornecimento de macro e micronutrientes e vitaminas de forma equilibrada e em quantidade suficiente, ajuste do pH do meio, condições físicas (temperatura, qualidade e quantidade de luz adequada) e balanço hormonal adequado à indução de processos morfogênicos, embriogênicos ou mesmo a calogênese.

Para que os explantes possam se desenvolver satisfatoriamente, o meio de cultura deve fornecer os princípios nutritivos indispensáveis para que ocorram processos morfogênicos. Entre os principais componentes de um meio de cultura estão as fontes de carbono e de energia (geralmente sacarose) e as fontes de nitrogênio, fósforo e sais minerais. Pode-se ainda adicionar substâncias complexas de composição química indefinida, como água de coco, extrato de malte, caseína hidrolisada, glutamina, bem como adição de fitorreguladores de

crescimento (Santos-Serejo et al., 2006). A formulação MS de Murashige & Skoog (1962) é a mais utilizada para diferentes processos de cultura de tecidos; já o meio de cultura WPM (Lloyd & Mc Cown, 1980) tem sido muito utilizado para a propagação *in vitro* de espécies lenhosas (Vengadesan et al., 2002).

A propagação *in vitro*, também denominada de micropropagação em função dos propágulos utilizados, é, indiscutivelmente, a aplicação mais concreta da cultura de tecidos de órgãos vegetais (Grattapaglia & Machado, 1998; Santiago et al., 2001). Souza, F. et al. (2006) destacam que esta técnica de cultura de tecidos tem possibilitado que os agricultores tenham rápido acesso a novas cultivares desenvolvidas por programas de melhoramento genético, além da multiplicação de clones superiores de espécies que se propagam por sementes, evitando, assim, perdas por segregação. A principal vantagem da micropropagação é a fixação de ganhos genéticos nas populações clonais e a obtenção de um grande número de plantas saudáveis e de alta qualidade em pequeno espaço físico e em curto espaço de tempo, independente de fatores climáticos limitantes (George, 1993), além de proporcionar maior precocidade na produção (Melo et al., 1999).

Segundo Pierik (1990), a micropropagação pode ocorrer de forma direta, na qual gemas e ápices caulinares se desenvolvem dando origem a brotações que posteriormente passam pela fase de enraizamento, formando uma planta completa ou por meio indireto, em que tecidos vegetais se desdiferenciam passando pela fase de calo e, posteriormente, por estímulos físicos e ou químicos que podem originar brotações, que podem enraizar e formar uma planta. Para isso, podem-se utilizar a cultura de ápices caulinares e segmentos nodais, embriogênese somática e formação de gemas adventícias em diversos tipos de explantes (Torres et al., 2000).

A adição de reguladores de crescimento no meio nutritivo tem como objetivo suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos

explantes que foram isolados da planta matriz, bem como estimular o alongamento ou a multiplicação da parte aérea (Santos-Serejo et al., 2006).

O sinergismo entre auxinas e citocininas é determinante no controle da morfogênese *in vitro*. Elevadas concentrações de citocininas e baixas de auxinas proporcionam a formação de gemas em detrimento da formação de raízes e, invertendo-se esta relação, as gemas são inibidas, havendo indução de raízes (Santana, 2003).

2.6 Cultivo em meio líquido

Os meios líquidos são ideais na micropropagação, por evitarem o emprego de agentes solidificantes do meio de cultura (como o ágar) e proporcionarem a possibilidade de automação do processo (Aitken-Christie, 1991). Segundo Caldas et al. (1998), o cultivo em meio líquido necessita de algum tipo de suporte ou agitação para fornecer oxigênio necessário para a respiração do explante, mas, apresenta vantagens como menor custo e preparo mais rápido.

A metodologia convencional de micropropagação baseia-se no cultivo em pequenos frascos, com número reduzido de plantas por recipiente, utilizando meio contendo agentes solidificantes, acarretando em uma intensa manipulação das culturas, exigindo mão-de-obra especializada (Teixeira, 2002).

Com a utilização do cultivo em meio líquido, diminui o número de subcultivos, melhora o aproveitamento do meio de cultura, reduz a necessidade de investimento em vidraria, além de facilitar a limpeza e o preparo dos mesmos, reduzindo, assim, os custos de produção de plantas micropropagadas.

O cultivo em meio líquido permite um melhor desenvolvimento dos explantes por permitir maior difusão dos nutrientes no meio de cultura, evitando gradientes (Caldas et al., 1998). Debergh (1982) observou que quanto maior for a área de contato da planta com o meio, maior será a absorção dos seus

compostos e, em consequência, maior também a taxa de crescimento dos explantes. A característica física do meio de cultura líquido permite um contato muito maior com o explante do que o meio sólido, aumentando consideravelmente a absorção de nutrientes, tanto pelas folhas, como por caules e raízes, proporcionando maior produção de biomassa.

Biorreatores e agitadores orbitais são dois sistemas utilizados no cultivo *in vitro* com meio líquido. Segundo Silva (2006), a utilização comercial de biorreatores é limitada pela falta de estudos e também pelo elevado custo do equipamento.

2.7 Embriogênese somática

Segundo Haccius (1978), a embriogênese somática ou adventícia é o processo pelo qual novos indivíduos se originam a partir de células simples, que não são produtos da fusão de gametas e que não apresentam conexões vasculares com os tecidos maternos.

A embriogênese e a organogênese podem distinguir-se com base em critérios morfológicos e anatômicos. De acordo com Costa et al. (2006), a formação de embriões a partir de tecidos somáticos *in vitro* é semelhante à embriogênese zigótica que ocorre em órgãos reprodutivos de plantas, culminando na formação de uma planta completa a partir de uma única célula. Em certos explantes, de acordo com Kerbauy (1998), embriões somáticos formam-se a partir da diferenciação conjunta de grupos de células embriogênicas. Este sistema é utilizado para a propagação massal de plantas elites, apresentando grande potencial, pois possibilita elevadas taxas de multiplicação (Gupta et al., 1993).

No processo de embriogênese, anatomicamente, os tecidos do caule e da raiz estão conectados por um sólido procâmbio, que dá origem ao tecido vascular. O ápice radicular é fechado, sem conexão vascular com o tecido

materno. Já a organogênese implica na formação de estruturas monopolares que estabelecem conexão vascular com o tecido de origem, em que, normalmente os caules e raízes se formam de modo independente, muitas vezes com ausência de conexão vascular entre eles (Costa et al., 2006). De acordo com os mesmos autores, podem ocorrer duas maneiras de padrões morfogênicos: um de maneira direta, no qual embriões se originam diretamente do explante sem formação de calo e outro de maneira indireta, em que há prévia formação de calos antes do desenvolvimento de estruturas organizadas.

Segundo Grattapaglia & Machado (1998), a grande maioria dos sistemas de embriogênese somática ocorre pela via indireta, na qual calos embriogênicos são induzidos e mantidos ao longo do processo de multiplicação. Do ponto de vista de multiplicação e de custos envolvidos, a embriogênese somática apresenta enorme vantagem sobre os outros sistemas de micropropagação, pois grande quantidade de embriões pode ser formada em suspensão de células embriogênicas com um mínimo de manipulação e espaço físico do laboratório.

A embriogênese apresenta algumas limitações que têm dificultado sua utilização em sistemas de micropropagação. A primeira e maior delas é a obtenção de um sistema de embriogênese reproduzível em larga escala. Outra limitação é quanto à variabilidade genética indesejável, às vezes, introduzida pelo processo ao passar pela fase de calo. Outro problema é a perda da capacidade embriogênica das culturas após alguns subcultivos, embora sistemas embriogênicos em algumas espécies tenham permanecido com alta capacidade por mais de dois anos (Grattapaglia & Machado, 1998).

Segundo Vasil (1982), a competência embriogenética é aparentemente adquirida durante o período inicial em cultura na presença de altos níveis de 2,4-D, sendo, posteriormente, necessário removê-la ou reduzir seus níveis para que a embriogênese somática se expresse nestes tecidos. Segundo Ammirato (1983), o 2,4-D induz a formação de calos mais facilmente que outros reguladores, sendo

conhecido como determinante da embriogênese somática.

Também é descrita, na literatura, uma dependência do GA₃ no meio de indução de embriogênese somática (Germana, 2005; Rugini et al., 2005).

O estágio de desenvolvimento dos embriões zigóticos utilizados como fonte de explante é fundamental para a expressão de seu potencial morfogenético (Chalupa, 1999). A germinação *in vitro* de embriões zigóticos imaturos e maduros pode ser utilizada para o resgate de embriões em programas de conservação e melhoramento genético, na recuperação de híbridos de cruzamentos incompatíveis e também como fonte de explante para a cultura de tecidos, como a embriogênese somática (Zhang & Lespinasse, 1991).

O sucesso em se obter a expressão da embriogênese somática depende da utilização de explantes juvenis ou embrionários e da manipulação adequada de uma auxina, como o 2,4-D (Guerra & Nodari, 2006).

2.8 Isolamento de protoplastos

Protoplastos são células vegetais desprovidas da parede celular, obtidas em laboratório. Dessa forma, podem ser manipuladas como células animais e microorganismos, conservando ainda as potencialidades de células vegetais (Carneiro et al., 1998). De acordo com Matsumoto (2006), protoplasto é um estado transitório de uma célula desprovida de parede celular, comumente obtido pela ação de enzimas pectocelulolíticas. Sem parede celular, os protoplastos adquirem capacidade de incorporar materiais como DNA e de fundirem-se entre si. Quando a fusão ocorre entre protoplastos de espécies diferentes, híbridos somáticos são obtidos.

Para a obtenção de protoplastos viáveis, diversos fatores são importantes. Entre eles, a espécie, o estado fisiológico da planta, o tipo e a idade do explante e as condições de isolamento. O método mais utilizado na obtenção de protoplastos é a degradação dos componentes da parede celular com a

utilização de enzimas pectocelulolíticas. A seleção destas, bem como a adequação de suas concentrações, é muito importante para o isolamento de quantidade elevada de protoplastos viáveis (Carneiro et al., 1998).

As enzimas mais utilizadas no isolamento de protoplastos são: Cellulase “Onozuca” R-10 (Yakult Honsha), que possui atividade celulolítica, descristalização de cadeias e despolimerização da celulose; Macerozyme R-10 (Yakult Honsha), que tem importante atividade endo-poligalacturonase, desdobrando assim a pectina e Driselase, que possui atividade pectinolítica e celulolítica. São também utilizadas a celulase Cellulysin, a hemicelulase Rhozyme e a pectinase Pectolyase Y-23 (Carneiro et al., 1998).

Para a permanência de protoplastos viáveis durante todo o processo de isolamento e purificação, determinadas necessidades da célula devem ser supridas, tais como nutrientes básicos, solução em pH adequado tanto para a ação das enzimas como para a viabilidade dos protoplastos e um potencial osmótico que permita a estabilização da membrana plasmática, para que não ocorra a ruptura, devido à pressão hidrostática interna, devendo a mesma sofrer uma leve plasmólise. A solução comumente utilizada para pré-plasmólise dos tecidos, isolamento de protoplastos, dissolução de enzimas e lavagem dos protoplastos tem sido o CPW 13, que é uma solução salina de baixa viscosidade universalmente conhecida como CPW - Cell Washing Protoplasts (Frearson et al., 1973) e manitol a 13% (Dornelas & Vieira, 1993; D’Utra Vaz et al., 1993; Dornelas, 1995; Otoni, 1995; Passos et al., 2004).

A fusão de protoplastos é um dos métodos utilizados em transformação de plantas baseada na utilização de sistemas celulares desprovidos de parede celular. Esta técnica vem sendo utilizada no melhoramento de espécies de interesse agrônomo, para a obtenção de plantas transgênicas, de híbridos somáticos, de mutantes ou variantes somaclonais (Carneiro et al., 1998).

Em condições bem estabelecidas de cultura, os protoplastos são capazes

de manter a totipotencialidade celular, reconstituindo suas paredes, dividindo-se, formando calos e regenerando plantas por embriogênese ou organogênese (Barros & Carneiro, 1998).

A hibridação somática por meio da fusão de protoplastos é uma alternativa para a reprodução sexual, a fim de combinar (por meio de tratamentos químicos ou por eletrofusão) dois genomas completos, incluindo as organelas citoplasmáticas (Binsfeld, 1999). Segundo Liu et al. (2005), a fusão de células somáticas tem potencial de aplicação no melhoramento genético em casos de alta incompatibilidade sexual ou de barreiras de reprodução entre as espécies não relacionadas, inclusive pela recombinação de novas combinações dos genomas nuclear e ou citoplasmático.

Entretanto, em muitas espécies, podem-se superar incompatibilidades sexuais pela fusão de protoplastos, permitindo, assim, a transferência e a incorporação de caracteres poligênicos (Liu et al., 2005). Alguns caracteres introduzidos pelas técnicas de DNA recombinante, como, por exemplo, resistência a vírus ou a insetos (Meyer et al., 1987), são codificados por um único gene. Entretanto, na maioria das culturas de importância econômica, caracteres, tais como resistências a doenças, tolerância a estresse e produção, estão sob controle de poligenes. Estes podem ser transferidos pela fusão de protoplastos (Binsfeld, 1999).

A indução da fusão pode ser alcançada utilizando-se tratamentos químicos ou físicos comuns. Em ambos os casos, a fusão é um processo de dois estágios. Primeiro, os protoplastos têm que ser aproximados para contato próximo entre membranas, em que o grau de adesão da membrana plasmática depende dos protoplastos parentais (Binsfeld, 1999).

Davey et al. (2005) apresentam resultados positivos, em que a fusão de protoplastos, simétrica ou assimétrica, colaborou no melhoramento genético de diversas culturas economicamente importantes, como batata, plantas

ornamentais, citrus, brássicas e cereais. Ainda segundo os autores, os protoplastos fornecem também sistemas para investigar a maioria dos aspectos da genética e da fisiologia celular das plantas, incluindo estudos da genômica, proteômica e metabolômica.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITKEN-CHRISTIE, J. Automation. In: DEBERG, P. C.; ZIMMERMAN, R. J. (Ed.). **Micropropagation**. Dordresh, Netherlands, 1991. p. 363-388.

ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. 464 p.

ALMEIDA, S. P.; SILVA, J. A. **Piqui e buriti: importância alimentar para a população dos cerrados**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1994. 38 p. (Documentos, 54).

AMMIRATO, P. V. Embryogenesis. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. (Ed.). **Handbook of plant cell culture**. New York: Macmillan, 1983. v. 1, p. 82-123.

ARAÚJO, F. D. de. **The ecology, ethnobotany and management of *Caryocar brasiliense* Camb. around Montes Claros, MG, Brazil**. 1994. 175 f. Thesis (Doctor in Plant Sciences) - University of Oxford, Oxford.

BARRADAS, M. M. Informações sobre a floração, frutificação e dispersão do piqui (*Caryocar brasiliense* Camb.) (Caryocaraceae). **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 24, p. 1063-1068, 1972.

BARROS, L. M. G.; CARNEIRO, V. T. C. Eletroporação de protoplastos. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CENARGEM, 1998. p. 37-47.

BILICH, F.; SILVA, R. da. **Análise da produção de biodiesel utilizando multicritério**. 2006. Disponível em <<http://www.biodiesel.gov.br/docs/congresso2006/agricultura/AnaliseProdu%E7%E3oL.pdf>>. Acesso em: 23/10/2007.

BINSFELD, P. C. **Production and characterization of interspecific transgenic plants in the genus *Helianthus* using microprotoplast technique.** Göttingen: Cuvillier Verlag, 1999.

BRANDÃO, M.; CARVALHO, P. G. S.; JESUÉ, G.. **Guia ilustrado de plantas do cerrado de Minas Gerais.** Belo Horizonte: CEMIG. Superintendência de Apoio Administrativo, 1992. 78 p.

BRANDÃO, M.; LACA-BUENDÍA, J. P.; MACEDO, J. F. **Árvores nativas e exóticas do Estado de Minas Gerais.** Belo Horizonte: EPAMIG, 2002. 528 p.

BRUCK, E. C.; FREIRE, M. V.; LIMA, M. F. **Unidades de conservação no Brasil, cadastramento e vegetação 1991-1994.** Brasília: Instituto do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, 1995.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: EMBRAPA-SPI, 1998. v.1, p.87-132.

CARNEIRO, V. T.C.; CONROI, T.; BARROS, L. M. G.; MATSUMOTO, K. Protoplasto: cultura e aplicações. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Org.). **Cultura de tecidos vegetais e transformação genética de plantas.** Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. v. 1, p. 413-458.

CHALUPA, V. Somatic embryogenesis in linden (*Tilia* spp.). In: JAIN, S. M.; GUPTA, P. K.; NEWTON, R. J. (Ed.). **Somatic embryogenesis in woody plants.** Dordrecht: Kluwer Academics, 1999. v. 5, p. 31-43.

COSTA, M. A. P. C.; SOUZA, A. S.; ALMEIDA, A. B. A. Morfogênese *in vitro*. In: SOUZA, A. S.; JUNGHANS, T. G. (Ed.). **Introdução à micropropagação de plantas.** Cruz das Almas, BA: EMBRAPA, 2006. p.115-130.

D'UTRA VAZ, F. B.; SANTOS, A.V. P. dos; MANDERS, G. et al. Plant regeneration from leaf mesophyll protoplasts of the tropical woody plant, passion fruit (*Passiflora edulis* fv. *flavicarpa* Degener): the importance of the antibiotic cefotaxime in the culture medium. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 12, p. 220-225, 1993.

DAVEY, M. R.; ANTHONY, P.; POWER, J. B.; LOWE, K. C. Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. **Biotechnology Advances**, v. 23, p.

131-171, 2005.

DEBERGH, P. Y. Physical properties of culture media. In: FUJIWARA, A. (ed.) **Proceedings of the 5th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture**. Tokyo: Maruzen, 1982, p. 135–136.

DIAS, B. F. S. A conservação da natureza. In: NOVAES PINTO, M. (Org.). **Cerrado: caracterização, ocupação e perspectivas**. Brasília: Universidade de Brasília. Brasília, 1990. p. 583-640.

DOMBROSKI, J. L. D.; PAIVA, R.; CAMARGO, I. P. de. Efeito da escarificação sobre a germinação do pequi. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 20, n. 1, p. 68-73, 1998.

DONADIO, L. C.; MORO, F. V.; SERVIDONE, A. A. **Frutas brasileiras**. Jaboticabal: Editora Novos Talentos, 2002. 288 p.

DORNELAS, M. C. **Cultura e fusão de protoplastos de *Passiflora* spp.** 1995. 182 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP.

DORNELAS, M. C.; VIEIRA, M. L. C. Plant regeneration from protoplast cultures of *Passiflora edulis* fv. *flavicarpa* Deg., *P. amethystina* Mikan and *P. cincinnata* Mast. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 13, p. 103-106, 1993.

FELFILI, J. M.; NOGUEIRA, P. E.; SILVA JÚNIOR, M. C.; MARIMON, B. S.; DELITTI, W. B. C. Composição florística e fitossociologia do cerrado sentido restrito no município de Água Boa, MT. **Acta Botânica Brasilica**, v. 16, n. 1, p. 103-112, 2002.

FERREIRA, F. R.; BIANCO, S.; DURIGAN, J. F.; BELINGIERE, P. A. Caracterização física e química de frutos de pequi. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 9., 1987. Campinas. **Anais...** Campinas, SP: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1988. p. 643-646.

FERRI, M. G. **Plantas do Brasil – espécies do cerrado**. São Paulo: E. Blücher, 1969. 239 p.

FREARSON, E. M.; POWER, J. B.; COCKING, E. C. The isolation, culture, and regeneration of *Petunia* leaf protoplasts. **Developmental Biology**, San Diego, v. 33, p. 130-137, 1973.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: the technology**. 2.ed. London: Exegetics, 1993. pt 1, 574 p.

GERMANA, M. A. Protocol of somatic embryogenesis from *citrus* spp. anther culture. In: MOHAN JAIN, S.; PRAMON K, GU. (Ed.). **Forestry sciences: protocol for somatic embryogenesis in woody plants**. Dordrecht: Springer, 2005. v. 77, p. 191-208.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1998. v. 1, p. 183-260.

GRIBEL, R.; HAY, J. D. Pollination ecology of *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae) in Central Brazil cerrado vegetation. **Journal Tropical Ecology**, v. 9, p. 199-211, 1993.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. **Biotechnologia vegetal**. Florianópolis: STEINMACHER. 2006. Disponível em:<<http://www.cca.ufsc.br/lfdgv/Apostila%20Biotechnologia.pdf>>. Acesso em: 15/10/2007.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformações genéticas de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CBAB, 1998. p. 533-568.

GUPTA, P. K.; TIMMIS, R.; CARLSON, W. C. Somatic embryogenesis: a possible tool for large-scale propagation of forestry species. In: SOH, W. Y.; LIU, J. R.; KOMAMINE, A. (Ed.). **Advances in developmental biology and biotechnology of higher plants**. Korean: Korean Soc. Plant Tissue Culture, 1993. p. 18-37.

HACCIUS, B. Question of uncellular origin of non-zygotic embryos in callus cultures. **Phytomorphology**, Jodhpur, v. 8, p. 74-81, 1978.

HOFFMANN, W.; JACKSON, R. Vegetation climate feedbacks in the conversion of tropical savanna to grassland. **Journal Clim.**, v. 13, p. 1593-1602, 2000.

KERBAUY, G. B. Competência e determinação celular em cultura de células e

tecidos de plantas. In: TORRES, A. C. L. E.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1998. v.2, p. 519-531.

KLINK, C. A.; MACEDO, R. H.; MUELLER, C. C. De grão em grão, o cerrado perde espaço. In: MARTINS, E. S.; ALHO, C. J. R. (Ed.). **Cerrado: impactos do processo de ocupação**. Brasília: WWF & PROCER, 1995. 66 p. (Documento para Discussão).

LIU, J.; XU, X.; DENG, X. Intergeneric somatic hybridization and its application to crop genetic improvement. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 82, p.19-42, 2005.

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

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 2000. v. 1.

MANTELL, S. H. et al. **Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1994. 333 p.

MATSUMOTO, K. **Suspensão celular: focalizando a bananeira**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. p. 24. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 126).

MELO, J. T. **Fatores relacionados com a dormência da semente de pequi (*Caryocar brasiliense Camb.*)**. 1987. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Escola Superior de Agricultura de “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP.

MELO, N. F. de; OKASAKI, W. Y.; LEITE, C. B.; MIKLÓS FÁRI. Estabelecimento do cultivo in vitro da aceroleira (*Malpighia emarginata* DC.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 23, n. 1, p. 102-107, 1999.

MEYER, P.; HEIDMANN, I.; FORKMAN, G.; SAEDLER, H. A new petunia flower color generated by transformation of mutant with a maize gene. **Nature**, v. 330, p. 677-678, 1987.

MIRANDA, J. de S.; SILVA, H.; MATOS, M.A. de O. Emergência e vigor de sementes de pequi submetidas a pré-tratamentos mecânicos e térmicos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 9., 1987, Campinas. **Anais...** Campinas: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1988. p. 647-651.

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

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, 2000.

OLIVEIRA, S. S. **Efeito de giberelina, fungicida, tratamentos mecânicos e período de armazenamento sobre a germinação de sementes de pequi.** 2002. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical) - Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MG.

OTONI, W. C. **Hibridização e embriogênese somática e transformação genética em espécies de Passiflora.** 1995. 198 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

PASSOS, I. R. S.; MATOS, G. V. C. ; BINSFELD, P. C.; ROSALES, M. B.; SCOTT, M. D. S.; SAWASAKI, H. E.; MELETTI, L. M. M.; BERMACCI, L. C.; SIQUEIRA, W. J. Protoplasts: isolation, culture and plant regeneration in species of the genus *Passiflora*. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOLOGIA CELULAR, 12.; CONGRESSO DA SOCIEDADE IBEROAMERICANA DE BIOLOGIA CELULAR, 9., 2004, Campinas. **Anais...** Campinas: Sociedade Brasileira de Biologia Celular/ Sociedade Iberoamericana de Biologia Celular, 2004.

PAULA-JUNIOR, W. **Atividades biológicas in vitro de extratos hidroetanólicos de folhas e do mesocarpo interno de *Caryocar brasiliense* Cambess.** 2004. 82 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

PEREIRA, A. V.; PEREIRA, E.B.C.; FIALHO, J.F.; JUNQUEIRA, N.T.V.; GOMES, A.C. **Avaliação de métodos de enxertia em mudas de pequi.** Goiânia, GO: Embrapa, Agência Rural, 2002a. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 51).

PEREIRA, A.V.; PEREIRA, E. B. C.; JUNQUEIRA, N. T. V. Propagação e

domesticação de plantas nativas do Cerrado com potencial econômico.

Horticultura Brasileira, Brasília, v.19, n. 2, jul. 2001. 1 CD-ROM.

PEREIRA, A.V.; PEREIRA, E. B. C.; JUNQUEIRA, N. T. V.; FIALHO, J. F.
Enxertia de mudas de pequi. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2002b.
25 p. (Documentos, 66).

PIERIK, R.L.M. **Cultivo in vitro de las plantas superiores**. Madrid: Mundi -
Prensa, 1990. 326 p.

POZO, O. V. C. **O pequi (*Caryocar brasiliense*): uma alternativa para o
desenvolvimento sustentável do cerrado no norte de Minas Gerais**. 1997. 100 f.
Dissertação (Mestrado em Administração) – Universidade Federal de Lavras,
Lavras, MG.

RIBEIRO, A. E. O espaço, o homem e o seu destino no norte de Minas. In:
UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS. Departamento de Administração e
Economia. **Manejo sustentado do cerrado para uso múltiplo: subprojeto
agroecologia e desenvolvimento**. Lavras, 1996. p. 11-18.

RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. Fitofisionomias do bioma cerrado. In:
SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. de. **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina, DF:
EMBRAPA-CPAC, 1998. p. 89-152.

RUGINI, E.; MENCUCCINI, R.; BIASI, R.; ALTAMURA, M. M. Olive (*Olea
europaea* L.) In: JAIN, S. M.; GUPTA, P. K. **Protocol for somatic
embryogenesis in woody plants**. Dordrecht: Springer, 2005. p. 345-360.

SÁ, C.; C. G.; CÔRTEZ, R. A.; CARNEIRO, I. F.; BORGES, J. D. Efeito de
diferentes tratamentos na germinação do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.).
Acta Botânica Brasileira, v. 8, n. 1, p. 109-120, 1994.

SANTANA, J. R. F. **Controle da morfogênese in vitro em algumas espécies
de annonaceae**. 2003. 237 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) -
Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SANTIAGO, E. J. A.; PINTO, J. E. B. P.; CASTRO, E. M.; LAMEIRA, O. A.;
CONCEIÇÃO, H. E. O.; GAVILANES, M. L. Aspectos da anatomia foliar da
pimenta longa (*Piper hispidinervium* C.D.C.) sob diferentes condições de
luminosidade. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 5, p. 1035-1042,
set./out. 2001.

SANTOS-SEREJO, J. A.; JUNGHANS, T. G.; SOARES, T. L. ; SILVA, K. M. Meios nutritivos para micropropagação de plantas. In: SOUZA, A. da S.; JUNGHANS, T. G. (Org.). **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. p. 79-98.

SANTOS, B. R.; PAIVA, R.; DOMBROSKI, J. L. D.; MARTINOTTO, C.; NOGUEIRA, R. C.; SILVA, A. A. N. **Pequi** (*Caryocar brasiliense* **CAMB.**): uma espécie promissora do cerrado brasileiro. Lavras: UFLA, 2005.

SILVA, A. B. da. **Biorreator e luz natural na micropropagação do abacaxizeiro**. 2006. 123 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SILVA, D. B. da; SILVA, J.A. da; JUNQUEIRA, N.T.V.; ANDRADE, L.R.M. **Frutas do Cerrado**. Planaltina: EMBRAPA Cerrados; Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2001. 179 p.

SILVA, J. A. da; FONSECA, C. E. L. da. **Propagação vegetativa do pequi**: enxertia em garfagem lateral e no topo. Planaltina, DF: EMBRAPA-CPAC, 1991. 4 p. Pesquisa em andamento.

SOUZA, A. S.; COSTA, M. A. P. de C.; SANTOS-SEREJO, J. A.; JUNGHANS, T. G.; SOUZA, F. V. D. Introdução à cultura de tecidos de plantas. In: SOUZA, A. da S.; JUNGHANS, T. G. (Org.). **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. v. 1, p. 11-37.

SOUZA, F. V. D.; JUNGHANS, T. G. ; SOUZA, A. da S.; SANTOS-SEREJO, J. A. ; COSTA, M. A. P. de C. Micropropagação. In: SOUZA, A. da S.; JUNGHANS, T. G. (Org.). **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. v. , p. 38-52.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TEIXEIRA, J. B. Biorreatores. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 4, n. 24, p. 36-41, 2002.

TORRES, A. C.; FAJARDO, T. V.; DUSI, A. N.; RESENDE, R. O.; BUSO, J. A. Shoot tip culture and thermotherapy for recovering vírus-free plants of garlic. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 18, n. 3, p. 192-195, 2000.

VASIL, I. K. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cereals and

grasses. In: FUJIWARA, A. **Plant tissue culture**. Tokyo: Maruzen, 1982.p. 101-103.

VENGADESAN, G. et al. In vitro propagation of Acacia species - a review. **Plant Science**, v. 163, n. 1, p. 663-671, 2002.

ZHANG, Y. X.; LESPINASSE, Y. Removal of embryonic dormancy in apple (*Malus domestica* Borkh) by 6-benzylaminopurine. **Scientia Horticulturae**, v. 46, p. 215-223, 1991.

CAPÍTULO II

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E ANÁLISE ULTRA-ESTRUTURAL DE CALOS DE PEQUIZEIRO

RESUMO

MARTINOTTO, Cristiano. Embriogênese somática e análise ultra-estrutural de calos de pequiizeiro. In:_____. **Embriogênese somática e isolamento de protoplastos de pequiizeiro**. 2007. Cap.2, p.27-50. Tese (Doutorado em Agronomia - Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

O pequiizeiro apresenta sementes recalcitrantes, o que dificulta a produção em larga escala de mudas para o estabelecimento de plantios comerciais e para fins de reflorestamento. Em vista disso, técnicas de cultivo *in vitro* são alternativas para a propagação desta espécie. A embriogênese somática é o processo pelo qual células somáticas desenvolvem-se por meio de diferentes estádios embriogênicos, formando embriões, sem que ocorra a fusão de gametas. Este trabalho teve por objetivo a indução de embriões somáticos e calos embriogênicos a partir de embriões zigóticos de pequiizeiro. Estudaram-se, em meio de cultura MS, o efeito da combinação entre diferentes concentrações de sacarose (30, 60 e 90 g L⁻¹) e 2,4-D (0; 0,75; 1,5; 3,0 e 6,0 mg L⁻¹), o subcultivo nas mesmas combinações aos 45 dias e o efeito da combinação entre diferentes concentrações de 2,4-D (0; 0,75; 1,5; 3,0 e 6,0 mg L⁻¹) e 2iP (0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹), cultivados no escuro. Aos 45 dias foram avaliados a formação de calos embriogênicos, embriões somáticos e o tamanho dos calos. Foram realizados estudos de microscopia eletrônica de varredura nos calos obtidos. Para o desenvolvimento de embriões somáticos foi testada a adição de 10 mg L⁻¹ de ABA em meio MS líquido. Foram obtidos uma taxa de 10% de indução de calos embriogênicos e a indução de embriões somáticos no meio MS contendo 60 g L⁻¹ de sacarose na ausência de 2,4-D. Em subcultivo, foi obtida a indução de calos embriogênicos em meio MS contendo 60 g L⁻¹ (40% de indução), 30 g L⁻¹ (30 % de indução) de sacarose, seguido de meio com 30 g L⁻¹ de sacarose mais 6 mg L⁻¹ de 2,4-D (10% de indução). A combinação de 2,4-D e 2-iP promoveu apenas o desenvolvimento de calos com características não embriogênicas. O ABA não foi eficiente para promover o desenvolvimento de embriões somáticos nas concentrações utilizadas. Calos embriogênicos de pequiizeiro caracterizam-se por apresentar coloração branco-clara translúcida, mucilaginosa e brilhante com aspecto granular. Sob análise de microscopia eletrônica de varredura, calos embriogênicos obtidos apresentaram células pequenas e isodiamétricas, ao passo que calos brancos friáveis apresentaram células alongadas e calos amarelados apresentaram células alongadas em tecido desorganizado e frágil.

Comitê Orientador: Dr. Renato Paiva - UFLA (Orientador); Dr. Eduardo Alves.

ABSTRACT

MARTINOTTO, Cristiano. Somatic embryogenesis and ultra structural analysis of *Caryocar brasiliense* Camb. callus. In: _____. **Somatic embryogenesis and protoplasts isolation of *Caryocar brasiliense* CAMB.** 2007. Chap.2, p.27-50. Thesis (Doctorate in Agronomy - Plant Physiology) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

The *Caryocar brasiliense* Camb. Species present recalcitrant seeds, that difficulty the production in large scale of seedlings for the establishment of commercial plantations and for reforestation. Based on this fact, *in vitro* cultivation techniques may be an alternative for this species propagation. The somatic embryogenesis is the process by which somatic cells develop on different embryogenic stages, forming embryos without gamete fusion. The objective of this work was to induce the somatic embryos and embryogenic callus from zygotic embryos of *Caryocar brasiliense*. The effect of different combinations of sucrose (30, 60 and 90 g L⁻¹) and 2,4-D (0; 0.75; 1.5; 3.0 e 6.0 mg L⁻¹), the sub cultivation in the same concentrations occurred at 45 days and the effect of the combination of different concentrations of 2,4-D (0; 0.75; 1.5; 3.0 e 6.0 mg L⁻¹) and 2-iP (0; 0.5; 1.0 e 2.0 mg L⁻¹) on MS medium maintained in the dark was studied. After 45 days cultivation, embryogenic callus formation, somatic embryos and callus size were evaluated. Analysis on electronic scanning microscopy of the formed callus was also performed. For somatic embryo development, the addition of 10 mg L⁻¹ ABA in MS liquid medium was tested. The results showed a rate of 10% of the embryogenic callus induction and induction of somatic embryos in MS medium containing 60 g L⁻¹ sucrose in the absence of 2,4-D. In the subcultivation, it was obtained induction of embryogenic callus in MS medium containing 60 g L⁻¹ (40% induction), 30 g L⁻¹ (30 % induction) sucrose followed by the medium composed by 30 g L⁻¹ sucrose plus 6 mg L⁻¹ 2,4-D (10 % induction). The combination of 2,4-D and 2-iP promoted only the development of callus with non embryogenic characteristics. The ABA was not effective to promote the somatic embryo development in the used concentrations. Embryogenic callus of *C. brasiliense* was characterized by a white translucent color, mucilaginous and bright with granular aspect. The scanning microscopy of these calluses showed small and isodiametric cells. The white friable callus showed elongated cells and the yellowish callus showed elongated cells in disorganized and fragile tissue.

Guidance Committee: Dr. Renato Paiva (UFLA); Dr. Eduardo Alves (UFLA).

1 INTRODUÇÃO

O pequizeiro é uma importante frutífera nativa do Cerrado brasileiro, sendo encontrado em diversos estados, tais como Bahia, Ceará, Distrito Federal, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Piauí, Rio de Janeiro, São Paulo e Tocantins (Almeida et al., 1998). É uma espécie de grande potencial econômico devido aos seus frutos, os quais são utilizados na culinária como fonte de vitaminas, ou na forma de licores, tendo ainda o seu óleo utilizado na produção de cosméticos (Almeida et al., 1998; Lorenzi, 2000).

Apresenta dificuldade quanto à propagação sexuada, devido à dormência de suas sementes, ocasionando um baixo IVG. Com isso, a produção de mudas a partir de sementes tem sido incipiente. Tal característica é um entrave à implantação de plantios racionais e à exploração comercial, limitada atualmente pelo seu caráter extrativista.

Técnicas biotecnológicas de cultura de tecidos como a embriogênese somática são uma alternativa para a propagação sexuada, principalmente em espécies perenes. Elas possibilitam a produção de elevado número de propágulos livres de patógenos em curto espaço de tempo, além de evitar a segregação gênica e contornar problemas inerentes às sementes, como recalcitrância e dormência, dentre outros.

A embriogênese somática é o processo pelo qual células somáticas desenvolvem-se por meio de diferentes estádios embriogênicos, formando embriões que darão origem a uma planta, sem que ocorra a fusão de gametas. Esta técnica apresenta grande potencial, entretanto, o seu sucesso em plantas lenhosas ainda é incipiente (Guerra et al., 1998).

De acordo com Sharp et al. (1980), a embriogênese somática *in vitro* apresenta dois padrões básicos de desenvolvimento de embriões: a embriogênese somática direta, na qual os embriões somáticos originam-se diretamente de

tecidos matrizes, sem a formação de estádios intermediários de calos, e a embriogênese indireta, na qual os embriões somáticos se formam a partir de um calo. De acordo com Guerra et al. (1998), em ambos os padrões, o embrião somático segue a mesma seqüência de desenvolvimento do zigótico, ou seja, a passagem pelos estádios globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar.

Diversos autores relatam que o 2,4-D é o desencadeador do processo embriogênico em tecidos somáticos, necessitando, posteriormente, que esse regulador seja reduzido ou eliminado do meio de cultura subsequente, para que ocorra o desenvolvimento dos embriões somáticos. Entretanto, Nadgauda & Gogate (2005) obtiveram embriões somáticos de cajueiro utilizando no meio de desenvolvimento de embriões somáticos a mesma concentração de 2,4-D do meio de indução de calos embriogênicos (5 μ M).

Segundo Yeung & Thorpe (2005), o ABA é necessário para o desenvolvimento de embriões somáticos após a indução com auxina. O ABA paraliza a clivagem poliembriônica e inibe a germinação precoce dos embriões em desenvolvimento (Newton et al., 2005).

Carboidratos são significantes fatores no processo de maturação de embriões. Garin et al. (2000) verificaram que a sacarose combinada com elevada concentração de agente gelificante favoreceu a maturação de embriões de *Pinus strobus*. Meio de cultura com potencial osmótico elevado auxilia na indução e na maturação de embriões somáticos, podendo ser obtido com alta concentração de sacarose, manitol, polietilenoglicol (PEG) ou outro composto osmoticamente ativo que não prejudique o tecido embriogênico. A inclusão de elevadas concentrações de sacarose (9%) no meio de indução ocasiona grande aumento na formação de embriões somáticos (Guimarães et al., 1996).

Embora todos os tecidos sejam potencialmente capazes de desdiferenciar e redirecionar sua rota morfogênica, alguns tecidos têm maior capacidade de gerarem embriões somáticos, dentre os quais, destacam-se

a epiderme do embrião zigótico e as folhas cotiledonares.

A manutenção e a proliferação de calos embriogênicos de *Pinus* foi realizada por subcultivos no mesmo meio utilizado na indução (Harvengt, 2005; Salajova et al., 2005).

Para um eficiente protocolo de embriogênese somática é necessária a caracterização de calos embriogênicos para cada espécie. Não é regra, mas sim consenso de que calos embriogênicos apresentam características comuns em todas as espécies. Segundo Newton et al. (2005), calos embriogênicos de *Pinus elliottii* são branco-translúcidos, brilhantes e mucilaginosos. Além do aspecto visual, técnicas de microscopia de luz e eletrônica são importantes na caracterização de tais tecidos.

Salajova et al. (2005), trabalhando com *Pinus nigra* relataram que a iniciação de tecidos embriogênicos é profundamente afetada pelo estágio de desenvolvimento do embrião zigótico utilizado como explante. Embriões zigóticos maduros nesta espécie geralmente não respondem a tratamentos para a obtenção de embriões somáticos. Os mesmos autores verificaram que a frequência de iniciação de calos embriogênicos nesta espécie varia de ano para ano, encontrando valores de indução entre 1,53% e 24,4%.

O objetivo do presente trabalho foi realizar a indução de embriogênese somática em embriões zigóticos de pequizeiro visando à regeneração de plantas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, no Setor de Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia, na Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG.

2.1 Material vegetal

Frutos foram coletados de plantas nativas localizadas no município de Ijaci, MG, na primeira quinzena de dezembro. Foram utilizados como explante embriões zigóticos imaturos seccionados ao meio (Figura 1), extraídos de frutos com aproximadamente 60 dias após a antese e 4 cm de diâmetro. Após serem coletados, os frutos foram selecionados e submetidos a uma desinfestação prévia em câmara de fluxo laminar por imersão em álcool 70%, por dois minutos, seguida de imersão em solução de hipoclorito de sódio a 1% de cloro ativo por 40 minutos. Em seguida, os mesmos foram enxaguados por três vezes em água destilada e autoclavada. A extração dos embriões zigóticos imaturos foi realizada com o auxílio de bisturi e martelo, previamente autoclavados e imediatamente inoculados em meio de cultura.

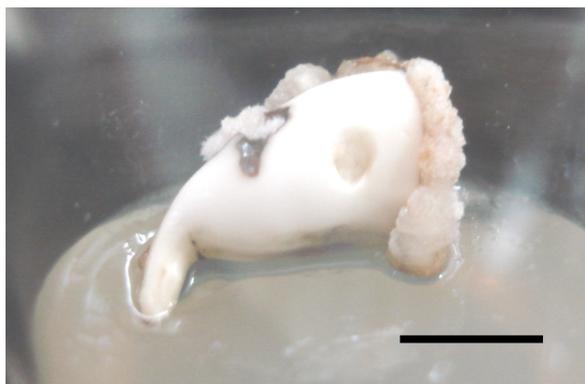


FIGURA 1. Embrião imaturo de pequi *in vitro*, com aproximadamente 60 dias após a antese (Barra = 5 mm). UFLA, Lavras, MG, 2007.

2.2 Efeito da interação entre 2,4-D e sacarose na indução de calos embriogênicos em embriões zigóticos imaturos de pequi

Para a indução de calos embriogênicos foi utilizado o meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) com 10% de água de coco, acrescido de 6 g L⁻¹

de ágar, 400 mg L⁻¹ de PVP (polivinilpirrolidona), sendo o pH do meio de cultivo ajustado para 5,8, posteriormente autoclavado a 121°C, por 20 minutos.

Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio (25 mm Φ x 150 mm de comprimento) contendo 15 mL de meio de cultura. Os tratamentos consistiram de combinações de diferentes concentrações de 2,4-D (0; 0,75; 1,5; 3,0 e 6,0 mg L⁻¹) e sacarose (30; 60 e 90 g L⁻¹) adicionadas ao meio de cultura. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 15 tratamentos compostos de cinco repetições que, por sua vez, eram compostas por dois tubos.

Após a inoculação dos explantes, os tubos foram mantidos em sala de crescimento, à temperatura de 25°C±2, no escuro.

Aos 45 dias de cultivo, foram avaliados a presença de embriões e o tamanho de calos, atribuindo notas de 1 a 5 (0%, 25%, 50%, 75% e 100% de cobertura de calos sobre o explante), de acordo com o desenvolvimento dos mesmos.

As características avaliadas por notas foram submetidas ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (Siegel, 1977), realizado com o auxílio do programa estatístico R (R Development Core Team, 2006).

2.3 Efeito da interação entre 2,4-D e sacarose na indução de calos embriogênicos em subcultivo

Calos provenientes do experimento anterior foram subcultivados nos mesmos tratamentos e condições de meio de cultura e ambiente de cultivo do experimento 2.2, a fim de verificar a proliferação e a indução de calos embriogênicos e a produção de embriões em subcultivo.

Aos 45 dias da inoculação, foram avaliados o tamanho dos calos, atribuindo-se notas de 1 a 5 (0%, 25%, 50%, 75% e 100% de cobertura de calos sobre o explante), a presença de embriões e a proliferação de calos embriogênicos. As características avaliadas por notas foram submetidas ao teste

não paramétrico de Kruskal-Wallis (Siegel, 1977), com o auxílio do software estatístico R (R Development Core Team, 2006).

2.4 Efeito do ácido abscísico (ABA) na indução de embriões somáticos em pequizeiro

Porções de cerca de 200 mg de calos obtidos de embriões zigóticos cultivados *in vitro* (experimento 2.2) foram avaliados quanto à indução de embriões somáticos na presença e na ausência de ABA.

Foi utilizado o meio de cultura MS líquido com pH ajustado para 5,8 acrescido de 6% de sacarose, 5 mg L⁻¹ de GA₃, 200 mg de caseína hidrolisada, 10% de água de coco, 400 mg de PVP, 200 mg L⁻¹ de mio-inositol e 200 mg L⁻¹ de L-glutamina esterilizada a frio com filtro Millipore® 0,22 µm em câmara de fluxo laminar e adicionada ao meio de cultura após um pré-resfriamento do mesmo (aproximadamente 40°C). Os tratamentos foram constituídos de duas concentrações de ABA (0 e 10 mg L⁻¹) com 4 repetições, sendo cada repetição composta por um frasco contendo 25 mL de meio.

Após a inoculação, os frascos permaneceram em agitador orbital, a 90 rpm, no escuro, sob 26°C. Aos 30 dias de cultivo foram avaliados a presença de embriões e o crescimento dos calos.

2.5 Efeito da interação entre 2,4-D e 2-iP na indução de calos embriogênicos em embriões zigóticos de pequizeiro

Foram utilizados embriões zigóticos seccionados à metade, extraídos de frutos com aproximadamente 70 dias após a antese e 6 cm de diâmetro, coletados no município de Ijaci. Após a coleta e o descarte de frutos com broca, os mesmos foram submetidos a uma desinfestação prévia em câmara de fluxo laminar por imersão em álcool 70% por dois minutos, seguido de imersão em solução de hipoclorito de sódio a 1% de cloro ativo por 40 minutos. Em seguida, os mesmos foram enxaguados por três vezes em água destilada e autoclavada. A

extração dos embriões zigóticos imaturos foi realizada com o auxílio de bisturi e martelo em câmara de fluxo laminar, sendo os mesmos imediatamente inoculados em meio de cultura.

Para a indução de calos embriogênicos foi utilizado o meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) com 10% de água de coco, acrescido de 6 g L⁻¹ de ágar, 400 mg L⁻¹ de polivinilpirrolidona (PVP), 450 mg L⁻¹ de L-glutamina, 450 mg L⁻¹ de caseína hidrolisada, 3% de sacarose, sendo o pH do meio de cultivo ajustado para 5,8 e posteriormente autoclavado a 121°C, por 20 minutos.

Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio (25 mm Φ x 150 mm de comprimento) contendo 15 mL de meio de cultura. Os tratamentos consistiram de combinações de diferentes concentrações de 2,4-D (0; 0,75; 1,5; 3,0 e 6,0 mg L⁻¹) e 2iP (0;0,5;1,0 e 2,0 mg L⁻¹) adicionadas ao meio de cultura. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 20 tratamentos compostos de 5 repetições compostas por dois tubos.

Após a inoculação dos explantes, os tubos foram mantidos em sala de crescimento à temperatura de 25°C±2 no escuro. Aos 45 dias da inoculação, foram avaliados: o tamanho dos calos, atribuindo-lhes notas de 1 a 5 (0%, 25%, 50%, 75% e 100% de cobertura de calos sobre o explante), a presença de embriões e a proliferação de calos embriogênicos. As características avaliadas por notas foram submetidas ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (Siegel, 1977) com o auxílio do software estatístico R (R Development Core Team, 2006).

2.6 Análise morfológica e ultra-estrutural de calos de pequi

Para as análises morfológicas e ultra-estruturais, calos obtidos do experimento 2.3 foram separados em três grupos, de acordo com suas características: calo branco claro translúcido, mucilaginoso e brilhante granular (embriogênico); calo branco leitoso friável e calo amarelado granular compacto,

os quais foram submetidos à microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Os calos foram fixados em Karnovsky por um período de 24 horas, à temperatura ambiente. Posteriormente, foram lavados em tampão cacodilato 0,05 M (3 vezes de 10 minutos) e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato 0,05 M por 4 horas. Em seguida, foi realizada a desidratação em gradiente de acetona (25%, 50%, 75% e 90%, por 10 minutos e 3 vezes com 100%, por 10 minutos cada). Após a desidratação, foi realizada secagem em aparelho de ponto crítico CPD 030, por meio de CO₂ líquido e as amostras metalizadas com ouro. As observações e as fotomicrografias foram realizadas em microscópio eletrônico (LEO Evo 040), operando entre 10 e 20 kV.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito da interação entre 2,4-D e sacarose na indução de calos embriogênicos em embriões zigóticos imaturos de pequi

A combinação de diferentes concentrações de 2,4-D e sacarose testadas não induziu o desenvolvimento de embriões somáticos ou a formação de calos embriogênicos *in vitro* a partir de embriões zigóticos imaturos de pequi.

De acordo com a análise dos dados, foi possível obter a indução de embriões somáticos e calos embriogênicos aos 45 dias de cultivo, no escuro, na presença de 60 g L⁻¹ de sacarose e ausência de 2,4-D. Nessas condições, embriões somáticos na fase globular e cordiforme e calos embriogênicos foram induzidos em 10% dos explantes cultivados (Figura 2). Os calos embriogênicos obtidos caracterizam-se por apresentar coloração branca clara, sendo translúcidos, mucilaginosos brilhantes e granulares.

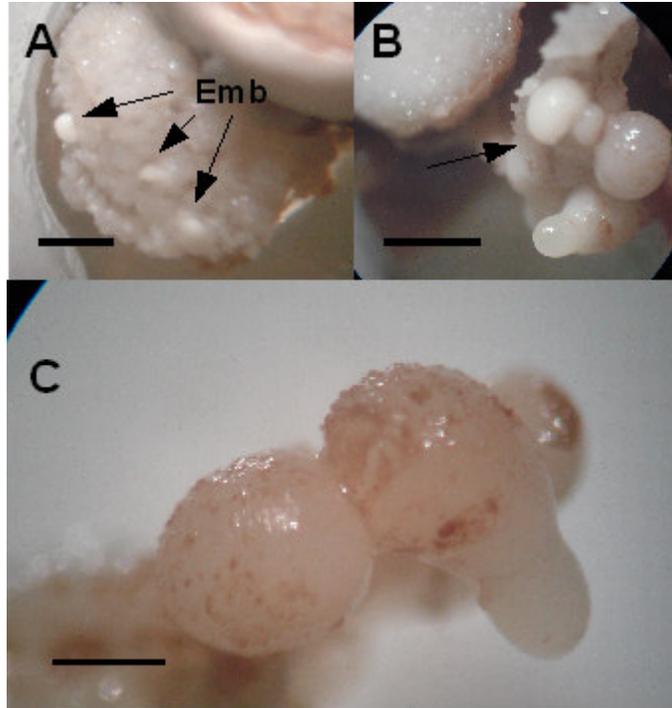


FIGURA 2. Embriões somáticos de pequi. A - Embriões (Emb) desenvolvendo-se sobre calo embriogênico (barra 5 mm); B - embriões em estágio globular e torpedo (barra = 1 mm); C - embriões em estágio torpedo (barra = 0,5 mm). UFLA, Lavras, MG, 2007.

Steinmacher et al. (2007), utilizando 10 μ M de picloran, obtiveram uma taxa de 9,8% de indução de calos embriogênicos, utilizando calos de embriões zigóticos de *Bactris gasipaes* como explante.

Segundo Fehér et al. (2003), a transição entre um tecido somático para um tecido embriogênico é mediada por um mecanismo de transição adaptativa a um estresse ocasionado por algum fator imposto pela condição de cultivo *in vitro*.

Segundo Guerra & Nodari (2006), uma auxina, geralmente, é utilizada, como o caso do 2,4-D, para a indução de embriogênese somática, porém, é

necessário que os explantes, após a indução, sejam subcultivados na ausência desta auxina ou em concentrações reduzidas para que ocorra o desenvolvimento destes embriões, fato não ocorrido neste experimento. Isso pode explicar o fato de não ter ocorrido a formação de tecidos embriogênicos nos tratamentos com 2,4-D no presente estudo.

Os resultados deste estudo indicam que o elevado potencial osmótico do meio proporcionado pela sacarose possivelmente foi determinante na formação de embriões somáticos.

A sacarose, nas concentrações de 30, 60 e 90 g L⁻¹, apresenta potencial osmótico de -0,237, -0,461 e -0,713 Mpa a 25°C, respectivamente, calculado pela fórmula de Van't Hoff's: $\Psi = CiRT$, em que C corresponde à concentração do soluto (mol L⁻¹), i é a constante de ionização do soluto, R é a constante dos gases (0,00831 kg MPa mol⁻¹ K⁻¹) e T a temperatura em Kelvin (Paiva Neto & Otoni, 2003).

Segundo Karami et al. (2006), o aumento da concentração de sacarose no meio causa um estresse osmótico nos explantes, proporcionando melhor resposta embriogênica. Os mesmos autores, testando diferentes concentrações de sacarose, conseguiram maior frequência de calos embriogênicos de *Dianthus caryophyllus* L. em meio contendo de 90 a 120 g L⁻¹ de sacarose em meio MS. Nakagawa et al. (2001), estudando a utilização de diferentes concentrações de manitol, sacarose e ABA na embriogênese somática de melão, verificaram que elevadas concentrações de sacarose e manitol foram necessárias para a indução de embriogênese somática. Os mesmos autores verificaram, ainda, que calos embriogênicos submetidos à elevada concentração de sacarose (68,5 g L⁻¹) apresentavam elevada acumulação endógena de ABA. Isso os levou a supor que este hormônio esteja envolvido na indução de calos embriogênicos e na formação de embriões somáticos, sendo seus níveis endógenos induzidos pelo estresse osmótico proporcionado pelo meio. Estudos demonstram que o aumento

da concentração de substâncias osmoticamente ativas, como a sacarose, tem aumentado a eficiência na indução de tecidos embriogênicos (Guimarães et al., 1996).

Quanto à avaliação do tamanho de calos obtidos, independente de esses serem embriogênicos ou não, a análise estatística pelo teste de Kruskal-Wallis não demonstrou diferença significativa entre os tratamentos (p -valor = 0,2383; ou seja, >5% de probabilidade de aceitar H_0).

3.2 Efeito da interação entre 2,4-D e sacarose na indução de calos embriogênicos em subcultivo

Foi observado efeito significativo na indução e na proliferação de tecidos embriogênicos. Os dados avaliados quanto à presença e à ausência de calos embriogênicos apresentam distribuição binomial. Porém, não foi possível realizar um ajuste dos dados por modelos lineares generalizados, devido à característica das respostas neste tipo de experimento (excesso de zeros). Dessa forma, realizou-se uma análise estatística descritiva dos mesmos com a porcentagem de indução de calos embriogênicos por tratamento.

Com relação ao subcultivo dos explantes, verificou-se formação de tecidos embriogênicos, tanto em tratamentos em que ocorreram a embriogênese e a formação de calos embriogênicos (6% de sacarose em ausência de 2,4-D), bem como nos tratamentos que não apresentaram esta transição no experimento anterior. Destacam-se os tratamentos contendo 60 ou 30 g L⁻¹ de sacarose sem a presença de 2,4-D, seguidos do tratamento em que o meio foi acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose e 6,0 mg L⁻¹ de 2,4-D (Figura 3).

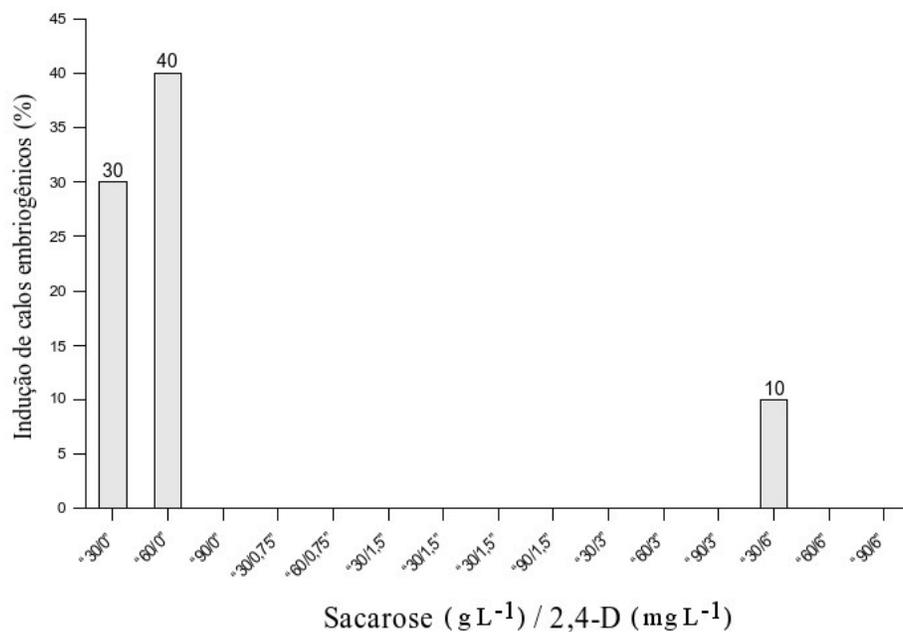


FIGURA 3. Porcentagem de indução de calos embriogênicos em embriões zigóticos de pequiheiro em subcultivo, aos 45 da inoculação no escuro.

Nas Figuras 4A e 4B, observam-se detalhes dos calos embriogênicos obtidos nos tratamentos contendo 30 e 60 g L⁻¹ de sacarose. Já na figura 4C verifica-se a diferença entre um tecido branco friável não embriogênico e um tecido embriogênico em um mesmo explante.

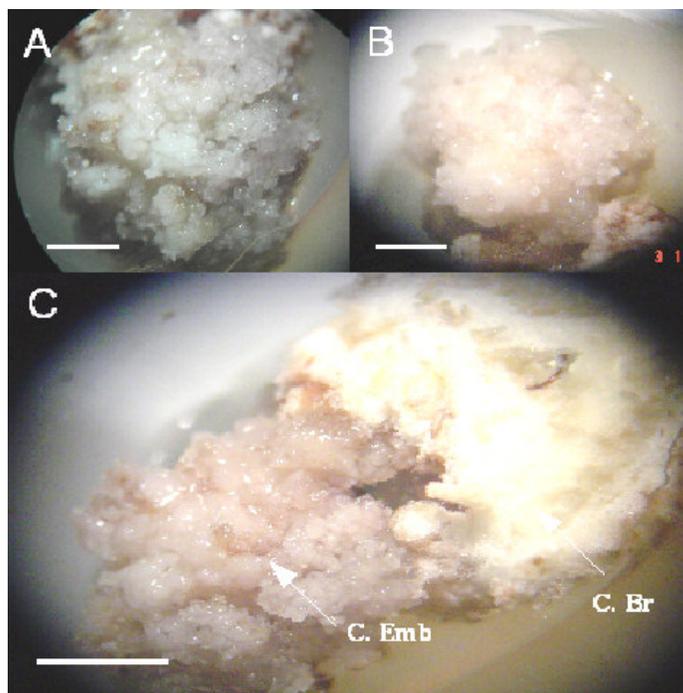


FIGURA 4. Calos embriogênicos induzidos em meio MS com 6% (A) e 3% (B) de sacarose em subcultivo, aos 45 dias de cultivo no escuro; calo embriogênico (C. Emb) e calo branco (C. Br) desenvolvendo-se no mesmo explante (C). UFLA, Lavras, MG, 2007.

Segundo Newton et al. (2005), calos embriogênicos de *Pinus elliottii* são brancos translúcidos, brilhantes e mucilaginosos. Tang & Newton (2005) verificaram quatro tipos de calos em *Pinus taeda*: branco transparente, mucilaginoso e brilhante, amarelado, verde-claro e bege-claro, dos quais apenas o branco transparente, brilhante e mucilaginoso foi capaz de gerar embriões somáticos.

De acordo com as análises pelo teste de Kruskal-Wallis para tamanho de calos, houve diferença significativa entre os tratamentos (p-valor <0,05), ou seja, existem pelo menos dois tratamentos com diferença estatística significativa entre si (Tabela 1 em anexo).

Conforme se pode observar na Figura 5, o tratamento que mais se destacou para crescimento de calos foi o que utilizou 3,0 mg L⁻¹ de 2,4-D, com 60 g L⁻¹ de sacarose.

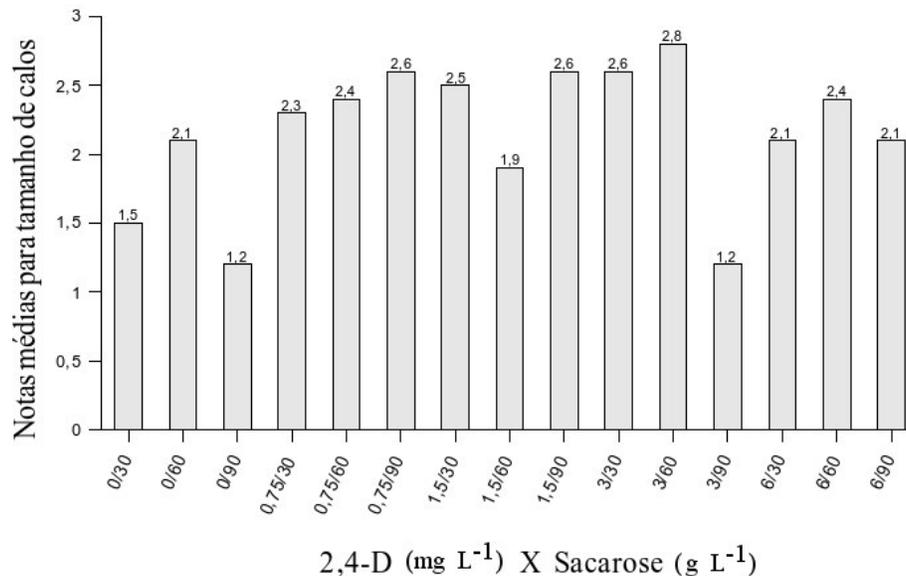


FIGURA 5. Notas médias para tamanho de calos em embriões zigóticos de pequiheiro em subcultivo, aos 45 dias de cultivo *in vitro* no escuro.

Na concentração de 60 g L⁻¹ de sacarose, as médias das notas foram maiores nas diferentes concentrações de 2,4-D, com exceção da concentração 0,75 e 1,5 mg L⁻¹. Na primeira, os valores foram muito próximos da maior média. Isso pode indicar que a sacarose em maiores concentrações do que a usual para o meio MS (30 g L⁻¹) pode ser melhor para o desenvolvimento de calos de pequiheiro *in vitro*, demonstrando um efeito nutricional da mesma. Ishii et al. (1998) observaram que o crescimento de calos da orquídea *Phalaenopsis* é influenciado pelo tipo e pela quantidade de carboidrato no meio de cultura e que, para a indução de calos, a quantidade ideal de sacarose seria de 40 g.L⁻¹.

3.3 Efeito do ácido abscísico (ABA) na indução de embriões somáticos em pequiheiro

O ABA não teve efeito no desenvolvimento de embriões somáticos. Ao contrário, Gupta & Holmstrom (2005) obtiveram sucesso ao induzir o desenvolvimento de embriões somáticos de *Pseudotsuga menziessi* utilizando 5 mg L⁻¹ de ABA em meio líquido.

Mihaljevic (2005) utilizou meio de cultura para maturação de embriões de *Picea omorika* com concentrações entre 20 a 40 mg L⁻¹ de ABA. Todavia, Thompson & Harrington (2005) utilizaram 50 mg L⁻¹ de ABA para promover o desenvolvimento e a maturação de embriões somáticos de *Picea sitchensis*.

Tais citações demonstram que a dependência por ABA para o desenvolvimento de embriões somáticos varia de espécie para espécie. Ao que tudo indica, a utilização de 10 mg L⁻¹ de ABA no presente trabalho não foi eficiente para promover o desenvolvimento de embriões somáticos de pequiheiro.

3.4 Efeito da interação entre 2,4-D e 2-iP na indução de calos embriogênicos em embriões zigóticos de pequiheiro

O 2,4-D e 2iP não promoveram o desenvolvimento de calos embriogênicos nem embriões somáticos em embriões zigóticos de pequiheiro nas concentrações utilizadas. Entretanto, Steinmacher et al. (2007) relataram o sucesso na indução de culturas embriogênicas utilizando esses reguladores em interação.

Um fator que pode ter influenciado na resposta à indução foi a idade do explante inicial (70 dias após a antese). Salajova et al. (2005), trabalhando com *Pinus nigra* relataram que a iniciação de tecidos embriogênicos são profundamente afetados pelo estágio de desenvolvimento do embrião zigótico utilizado como explante.

Quanto ao desenvolvimento de calos avaliados por meio de notas (1 a 5), de acordo com o p-valor obtido pelo teste de Kruskal-Wallis (0,7599% de probabilidade de não haver diferença significativa entre pelo menos duas médias dos tratamentos) para tamanho de calos, houve diferença altamente significativa (Tabela 2 em anexo).

Pode se observar, pela Figura 6, que o tratamento que proporcionou maior crescimento de calos foi aquele que utilizou 4 mg L⁻¹ de 2,4-D na ausência de 2iP, seguido dos que utilizaram as relações entre 2,4-D/2iP de 0,5/1, 1/0 e 1/2 mg L⁻¹.

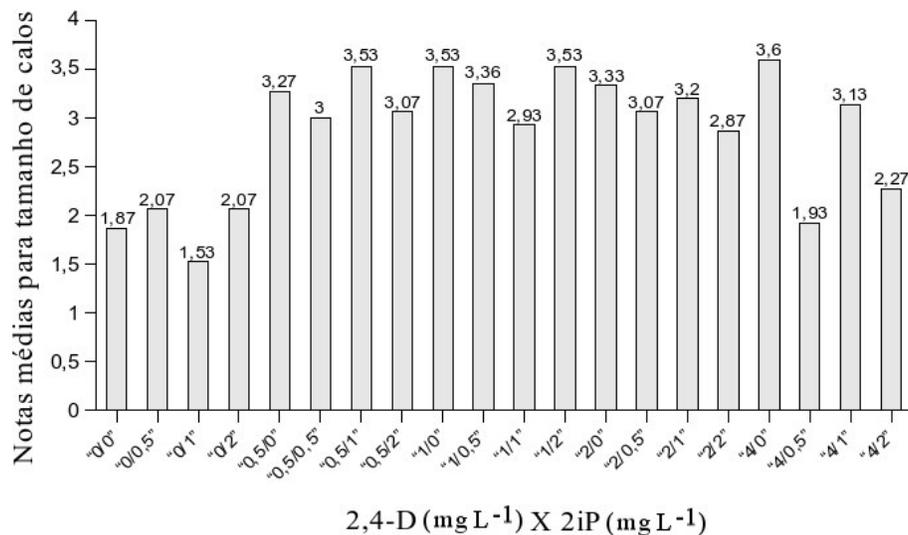


FIGURA 6. Notas médias para crescimento de calos em função da combinação de diferentes concentrações de 2,4-D e 2iP, aos 45 dias de cultivo *in vitro* no escuro.

3.5 Análise morfológica e ultra-estrutural de calos de pequiheiro

As análises realizadas por meio do uso de microscopia eletrônica de varredura demonstraram diferenças morfológicas nos três tipos de calos em estudo (Figura 7).

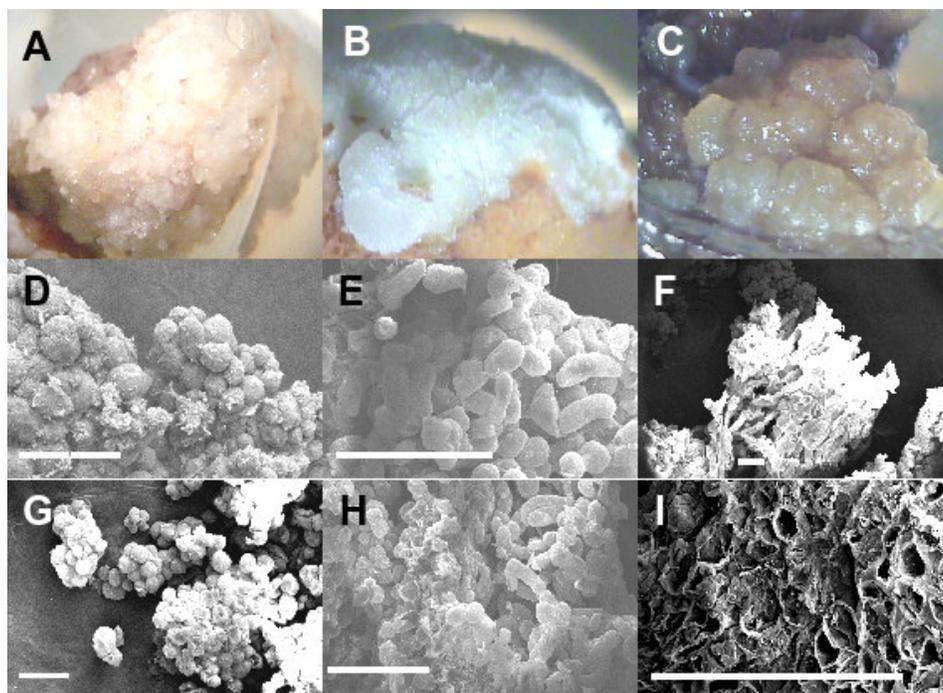


FIGURA 7. Fotografias e eletromicrografias de varredura de calos de pequizeiro, aos 45 dias de cultivo *in vitro*. Coluna ADG - Calo embriogênico, branco claro translúcido, mucilaginoso, brilhante e granular; Coluna BEH - Calo branco leitoso friável; Coluna CFI - Calo amarelo globular. (Barras = 200 μ m). UFLA, Lavras, MG, 2007.

Os calos embriogênicos obtidos nos tratamentos contendo 30 e 60 g L⁻¹ de sacarose na ausência de 2,4-D do experimento 2.3. apresentam coloração branca clara translúcida, mucilaginosa, brilhante e granular (Figura 7A).

Tang & Newton (2005) observaram que, em *Pinus taeda*, apenas calos brancos transparentes, brilhantes e mucilaginosos foram capazes de gerar embriões somáticos.

Quanto à análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV), os calos embriogênicos apresentaram células isodiamétricas, pequenas e com tecido organizado, como pode ser observado nas Figuras 7D e 7G.

Figueiredo (2007), estudando calos cultivados em 2,4-D e cinetina, com características embriogênicas em *Passiflora* spp., encontrou células isodiamétricas em tecido organizado.

Calos com coloração branco-leitosa, friáveis (Figura 7B) apresentaram células alongadas com pequena quantidade de células isodiamétrica e tecido organizado (Figuras 7E e 7H). Já os calos amarelados globulares (7C), apresentaram células alongadas com tecido altamente desorganizado e frágil (Figuras 7F e 7I).

Zuo et al. (2002) conseguiram obter formação de raízes, centros meristemáticos e embriões somáticos a partir de calos amarelo-globulares, o que não foi verificado no presente trabalho.

Schumann et al. (1995) descreveram que a formação de embriões somáticos por via indireta consiste na seqüência do desenvolvimento do calo que, primeiramente, forma uma massa fina, aquosa e translúcida, consistindo de células alongadas, seguida da formação de uma massa de calos compacta, quebradiça e de coloração amarelada com células isodiamétricas e, finalmente, a formação de estruturas globulares com os embriões.

4 CONCLUSÕES

A sacarose a 60 g L^{-1} foi eficiente na indução de embriões somáticos e calos embriogênicos em embriões zigóticos de pequiizeiro, aos 45 dias de cultivo.

O 2,4-D, nas concentrações utilizadas, não foi eficiente na indução de embriões somáticos em embriões zigóticos de pequiizeiro.

O subcultivo aos 45 dias no mesmo meio de indução propiciou a proliferação de calos embriogênicos.

O uso do 2,4-D e o 2iP nas concentrações utilizadas não foi eficiente na indução de calos embriogênicos em embriões zigóticos de pequiizeiro.

A utilização de 10 mg L⁻¹ de ABA em meio líquido não foi eficiente para induzir o desenvolvimento de embriões somáticos de pequizeiro.

Calos embriogênicos de pequizeiro apresentam coloração branca clara, sendo translúcidos, mucilaginosos, brilhantes e granulares.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. 464 p.
- FEHÉR, A.; PASTERNAK, T. P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell Tiss. Organ Cult.**, v. 74, p. 201-228, 2003.
- FIGUEIREDO, M. A. **Obtenção, análises morfológicas e ultra-estruturais de calos de *Passiflora* spp.** 2007. 113 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- GARIN, E.; BERNIER-CARDOU, N.; ISABEL, K.; KLIMASZEWSKA ; A. P. Effect of sugars, Amino acids, and culture technique on maturation of somatic embryos of *Pinus strobus* on medium whith two gellan gum concentrations. **Plant Cell Tissue Org. Cult.** v. 62, p. 27-37, 2000.
- GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. **Biotecnologia vegetal**. Florianópolis: STEINMACHER. 2006. Disponível em:<<http://www.cca.ufsc.br/lfdgv/Apostila%20Biotecnologia.pdf>>. Acesso em: 15/10/2007.
- GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 1998. p. 533-568.
- GUIMARÃES, M. L.; TOMÉ, M. C.; CRUZ, G. S. *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. (Tamarillo). In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry**. Berlim: Trees IV. Spring-Verlang, 1996. v. 35, p. 120-137.
- GUPTA, P. K.; HOLMSTROM, D. Douglas-fir (*Pseudotsuga menziensis*). In:

- JAIN, S. M.; GUPTA, P. K.; (Ed.). **Forestry sciences**. Protocol for somatic embryogenesis in woody plants. Dordrecht: Springer, 2005. v. 77, p. 25-34.
- HARVENGT, L. Somatic embryogenesis in maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). In: JAIN, S. M.; GUPTA, P. K. (Ed.). **Forestry sciences**. Protocol for somatic embryogenesis in woody plants. Dordrecht: Springer, 2005. v. 77, p. 107-120.
- ISHII, Y.; TAKAMURA, T.; GOI, M.; TANAKA, M. Callus induction and somatic embryogenesis of *Phalaenopsis*. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 17, p. 446-450, 1998.
- KARAMI, O.; DELJOU, A.; ESNA-ASHARI, M.; OSTAD-AHMADI, P. Effect of sucrose concentrations on somatic embryogenesis in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 110, p. 340-344, 2006.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2000. v. 1, 367 p.
- MIHALJEVIC, S.; JELASKA, S. Omorika spruce (*Picea omorika*). In: JAIN, S. M.; GUPTA, P. K. (Ed.). **Forestry sciences**. Protocol for somatic embryogenesis in woody plants. Dordrecht: Springer, 2005. v. 77, p. 35-46.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NADGAUDA, R. S.; GOGATE, S. S. Cashew (*Anacardium occidentale* L.). In: JAIN, S. M.; GUPTA, P. K. (Ed.). **Forestry sciences**. Protocol for somatic embryogenesis in woody plants. Dordrecht: Springer, 2005. v. 77.
- NAKAGAWAA, H.; SAIJYOA, T.; YAMAUCHI, N.; SHIGYOA, M.; KAKOA, S.; ITOB, A. Effects of sugars and abscisic acid on somatic embryogenesis from melon (*Cucumis melo* L.) expanded cotyledon. **Scientia Horticulturae**, v. 90, p. 85-92, 2001.
- NEWTON, R. J.; TANG, W.; JAIN, S. M. Slash pine (*Pinus elliottii* Engelm.). In: MOHAN, S.; JAIN; PRAMON K. GUPTA (Ed.). **Forestry sciences**. Protocol for somatic embryogenesis in woody plants. Dordrecht: Springer, 2005. v. 77, p.1-10.
- PAIVA. NETO, V. B. de.; OTONI, W. C. Carbon sources and their osmotic potential in plant tissue culture: does it matter? **Scientia Horticulturae**, v. 97,

p.193–202, 2003.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna, Áustria: R Foundation for Statistical Computing, 2006. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 15/07/2007

SALAJOVA, T.; RODRIGUES, R.; CANAL, M. J.; DIEGO, L. B.; BERDASCO, M.; RADOJEVIC, L.; SALAJ, J. Protocol of somatic embryogenesis of *Pinus nigra* Arn. In: MOHAN JAIN, S.; PRAMON K. GUPTA (Ed.). **Forestry sciences**. Protocol for somatic embryogenesis in woody plants. Dordrecht: Springer, 2005. v. 77, p. 81-94.

SCHUMANN, G.; RYSCHKA, U.; SCHULZE, J.; KLOCKE, E. Anatomy of somatic embryogenesis. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Somatic embryogenesis and synthetic seed**. Berlin: Springer-Verlag, 1995. p. 3-19.

SHARP, W. R.; SONDAHL, M. R.; CALDAS, L. S.; MARAFFA, S. B. The physiology of in vitro asexual embryogenesis. **Horticultural Review**, New York, v. 2, p. 268-310, 1980.

SIEGEL, S. **Estatística não paramétrica para ciências do comportamento**. Rio de Janeiro: McGraw, 1977. p. 350.

STEINMACHER, D. A.; CANGAHUALA-INOCENTE; CLEMENT, C. R.; GUERRA M. P., Somatic embryogenesis from peach palm zygotic embryos. **In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant**, v. 43, p. 124-132, 2007.

TANG, W.; NEWTON, R. J. Loblolly pine (*Pinus taeda*). In JAIN, S. M.; GUPTA, P. K. (Ed.). **Forestry sciences**. Protocol for somatic embryogenesis in woody plants. , Dordrecht: Springer, 2005. v. 77, p. 95-106

THOMPSON, D.; HARRINGTON, F. Sitka spruce (*Picea sitchensis*). In: JAIN, S. M.; GUPTA, P. K. (Ed.). **Forestry sciences**. Protocol for somatic embryogenesis in woody plants. Dordrecht: Springer, 2005. v. 77, p. 69-80.

YEUNG, E. C.; THORPE, T. A. Somatic embryogenesis in *Picea glauca*. In: JAIN, S. M.; GUPTA, P. K. (Ed.). **Forestry sciences**. Protocol for somatic embryogenesis in woody plants. Dordrecht: Springer, 2005. v. 77, p. 47-58.

ZUO, J.; NIU, Q-W.; FRUGIS, G.; CHUA N-H. The *WUSCHEL* gene promotes vegetative-to-embryonic transition in *Arabidopsis*. **Plant Journal**, v. 30, p. 349-360, 2002.

CAPÍTULO III

ISOLAMENTO DE PROTOPLASTOS DE TECIDO FOLIAR DE PEQUIZEIRO OBTIDO IN VITRO

RESUMO

MARTINOTTO, Cristiano. Isolamento de protoplastos de tecido foliar de pequiheiro obtido *in vitro*. In: _____. **Embriogênese somática e isolamento de protoplastos de pequiheiro**. 2007. Cap.3, p.51-72 Tese (Doutorado em Agronomia - Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

O pequiheiro apresenta problemas quanto à sua propagação sexuada. Dessa forma, a regeneração de plântulas por meio de técnicas de cultura de tecidos é uma alternativa para a sua propagação. Entre elas, tem-se o cultivo *in vitro* de protoplastos, podendo servir ainda como base para o melhoramento genético da espécie por transformação de plantas utilizando eletrofusão ou ação de agentes osmóticos, sendo, em seguida, regeneradas. Este trabalho foi realizado com o objetivo obter protoplastos isolados viáveis de tecido foliar obtido *in vitro* de pequiheiro, visando à regeneração de plantas e o melhoramento genético. Para o isolamento de protoplastos, foram testadas duas soluções enzimáticas: solução A – 3 % (p/v) de Cellulase “Onozuca R-10” (Yakult Honsha) + 1% (p/v) de “Pectolyase Y23” (Sishim Pharmaceutical., USA) (Yakult Honsha) + 1 % (p/v) de Driselase (Sigma London Chemical Co Ltd) + 5 mM de MES e solução B – 1 % (p/v) Cellulase “Onozuca R-10” (Yakult Honsha) + 0,2 % (p/v) de “Macerozyme R10” (Yakult Honsha) + 0,1 % (p/v) de Driselase (Sigma London Chemical Co Ltd) + 5 mM de MES, em 4 tempos de incubação no escuro (5, 10, 15 e 20 horas). Também foram testadas três concentrações de manitol (0,5; 0,6 e 0,7 M) em meio CPW e sistema de incubação estacionário e rotação orbital. Foram avaliados a viabilidade dos protoplastos obtidos e o diâmetro médio dos mesmos. O melhor sistema para a obtenção de protoplastos viáveis foi a utilização da solução enzimática composta por 1 % (p/v) Cellulase “Onozuca R-10” (Yakult Honsha) + 0,2 % (p/v) de “Macerozyme R10” (Yakult Honsha) + 0,1 % (p/v) de Driselase (Sigma London Chemical Co Ltd) + 5 mM de MES em 0,6 M de manitol sob sistema de incubação estacionário por 10 horas no escuro, obtendo-se $18,32 \times 10^5 \pm 3,9$ protoplastos com 96,7% $\pm 3,9$ de protoplastos viáveis com um diâmetro médio de $25,19 \pm 4,75$ μm .

Comitê Orientador: Prof. Dr. Renato Paiva - UFLA (Orientador); Prof. Dr. Wagner Campos Otoni - UFV.

ABSTRACT

MARTINOTTO, Cristiano. Isolation of protoplasts from *Caryocar brasiliense* CAMB. leaves obtained *in vitro* In: _____. **Somatic embryogenesis and protoplasts isolation of *Caryocar brasiliense* CAMB.** 2007. Chap.3, p. 51-72. Thesis (Doctorate in Agronomy - Plant Physiology) - Federal University of Lavras, Lavras, MG.

The *Caryocar brasiliense* present problems related with its sexual propagation. In this context, plantlet regeneration using tissue culture techniques may be considered as an alternative for its propagation. Among the techniques available, the protoplast *in vitro* culture may help the genetic improvement of the species through plant transformation using eletrofusion or osmotic agents to regenerate new plants. The objective of this was to isolate viable protoplasts from *Caryocar brasiliense* leaf tissue obtained *in vitro* for further plant regeneration and genetic breeding. For the protoplasts isolation, two enzymatic solutions: (A) 3 % (w/v) Cellulase “Onozuca R-10” (Yakult Honsha) + 1 % (w/v) “Pectolyase Y23” (Sishim Pharmaceutical., USA) (Yakult Honsha) + 1 % (w/v) Driselase (Sigma London Chemical Co Ltd) + 5 mM MES and solution (B) 1 % (w/v) Cellulase “Onozuca R-10” (Yakult Honsha) + 0.2% (w/v) “Macerozyme R10” (Yakult Honsha) + 0.1 % (w/v) Driselase (Sigma London Chemical Co Ltd) + 5 mM of MES and 4 incubation time in dark (5, 10, 15 and 20 hours) were tested. Three concentrations of manitol (0.5; 0.6 and 0.7 M) in CPW medium as well as the systems of stationary incubation and orbital rotation were also tested. Protoplasts viability and average diameter were evaluated. The best system to obtain viable protoplast was the use of the enzymatic solutions composed by 1 % (w/v) Cellulase “Onozuca R-10” (Yakult Honsha) + 0.2 % (w/v) “Macerozyme R10” (Yakult Honsha) + 0.1 % (w/v) Driselase (Sigma London Chemical Co Ltda) + 5 mM MES in manitol 0.6 M on stationary incubation system for 10 hours in the dark, which produced $18.32 \times 10^5 \pm 3.9$ protoplasts with $96.7\% \pm 3.9$ viable protoplasts with an average diameter of $25.19 \pm 4.75 \mu\text{m}$.

Guidance Committee: Dr. Renato Paiva (UFLA); Dr. Wagner Campos Otoni (UFV).

1 INTRODUÇÃO

A utilização de espécies nativas com potencial econômico em plantios comerciais e em programas de reflorestamento exige que o processo de propagação da mesma esteja dominado.

Sob condições adequadas de temperatura e umidade, a semente de pequi inicia a germinação a partir de um mês de plantio, podendo levar de 6 a 11 meses para concretizar o processo (Miranda et al., 1987). Estes elevados tempo e desuniformidade de germinação dificultam a produção de mudas. Resultados positivos foram alcançados utilizando-se giberelinas e escarificação, diminuindo o tempo de germinação para 56 dias (Dombroski et al., 1998), porém, com baixa porcentagem de germinação.

Neste contexto, a propagação via cultura de tecidos se torna uma alternativa para a propagação do pequi, a qual pode ocorrer por meio de organogênese direta via brotações de gemas apicais e axilares, ou via regeneração de calos, suspensões celulares e mesmo protoplastos.

De acordo com Matsumoto (2006), protoplasto é um estado transitório de uma célula desprovida de parede celular, comumente obtido pela ação de enzimas pectocelulolíticas. O cultivo de protoplastos consiste no cultivo de células desprovidas de parede celular, podendo esta técnica ser utilizada na transformação genética por meio de eletroporação ou microinjeção, auxiliando programas de melhoramento. Dessa forma, características desejáveis, como qualidade nutricional, ausência de espinhos, diminuição do grau de dormência entre outras, poderão ser incorporadas ao pequi por transformação genética. Os protoplastos, ao serem cultivados em suspensão, mantêm sua totipotencialidade, dividindo-se, podendo formar colônias, calos e regenerar plantas por embriogênese ou organogênese (Barros & Carneiro, 1998).

Para que esta técnica seja realizada com sucesso é necessário o

desenvolvimento de um protocolo eficiente de isolamento dos mesmos a partir de tecidos organizados ou calos. A correta escolha de enzimas, concentração, tempo de incubação, velocidade de agitação, temperatura, condicionador osmótico é de fundamental importância.

Após o isolamento, é necessário verificar a viabilidade dos protoplastos para determinar a densidade de plaqueamento a ser utilizada no cultivo, por ter essa variável influência nos seus processos de divisões e diferenciação.

O objetivo deste trabalho foi a obtenção de protoplastos isolados viáveis de tecido foliar obtido *in vitro* de pequiheiro, visando à regeneração de plantas e o melhoramento genético.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, no Setor de Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia, na Universidade Federal de Lavras e no Laboratório de Cultura de Tecidos II, no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG.

2.1 Material vegetal

Foram utilizadas, para o isolamento de protoplastos, folhas de plântulas de pequiheiro cultivadas *in vitro* em fase de multiplicação com cerca de 60 dias de idade. Para a obtenção dessas plântulas, segmentos nodais foram inoculados em meio de cultura constituído por sais e vitaminas do meio WPM, acrescido de 3% de sacarose, 6,5 g L⁻¹ de ágar, 0,75 mg L⁻¹ de BAP, 0,05 mg L⁻¹ de ANA, pH ajustado para 5,8 e, posteriormente, autoclavado por 20 minutos a 120°C, segundo o protocolo desenvolvido por Santos et al. (2006). Após a inoculação dos explantes, os mesmos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25°C ±2, fotoperíodo de 16 horas e 35 μmol m⁻² s⁻¹ de densidade

de fluxo de fótons.

2.2 Avaliação de combinações enzimáticas e tempo de incubação no isolamento de protoplastos

Para avaliar a melhor combinação enzimática e o melhor tempo de incubação para o isolamento de protoplastos de pequiheiro, para cada combinação, foi depositado um grama de folhas de plântulas de pequiheiro cultivadas *in vitro*, seccionadas em cortes paralelos de aproximadamente 1 mm em placa de Petri (90 mm Φ X 15 mm) com 10 mL de solução CPW 0,6 M para pré-plasmólise. Após permanecer por uma hora na ausência de luz, a solução de pré-plasmólise foi retirada com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, sendo adicionados 10 mL de cada solução enzimática a ser testada (solução A e solução B).

As soluções enzimáticas testadas foram diluídas em CPW 0,6 M, tendo seu pH ajustado a 5,6, cujas composições encontram-se descritas abaixo:

. a solução enzimática A foi composta por:

- 3% (p/v) de Cellulase “Onozuca R-10” (Yakult Honsha) + 1% (p/v) de “Pectolyase Y23” (Sishim Pharmaceutical., USA) (Yakult Honsha) + 1% (p/v) de Driselase (Sigma London Chemical Co Ltd) + 5 mM de MES;

. a solução enzimática B foi composta por:

- 1% (p/v) Cellulase “Onozuca R-10” (Yakult Honsha) + 0,2% (p/v) de “Macerozyme R10” (Yakult Honsha) + 0,1% (p/v) de Driselase (Sigma London Chemical Co Ltd) + 5 mM de MES.

Após o preparo, as combinações enzimáticas passaram por um processo de purificação por centrifugação a 5.000 rpm, por 5 minutos, sendo o

sobrenadante microesterilizado por meio de filtros de membrana com poros de 0,22 μm de diâmetro (Millipore[®]) e armazenados a -20°C , sendo o pellet descartado.

A incubação foi realizada à temperatura de $26^{\circ}\text{C}\pm 2$, no escuro, em agitador orbital, a 40 rpm.

2.2.1 Purificação

Após a fase de incubação, a suspensão obtida (protoplastos isolados e tecidos não digeridos) foi filtrada, utilizando-se peneira de náilon 64 μm (Wilson Sieves, Nottingham, UK), centrifugada a 700 rpm, por 5 minutos e novamente ressuspensa com a solução de CPW + manitol utilizada na pré-plasmólise. O processo foi repetido por mais duas vezes para a eliminação da solução enzimática. Na última vez, o precipitado foi ressuspensa com 2 mL de CPW + manitol e transferido para novo tubo de centrífuga contendo gradiente de sacarose (CPW 30%, 25%, 20%, 21%, 18% e 15% de sacarose) e, na seqüência, centrifugado, por 5 minutos, a 700 rpm.

Os protoplastos purificados ficaram concentrados na interface entre dois meios com diferente gradiente de sacarose. Em seguida, foram coletados com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e transferidos para a determinação do rendimento, utilizando-se um hemacitômetro (Hausser Scientific, USA), sob microscópio ótico (Figura 3).

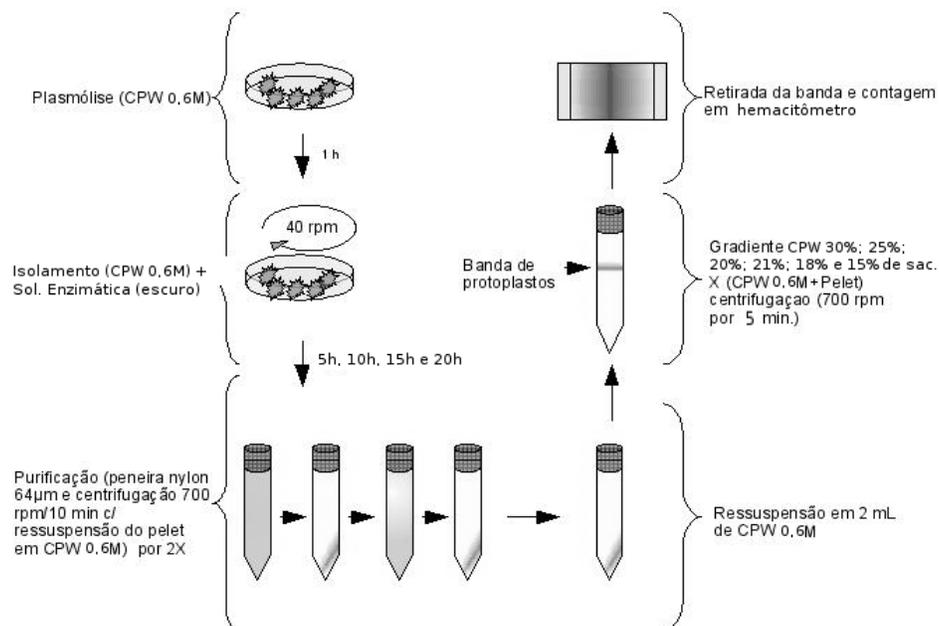


FIGURA 3. Processo de isolamento e purificação de protoplastos.

Cada tratamento (combinação enzimática) foi composto por duas repetições, sendo cada repetição constituída por uma placa de isolamento. A eficiência do isolamento foi determinada por meio de contagens de protoplastos liberados, sendo realizada a cada 5 horas, das 5 às 20 horas de incubação.

2.3 Efeito de diferentes concentrações de manitol no isolamento de protoplastos de tecido foliar *in vitro*

Para testar a melhor concentração de manitol para isolamento de protoplastos, plântulas de pequizeiro com 60 dias de idade, cultivadas *in vitro*, foram levadas para câmara de fluxo laminar previamente desinfestada, onde tiveram suas folhas excisadas e seccionadas em cortes paralelos de aproximadamente 1 mm de distância um do outro. Em seguida, porções de um grama deste material foram transferidas para pré-plasmólise em placas de petri

(90 mm Φ X 15 mm), sendo adicionados, em seguida, 10 mL de solução CPW e testadas três concentrações de manitol 0,5 M, 0,6 M e 0,7 M. As porções de material permaneceram por uma hora nestas três soluções na ausência de luz.

Após decorrido o tempo, as soluções de pré-plasmólise foram descartadas com o auxílio de pipeta de Pasteur e, em seguida, foram adicionados ao material 10 mL da solução enzimática preparada, composta por 1% (p/v) Cellulase “Onozuka R-10” (Yakult Honsha) + 0,2% (p/v) de “Macerozyme R10” (Yakult Honsha) + 0,1% (p/v) de Driselase (Sigma London Chemical Co Ltd) + 5 mM de MES, em CPW nas respectivas concentrações de manitol e, em seguida, incubadas à temperatura de $26^{\circ}\text{C}\pm 2$ no escuro em agitador orbital a 40 rpm.

O processo de purificação foi o mesmo utilizado no experimento anterior (Figura 3). Cada tratamento (concentração de manitol) foi composto por duas repetições, sendo cada repetição constituída por uma placa de isolamento. A eficiência do isolamento foi avaliada pelo número de protoplastos liberados, obtidos por meio de contagens, realizadas a cada 5 horas, das 5 às 20 horas de incubação, com o auxílio de um hematocitômetro sob microscópio ótico.

Após a etapa final do processo de purificação, os protoplastos foram ressuspensos em 10 ou 15 mL de meio CPW 9 M, sendo tomadas três amostras (50 a 75 μL por alíquotas) em duas repetições e transferidas para um hematocitômetro (Fuchs-Rosenthal-B.S. 74B - Weber Scientific Int. LTD., Sussex, U.K.) com o qual foi obtido o número de protoplastos a partir da digestão enzimática de 1,0 g de tecido foliar.

2.4 Efeito do sistema de incubação estacionário ou em rotação orbital na eficiência do isolamento de protoplastos de tecido foliar

Para avaliar o melhor processo de incubação para a digestão enzimática, foi testada a influência do repouso e da agitação orbital (40 rpm).

Porções de um grama do material vegetal utilizado foram transferidas para pré-plasmólise em placas de Petri (90 mm Φ x 15 mm), sendo adicionados, em seguida, 10 mL de solução CPW com 0,6 M de manitol (melhor concentração osmótica obtida no experimento 2.3). Após decorrida uma hora, a solução de pré-plasmólise foi descartada com o auxílio de pipeta de Pasteur e, em seguida, foram adicionados ao material 10 mL da solução enzimática B, preparada em CPW com 0,6 M de manitol e, em seguida, incubada a uma temperatura de $26^{\circ}\text{C}\pm 2$ no escuro em agitador orbital a 40 rpm e em regime estacionário. O processo de purificação foi o mesmo utilizado anteriormente.

Cada tratamento (agitação orbital e regime estacionário) foi composto por duas repetições, sendo cada repetição constituída por uma placa de isolamento. A eficiência do isolamento foi avaliada pelo número de protoplastos liberados, obtidos por meio de contagens realizadas a cada 5 horas, das 5 às 20 horas de incubação, com o auxílio de um hemacitômetro sob microscópio ótico.

2.5 Avaliação de diferentes concentrações de manitol na viabilidade de protoplastos

A viabilidade dos protoplastos foi avaliada para cada concentração de manitol do experimento 2.3, sendo determinada por meio da coloração com DAF (Widholm, 1972). Uma mistura de volumes iguais de suspensão de protoplastos e da solução de DAF (0,01%) foi deixada em repouso por 3 a 5 minutos em temperatura ambiente e, posteriormente, observada sob luz UV (com filtro azul) utilizando microscópio invertido (Olympus IMT 2). Os protoplastos viáveis foram indicados por uma fluorescência verde e a viabilidade definida pela percentagem de protoplastos fluorescentes (Aditya & Baker, 2003).

Para análise estatística, foi avaliada a porcentagem de protoplastos com fluorescência verde, em relação ao número de protoplastos total por campo (aumento 400x), sob microscopia de fluorescência. Foi calculado a média de, no

mínimo, 200 protoplastos por repetição (2 repetições) e os dados foram submetidos à análise de variância e ao teste SNK (5%) de separação de médias.

2.6 Avaliação dos diâmetros de protoplastos isolados de tecido foliar

O diâmetro dos protoplastos obtidos do tecido foliar de plântulas *in vitro* de pequizeiro, por digestão em solução enzimática (1% (p/v) “Cellulase” Onozuka R10; 0,2% (p/v) “Macerozyme” Onozuka R10; 0,1% (p/v) “Driselase”; MES 5 mM, pH 5,6 em CPW 0,6M de manitol) foram determinados por meio de medições com o auxílio de uma ocular micrometrada acoplada a um microscópio ótico. Foram avaliadas quatro repetições de 50 protoplastos, ressuspensos em solução CPW 0,6 M.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação de combinações enzimáticas e tempo de incubação no isolamento de protoplastos

A solução enzimática B, constituída de 1% (p/v) Cellulase “Onozuca R-10” (Yakult Honsha) + 0,2% (p/v) de “Macerozyme R10” (Yakult Honsha) + 0,1% (p/v) de Driselase (Sigma London Chemical Co Ltd) + 5 mM de MES foi mais eficiente no processo de isolamento de protoplastos em relação à solução enzimática A em todos os tempos de incubação testados. Para a solução B, o melhor tempo de incubação foi de 10 horas sob agitação (40 rpm) no escuro, com o qual, foram obtidos $18,32 \times 10^5 \pm 1,21$ protoplastos por grama de massa fresca (Tabela 1).

TABELA 1. Rendimento de isolamento de protoplastos em tecido foliar de pequiheiro *in vitro*, em função de diferentes soluções enzimáticas e tempos de incubação (média±desvio padrão).

Tempo de incubação (h)	Protoplastos /g MF A*	Protoplastos /g MF B*
5 horas	9,54 x10 ⁵ ±2,12	17 x10 ⁵ ±0,18
10 horas	10 x10 ⁵ ±1,78	18,32 x10⁵ ±1,21
15 horas	6,21 x10 ⁵ ±0,68	12,01 x10 ⁵ ±0,28
20 horas	4,87 x10 ⁵ ±3,54	8 x10 ⁵ ±1,57

A - 3% Cellulase “Onozuka” R-10 + 2% Meicelase + 1% Driselase em 0,6 M de manitol, pH 5,6.

B - 1% (p/v) “Cellulase” Onozuka R10; 0,2% (p/v) “Macerozyme” Onozuka R10; 0,1% (p/v) “Driselase”; MES 5 mM, pH 5,6.

O processo de isolamento de protoplastos em tecido foliar de pequiheiro obtido *in vitro* está ilustrado na Figura 4.

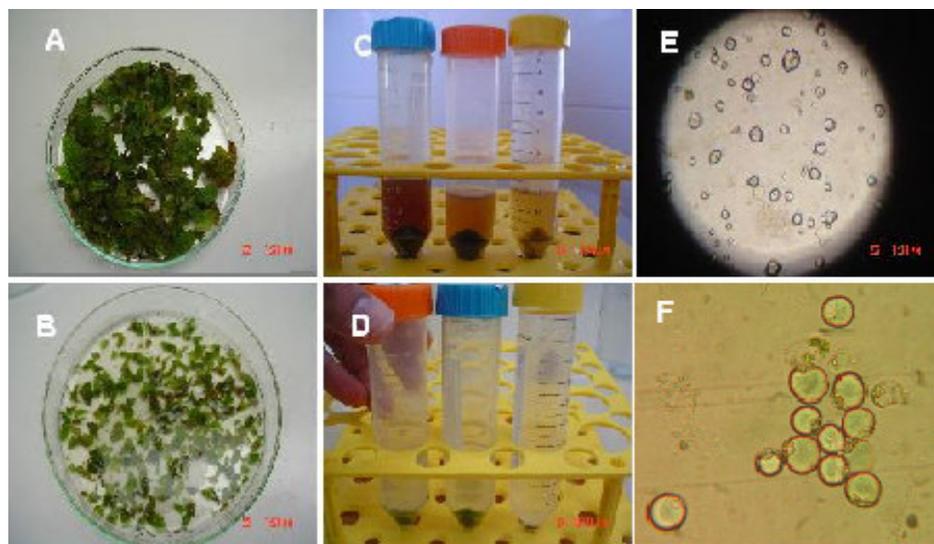


FIGURA 4. Processo de isolamento e purificação de protoplastos de pequi. A - folhas de pequi cultivado *in vitro*; B - pré-plasmólise das células em CPW 0,6 M; C e D - processo de purificação de protoplastos (centrifugação, ressuspensão em CPW 0,6 M); E - digestão enzimática (100X) e F - detalhe dos protoplastos isolados em solução enzimática B por 10 horas (400X). UFLA, Lavras, MG, 2007.

Observou-se que tempos superiores a 10 horas de incubação foram prejudiciais quanto à eficiência no isolamento de protoplastos.

Silva-Junior (2007), trabalhando com bastão-do-imperador, encontrou resultados superiores embora com maior tempo de incubação. O autor obteve $22,0 \times 10^5$ protoplastos por grama de tecido fresco de mesofilo de bastão-do-imperador com 15 horas de incubação em solução composta por 3% de Cellulase + 2% de Meicelase + 1% de Driselase + 1% Dextran A 40 rpm no escuro.

Ochatt et al. (1987), trabalhando com cerejeira (*Prunus avium* x *Pseudocerasus*), obtiveram um isolamento de $0,6 \times 10^7$ a $1,5 \times 10^8$ protoplastos g^{-1} de matéria fresca, superior ao observado no presente trabalho.

Todavia, Costa et al. (2002), trabalhando com calos de laranja Pera cv. 158, utilizando uma solução enzimática composta de 1% de Cellulase “Onozuka” R-10 + 0,2% de Macerozyme R-10 e 0,1% de Driselase, obtiveram um rendimento de $4,8 \times 10^6$ protoplastos g⁻¹ de calos. Este valor obtido foi também superior aos encontrados para tecido foliar *in vitro* de pequiizeiro. Oliveira et al. (1995), trabalhando com suspensão celular de porta-enxertos de citros, limoeiro Cravo e tangerina Cleópatra, conseguiram um rendimento de $0,5 \times 10^6$ e $0,7 \times 10^6$ protoplastos por mL de células em suspensão, respectivamente.

A solução A utilizada apresenta, em sua composição, três vezes mais celulase e dez vezes mais driselase do que a solução B. A baixa eficiência da solução A em relação à B, quanto ao isolamento de protoplastos, possivelmente foi consequência da falta de especificidade das enzimas utilizadas pela parede celular, atacando também a membrana plasmática. Este efeito, embora também possa estar presente na solução B, ocorreu de maneira mais suave, não degradando os protoplastos à medida que eram liberados no meio de incubação. A diferença das soluções também pode ter afetado o processo de isolamento. A solução A era composta por meicelase enquanto a solução B pela macerozyme, sendo esta mais eficiente no isolamento de protoplastos em tecidos foliares de pequiizeiro.

3.2 Efeito de diferentes concentrações de manitol no isolamento de protoplastos de tecido foliar *in vitro*

Quanto ao efeito da concentração do manitol no isolamento de protoplastos, verificou-se que a concentração de 0,6 M de manitol no meio CPW em pré-plasmólise e durante a incubação e a purificação de protoplastos foi a mais eficiente em todos os tempos de incubação testados. Com tal concentração, o melhor tempo de incubação foi de 10 horas no escuro, com o qual foram obtidos $18,32 \times 10^5 \pm 1,18$ protoplastos por grama de massa fresca (Tabela 2).

TABELA 2. Número de protoplastos isolados a partir da digestão enzimática de 1,0 g de folhas *in vitro* de pequizeiro e função de três concentrações de manitol em diferentes tempos de incubação.

Tempo de incubação	MANITOL		
	0,5 M*	0,6 M**	0,7 M***
5 horas	1,23x10 ⁵ ±1,98	17x10 ⁵ ±3,65	15x10 ⁵ ± 1,37
10 horas	1,1x10 ⁵ ± 2,47	18,32 x10⁵± 1,18	14,32x10 ⁵ ±0,12
15 horas	0,98x10 ⁵ ± 1,81	12,1x10 ⁵ ± 1,63	9x10 ⁵ ±0,87
20 horas	0,80x10 ⁵ ± 1,1	8x10 ⁵ ± 0,35	7,89x10 ⁵ ±1,7

* Manitol 0,5 M (9 g/ 100 mL de CPW)

** Manitol 0,6 M (11 g/ 100 mL de CPW)

*** Manitol 0,7 M (13 g/ 100 mL de CPW)

Esses resultados divergem dos obtidos por diversos autores, os quais utilizaram o CPW 0,7 M (CPW 13) para o isolamento de protoplastos em *Passiflora* (Dornelas & Vieira, 1993; D'Utra Vaz, 1993; Dornelas et al., 1995; Otoni, 1995; Passos et al., 2004).

No entanto, resultados semelhantes foram encontrados por Matsumoto (2006), em bananeira, testando a eficiência de isolamento de protoplastos, utilizando soluções de manitol a 0,6 M e a 0,7 M. O autor concluiu que o rendimento foi aumentado quando a pré-plasmólise e a incubação eram realizadas em manitol a 0,6 M.

3.3 Efeito do sistema de incubação estacionário ou rotação orbital na eficiência do isolamento de protoplastos de tecido foliar

De acordo com os resultados obtidos (Tabela 3), o número de protoplastos isolados foi maior em sistema estacionário em relação à rotação orbital a 40 rpm. Com 10 horas de incubação em solução enzimática B com 0,6 M de manitol em sistema estacionário foi obtido o isolamento de $17,55 \times 10^5 \pm 1,56$ protoplastos por grama de tecido foliar obtido *in vitro* de pequizeiro (Tabela 3).

TABELA 3. Número de protoplastos isolados a partir da digestão enzimática de 1,0 g de tecido foliar *in vitro* de pequizeiro em incubação com agitação orbital (40 rpm) e estacionário.

Tempo de incubação	Protopl. ^a (g MF) ⁻¹ estacionário	Protopl. ^a (g MF) ⁻¹ rotacionado
5 horas	$16,54 \times 10^5 \pm 2,35$	$13,41 \times 10^5 \pm 0,67$
10 horas	$17,55 \times 10^5 \pm 1,56$	$11 \times 10^5 \pm 1,87$
15 horas	$11,36 \times 10^5 \pm 0,35$	$8 \times 10^5 \pm 1,58$
20 horas	$7,65 \times 10^5 \pm 1,74$	$3,55 \times 10^5 \pm 2,63$

- 1% (p/v) “Cellulase” Onozuka R10; 0,2% (p/v) “Macerozyme” Onozuka R10; 0,1% (p/v) “Driselase”; MES 5 mM, pH 5,6 (escuro).

Estes resultados confrontam os obtidos por Monteiro et al. (2003), os quais verificaram elevados rendimentos ao utilizarem sistema de rotação contínua (35 rpm) em condição de escuro no isolamento de protoplastos de alfafa (*Medicago sativa*). Esses autores obtiveram maiores rendimentos quando

a rotação e o recobrimento da placa de isolamento eram realizados. Silva-Junior (2007) obteve maior rendimento utilizando sistema orbital a 40 rpm para o isolamento de protoplastos de tecido foliar de bastão-do-imperador (*Etilingera elatior*).

À medida que os protoplastos vão sendo isolados, os mesmos permanecem na solução enzimática até o final do tempo de incubação. Neste período, a agitação mecânica pode causar danos à membrana plasmática, devido à sua fragilidade, rompendo-a e inviabilizando os protoplastos já isolados. Outro fator que pode ser considerado é a falta de especificidade das enzimas com relação à parede celular, a qual pode atacar também a membrana plasmática. A agitação pode ser um fator que potencializa a degradação desta, diminuindo a eficiência de isolamento.

3.4 Avaliação de diferentes concentrações de manitol na viabilidade de protoplastos

A utilização de uma concentração de manitol em meio CPW de 0,6 M tornou mais eficiente o isolamento de protoplastos viáveis em tecido foliar *in vitro* (96,7%), seguido da solução contendo 0,5 M (81,8%), conforme Tabela 4.

Uma expressiva queda na viabilidade dos protoplastos foi verificada quando utilizou-se uma concentração de 0,7 M de manitol, obtendo-se apenas 30,2% de protoplastos viáveis (Tabela 4).

Resultados divergentes foram obtidos por Monteiro et al. (2003), os quais obtiveram elevada viabilidade (78,29% a 85,61%) de protoplastos isolados de tecido foliar em diferentes cultivares de alfafa, utilizando solução de manitol a 0,7 M.

TABELA 4. Viabilidade de protoplastos isolados de tecido foliar *in vitro* de pequiizeiro, em função de três concentrações de manitol.

Manitol	Viabilidade ^b (%)
0,5 M	81,8
0,6 M	96,7
0,7 M	30,2

^b Porcentagem de protoplastos com fluorescência verde, em relação ao número de protoplastos total por campo, sob microscopia de fluorescência. Média da observação de, no mínimo, 200 protoplastos por repetição (2 repetições).

O estado fisiológico da planta pode interferir na obtenção de protoplastos viáveis, uma vez que células com maior quantidade de solutos tendem a absorver maior quantidade de água, necessitando de condicionadores osmóticos mais concentrados para estabilizar a membrana plasmática no processo de isolamento para manter a sua integridade.

O estudo da viabilidade após isolamento tem grande importância na determinação da densidade de plaqueamento a ser utilizada no cultivo de protoplastos, uma vez que essa variável influencia os processos de divisão e diferenciação celular.

3.5 Avaliação dos diâmetros de protoplastos isolados de tecido foliar

Os protoplastos isolados a partir de tecidos foliares de pequiizeiro obtidos *in vitro* apresentaram diâmetro médio de $25,19 \pm 4,75 \mu\text{m}$. Tal resultado está de acordo com o apresentado por Dornelas et al. (1995), segundo os quais o tamanho médio dos protoplastos depende da espécie analisada e do explante

utilizado, podendo variar de 19 a 47 μm , quando isolados de tecidos foliares ou de 30 a 60 μm , quando os protoplastos derivam de tecidos cotiledonares.

Silva-Junior (2007), estudando protoplastos de bastão-de-imperador (*Etilingera elatior*), obteve 36,7 μm de diâmetro médio para folha obtida *in vitro*, superior ao encontrado no mesmo tecido em pequiheiro. Kanchanapoomak et al. (2001) isolaram protoplastos de *Dendrobium pompadour*, obtendo valores muito superiores para tecido foliar com um diâmetro de protoplastos de 50 a 80 μm .

Segundo Zimmermann & Schevrich (1981), o conhecimento do diâmetro dos protoplastos é importante em trabalhos de fusão usando o método de eletrofusão, pois existe relação inversa entre o diâmetro e a voltagem necessária para a fusão dos protoplastos.

A caracterização dos protoplastos quanto ao diâmetro é um pré-requisito para o sucesso na manipulação dos mesmos no contexto da fusão e ou subsequente seleção de heterocariontes pela citometria de fluxo (Ochatt & Power, 1992). Existe, ainda, relação entre tamanho do protoplasto e sua capacidade de responder a estímulos elétricos, tanto em relação a aspectos que envolvam a transformação por absorção de DNA exógeno por eletroporação, como do incremento, pelo estímulo elétrico das respostas dos protoplastos em cultura.

4 CONCLUSÕES

A solução enzimática (B), composta por 1% (p/v) Cellulase “Onozuca R-10” (Yakult Honsha) + 0,2% (p/v) de “Macerozyme R10” (Yakult Honsha) + 0,1% (p/v) de Driselase (Sigma London Chemical Co Ltd) + 5 mM de MES, foi eficiente no isolamento de protoplastos de tecido foliar de pequiizeiro.

O meio CPW com 0,6 M de manitol em regime estacionário de incubação foi o mais eficiente no isolamento de protoplastos de tecido foliar de pequiizeiro.

Protoplastos de tecido foliar de pequiizeiro obtidos *in vitro* apresentam um diâmetro médio de $25,19 \pm 4,75$ μm em meio CPW com 0,6M de manitol.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADITYA, T. L.; BAKER D. A. Optimization of protoplast isolation from NaCl stressed primary, secondary and tertiary calli derived from mature seeds of Bangladeshi indica rice cultivar Binnatoa. **Plant Growth Regul.**, v. 41, p. 49–56, 2003.

BARROS, L. M. G.; CARNEIRO, V. T. C. Eletroporação de protoplastos. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CENARGEM, 1998. p. 37-47.

COSTA, M. A. P. C.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; MENDES, B. M. J. Isolamento e eficiência de plaqueamento de protoplastos de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 2 ago. 2002.

DOMBROSKI, J. L. D.; PAIVA, R.; CAMARGO, I. P. de. Efeito da escarificação sobre a germinação do pequiizeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 20, n. 1, p. 68-73, 1998.

D'UTRA VAZ, F. B.; SANTOS, A. V. P.; MANDERS, G.; COCKING, E. C.; DAVEY, M. R.; POWER, J. B. Plant regeneration from leaf mesophyll protoplasts of the tropical woody plant, passionfruit (*Passiflora edulis* fv. *flavicarpa* Deg.): the importance of the antibiotic cefotaxime in the culture medium. **Plant Cell Reports**, v. 12, p. 220-225, 1993.

DORNELAS, M. C.; TAVARES, F. C. A.; OLIVEIRA, J. C. de; VIEIRA, M. L. C. Plant regeneration from protoplast fusion in *Passiflora* ssp. **Plant Cell Reports**, v. 15, p. 106- 110, 1995.

DORNELAS, M. C.; VIEIRA, M. L. C. Plant regeneration from protoplasts cultures of *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deg., *P. amethystina* Mikan. and *P. cincinnata* Mast. **Plant Cell Reports**, v. 13, p. 103-106, 1993.

KANCHANAPOOMA, K.; JANTAROB, S.; RAKCHADB, D. Isolation and fusion of protoplasts from mesophyll cells of *Dendrobium pompadour*. **Science Asia**, n. 27, p. 29-34, 2001.

MATSUMOTO, K. **Suspensão celular** - focalizando a bananeira. Brasília: Embrapa, 2006. p. 24. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 126).

MIRANDA, J. de S.; SILVA, H.; MATOS, M. A. de O. Emergência e vigor de sementes de pequi submetidas a pré-tratamentos mecânicos e térmicos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 9., 1987, Campinas. **Anais...** Campinas: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1987. p. 647-651.

MONTEIRO, M.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; VALARINI, M. J.; OLIVEIRA, C. A. de; VIEIRA, M. L.C. Plant regeneration from protoplasts of alfalfa (*Medicago sativa*) via somatic embryogenesis. **Scientia Agricola**, v. 60, n. 4, p. 683-689, Oct./Dec. 2003.

OCHATT, S. J.; COCKING, E. C.; POWER, J. B. Isolation, culture and plant regeneration of colt cherry (*Prunus avium* x *pseudocerasus*) protoplasts. **Plant Science**, Amsterdam, v. 50, p. 139-143, 1987.

OCHATT, S. J.; POWER, J. B. Plant regeneration from cultured protoplasts of higher plants. In: FOWLER, M. W.; WARREN, G. S.; MOO-YOUNG, M. (Ed.). **Plant biotechnology: comprehensive biotechnology**. Oxford: Pergamon, 1992. p. 99-127.

OLIVEIRA, R. P. de et al. Isolation and growth of citrus rootstock protoplasts.

Science Agriculturae, Piracicaba, v. 52, n. 2, 1995. Disponível em:
<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90161995000200007&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 04 maio 2007.

OTONI, W. C. **Hibridização e embriogênese somática e transformação genética em espécies de *Passiflora***. 198 p. 1995. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG

PASSOS, I. R. S.; MATOS, G. V. C.; BINSFELD, P. C.; ROSALES, M. B.; SCOTT, M. D. S.; SAWASAKI, H. E.; MELETTI, L. M. M.; BERMACCI, L. C.; SIQUEIRA, W. J. Protoplasts: isolation, culture and plant regeneration in species of the genus *Passiflora*. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOLOGIA CELULAR, 12.; CONGRESSO DA SOCIEDADE IBEROAMERICANA DE BIOLOGIA CELULAR, 9., 2004, Campinas. **Anais...** Campinas: Sociedade Brasileira de Biologia Celular/Sociedade Iberoamericana de Biologia Celular, 2004.

SANTOS, B. R. et al. Micropropagation of "pequizeiro" (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 2, 2006.

SILVA JÚNIOR, J. M. **Propagação *in vitro*, obtenção de protoplastos e aspectos anatômicos da aclimatização de Bastão-do-Imperador** 2007. 113p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

WIDHOLM, J. R. The use of fluorescein diacetate and phenolsafranine for determine viability os culture plant cells. **Stain Technology**, Baltimore, v. 47, p. 198-194, 1972.

ZIMMERMANN, V.; SCHEVRICH, P. High frequency fusion of plant protoplasts by eletric fields. **Planta**, Heidelberg, v. 151, p. 26-32, 1981

CAPÍTULO IV

CULTIVO *IN VITRO* DE PEQUIZEIRO (*Caryocar brasiliense* CAMB.)

RESUMO

MARTINOTTO, Cristiano. Cultivo *in vitro* de pequiizeiro (*Caryocar brasiliense* CAMB.). In: _____. **Embriogênese somática e isolamento de protoplastos de pequiizeiro**. 2007. Cap.4, p.73-97. Tese (Doutorado em Agronomia - Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

O pequiizeiro é considerado uma espécie social, visto a importância dada por populações locais que fazem uso de seus frutos em período de produção e complementam a renda por meio do extrativismo e venda em feiras livres e à margem de estradas. Embora exista grande interesse na produção comercial do pequiizeiro, agricultores esbarram no problema da obtenção de mudas. As sementes de pequiizeiro apresentam problemas quanto à germinação, por serem dormentes e apresentarem certo grau de recalcitrância. Dessa forma, técnicas de propagação vegetativa como a cultura de tecidos pode ser aplicada na obtenção de mudas de qualidade e em quantidade. O objetivo do presente trabalho foi o estudo de aspectos do cultivo *in vitro* de pequiizeiro. Foram utilizados como explantes brotações obtidas *in vitro* com cerca de 0,7 cm de comprimento. Foram testados o efeito do meio WPM líquido e o meio WPM sólido, luz e escuro, combinações entre diferentes concentrações BAP (0; 0,5; 1 e 2 mg L⁻¹) e ANA (0; 0,5; 1; 2; 4 e 8 mg L⁻¹), no escuro. Também foram testadas diferentes combinações entre cinetina (0; 0,5 e 1 mg L⁻¹) e picloran (0; 0,5; 1; 2; 4 e 8 mg L⁻¹), no escuro. Aos 45 dias de cultivo, foram avaliados número de folhas, número de brotações, comprimento médio das três maiores brotações, número de raízes e tamanho da maior raiz. Foi realizado, ainda, estudo anatômico foliar no cultivo em meio líquido e sólido e massa fresca e massa seca. O cultivo em meio líquido apresentou maior número de folhas (3,74), comprimento médio das três maiores brotações (9,45 mm), massa fresca (1,23 g) e massa seca (0,15 g) do que o meio sólido. Folhas obtidas em meio sólido foram mais espessas do que em meio líquido. A ausência de luz promoveu um maior comprimento médio das brotações (10,72 mm). A melhor concentração de ANA/BAP para número de brotações foi 0/1 mg L⁻¹ (13,3 brotações). Para tamanho médio das três maiores brotações, a melhor concentração foi 0/0,5 mg L⁻¹ (22,94 mm). Para número de raízes e maior comprimento médio de raiz 1/0 mg L⁻¹ (28,07 raízes e 29,07 mm). Para a combinação de cinetina/picloran, a melhor concentração para número de brotações foi 1/0 mg L⁻¹ (9,07 brotações) e, para tamanho médio das três maiores brotações, 0,5/0 mg L⁻¹ (21,96 mm). Não foi obtida indução de raízes com cinetina e picloran.

Comitê Orientador: Prof. Dr. Renato Paiva - UFLA (Orientador); Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro.

ABSTRACT

MARTINOTTO, Cristiano. *In vitro* cultivation of *Caryocar brasiliense* CAMB. In: _____. **Somatic embryogenesis and protoplasts isolation of *Caryocar brasiliense* CAMB.** 2007. Chap.4, p. 73-97. Thesis (Doctorate in Agronomy - Plant Physiology) - Federal University of Lavras, Lavras, MG.

The *Caryocar brasiliense* is considered a social species, due to its importance for local populations that make use of its fruits during the harvest period to complement their income. Although there is a high interest in the commercial production of *C. brasiliense*, farms have problems with the seedling production. The *C. brasiliense* seed show problems in germination due to dormancy as well as certain level of recalcitrance. In this context, techniques of vegetative propagation like tissue culture may help to obtain plantlets with high quality and in large scale. The objective of this work was to optimize aspects of the *in vitro* culture of *C. brasiliense*. Shoots obtained *in vitro* with 0.7 cm length were used as explants. The effect of liquid and solid WPM medium, absence and presence of light and combinations of different concentrations of BAP (0; 0.5; 1.0 and 2.0 mg L⁻¹) and NAA (0; 0.5; 1.0; 2.0; 4.0 and 8.0 mg L⁻¹) in the dark were tested. Different combinations between kinetin (0; 0.5 and 1.0 mg L⁻¹) and picloran (0; 0.5; 1.0; 2.0; 4.0 and 8.0 mg L⁻¹) in the absence of light were also tested. After 45 days of cultivation, the number of leaves and shoots, average length of the three largest shoots, root number and largest root size were also evaluated. An anatomical study of leaves obtained through the cultivation in liquid and solid medium as well a dry and fresh mass was also performed. The cultivation in liquid medium showed higher number of leaves (3.74), average length of the three largest shoots (9.45 mm), fresh mass (1.23 g) and dry mass (0.15 g) than the solid medium. Leaves obtained in solid medium were thicker than those obtained from liquid medium. The absence of light promoted a higher average length of shoots (10.72 mm). The best NAA/BAP concentration for number of shoots was 0/1 mg L⁻¹ (13.3 shoots). For the size of three higher shoots, the best concentration was 0/0.5 mg L⁻¹ (22.94 mm). For root number and higher average root length, the best concentration was 1/0 mg L⁻¹ (28.07 roots and 29.07 mm). For the combination of kinetin/picloran, the best concentration for shoot number was 1/0 mg L⁻¹ (9.07 shoots) and for the average size of three higher shoots was 0.5/0 mg L⁻¹ (21.96 mm). No root induction was obtained with the use of kinetin and picloran.

Guidance committee: Dr. Renato Paiva (UFLA); Dr. Evaristo Mauro de Castro (UFLA).

1 INTRODUÇÃO

O pequizeiro é uma das espécies arbóreas nativas do Cerrado brasileiro que mais tem despertado interesse do setor produtivo agrícola. Apresenta inúmeros usos, tanto de seus frutos na culinária, bem como por sua madeira de ótima qualidade, propriedades medicinais, curtume, paisagística e melífera (Santos et al., 2006). É uma espécie social, visto a importância dada por populações locais que fazem uso no período de produção e complementam a renda por meio do extrativismo, vendendo seus frutos em feiras livres e margens de estradas.

Porém, nas últimas décadas, tem sofrido considerável redução de sua população natural, devido, principalmente, à ocupação do Cerrado pelo setor agrícola, incorporando extensas áreas da região de ocorrência natural desta espécie. Isto, aliado à baixa regeneração natural da espécie, tem colocado o pequizeiro na lista de espécies ameaçadas, sendo criadas, até mesmo, leis de proteção contra o corte desta espécie (Werneck, 2001).

Embora exista grande interesse na produção comercial do pequizeiro, agricultores esbarram no problema da obtenção de mudas. As sementes de pequizeiro apresentam problemas quanto à sua germinação, por serem dormentes (Dombroski et al., 1998).

Dessa forma, técnicas de cultura de tecidos se tornam úteis, permitindo, por meio da micropropagação, a produção de grande quantidade de mudas em pequeno intervalo de tempo e, ainda, a seleção de plantas elite e fixação de características desejáveis, sem ter que passar por técnicas demoradas de melhoramento genético clássico de espécies.

A cultura de tecido se baseia no princípio da totipotência celular vegetal, em que, potencialmente, qualquer célula nucleada possui, em determinadas condições de cultivo, a capacidade de regenerar uma planta adulta. Tais

condições variam de espécie para espécie, bem como em função do tipo de tecido celular utilizado como explante e do grau de diferenciação celular. O sucesso da micropropagação depende de um balanço hormonal interno que propicie o redirecionamento da rota de crescimento estabelecida, a fim de se obter os resultados desejados (Kerbaui, 1998). Os fitorreguladores, neste sentido, são essenciais na obtenção de mudas micropropagadas, sendo necessário o estudo do efeito destes nos padrões de desenvolvimento de espécies de interesse.

As auxinas e citocininas são as classes de reguladores mais utilizadas na cultura de tecidos, a formação de raízes, parte aérea e calos é regulada pela disponibilidade e interação entre estas duas classes de reguladores de crescimento (Skoog & Miller, 1967). O sinergismo entre auxinas e citocininas é crítico para o controle da morfogênese *in vitro*, em que um balanço favorecendo a auxina tende a formar raízes em detrimento de gemas, sendo o contrário observado quando as citocininas estão em maior quantidade no meio de cultura, favorecendo a formação de gemas. Quando ocorre um balanço equilibrado entre as duas classes, ocorre a formação de calos (Santana, 2003).

Quanto às condições de cultivo, a luz é um dos principais componentes do ambiente a influenciarem o desenvolvimento de culturas *in vitro*. Exerce grande influência no metabolismo das células e efeito morfogenético no desenvolvimento da planta *in vitro* (Ammirato, 1986).

O presente trabalho teve por objetivo estudar o efeito de fitorreguladores sobre os padrões de desenvolvimento de brotações de pequi em função de diferentes combinações de citocininas, auxinas e condições de cultivo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de

Tecidos de Plantas, no Setor de Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia, da Universidade Federal de Lavras.

2.1 Material vegetal

Foram utilizados, como explantes iniciais, brotações de pequiheiro de aproximadamente 0,7 cm, obtidas do cultivo *in vitro* de segmentos caulinares (Santos et al., 2006) provenientes de sementes germinadas *in vitro* em meio WPM (Lloyd & McCown, 1980).

2.2 Efeito do meio líquido e sólido no cultivo *in vitro* de pequiheiro

Para avaliar o efeito do cultivo *in vitro* do pequiheiro em meio líquido e na presença de agar, foi utilizado o meio WPM com 0,75 mg L⁻¹ de BAP e 0,05 mg L⁻¹ de ANA, acrescido de 3% de sacarose e 400 mg L⁻¹ de PVP. Após o ajuste de pH para 5,8, os meios foram esterilizados por autoclavagem a 120°C, por 20 minutos. Após a inoculação em câmara de fluxo laminar, os explantes foram mantidos em sala de crescimento à temperatura de 26±1°C, com fotoperíodo de 16 horas, à densidade de fluxo de fótons de 30 µmol m⁻² s⁻¹. Para o meio sólido, foram utilizados 15 mL de meio solidificado com ágar (0,6%) em tubos de ensaio (25 mm Φ x 150 mm) e, para o meio líquido, foram utilizados 15 mL de meio líquido em frascos de 300 mL em agitador orbital, a 90 rpm.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com dois tratamentos (meio sólido e meio líquido), sendo cada um composto por 32 repetições. Aos 45 dias de cultivo, foram avaliados número de folhas, número de gemas, tamanho médio das três maiores brotações, massa fresca e massa seca e realizado estudo anatômico das folhas obtidas.

2.2.1 Estudo anatômico foliar

Folhas de cada tratamento foram coletadas e fixadas em álcool 70%,

sendo posteriormente desidratadas e emblocadas em parafina, segundo metodologia de Johansen (1940). Foram realizados cortes histológicos transversais da porção mediana da folha na espessura de 12 a 15 μm com auxílio de um micrótomo de mesa. Usou-se a coloração safra-blau e montagem em resina sintética. Após preparo das lâminas, os cortes foram fotografados com câmara fotográfica digital (Canon PowerShot A710) acoplada a um microscópio, sendo realizadas as medições da espessura das epidermes e mesofilo foliar com o auxílio do software Sigma Scan Pro 5[®] após calibração. Foram avaliados 40 cortes transversais de cada tratamento. Os dados foram analisados pelo teste de Scott-Knott (1974), a 5 % de probabilidade, com auxílio do software estatístico Sisvar[®] (Ferreira, 2000).

2.3 Efeito da luminosidade no cultivo *in vitro* de pequi

Para avaliar o cultivo *in vitro* do pequi na presença e na ausência de luz foi utilizado o meio WPM com 0,75 mg L⁻¹ de BAP e 0,05 mg L⁻¹ de ANA, acrescido de 3% de sacarose e 400 mg L⁻¹ de PVP. Após o ajuste do pH a 5,8, os meios foram esterilizados por autoclavagem, a 120°C, por 20 minutos.

Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento à temperatura de 26 \pm 1°C e, nos tratamentos na luz, fotoperíodo de 16 horas a uma densidade de fluxo de fótons de 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 2 tratamentos (cultivo sob luz e escuro), sendo cada um composto por 32 repetições. Aos 45 dias de cultivo, foram avaliados número de folhas, número de gemas, tamanho da maior brotação, massa fresca e massa seca. Os dados foram analisados pelo teste de Scott-Knott (1974), a 5 % de probabilidade, com auxílio do software estatístico SISVAR[®] (Ferreira, 2000).

2.4 Efeito da interação BAP e ANA no cultivo *in vitro* de pequi

Para verificar o efeito da interação entre BAP e o ANA, foi utilizado o meio de cultivo WPM acrescido de 6 g L⁻¹ de ágar, 400 mg L⁻¹ de PVP, 3% de sacarose e diferentes concentrações de BAP (0; 0,5; 1 e 2 mg L⁻¹) e ANA (0; 0,5; 1; 2; 4 e 8 mg L⁻¹).

Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio (25 mm Φ x 150 mm) contendo 15 mL de meio, sendo o pH do meio de cultivo ajustado para 5,8, sendo posteriormente autoclavado a 121°C, por 20 minutos.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 24 tratamentos compostos por 15 repetições cada um. Após a inoculação, os tubos foram mantidos em sala de crescimento à temperatura de 25°C±2, no escuro.

Aos 45 dias de cultivo, foram avaliados o número de brotações >3 mm, o comprimento médio das três maiores brotações, o número de raízes e o comprimento da maior raiz.

Os dados foram analisados pelo teste de Scott-Knott (1974), a 5% de probabilidade, com auxílio do software estatístico SISVAR[®] (Ferreira, 2000).

2.5 Efeito da interação cinetina e picloran no cultivo *in vitro* de pequi

Para verificar o efeito da interação entre a cinetina e o picloran, foi utilizado o meio de cultivo WPM acrescido de 6 g L⁻¹ de ágar, 400 mg L⁻¹ de PVP, 3% de sacarose e combinações de diferentes concentrações de cinetina (0; 0,5 e 1,0 mg L⁻¹) e picloran (0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 mg L⁻¹). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 18 tratamentos compostos por 15 repetições.

Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio (25 mm Φ x 150 mm) contendo 15 mL de meio, sendo o pH do meio de cultivo ajustado para 5,8 e, posteriormente, autoclavados a 121°C, por 20 minutos.

Após a inoculação, os tubos foram mantidos em sala de crescimento à

temperatura de 25°C±2, no escuro.

Aos 45 dias de cultivo, foram avaliados o número de brotações >3 mm, o comprimento médio das três maiores brotações, o número de raízes e o comprimento da maior raiz. Os dados foram analisados pelo teste de Scott-Knott (1974), a 5 % de probabilidade, com auxílio do software estatístico SISVAR® (Ferreira, 2000).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito do meio líquido e sólido no cultivo *in vitro* de pequizeiro

De acordo com a análise de variância dos dados avaliados, foi constatada, com exceção do número de gemas, diferença significativa para todas as características avaliadas (Tabelas de 3 a 7, em anexo).

O cultivo em meio líquido foi o que proporcionou melhor desenvolvimento aos explantes, ao considerar o número de folhas, comprimento médio das três maiores brotações, massa fresca e massa seca, cujos valores chegaram a 98%, 75%, 83% e 150% maiores, respectivamente (Figura 2).

O cultivo em meio líquido proporcionou um melhor desenvolvimento das folhas, as quais se apresentaram mais expandidas que as formadas em meio sólido (Figura 3). A presença de folhas é de grande importância no período de aclimatização, pois é fonte de auxina, favorecendo maior formação de novas raízes, muito importante para o estabelecimento das plântulas *ex vitro*. Além da auxina, a qual é translocada para a base da plântula, permite a produção de carboidratos por meio da fotossíntese pela planta, tornando as mudas mais vigorosas (Hartmann et al., 1990).

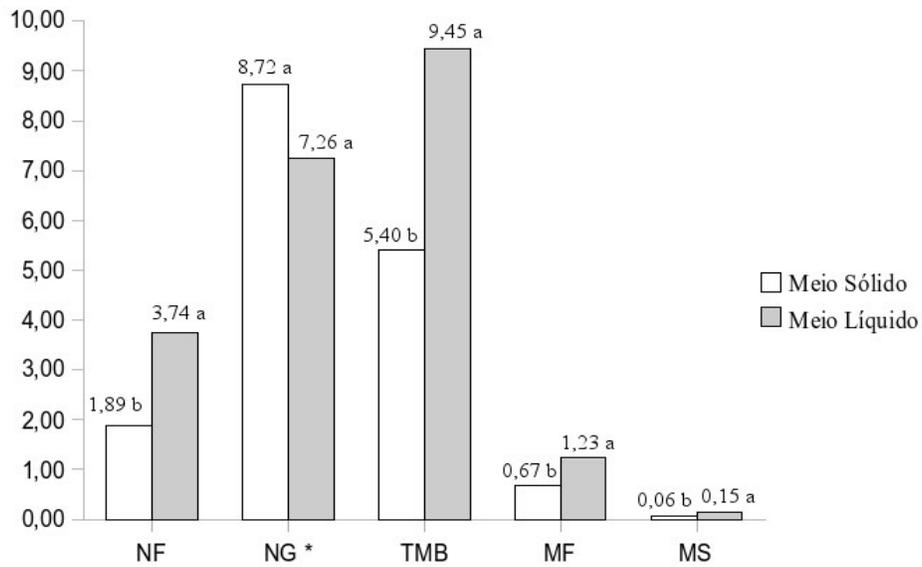


FIGURA 2. Valores médios das características avaliadas aos 45 dias de cultivo. NF - número de folhas; NG - número de gemas (*não significativo); TMB - tamanho médio das três maiores brotações; MF - massa fresca; MS - massa seca.

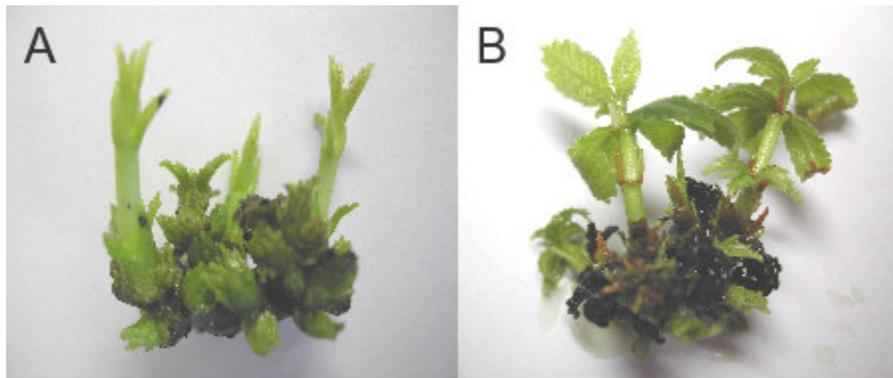


FIGURA 3. Brotações obtidas em meio sólido (A) e brotações obtidas em meio líquido (B). UFLA, Lavras, MG, 2007.

3.1.1 Estudo anatômico foliar

De acordo com as análises estatísticas realizadas nos dados de medidas de espessura, todas as características avaliadas apresentaram diferença significativa a 1%, pelo teste de F (Tabelas 8, 9 e 10, em anexo).

Folhas formadas em cultivo em meio sólido apresentaram maior espessura tanto das epidermes quanto do parênquima fundamental, o qual apresentou, em média, uma espessura cerca de duas vezes maior do que o cultivado em meio líquido (Figuras 4 e 5).

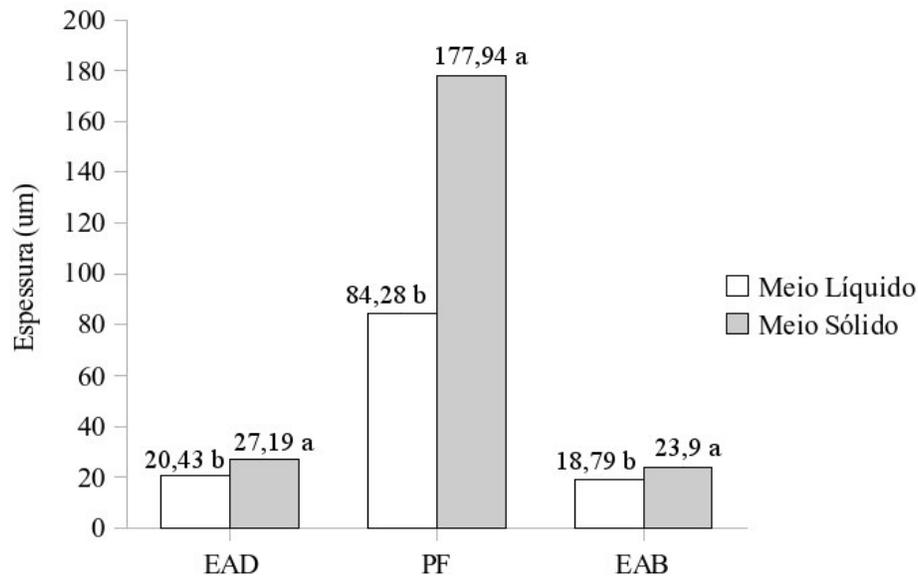


FIGURA 4. Espessura média foliar avaliada aos 45 dias de cultivo. EAD - espessura da epiderme adaxial; PF - espessura do parênquima fundamental; EAB - espessura da epiderme abaxial.

De acordo com Wright et al. (2004), uma alta relação massa/área foliar (folhas mais espessas) está associada a estratégias de crescimento lento, geralmente encontradas em plantas que vivem sob condições de menor disponibilidade de recursos, tais como ambientes sombreados ou com baixa

disponibilidade de nutrientes. Isso está de acordo com os dados encontrados, uma vez que a difusão de nutrientes em meio de cultura sólido é menor do que em meio de cultivo líquido, além de que, em meio de cultura líquido, o maior contato com o explante favorece a absorção de nutrientes.

De acordo com a Figura 5, observa-se que folhas desenvolvidas em meio sólido apresentam uma maior desorganização em seus tecidos.

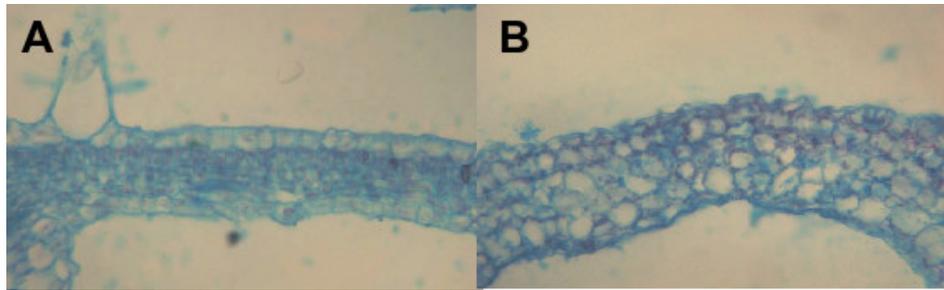


FIGURA 5. Fotomicrografias dos cortes anatômicos realizados na porção mediana do limbo foliar. A - Meio de cultura líquido; B - Meio de cultura solidificado com 0,6% de ágar. UFLA, Lavras, MG, 2007.

3.2 Efeito da luminosidade no cultivo *in vitro* de pequi

De acordo com a análise estatística dos dados avaliados, apenas o caráter comprimento médio das três maiores brotações apresentou diferença estatística significativa pelo teste de F a 1% de probabilidade (Tabela 11, em anexo).

Brotações obtidas do cultivo no escuro apresentaram média de 10,7 mm de comprimento enquanto que, para o cultivo na luz, obteve-se uma média de 5,4 mm de comprimento (Figura 6).

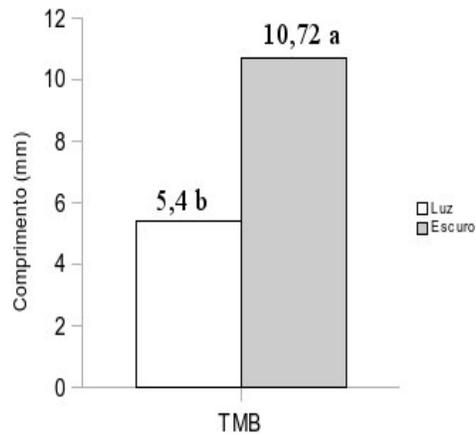


FIGURA 6. Tamanho médio das três maiores brotações (TMB), aos 45 dias de cultivo.

As brotações obtidas na ausência de luz apresentaram-se maiores em comprimento e com pouca pigmentação (Figura 7), resultado de um processo de estiolamento. Santos (2006), cultivando segmentos nodais de pequiheiro no escuro obteve brotações com 28,13 mm de comprimento médio, utilizando 0,05 mg L⁻¹ de ANA e 0,75 mg L⁻¹ de BAP.



FIGURA 7. Brotações obtidas na presença de luz (A) e na ausência de luz (B). UFLA, Lavras, MG, 2007.

O estiolamento é o desenvolvimento de brotos, ramos ou partes desses, decorrente da ausência de luz, o que causa o crescimento, geralmente alongado e com coloração amarela ou branca (Hartmann & Kester, 1990). Brotações estioladas podem apresentar maior capacidade de enraizamento, por apresentarem uma menor lignificação de seus tecidos e uma maior concentração de auxinas, devido à maior estabilidade de sua estrutura química e maior eficiência nos processos de diferenciação e crescimento celular (Tais & Zeiger, 2004).

3.3 Efeito da interação BAP e ANA no cultivo *in vitro* de pequi

De acordo com a análise de variância realizada, houve diferença significativa, a 5%, pelo teste de F para o número de brotações e comprimento médio das três maiores brotações (Tabelas 12 e 13, em anexo).

Os melhores resultados obtidos para número de brotações foram com os tratamentos 0/1, 1/1, 0/2, 0,5/1 e 0,5/2 (ANA/BAP mg L⁻¹) com 13,3, 12,2, 11,9, 11,7 e 10,5 brotações por explante, respectivamente, os quais não diferiram estatisticamente entre si (Figura 8).

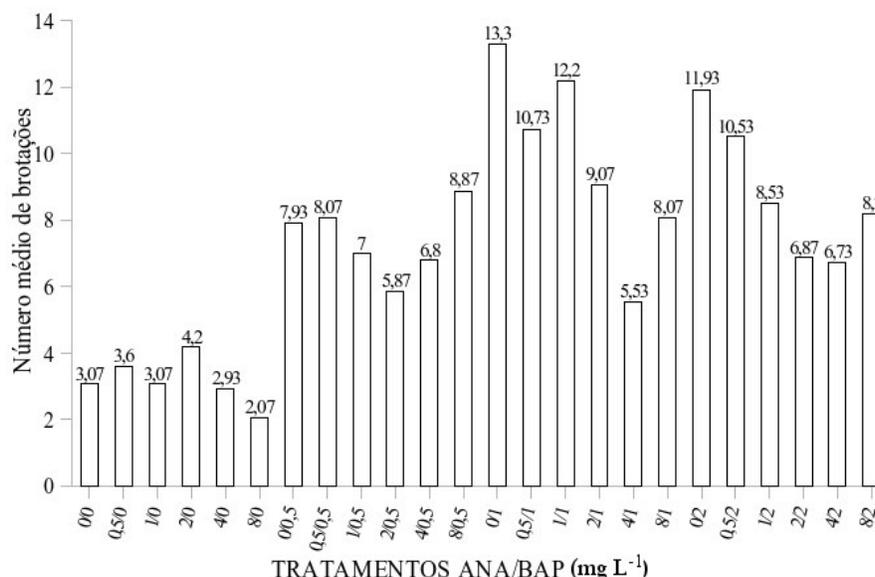


FIGURA 8. Número médio de brotações, em função do BAP e ANA, aos 45 dias de cultivo no escuro.

Estes resultados mostram-se bem superiores aos obtidos por Santos et al. (2006), também com pequi, os quais obtiveram seis brotações por explante, utilizando 0,75 mg L⁻¹ de BAP e 0,05 mg L⁻¹ de ANA, cultivado na presença de luz. Esta diferença também pode estar associada à origem do explante, uma vez que os autores utilizaram brotações de plântulas germinadas *in vitro*, enquanto que, neste trabalho, foram utilizadas brotações obtidas pelo protocolo desenvolvido por Santos et al. (2006). Maran et al. (2004) obtiveram maior biomassa seca e fresca de parte aérea e de raiz e maior área foliar na micropropagação do morangueiro à medida que foi subcultivado *in vitro*, indicando que plantas estabelecidas por maior tempo *in vitro* respondem diferenciadamente em relação às plantas recém-estabelecidas.

Para o comprimento médio das três maiores brotações, o melhor resultado foi obtido pelo tratamento composto por 0/0,5 mg L⁻¹ de ANA/BAP, com 22,9 mm de comprimento seguido de 0/1 mg L⁻¹ de ANA/BAP com

16,2mm, os quais diferiram significativamente entre si (Figura 9). No melhor tratamento, a média das três maiores brotações foi cerca de duas vezes maior do que o melhor tratamento obtido por Santos et al. (2006) na mesma espécie, utilizando cultivo na presença de luz. Tal resultado observado pode, provavelmente, ser devido ao estiolamento das brotações obtidas no presente experimento (Figura 10).

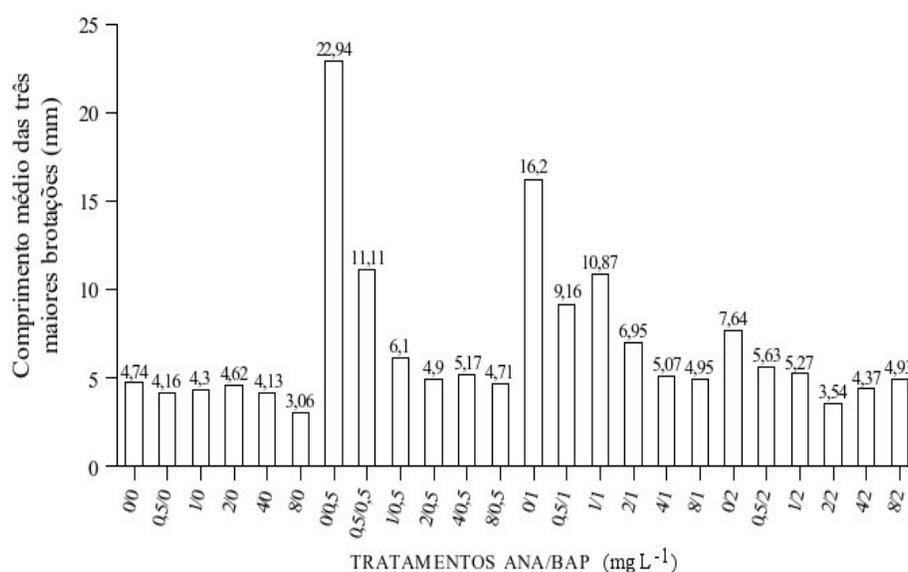


FIGURA 9. Comprimento médio das três maiores brotações por explante.

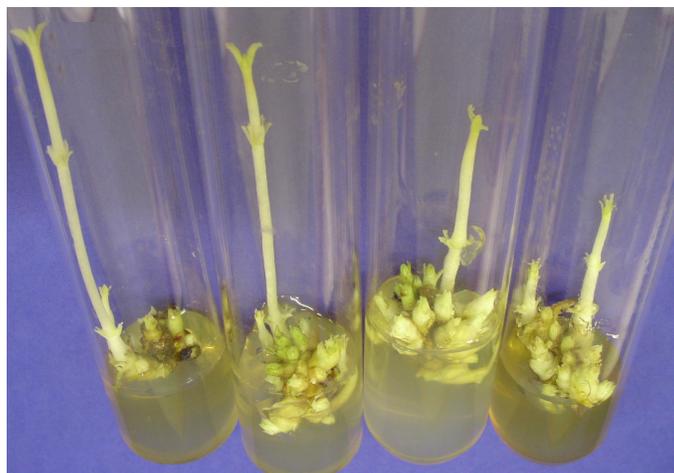


FIGURA 10. Brotações obtidas durante o experimento. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Além do fator fonte do explante citado anteriormente, pode-se inferir que o cultivo no escuro proporcionou maior crescimento em altura no cultivo *in vitro* de pequiizeiro, em função do estiolamento das brotações. O estiolamento pode ser útil na micropropagação de plantas, proporcionando maior quantidade de explantes e maior taxa de multiplicação entre repicagens (Kiss et al., 1995).

Quanto ao número de raízes e tamanho da maior raiz, a análise de variância demonstrou que houve diferença estatística significativa para as duas características avaliadas (Tabelas 14 e 15, em anexo).

Os melhores tratamentos para número médio de raízes foi o composto por 1/0 (28,07 raízes) e 2/0 mg L⁻¹ (24,67 raízes) de ANA/BAP seguidos de 0,5/0 (20,93 raízes) e 4/0 mg L⁻¹ (20,33 raízes) de ANA/BAP. Os resultados demonstram que, quanto menor a concentração de BAP no meio de cultura, maior o número de raízes e que, na ausência de ANA, apenas houve pouca formação de raízes (0,27 raízes por explante) na ausência de BAP (Figura 11). Santos et al. (2006) relatam média de 12,87 raízes por brotação usando 3 mg L⁻¹ de AIB.

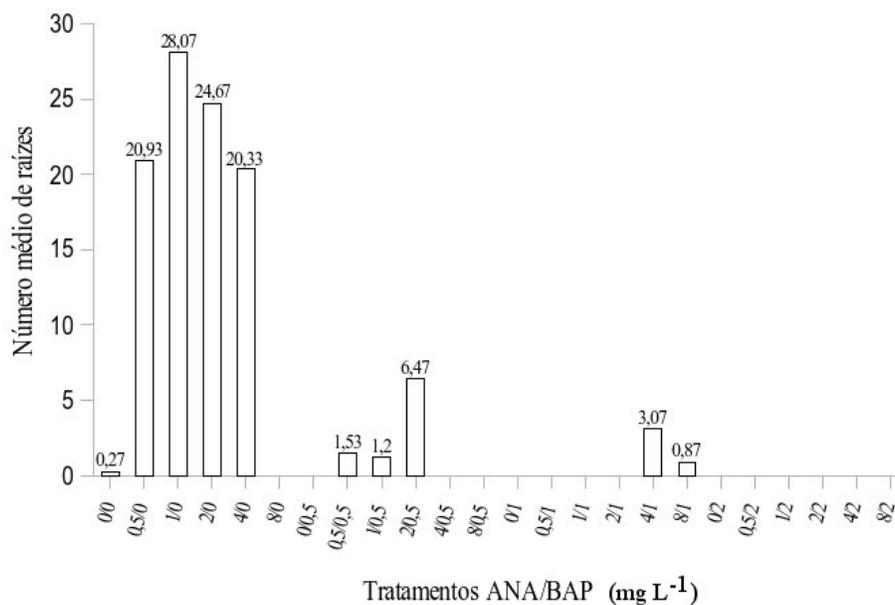


FIGURA 11. Número médio de raízes em função do BAP e ANA, avaliado aos 45 dias de cultivo.

No que diz respeito ao comprimento médio da maior raiz, destacam-se os tratamentos compostos por 1/0 e 0,5/0 mg L⁻¹ de ANA/BAP seguidos de 2/0 mg L⁻¹ de ANA/BAP com, respectivamente, 29,0; 27,5 e 16,7 mm de comprimento (Figura 12). De acordo com os dados avaliados, quanto menor a concentração de BAP em meio de cultura, maior o comprimento das raízes. As raízes obtidas apresentaram coloração clara e com várias raízes secundárias (Figura 13).

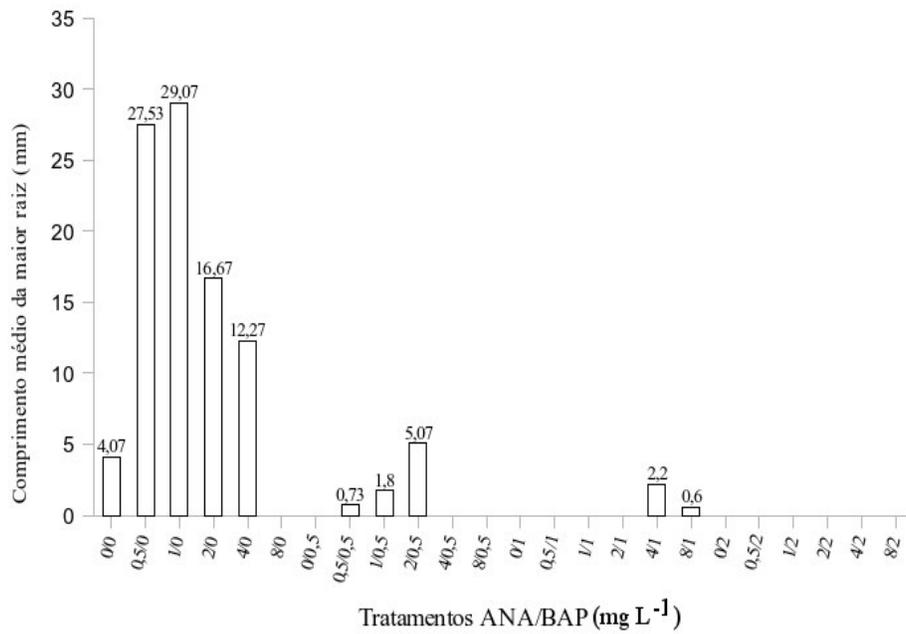


FIGURA 12. Comprimento médio da maior raiz em função do ANA e BAP, aos 45 dias de cultivo no escuro.

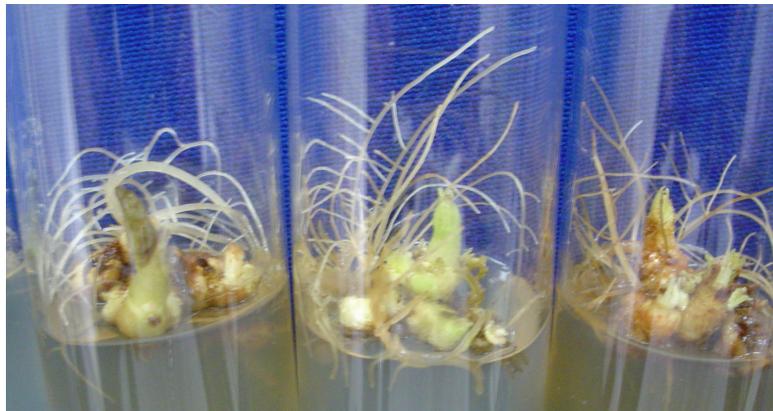


FIGURA 13. Raízes obtidas no cultivo *in vitro* utilizando 1 mg L⁻¹ de ANA no meio de cultura, aos 45 dias de cultivo. UFLA, Lavras, MG, 2007.

3.4 Efeito da interação cinetina e picloran no cultivo *in vitro* de pequizeiro

De acordo com a análise de variância realizada, houve diferença significativa entre os tratamentos utilizados, tanto para média das três maiores brotações quanto para número de brotações (Tabelas 16 e 17, em anexo).

Para a indução de brotações, verificou-se que o tratamento composto por 1,0 mg L⁻¹ cinetina foi o mais eficiente, apresentando, em média, 9,07 brotações por explante, seguido de 0,5 mg L⁻¹ de cinetina e 1,0 mg L⁻¹ de cinetina + 0,5 mg L⁻¹ de picloran com 5 e 4,07 brotações por explante, em média, respectivamente (Figura 14). Fráguas (2003) também obteve maior comprimento de brotações em figueira utilizando a concentração de 0,5 mg L⁻¹ de cinetina. Nicioli (2006), estudando a cinetina em interação com outras auxinas, verificou que esta foi essencial à proliferação de brotações em barbatimão, sendo a melhor concentração 5,0 mg L⁻¹ de cinetina, obtendo, em média, 3 brotos por explante. Aumento na produção de brotos de *Salix humboldtiana* foi possível utilizando 0,5 mg.L⁻¹ de cinetina (Pereira et al., 2000).

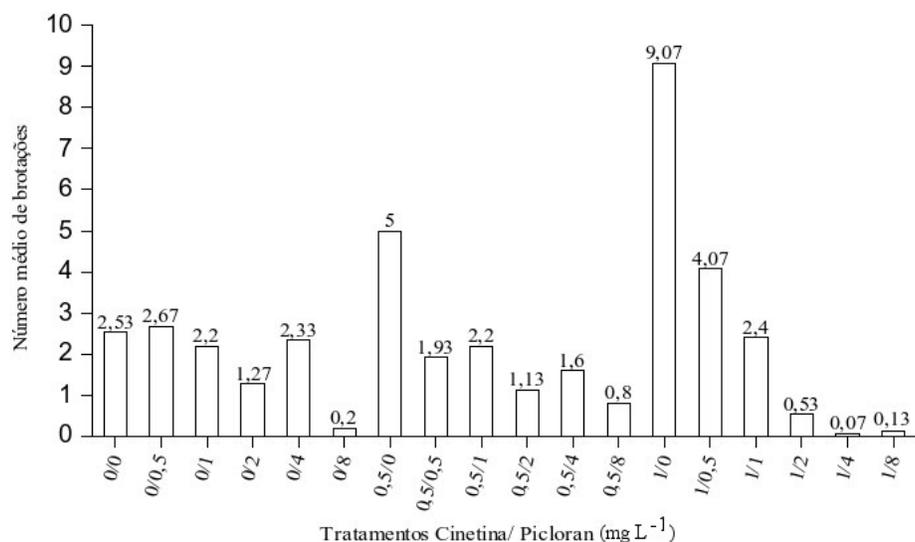


FIGURA 14. Número médio de brotações por explante em função da cinetina e picloran, aos 45 dias de cultivo no escuro.

Considerando o comprimento médio das três maiores brotações, verificou-se que o melhor tratamento foi o meio de cultivo contendo 0,5 mg L⁻¹ de cinetina, com 21,96 mm de comprimento, seguido de 1,0 mg L⁻¹ cinetina, com um comprimento médio de 11,67 mm (Figura 15). Os tratamentos que continham picloran, mesmo em quantidades mínimas, promoveram reduções no tamanho das brotações, não ultrapassando os 3,33 mm de comprimento. Fráguas (2003) encontrou resultados próximos a este (5,2 mm) ao empregar meio contendo 0,5 mg L⁻¹ de picloran.

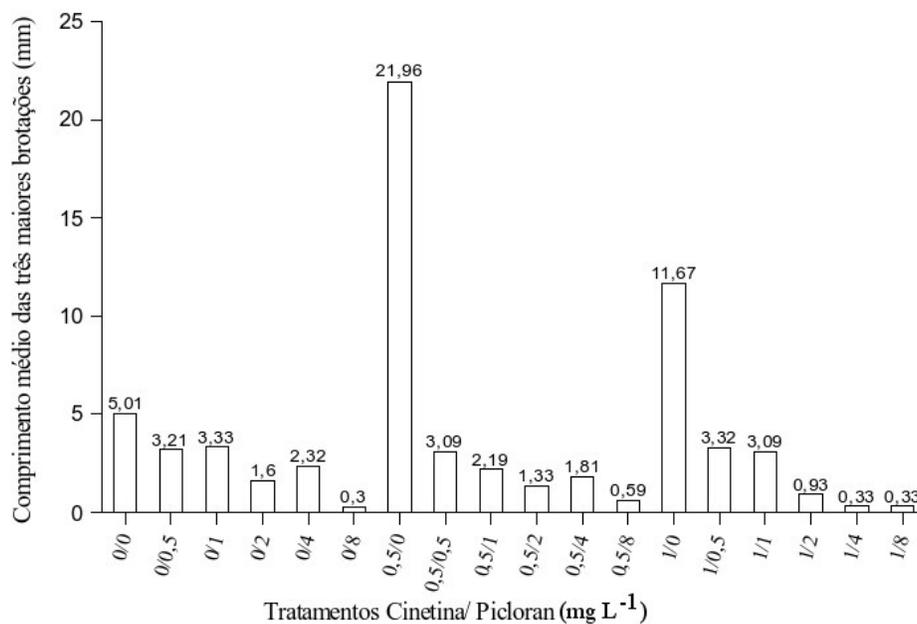


FIGURA 15. Comprimento médio das três maiores brotações, em função da cinetina e picloran, aos 45 dias de cultivo no escuro.

No presente experimento não houve indução e desenvolvimento de raízes.

4 CONCLUSÕES

O cultivo em meio líquido foi superior ao cultivo em meio sólido quanto ao número de folhas, comprimento médio das três maiores brotações, massa fresca e massa seca.

Folhas desenvolvidas em cultivo com meio sólido são mais espessas em relação às desenvolvidas em cultivo com meio líquido.

O cultivo na ausência de luz proporcionou maior comprimento de brotações.

A presença de BAP no meio de cultura causou redução na formação de raízes.

O picloran não foi eficiente na indução de raízes em pequiheiro nas concentrações utilizadas, tendo efeito prejudicial ou inibitório no comprimento das brotações.

O ácido naftaleno acético (ANA) foi essencial para a indução de raízes.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMMIRATO, P. V. Control and expression of morphogenesis in culture. In: WITHERS, L. A.; ALDERSON, P. G. (Ed.). **Plant tissue culture and its agricultural applications**. London: Butterworths, 1986. p. 23-45.

DOMBROSKI, J. L. D.; PAIVA, R.; CAMARGO, I. P. de. Efeito da escarificação sobre a germinação do pequiheiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 20, n. 1, p. 68-73, 1998.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: 45ª Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos, SP, UFSCar, 2000. p. 255-258.

FRÁGUAS, C. B. **Micropropagação e aspectos da anatomia foliar da figueira ‘Roxo-de-Valinhos’ e diferentes ambientes.** 2003. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

HARTMANN, H. T. et al. **Plant propagation: principles and practices.** New Jersey : Prentice Hall, 1990. 647 p.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E. **Propagacion de plantas- principios y practicas.** México, D.C.: Continental, 1990. 760 p.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique.** New York: McGraw-Hill, 1940.

KERBAUY, G. B. Competência e determinação celular em culturas de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A. L.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília, DF: ASCTP/Embrapa-CNPq, 1998. v. 2, p. 519-531.

KISS, E.; KISS, J.; GYULAI, G.; HESZKY, L.E. A novel method for rapid micropropagation of pineapple. **Hort Science**, Alexandria, v. 30, n. 1, p. 127-129, 1995.

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

MARAN, R.; CALVETE, E. O.; GOMIDE, D. G.; GRANDO, M. F.; SUZIN, M. Influência do número de subcultivos no meio de multiplicação em plantas micropropagadas de morangueiro. In: MOSTRA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO, 14., 2004, Passo Fundo. **Anais...** Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo, 2004.

NICOLI, P. M. **Micropropagação e aspectos fitoquímicos de calos de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] – Fabaceae.** 2006. Dissertação (Mestrado em Agronomia. Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PEREIRA, A. M. S.; BERTONI, B. W.; MORAES, R. M.; FRANCA, S. C. Micropropagation of *Salix humboldtiana* Hild. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 2, n. 2, p. 17-21, 2000.

SANTANA, J. R. F. **Controle da morfogênese *in vitro* em algumas espécies**

de annonaceae. 2003. 237 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2003.

SANTOS, B. R. et al. Micropropagation of "pequizeiro" (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 2, 2006.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A. Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Washington, v. 30, p. 507-512, Sept. 1974.

SKOOG, F.; MILLER, C. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, Heidelberg, v.11, p. 118-131, 1967.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004.

WERNECK, G. Minas deve escolher o pequizeiro. **Jornal Estado de Minas**, Belo Horizonte, 16 out. 2001.

WRIGHT, I. J.; REICH, P. B.; WESTOBY, M.; ACKERLY, D. D.; BARUCH, Z.; BONGERS, F.; CAVENDER-BARES, J.; CHAPIN, T.; CORNELISSEN, J. H. C.; DIEMER, M.; FLEXAS, J.; GARNIER, E.; GROOM, P. K.; GULIAS, J.; HIKOSAKA, K.; LAMONT, B. B.; LEE, T.; LEE, W.; LUSK, C.; MIDGLEY, J. J.; NAVAS, M.; NIINEMETS, U.; OLEKSYN, J.; OSADA, N.; POORTER, H.; POOT, P.; PRIOR, L.; PYANKOV, V. I.; ROUMET, C.; THOMAS, S.C.; TJOELKER, M.G.; VENEKLAAS, E. J.; VILLAR, R. The worldwide leaf economics spectrum. **Nature**, v. 428, p. 822-828, 2004.

ANEXOS

TABELAS

TABELA 1. Teste de Kruskal-Wallis para tamanho de calos (notas de 1 a 5), em função do 2,4-D x sacarose em subcultivo.

Kruskal-Wallis rank sum test		
data: notas		
chi-squared = 176,9691,	df = 1	p-value < 2,2e-16

TABELA 2. Teste de Kruskal-Wallis para tamanho de calos (notas de 1 a 5), em função do 2,4-D x 2-ip.

Kruskal-Wallis rank sum test		
data: notas		
Chi-squared = 13,9067,	df = 4,	p-value = 0,007599

TABELA 3. Análise de variância para número de folhas.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
MEIO	1	55,074952	55,074952	14,415	0,0003 **
erro	62	236,877984	3,820613		
Total corrigido	63	291,952936			
CV (%) =	69,49				
Média geral:	2,8129687				

** Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste de F.

TABELA 4. Análise de variância para número de gemas.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
MEIO	1	34,266389	34,266389	2,446	0,1229 ns.
erro	62	868,703297	14,011343		
Total corrigido	63	902,969686			
CV (%) =	46,85				
Média geral:	7,9895313				

ns – não significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste de F.

TABELA 5. Análise de variância para dados de tamanho médio das três maiores brotações.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
MEIO	1	262,723577	262,723577	36,920	0,0000 **
erro	62	441,189497	7,115960		
Total corrigido	63	703,913073			
CV (%) =	35,92				
Média geral:	7,4264063				

** Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste de F.

TABELA 6. Análise de variância para dados de massa fresca.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
MEIO	1	5,017600	5,017600	35,758	0,0000 **
erro	62	8,699900	0,140321		
Total corrigido	63	13,717500			
CV (%) =	39,28				
Média geral:	0,95				

** Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste de F.

TABELA 7. Análise de variância para dados de massa seca.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
MEIO	1	0,132314	0,132314	166,621	0,0000 **
erro	62	0,049234	0,000794		
Total corrigido	63	0,181548			
CV (%) =	26,18				
Média geral:	0,108				

** Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste de F.

TABELA 8. Análise de variância para dados de espessura de epiderme adaxial.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	1	912,938281	912,938281	43,477	0,0000**
erro	78	1637,852987	20,998115		
Total corrigido	79	2550,791269			
CV (%) =	19,25				
Média geral:	23,81				

** Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste de F.

TABELA 9. Análise de variância para dados de espessura de parênquima fundamental.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	1	175416,751651	175416,751651	214,545	0,0000**
erro	78	63774,499218	817,621785		
Total corrigido	79	239191,250869			
CV (%) =	21,81				
Média geral:	131,1106250				

** Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste de F.

TABELA 10. Análise de variância para dados de espessura de epiderme abaxial.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	1	522,548645	522,548645	23,963	0,0000 **
erro	78	1700,918150	21,806643		
Total corrigido	9	2223,466795			
CV (%) =	21,88				
Média geral:	21,3422500				

** Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste de F.

TABELA 11. Análise de variância para dados de tamanho médio das três maiores brotações.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
LUZ	1	452,944806	452,944806	21,301	0,0000**
erro	62	1318,360169	21,263874		
Total corrigido	63	1771,304975			
CV (%) =	57,21				
Média geral:	8,0606250				

** Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste de F.

TABELA 12. Análise de variância para dados de número de brotações.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	24	3614,255556	150,593981	9,617	0,0000**
erro	330	5167,592332	15,659371		
Total corrigido	354	8781,847887			
CV (%) =	55,26				
Média geral:	7,1605634				

** Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste de F.

TABELA 13. Análise de variância para dados de média de comprimento das três maiores brotações.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	24	7341,442000	305,893417	12,577	0,0000**
erro	330	8026,076479	24,321444		
Total corrigido	354	15367,518479			
CV (%) =	71,64				
Média geral:	6,8839437				

** Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste de F.

TABELA 14. Análise de variância para dados de número de raízes.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	23	27345,775000	1188,946739	37,702	0,0000**
erro	336	10596,000000	31,535714		
Total corrigido	359	37941,775000			
CV (%) =	125,49				
Média geral:	4,4750000				

** Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste de F.

TABELA 15. Análise de variância para dados de comprimento da maior raiz.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	23	24985,866667	1086,342029	43,370	0,0000**
erro	336	8416,133333	25,048016		
Total corrigido	359	33402,000000			
CV (%) =	120,12				
Média geral:	4,1666667				

** Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste de F.

TABELA 16. Análise de variância para dados de número de brotações.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	17	59,389368	3,493492	10,391	0,0000**
erro	252	84,720043	0,336191		
Total corrigido	269	144,109411			
CV (%) =	35,31				
Média geral:	1,6419169				

** Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste de F.

TABELA 17. Análise de variância para dados de comprimento médio das três maiores brotações.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	17	168,571103	9,915947	16,151	0,0000**
erro	252	154,713327	0,613942		
Total corrigido	269	323,284430			
CV (%) =	41,92				
Média geral:	1,8690615				

** Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste de F.