

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM *Butia odorata* (BARB. RODR.) NOBLICK:
DESCRIÇÃO ANATÔMICA, HISTOQUÍMICA E IDENTIFICAÇÃO DE UMA
SEQUÊNCIA PARCIAL DO GENE *SERK*

Samanta Siqueira de Campos
Engenheira Agrônoma/UFRGS
Mestre em Fitotecnia/UFRGS

Tese apresentada como um dos requisitos
à obtenção do Grau de Doutor em Fitotecnia
Ênfase em Melhoramento e Biotecnologia Vegetal

Porto Alegre (RS), Brasil
Fevereiro de 2018

CIP - Catalogação na Publicação

Siqueira de Campos, Samanta
EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM *Butia odorata* (BARB.
RODR.) NOBLICK: DESCRIÇÃO ANATÔMICA, HISTOQUÍMICA E
IDENTIFICAÇÃO DE UMA SEQUÊNCIA PARCIAL DO GENE SERK
/ Samanta Siqueira de Campos. -- 2018.

142 f.

Orientador: Sergio Francisco Schwarz.

Coorientador: Claudimar Sidnei Fior.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. *Butia odorata*. 2. Embrião zigótico. 3.
Embriogênese somática. 4. Morfogênese. 5. Anatomia.
I. Francisco Schwarz, Sergio, orient. II. Sidnei
Fior, Claudimar, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

SAMANTA SIQUEIRA DE CAMPOS
Engenheira Agrônoma - UFRGS
Mestre em Fitotecnia - UFRGS

TESE

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

DOUTOR EM FITOTECNIA

Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em: 26.02.2018
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 23.10.2018
Por

SERGIO FRANCISCO SCHWARZ
Orientador - PPG Fitotecnia
UFRGS

CHRISTIAN BREDEMEIER
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia

CLAUDIMAR SIDNEI FIOR
Coorientador - PPG Fitotecnia
UFRGS

MAGNÓLIA APARECIDA SILVA DA SILVA
PPG Fitotecnia/UFRGS

ENIO LUIZ PEDROTTI
UFSC

SOFIA AUMOND KUHN
Instituto Federal Farroupilha
Campus Júlio de Castilhos

CARLOS ALBERTO BISSANI
Diretor da Faculdade
de Agronomia

AGRADECIMENTOS

À Deus em primeiro lugar.

À toda minha família, aos meus pais Juarez e Eva, em especial a minha mãe pela eterna confiança e amor incondicional.

Ao professor Sergio Francisco Schwarz pela orientação, amizade, convívio e trabalho harmoniosos.

Ao professor Claudimar Sidnei Fior pela coorientação, críticas construtivas e conselhos.

À Faculdade de Agronomia-UFRGS, ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia e a todos os professores que contribuíram durante minha vida acadêmica.

À Capes pela concessão de bolsa.

Ao professor Jorge Ernesto de Araújo Mariath pela disponibilidade, paciência, pelos ensinamentos na área de anatomia no laboratório de Anatomia Vegetal (LAVEG) UFRGS e pelo carisma e descontração.

Ao professor Pedro Miguel Guerra pela oportunidade de aprender os primeiros passos da embriogênese somática no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV) – UFSC.

Ao Joseph Francis Ree pela atenção e disponibilidade em explicar as técnicas desenvolvidas no LFDGV.

À pesquisadora Dra. Regina Beatriz Bernd pela confiança e oportunidade de realizar este trabalho na Embrapa Recursos Genético e Biotecnologia - DF.

Ao pesquisador Dr. Jonny Everson Scherwinski Pereira por abrir as portas do Laboratório de Culturas de Tecido II (LCTII) - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - DF, pela troca de experiência, ensinamentos e conselhos.

À pesquisadora Dra. Lucília Helena Marcellino pela oportunidade de desenvolver parte da pesquisa em seu Laboratório de Regulação Gênica I (LRGI) - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - DF, e pela dedicação em ensinar a interpretar as análises moleculares.

À analista Loeni Ludke Falcão pela paciência, orientação e valiosas dicas nos trabalhos de molecular desenvolvidos no LRGI.

À pesquisadora Dra. Diva Maria De Alencar Dusi pela oportunidade de desenvolver parte da pesquisa em seu Laboratório de Reprodução Vegetal (LRV) - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - DF, e pela disponibilidade em ensinar técnicas de hibridização.

À analista Ana Cristina Meneses M. Gomes pela atenção e orientação nos uso dos equipamentos do Laboratório de Microscopia - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – DF.

À pesquisadora Dra. Vânia C. Rennó Azevedo por disponibilizar o Laboratório de Genética Vegetal (LGV) - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – DF para o sequenciamento das amostras.

Ao Dr. Peter W. Inglis pela disponibilidade e atenção na realização do sequenciamento e análises no LGV.

Aos colegas e grande família acadêmica do Departamento de Horticultura e Silvicultura Aquélis Emer, Bruna Baratto, Eduarda Avrella, Fernanda Varela, Gerson Boettcher, Gislaine Grzeça, Gustavo de Almeida, Júlio Lucchese, Luciana Paim, Manuela Sulzbach, Mara Winhelmann, Marina Back, Mateus Gonzato, Sandra Nunez, Taís Altmann e Vanessa Braga por todos os momentos compartilhados nessa vida acadêmica e fora dela.

Às famílias de coração, ao casal Bia e Humberto e seus familiares, ao casal Kícia e Klésio e o pequeno Davi que me acolheram em Brasília.

Aos colegas do LCTII, em especial aos colegas e amigos Amanda, André Xavier, Emília Saleh, Fernanda Furlan, Filipe Meira, Inaê Marie, Jéssica, Luana, Luciana Florêncio, Palloma Lima, Paulo César, Raphael Almeida, Rennan Meira e Talita Balzon pelos momentos de trabalho e superdescontração.

À banca examinadora que aceitou o convite.

Aos funcionários do Departamento de Horticultura e Silvicultura pela ajuda prestada.

E a todos que participaram e contribuíram para realização deste trabalho!

Muito obrigada!

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM *Butia odorata* (BARB. RODR.) NOBLICK: DESCRIÇÃO ANATÔMICA, HISTOQUÍMICA E IDENTIFICAÇÃO DE UMA SEQUÊNCIA PARCIAL DO GENE *SERK*¹

Autora: Samanta Siqueira de Campos
Orientador: Sergio Francisco Schwarz
Coorientador: Claudimar Sidnei Fior

RESUMO

Butia odorata (Barb. Rodr.) Noblick, é nativa da região Sul do Brasil e Sudeste do Uruguai. As áreas de butiazais do Rio Grande do Sul, formadas por *B. odorata*, vêm sofrendo redução devido à expansão agrícola e urbana. Além disso, a espécie apresenta dificuldades para germinar causando entraves na produção de mudas e assim a produção se torna extrativista, o que reduz a renovação dos butiazais. A embriogênese somática (ES) é uma alternativa para multiplicação *in vitro* de *B. odorata*. Análises anatômicas e o uso de marcadores moleculares podem contribuir para a determinação do processo da ES. O presente trabalho teve por objetivo principal propor uma metodologia para obtenção de embriões somáticos *in vitro* da espécie a partir de diferentes explantes. Para isso foram avaliados os efeitos das auxinas 2,4-D e picloram e a influência dos meios de cultura MS e Y3 sobre embriões zigóticos maduros. A técnica Thin Cell Layer (TCL) foi testada como fonte alternativa de explante para indução da ES em *B. odorata*. Para uma melhor compreensão das mudanças morfológicas e celulares foi realizado um estudo histo-anatômico mais detalhado das fases durante a ES. Para verificar a expressão do gene *SERK* foi isolado, clonado e sequenciado um gene candidato a partir de calos embriogênicos de *B. odorata*. Os resultados apresentaram uma resposta heterogênea produzindo calos embriogênicos e embriões somáticos em ambos os meios combinados com diferentes concentrações das auxinas. Dentre os resultados obtidos para TCL destacam-se o meio de cultura Y3 com a auxina picloram, nas concentrações de 452,49; 542,99 e 633,48 $\mu\text{M/L}$, induzindo a formação de calos embriogênicos e embriões somáticos. A análise histo-anatômica permitiu verificar os principais eventos celulares ocorridos durante a ES, como a presença de centros meristemáticos, proembriões, embriões globulares e grãos de amido como fonte de reserva em embriões somáticos. A obtenção de uma sequência parcial do gene *SERK* em butiá, além de confirmar a indução da ES, pode ser usada, juntamente com as análises anatômicas, como marcador molecular específico para ES. A metodologia proposta apresenta resultados promissores até a fase de diferenciação dos embriões somáticos globulares e alguns mais desenvolvidos, contudo a conversão desses em plântulas não foi completa.

¹ Tese de Doutorado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (142f.) Fevereiro, 2018.

SOMATIC EMBRYOGENESIS IN *Butia odorata* (BARB. RODR.) NOBLICK: ANATOMIC DESCRIPTION, HISTOCHEMISTRY AND IDENTIFICATION OF A PARTIAL SEQUENCE *SERK* GENE¹

Author: Samanta Siqueira de Campos
Adviser: Sergio Francisco Schwarz
Co-adviser: Claudimar Sidnei Fior

ABSTRACT

Butia odorata (Barb. Rodr.) Noblick, is native to Southern Brazil and Southeastern Uruguay. Butiazais areas of Rio Grande do Sul, formed by *B. odorata*, have been reduced due to the agricultural and urban expansion. In addition, the species presents difficulties to germinate causing obstacles in seedlings production and thus the production becomes extractive, what reduces the renewal of butiazais. Somatic embryogenesis (ES) is an alternative to *in vitro* multiplication of *B. odorata*. Anatomical analysis and the use of molecular markers may contribute to the determination of the ES process. The present work had as main objective to propose a methodology for obtaining of somatic embryos *in vitro* of the different explants from species. The effects of 2,4-D auxins and picloram and the influence of MS and Y3 culture media on mature zygotic embryos were evaluated. The Thin Cell Layer (TCL) technique was tested as an alternative explant source for ES induction in *B. odorata*. For a better understanding of the morphological and cellular changes, a more detailed histo-anatomical study of the phases during ES was performed. To verify the expression of the *SERK* gene, a candidate gene was isolated, cloned and sequenced from *B. odorata* embryogenic calli. The results showed a heterogeneous response producing embryogenic calli and somatic embryos in both media combined with different concentrations of auxin. Among the results obtained for TCL include Y3 culture medium with auxin picloram, in concentrations of 452,49; 542,99 and 633,48 $\mu\text{M/L}$, inducing the formation of embryogenic calli and somatic embryos. Histo-anatomical analysis has shown the main cellular events that occurred during ES, as the presence of meristematic centers, proembryos, globular embryos and starch grains as a reserve source in somatic embryos. Obtaining a partial sequence of the *SERK* gene in pindo palm, in addition to confirm ES induction, it can be used, along with the anatomical analysis, such as molecular marker specific for ES. The proposed methodology presents promising results until the differentiation phase of the globular somatic embryos and some more developed, however the conversion of these in seedlings was not complete.

¹ Doctoral thesis in Plant Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (142p.) February, 2018.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Distribuição geográfica.....	3
2.2 Descrição e biologia da espécie <i>Butia odorata</i>	4
2.3 Importância socioeconômica de <i>Butia odorata</i>	7
2.4 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Butia</i>	9
2.4.1 Embriogênese Somática.....	11
2.4.1.1 Fatores que afetam a embriogênese somática.....	16
2.4.1.1.1 Explante.....	16
2.4.1.1.2 Composição do meio nutritivo.....	17
2.4.1.1.3 Condições físicas de incubação.....	19
2.4.1.1.4 Oxidação e Carvão Ativado.....	20
2.4.2 <i>Thin cell layer</i> TCL.....	21
2.5 Histologia.....	22
2.6 <i>SERK</i> : Marcador molecular na expressão da embriogênese somática.....	24
2.7 Referências bibliográficas.....	25
3 CAPÍTULO 1 - Embriogênese somática a partir de embriões zigóticos de <i>Butia odorata</i> (Barb. Rodr.) Noblick.....	39
3.1 Introdução.....	41
3.2 Material e métodos.....	43
3.2.1 Material vegetal.....	43
3.2.2 Meio de cultura.....	43
3.2.3 Fatores de indução.....	43
3.2.4 Fatores de multiplicação/manutenção.....	44
3.2.5 Fatores de diferenciação e maturação.....	44

	Página
3.2.6 Conversão dos embriões somáticos em plântulas.....	44
3.2.7 Morfologia externa, anatomia e histoquímica dos calos.....	44
3.2.8 Delineamento e Análise Estatística.....	45
3.3 Resultados e discussão.....	45
3.3.1 Indução da embriogênese somática.....	45
3.3.2 Multiplicação.....	50
3.3.3 Diferenciação e maturação.....	53
3.3.4 Regeneração.....	54
3.3.5 Anatomia e histoquímica.....	56
3.4 Conclusões.....	61
3.5 Referências bibliográficas.....	61
4 CAPÍTULO 2 - Aplicação da técnica <i>Thin Cell Layer</i> (TCL) para indução da embriogênese somática a partir de plântulas <i>in vitro</i> de <i>Butia odorata</i> (BARB. RODR.) NOBLICK.....	67
4.1 Introdução.....	70
4.2 Material e métodos.....	71
4.2.1 Meio de cultura para indução do calo primário.....	72
4.2.2 Meio de cultura para manutenção e multiplicação dos calos embriogênicos.....	73
4.2.3 Meio de cultura para desenvolvimento dos embriões somáticos.....	73
4.2.4 Meio de cultura para germinação dos embriões somáticos.....	73
4.2.5 Anatomia e Histoquímica.....	73
4.2.6 Delineamento e análise estatística.....	74
4.3 Resultados e discussão.....	74
4.3.1 Indução de calos embriogênicos.....	74
4.3.2 Manutenção e multiplicação dos calos embriogênicos.....	78
4.3.3 Diferenciação dos embriões somáticos.....	79
4.3.4 Germinação dos embriões somáticos.....	80
4.3.5 Anatomia.....	81
4.4 Conclusões.....	82
4.5 Referências bibliográficas.....	81
5 CAPÍTULO 3 - Ontogênese da formação do calo embriogênico durante a indução da embriogênese somática a partir de embriões zigóticos de <i>Butia odorata</i> (Barb. Rodr.) Noblick.....	86

	Página
5.1 Introdução.....	89
5.2 Material e métodos.....	90
5.2.1 Material vegetal e esterilização.....	90
5.2.2 Meio de cultura.....	91
5.2.3 Anatomia, histoquímica e morfologia externa dos calos.....	92
5.3 Resultados e discussão.....	92
5.4 Conclusões.....	106
5.5 Referências bibliográficas.....	106
6 CAPÍTULO 4 - Identificação de uma sequência codificante do gene <i>SERK</i> em calos embriogênicos de <i>Butia odorata</i> (Barb. Rodr.) Noblick.....	111
6.1 Introdução.....	113
6.2 Material e métodos.....	115
6.2.1 Material vegetal e cultivo <i>in vitro</i>	115
6.2.2 Identificação, isolamento e clonagem do gene <i>SERK</i>	116
6.2.2.1 Extração de RNA total.....	116
6.2.2.2 Purificação do RNA e síntese de cDNA.....	116
6.2.2.3 Amplificação do gene <i>SERK</i>	117
6.2.2.4 Clonagem dos fragmentos no vetor pGEM-T Easy.....	118
6.2.2.5 Sequenciamento.....	119
6.2.2.6 Comparação das sequências.....	119
6.3 Resultados e discussão.....	119
6.3.1 Análises da sequência e clonagem do gene <i>SERK</i>	119
6.4 Conclusões.....	123
6.5 Referências bibliográficas.....	123
7 CONCLUSÕES GERAIS.....	126

RELAÇÃO DE TABELAS

Página

CAPÍTULO 1

1. Porcentagem da germinação de embriões zigóticos (Germ.), embrião zigótico inerte (EZI) e calo primário (CP) aos 150 dias; calo embriogênico (CE) aos 240 dias de cultivo nos meios de cultura MS ou Y3 com as auxinas 2,4-D ou picloram em cinco diferentes concentrações e embrião somático (ES) aos 330 dias de cultivo..... 48

CAPÍTULO 4

1. Comparação das sequências de nucleotídeos de *BoSERK* (741 pb), obtidas a partir de cDNA amplificado com a combinação dos *primers* específicos de *Cocos nucifera* (Perez-Nuñez et al., 2009), com as sequências de outras espécies depositadas no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information)..... 120

RELAÇÃO DE FIGURAS

Página

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
1. (A) Butiazal em Barão do Triunfo, RS, 2015. (B) Folha. (C) Inflorescência. (D) Botão floral feminino (f) e masculino (m). (E) Frutos maduros. (F) Diásporos. (G) Semente de <i>Butia odorata</i> (Escala: 2mm).....	6
CAPÍTULO 1	
1. Calos primários e embriogênicos obtidos a partir do embrião zigótico (EZ) maduro de <i>B. odorata</i> . (A) EZ maduro no momento da inoculação, região proximal (a), região distal (b). (B) EZ intumescido durante a primeira semana. (C) Calo primário com estruturas translúcidas embriogênicas (seta). (D) Plântula com formação de calo (seta), com folha (seta tracejada) e raiz (seta vermelha). (E) Calo amarelo compacto liso. (F) Calo misto mucilaginoso (seta branca) e compacto (seta preta). (G) Calo friável (seta) e mucilaginoso. (H) Calo embriogênico. (I) Calo mucilaginoso com estruturas embriogênicas (seta). Escala: 1 mm (A e C), 0,5 mm (B), 5mm (D), 2 mm (E-I).....	46
2. Morfologia dos calos em meio de multiplicação com 20 µM/L de picloram, após 30 dias de cultivo (180 dias). (A) Calo oxidado em meio Y3 (induzido com 2,4-D). (B) Calo embriogênico em meio MS (induzido com picloram). (C) Calos amarelos com características embriogênicas sobre calo oxidado em meio Y3 (induzido com picloram). (D) Calo com embriões somáticos em meio MS (induzido com picloram) (seta). Escala: 5 mm (A, C, D), 2 mm (B).....	51
3. Imagens de calos embriogênicos com embriões somáticos. (A) Vista geral do calo embriogênico em meio MS. (B) Embriões somáticos globulares (setas). (C e D) Embriões somáticos mais desenvolvidos e fusionados (setas). Escala: 2 mm.....	53

	Página
4. Germinação de embriões somáticos (ES). (A) Calo embriogênico com ES em diferentes fases (setas). (B) ES isolados do calo embriogênico, cotilédones (seta). (C e D) ES em meio de regeneração MS sem reguladores de crescimento (C) ES com cotilédones esverdeados (seta). (D) Presença de raízes (setas). Escala: 5 mm (A-B) e 2 mm (C-D).....	54
5. Anatomia de calos embriogênicos, com características nodulares, compactos e amarelos, corados com Azul de Toluidina. (A) Faixa de células meristemáticas. (B) Células meristemáticas. (C) Células embriogênicas. (D) Proembriões isolados (seta preta) e compostos fenólicos (seta vermelha). Escala: 500 µm (A) e 50µm (B-D).....	57
6. Morfologia e anatomia dos calos primários, aos 90 dias, em meio de indução à embriogênese somática. (A) Calo primário em meio MS com 300 µM/L de picloram. (B) Calo primário em meio Y3 com 300 µM/L de picloram. (C) Calo primário em meio MS com 633,48 µM/L de 2,4-D. (D) Calo com raízes. (E) Corte anatômico do calo em (A). (F-G) Corte anatômico do calo em (B). (H) Células sem proteínas coradas com XP. (I) Células com carboidratos coradas com PAS. (J) Células com grãos de amido, reagente de Lugol. Escala: 1mm (A), 2 mm (B-D), 500 µm (E-F), 200 µm (G), 20 µm (H), 50 µm (I-J).....	58
7. Anatomia e morfologia de um calo embriogênico com embriões somáticos. (A) embriões somáticos fusionados ao tecido de origem (setas). (B) Embriões somáticos delimitados pela protoderme. (C) Detalhe da protoderme (seta). (D) Embriões somáticos (setas). Escala: 500 µm (A-B), 50 µm (C), 2 mm (D).....	59
 CAPÍTULO 2	
1. Interação da posição do explante com o tratamento durante a indução do calo primário aos 180 dias. T1: controle do meio MS sem auxina. MS + 2,4-D: T2 (452,49 µM/L), T3 (542,99 µM/L), T4 (633,48 µM/L). MS + picloram: T5(452,49 µM/L), T6 (542,99 µM/L), T7 (633,48 µM/L). T8: controle do meio Y3 sem auxina. Y3 + 2,4-D: T9 (452,49 µM/L), T10 (542,99 µM/L), T11(633,48 µM/L). Y3 + picloram: T12 (452,49 µM/L), T13 (542,99 µM/L), T14 (633,48 µM/L).....	75
2. Calos primários formados aos 60 dias em meio de indução. (A) Explante sem formação de calo e oxidado. (B) Calo primário formado. (C) Calo mucilaginoso branco. (D) Calo mucilaginoso com estrutura embriogênica amarela e translúcida (seta). Escala: 1 mm (A, C e D) e 500 µm (B).....	76
3. Desenvolvimento dos calos embriogênicos (CE) em <i>Butia odorata</i> a partir da técnica TCL, em meio Y3, aos 60, 90, 180 e 270 dias. A-A3: formação do CE com 452,49 µM/L de picloram. B-B3: formação do CE com 542,99 µM/L de picloram. C-C3: formação do CE com 633,48 µM/L de picloram. Escala: 500 µm (C), 1 mm (A, A1, B, C1), 2 mm (A2, B1-B3, C2, C3), 5 mm (A3).....	77

4. Número médio de calos embriogênicos, por calo primário formado em cada tratamento, aos 270 dias. T1: controle do meio MS sem auxina. MS + 2,4-D: T2 (452,49 $\mu\text{M/L}$), T3 (542,99 $\mu\text{M/L}$), T4 (633,48 $\mu\text{M/L}$). MS + picloram: T5 (452,49 $\mu\text{M/L}$), T6 (542,99 $\mu\text{M/L}$), T7 (633,48 $\mu\text{M/L}$). T8: controle do meio Y3 sem auxina. Y3 + 2,4-D: T9 (452,49 $\mu\text{M/L}$), T10 (542,99 $\mu\text{M/L}$), T11 (633,48 $\mu\text{M/L}$). Y3 + picloram: T12 (452,49 $\mu\text{M/L}$), T13 (542,99 $\mu\text{M/L}$), T14 (633,48 $\mu\text{M/L}$)..... 78
5. Embriões somáticos formados na concentração de 452,49 $\mu\text{M/L}$ de picloram em meio Y3. (A) Detalhes dos embriões somáticos fusionados. (B) Embriões em meio MS sem reguladores de crescimento na luz. Escala: 2 mm (A-B)..... 80
6. Embriões somáticos em meio Y3 com 452,49 $\mu\text{M/L}$ de picloram. (A) Embriões somáticos. (B) Corte longitudinal de um embrião somático. (C) Região proximal do embrião somático. (D) Anatomia da germinação de um embrião zigótico, região com primórdios foliares (seta branca), região da radícula (seta preta). Escala: 2mm (A), 500 μm (B), 200 μm (C-D)..... 82
- CAPÍTULO 3**
1. Mudanças morfológicas do embrião zigótico (EZ) durante os primeiros 10 dias em meio de indução. (A) EZ no momento da inoculação. (B) Anatomia do EZ, plúmula (seta branca) e feixes vasculares (setas pretas). (C) EZ aos cinco dias em meio de indução com estrias (seta branca). (D) EZ aos sete dias em meio de indução. (E) EZ aos 10 dias em meio de indução região proximal com cor amarelo intenso. (a) região proximal e (b) região distal. Escala: 1 mm (A), 200 μm (B) e 0,5 mm (C, D e E)..... 93
2. Anatomia do embrião zigótico aos cinco dias em meio de indução MS com 361,99 $\mu\text{M/L}$ de 2,4-D. (A) Vista geral do embrião zigótico. (B e E) Em a: protoderme com células embriogênicas (seta branca) e células do explante não responsivas (seta preta). (C e F) Em b: células não responsivas no centro (seta preta) e células embriogênicas na protoderme (seta branca). (D e G) Em c: região do feixe vascular com elementos de vaso (seta preta) e células responsivas (seta branca). Escala: 500 μm (A), 200 μm (B-D), 50 μm (E-F)..... 94
3. Imagens dos calos primários formados aos 30, 60, 90 e 180 dias (na linha) em meio MS nas concentrações de 2,4-D (361,99; 452,49; 542,99 e 633,48 $\mu\text{M/L}$) e picloram (50, 150 300 e 450 $\mu\text{M/L}$) na coluna. Setas brancas indicam estruturas embriogênicas. Setas pretas mostram desenvolvimento parcial do haustório. Escala: 1mm (B-B1; C-C1; D-D1; E-E1; F; G-G1; H-H1) e 2 mm(A-A3; B2-B3; C2-C3; D2-D3; E2-E3;F1-F3; G2-G3; H2-H3)..... 96

	Página
4. Morfologia e anatomia de calo primário aos 25 dias em meio Y3 com 633,48 $\mu\text{M/L}$ de 2,4-D. (A) Morfologia calo primário. (B) Corte anatômico do calo primário (A). (C) Células vacuoladas na região apical do calo primário. (D) Células embriogênicas na região próxima à plúmula. (E) Células meristemáticas e embriogênicas próximas ao feixe vascular (setas), região distal. (F) Detalhe dos proembriões mais isolados do tecido. Escala: 1 mm (A), 500 μm (B), 200 μm (C-F).....	97
5. Calo embriogênico aos 45 dias em meio de indução. (A) Calo embriogênico com estruturas translúcidas em meio de indução MS com 300 μM de picloram. (B) Corte anatômico do calo em A. (C) Detalhe do embrião fusionado ao tecido de origem (seta). (D) Detalhe da protoderme (seta) em B. Escala: 2 mm (A), 200 μm (B), 100 μm (C) e 20 μm (D).....	98
6. Cortes anatômicos de calo embriogênico aos 60 dias em meio Y3 com 450 $\mu\text{M/L}$ de picloram. (A) Faixa de células meristemáticas abaixo da periferia do calo (seta). (B) Região corada com PAS, detalhe células com grãos de amido. (C) Cordões de células meristemáticas (seta branca) e células da periferia do calo. (D) Região corada com PAS, apenas células da periferia do calo com grãos de amido (seta preta). (E) Região central do calo, com feixe vascular e células embriogênicas em seu entorno. (F) Células coradas com XP sem proteínas. Escala: 500 μm (A-B), 200 μm (C-E), 20 μm (F).....	99
7. Calo embriogênico aos 90 dias em meio de indução Y3 com 450 $\mu\text{M/L}$ de picloram. (A) Morfologia do calo embriogênico. (B) Anatomia da área com círculo branco em A, zonas meristemáticas organizadas no interior do calo (setas), células vacuoladas na periferia. (C) Detalhes das células da periferia do calo, cordões meristemáticos logo abaixo (seta branca) e células embriogênicas ao centro (seta preta). (D) Células embriogênicas isoladas pela exsudação da parede primária (setas). Escala: 2 mm (A), 500 μm (B), 200 μm (C-D).....	101
8. Calo embriogênico de <i>B. odorata</i> aos 105 dias em meio de indução MS com 100 mg/L de 2,4-D. (A) Morfologia calo embriogênico. (B) Vista de geral do corte na região do círculo preto em (A). (C) Detalhe na periferia com centros meristemáticos e proembriões. (D) Detalhe dos proembriões envoltos pelo exsudado da parede celular (setas). Escala: 5 mm (A), 200 μm (B), (C) 50 μm , 20 μm (D).....	102
9. Morfologia, anatomia e histoquímica de embriões somáticos (ES). (A) ES fusionados (setas). (B) ES em estágio globular (setas). (C) ES globular com protoderme definida (seta), células meristemáticas e parênquimáticas de preenchimento. (D) ES com amido em toda sua periferia (seta). Escala: 2 mm (A), 200 μm (B), 100 μm (C-D).....	104

CAPÍTULO 4	
1. Calos embriogênicos de <i>B. odorata</i> utilizados para extração de RNA total e isolamento do gene <i>SERK</i> . Escala: 5 mm (A e C), 2 mm (B).....	115
2. Alinhamento múltiplo das sequências de proteínas codificadas pelo gene <i>SERK</i> de <i>Cocos nucifera</i> (<i>CnSERK1</i>), <i>Daucus carota</i> (<i>DcSERK</i>), <i>Arabidopsis thaliana</i> (<i>AtSERK1</i> e <i>AtSERK2</i>) e a proteína expressa pelo gene parcial clonado de <i>Butia odorata</i> . Os domínios conservados foram localizados. SP = peptídeo sinal; ZIP = zíper de leucina; LRR = repetições ricas em leucina; SPP = região rica em prolina; TM = região transmembrana;* = identidade de todos os resíduos de aminoácidos na coluna indicada; : = similaridade dos aminoácidos alinhados na coluna; . = baixa similaridade dos aminoácidos na coluna.....	121

1 INTRODUÇÃO

A família Arecaceae (Palmae) compreende mais de 2585 espécies distribuídas em mais de 188 gêneros classificadas em cinco subfamílias com um número variável de tribos e subtribos. O gênero *Butia* está distribuído na América do Sul, principalmente no Brasil e Uruguai. *Butia* compreende 19 espécies e destas espécies 17 são nativas do Brasil. No Estado do Rio Grande do Sul além de *Butia* encontram-se mais cinco gêneros da família Arecaceae.

As formas de uso do butiá, ou coquinho-azedo como também é conhecido, são diversificadas e estão ligadas, principalmente, aos aspectos econômico e sociocultural. O fruto é consumido *in natura* ou processado, na forma de sucos, doces, geleias, sorvete e outros. As folhas são utilizadas em artesanato, na confecção de chapéus, cestas, vassouras. O estipe do butiá também pode ser utilizado como vaso para plantas.

Detrás dessa ampla gama de gêneros e espécies, algumas palmeiras, como *Butia odorata*, se encontram em risco de extinção devido ao manejo e práticas agrícolas empregados em áreas de ocorrência natural dessas palmeiras. Por exemplo, no Estado do Rio Grande do Sul a prática da monocultura de arroz e a criação extensiva de gado são alguns dos fatores que contribuem para a redução da população de butiás. Porém, existe o interesse em integrar as práticas agrícolas com a preservação do ambiente. Além de todo o contexto sociocultural que envolve as populações locais em relação ao uso dos recursos oferecidos pelo butiazeiro.

A busca por novas fontes de alimentos, ou pelo melhoramento das já utilizadas, e também pela conservação da flora nativa pode ser feita através do uso de técnicas biotecnológicas que visam o melhoramento e a conservação do germoplasma. A fusão de protoplastos, embriogênese somática, organogênese são algumas das ferramentas biotecnológicas utilizadas.

Para expandir ou ampliar o potencial de uso dos frutos do butiazeiro, de forma comercial, é necessária uma produção em grande escala dessas plantas. Porém, alguns entraves, como a dormência das sementes, dificultam a expansão dos butiazais de forma comercial, principalmente na fase de produção de mudas. Por isso, há necessidade de estudos multidisciplinares (fisiologia, anatomia, genética, bioquímica), que visem amenizar esse e outros entraves, aliados ao emprego das ferramentas biotecnológicas atualmente disponíveis. Assim, pode-se garantir a sustentabilidade ambiental e social no sentido de agregar renda às famílias rurais e promover a preservação da biodiversidade local existente. Pois, ao obter-se uma produção de mudas de *B. odorata* esta irá suprir as demandas para a reposição em seu habitat natural e a comercialização evitando o extrativismo irregular dessa espécie.

Com base no exposto, o objetivo geral deste trabalho foi verificar a possibilidade de obter embriões somáticos a partir de embriões zigóticos maduros da espécie *Butia odorata* pela técnica da embriogênese somática *in vitro*. E, a partir disso, avaliar e estudar as diferentes condições de cultivo como meio de cultura e reguladores de crescimento no processo da embriogênese somática. Analisar aspectos morfogênicos na formação de calos e de embriões somáticos com avaliações das estruturas a partir de cortes histológicos e testes histoquímicos. E por fim, verificar a expressão do gene *SERK* para detecção da embriogênese somática nos tecidos cultivados. Essas avaliações e análises visam comprovar e disponibilizar mais informações para um melhor entendimento do processo da embriogênese somática.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Distribuição geográfica

Arecaceae é uma família botânica da ordem Arecales (Stevens, 2017), com distribuição geográfica termocsmopolita, distribuída em áreas tropicais e subtropicais. Estima-se que a família seja composta por aproximadamente 188 gêneros, os quais podem ser subdivididos em mais de 2585 espécies classificadas em cinco subfamílias com um número variável de tribos e subtribos (Stevens, 2017). A costa equatorial da África, Oceania, costa brasileira, Amazônia, Indonésia e Antilhas podem ser destacadas como os principais centros de diversificação (Moore & Uhl, 1982).

A família Arecaceae é composta por plantas monocotiledôneas contendo várias espécies de trepadeiras tropicais, arbustos e árvores conhecidas como palmeiras (Basu *et al.*, 2014). Podem apresentar um crescimento indefinido florescendo e frutificando durante toda a sua existência, por exemplo, espécies dos gêneros *Cocos* e *Geonoma*. E algumas espécies, por exemplo, dos gêneros *Caryota* e *Raphia* apresentam crescimento definido com apenas uma floração e frutificação no fim do período vegetativo seguindo-se do definhamento da planta (Reitz, 1974). As palmeiras são usualmente cultivadas e conhecidas horticulturalmente em todo o planeta. Essa família contém várias espécies comercialmente importantes com diversas finalidades de uso. Desde o consumo *in natura* de seus frutos até a ornamentação de jardins e interiores (Basu *et al.*, 2014).

No Rio Grande do Sul, foi realizado um levantamento das espécies da família Arecaceae e foram reconhecidas 15 espécies nativas de palmeiras distribuídas em seis gêneros: *Bactris*, *Butia*, *Euterpe*, *Geonoma*, *Syagrus* e *Trithrinax* (Soares *et al.* 2014). O gênero *Butia* é composto por palmeiras neotropicais e apresenta grande distribuição desde o Centro-Sul do Brasil até o Uruguai, Paraguai e Argentina. Atualmente são aceitas 20 espécies no Brasil para o gênero (Soares, 2015). Contudo, as áreas de butiazais na região Sul do Brasil estão se tornando raras porque os seus habitats estão sendo transformados em áreas agrícolas e também devido à expansão urbana (Rivas & Barbieri, 2014).

Segundo Soares *et al.* (2014) oito espécies de *Butia* foram reconhecidas como nativas do Estado do Rio Grande do Sul: (*Butia catarinensis*, *B. eriospatha*, *B. exilata*, *B. lallemantii*, *B. odorata*, *B. paraguayensis*, *B. witeckii* e *B. yatay* e três binômios foram considerados sinônimos *B. missionera*, *B. pulposa* e *B. quaraimana*. A espécie *B. microspadix* foi excluída da flora gaúcha (Deble *et al.*, 2011; Soares *et al.*, 2014). Há a descrição da ocorrência de dois híbridos naturais *Butyagrus alegretensis* K. Soares sp. hibr. Nov (*Butia lallemantii* x *Syagrus romanzoffiana*) e *Butyagrus nabonnandii* (Prosch.) Vorster (*Butia odorata* x *Syagrus romanzoffiana*) (Soares *et al.*, 2014).

Noblick, em 2011, validou o nome da espécie *Butia odorata* que antes era classificada por alguns autores como *Butia capitata* var. *odorata*. A denominação *B. capitata* ficou restrita para as espécies que ocorrem no bioma cerrado (Rivas & Barbieri, 2014). De acordo com Soares *et al.* (2014), *B. odorata* é frequentemente visto ao longo de estradas devido à dispersão não intencional antrópica e pela fauna local. A ocorrência de populações naturais abrange a faixa litorânea e região Centro-Sul do Estado do RS.

2.2 Descrição e biologia da espécie *Butia odorata*

As espécies da família Arecaceae apresentam desde estipes escandentes, geralmente esguios, até robustamente colunares, solitários ou agrupados, às vezes gregários, com um rizoma rastejante, liso ou coberto com bases foliares secas aneladas por cicatrizes foliares circulares. As flores são unissexuais (flores imperfeitas – estaminadas ou pistiladas – ou uniesporangiadas) ou raramente bissexuais (flores perfeitas ou biesporangiadas). Inicialmente as espádices estão completamente inclusas em uma ou mais espátas cartáceas a lenhosas que geralmente se fendem antes da antese. As folhas podem ser flabeladas, pinadas ou simples. As sementes muitas vezes são cobertas com uma rafe, apresentam o endosperma homogêneo ou ruminado (com invaginações), em frutos imaturos o endosperma é parcialmente líquido e o embrião pequeno (Reitz, 1974).

As inflorescências de butiazeiros e palmeiras em geral, provêm de gemas exclusivamente florais que se formam a partir da base das folhas e, na maioria das palmeiras, são laterais e axilares, sendo formadas por três elementos: bráctea peduncular, raque e ramos (Lorenzi *et al.*, 2010; Soares, 2015). As palmeiras do gênero *Butia* são alógamas, monoicas, com flores diclinas e folhas pinadas. As flores deste

gênero são arrançadas em tríades (com a flor central pistilada e as duas laterais estaminadas), díades de flores estaminadas ou flor solitária estaminada sobre as ráquulas da inflorescência (Barbieri *et al.*, 2015).

A espécie *Butia odorata* é caracterizada por apresentar um estipe solitário, ereto, inclinado e coberto pelos restos da base das folhas, sua altura varia entre dois e 10 metros (Lorenzi *et al.*, 2010; Soares, 2015) (Figura 1A).

As folhas são pinadas com bainha e pecíolo indistintos (Lorenzi *et al.*, 2010) as bainhas têm entre 17-23 cm de largura e o pseudo pecíolo entre 30-75 cm de comprimento, com fibras rígidas e planas e espinhos de até cinco centímetros de comprimento, ao longo das margens (Soares, 2015). As folhas apresentam coloração verde turva ou escura dispostas em espiral em torno do estipe e em número de 13-32, a ráquis de 70-200 cm de comprimento, com 35-60 pinas lineares com ápice acuminado distribuídas de cada lado da raque, inseridas no mesmo plano ou em mais de um plano, dispostas obliquamente em ambos os lados da folha formando um “V” (Lorenzi *et al.*, 2010; Soares, 2015).

As inflorescências de *B. odorata* apresentam um pedúnculo de 40-70 cm de comprimento, a bráctea peduncular pode apresentar textura lenhosa e lisa medindo de 0,60-1,80 m de comprimento, enquanto o eixo da inflorescência (raque) de 0,20 m até 1,04 m de comprimento e apresenta de 35-141 ráquulas de 15-132 cm de comprimento (Lorenzi *et al.*, 2010; Soares, 2015). O período de floração ocorre entre os meses de setembro e janeiro (Rivas & Barbieri, 2014). O período entre o rompimento da espata e a exposição da inflorescência (início da floração) até a colheita dos frutos tem duração aproximada de 85 dias (Barbieri *et al.*, 2014).

Conforme descrito por Soares (2015) as flores podem apresentar coloração amarela, violeta, verde-amarelada ou arroxeadas. De acordo com Schwartz (2008), a espécie *Butia odorata* apresenta flores exclusivamente pistiladas (femininas) e exclusivamente estaminadas (masculinas) na mesma ráquila, e o conjunto dessas ráquulas compõem a inflorescência. Em seu trabalho Schwartz (2008) analisou separadamente as regiões basal, mediana e apical de uma inflorescência, por indivíduo, e verificou diferença na proporção da quantidade entre flores pistiladas e estaminadas, assim o número de flores estaminadas diminui da região basal (176 estaminadas:25 pistiladas) até a apical (129 estaminadas:11 pistiladas), porém se mantém superior ao número de flores pistiladas ao longo da inflorescência.

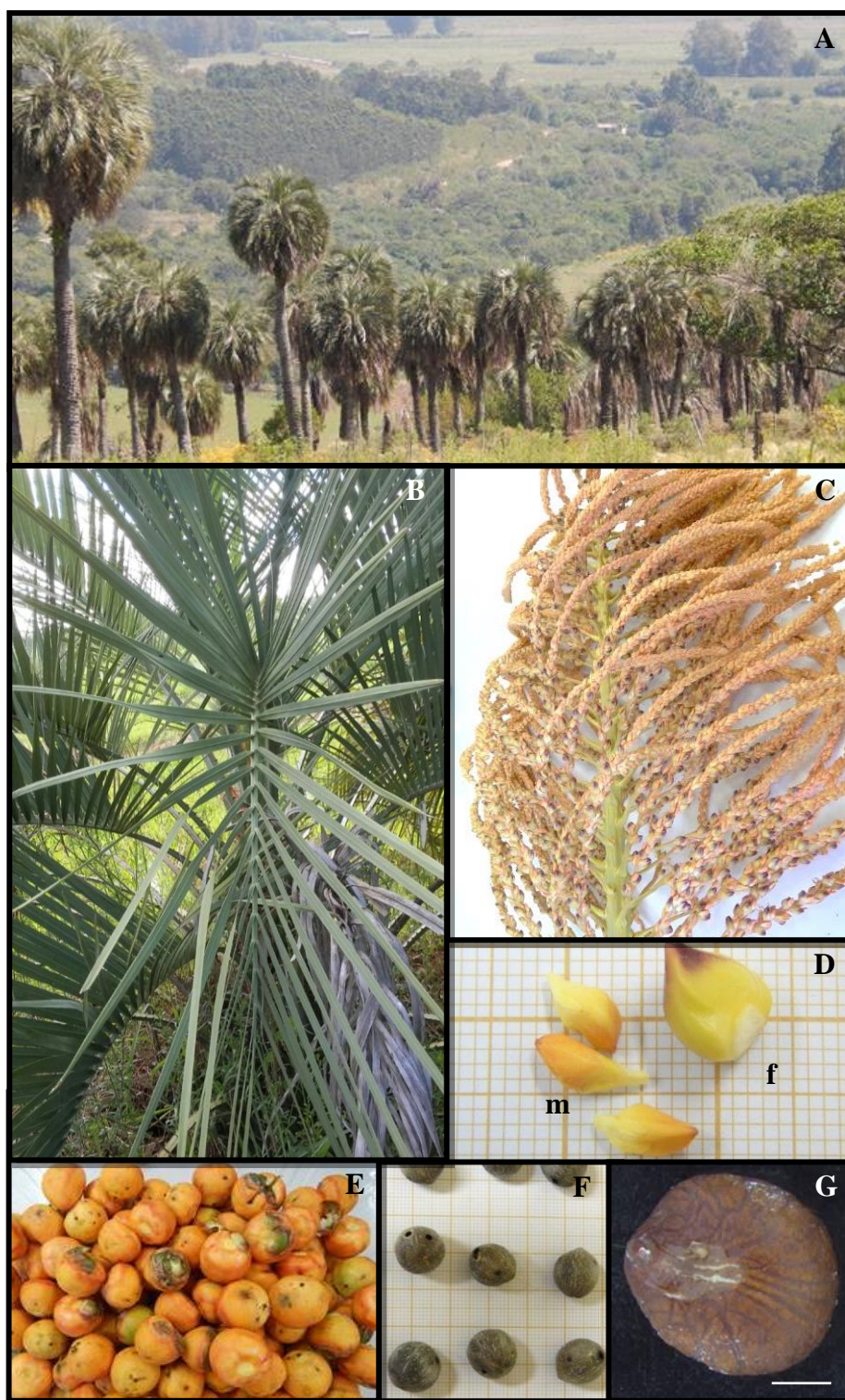


FIGURA 1. (A) Butiazal em Barão do Triunfo, RS, 2015. (B) Folha. (C) Inflorescência. (D) Botão floral feminino (f) e masculino (m). (E) Frutos maduros. (F) Diásporos. (G) Semente de *Butia odorata* (Escala: 2mm).

Os grãos de pólen apresentam forma variável, entre simétrica e assimétrica piriforme na visão polar, com tamanho médio a grande (eixo longitudinal de 50 a 79

mm), heteropolar, monossulcado e com viabilidade de 58% (Mourelle *et al.*, 2016). Padilha *et al.* (2016) avaliaram a produção de cachos por planta, em uma população natural com mais de 150 anos, ao longo de três anos, verificaram uma produção média de três cachos de frutos por planta com variação na produção de cachos por planta de um ano para o outro e a existência de variabilidade genética para o número de cachos produzidos por planta.

O fruto é do tipo drupa, carnoso e comestível, o endocarpo (coquinho ou caroço) pode apresentar de uma a três sementes, essas também são consumidas e conhecidas popularmente como amêndoas (Rivas & Barbieri, 2014; Barbieri *et al.*, 2015).

Os frutos apresentam tamanho variável, geralmente mais amplo do que longo, de 1,4-4,3 x 2,0-3,5 cm (Soares, 2015) com várias tonalidades do amarelo ao laranja e muito aromáticos (Lorenzi *et al.*, 2010). O mesocarpo (polpa) pode ser vermelho, amarelo esverdeado e amarelo com perianto persistente variando entre o doce e o ácido; endocarpo duro, geralmente globoso ou ligeiramente ovoide de 1,3-2,2 x 1,3-2,0 cm, com 1-3 sementes, endosperma homogêneo (Soares, 2015; Lorenzi *et al.*, 2010). A massa média dos frutos é de 12 g por unidade (Schwartz *et al.*, 2010). De acordo com Lorenzi *et al.* (2010) o tamanho do fruto aumenta conforme aumenta a latitude de distribuição da espécie. Os frutos de butiá podem ser classificados como climatérios, porque seu amadurecimento ainda segue após a colheita (Neuwald *et al.*, 2004).

Em relação a pragas e doenças para as espécies do gênero *Butia* e mesmo para a espécie *B. odorata* não se tem muito relatos. Mas, recentemente Tonietto & Schlindwein (2016) relataram, pela primeira vez, a ocorrência de um coleóptero para a espécie *B. odorata*, o curculionídeo *Revena plaumanni* BONDAR, 1943, que oviposita nas flores quando adulto e suas larvas se desenvolvem dentro das sementes causando danos. Dorneles *et al.*, (2017) coletaram frutos de *B. odorata* no Centro agrônomo da Palma da Universidade Federal de Pelotas, em Capão do Leão, RS. Estes frutos apresentavam sintomas de antracnose e os resultados das análises identificaram a presença do fungo *Colletotrichum theobromicola*.

2.3 Importância socioeconômica de *Butia odorata*

Na literatura encontram-se estudos e levantamentos florísticos sobre espécies de palmeiras nativas comestíveis e ornamentais, sua relação com a comunidade e fauna local, no Rio Grande do Sul, nos quais *B. odorata* é citada entre as espécies estudadas

(Buttow *et al.*, 2009; Venzke, 2012; Piaia *et al.*, 2013; Scipioni *et al.*, 2013). Alguns desses estudos apresentam como objetivo caracterizar as espécies de palmeiras em seu habitat natural para melhor entender seu comportamento fenológico e para caracterização da espécie. Parâmetros biométricos, caracterização da biologia reprodutiva, superação da dormência em sementes, produtividade e qualidade dos frutos são alguns dos temas abordados nas pesquisas com *B. odorata* (Rosa *et al.*, 1998; Fior *et al.*, 2011; Ferrão *et al.*, 2013). Além dessas abordagens disponíveis na literatura, podemos encontrar a descrição de novas espécies para o gênero *Butia* (Soares & Longhi, 2011; Deble *et al.*, 2012), algumas iniciativas ao incentivo da preservação dos butiazais (Piaia *et al.*, 2013) e informações sobre práticas para um manejo extrativista sustentável (Rivas & Barbieri, 2014) todas disponíveis ao público com o objetivo de colaborar para o uso sustentável do *B. odorata* preservando as áreas de butiazais.

Atualmente os frutos da espécie *B. odorata* tem recebido maior atenção nas pesquisas devido às suas propriedades bioativas com potencial de comercialização (Rivas & Barbieri, 2014; Hoffmann *et al.*, 2014). Os frutos possuem polpa doce, ácida e fibrosa, sua composição é rica em compostos bioativos, incluindo ácido L-ascórbico, carotenóides (provitamina A), antocianinas e compostos fenólicos (Fonseca *et al.*, 2012; Beskow *et al.*, 2015). São utilizados na produção de geleias, sorvetes, bombons, bebidas por pequenas agroindústrias locais. As folhas possuem fibras resistentes que têm sido utilizadas para produzir diversos artesanatos, uma fonte alternativa de renda para os agricultores. As plantas também são utilizadas como ornamentais, nas zonas rurais e urbanas. Ainda há a opção, não muito explorada, da produção de óleos de boa qualidade, para o desenvolvimento de novos produtos em setores industriais (alimentício, farmacêutico ou cosmético), a partir de suas sementes como mais uma oportunidade geradora de renda para comunidade (Rivas & Barbieri, 2014).

O uso do butiá está intimamente ligado à cultura dos agricultores do sul do Brasil. O fato de que tanto a sua diversidade genética quanto o conhecimento associado estão sob grave erosão é uma grande preocupação para os membros da comunidade científica e local. Mistura *et al.* (2016) mencionam quatro bancos de germoplasma que conservam o germoplasma de *B. odorata* no Brasil: três trabalham com a conservação *ex situ* e um com a conservação *in situ*. O banco de germoplasma *in situ* encontra-se numa área de 750 ha pertencentes a uma fazenda privada, em Tapes, e abriga uma

população composta por mais de 60 mil palmeiras adultas, a maioria com idade superior a 150 anos.

Pesquisas têm mostrado outras aplicações para *B. odorata* como a atividade antibacteriana do extrato de butiá, testado contra três bactérias patogênicas, comprovando potencial para uso em alimentos como agente bioconservante (Maia *et al.*, 2017). E com relação à estabilidade dos compostos presentes na polpa pasteurizada dos frutos de butiá que após o congelamento e armazenamento por 12 meses, apresenta queda no conteúdo dos compostos presentes (Hoffmam *et al.*, 2017).

Porém, ainda há a necessidade de mais estudos e pesquisas em relação à fisiologia (exigências de luz, água, temperatura, nutrientes; metabolismo primário e secundário), suas características agrônômicas (fenologia, produtividade) e também com relação às técnicas biotecnológicas que podem ser empregadas no melhoramento e conservação da espécie. Além disso, é necessário disponibilizar de forma clara o conhecimento geral sobre as palmeiras do gênero *Butia*, principalmente em relação a práticas e manejo de plantas, aos produtores e comunidade local enfatizando sua importância (econômica e social), incentivando a conservação e perpetuação da espécie. E assim alcançar o uso sustentável dos butiazeiros como fonte de renda, e conservá-los em coleções nos bancos de germoplasma *in situ* e/ou *ex situ*.

A propagação de *B. odorata* é exclusiva por sementes. Essa condição é limitante para a produção de mudas. Isso porque as sementes apresentam dormência, longo período germinativo e produção desuniforme, variando entre meses até anos (Barbieri *et al.*, 2014). Metodologias para superação da dormência permitem altos índices de germinação. O acondicionamento em saco plástico dos diásporos seguido da estratificação por temperatura apresentaram 80% de germinação, entre 12 a 48 dias após semeadura em viveiro (Tonietto *et al.*, 2009). A remoção do opérculo das sementes pode alcançar índices de 72% de germinação com tempo médio de 56 dias em casa de vegetação (Fior, *et al.*, 2011). Contudo ambas as metodologias exigem condições específicas ou demandam mão de obra.

2.4 Cultivo *in vitro* de *Butia*

Existem várias técnicas de cultivo *in vitro* de plantas, desde a micropropagação até a limpeza clonal para obter plantas livres de patógenos, além de dar suporte técnico a trabalhos de transformação genética e obtenção de plantas transgênicas. A

micropropagação, ou propagação *in vitro*, é uma das aplicações mais rotineiras e com maior impacto para agricultura, pois oferece uma relação de custo benefício melhor, permite uma rápida multiplicação, em escala comercial, com características agronômicas superiores obtendo material uniforme e selecionado (Cid & Teixeira, 2014). Também apresenta grande aplicação em espécies florestais e hortícolas, além da pesquisa básica que tem fundamental importância na compreensão dos eventos morfológicos e bioquímicos que ocorrem em plantas.

Dentre as principais etapas da propagação *in vitro*, ressalta-se a definição de um explante, a partir de um órgão da planta, a desinfestação desse órgão e o isolamento seguido da incubação do explante em meio de cultura. Os explantes podem ser constituídos por segmentos de tecidos ou órgão vegetal, e podem ser oriundos de diversas partes da planta (flor, folha, raiz, caule) e devem ser responsivos aos sinais químicos e/ou físicos induzidos no meio de cultura regenerando uma nova planta. O meio de cultivo compreende a combinação de sais minerais (macro e micronutrientes), carboidratos, vitaminas e reguladores de crescimento, quimicamente definido e utilizado para o crescimento de células, tecidos ou órgãos *in vitro*. Pode ser gelificado (adicionando-se ágar ou outro agente) ou líquido (Torres *et al.*, 2000).

Em Arecaceae diversos estudos têm sido realizados na área da propagação *in vitro*, principalmente com relação à embriogênese somática. As principais espécies de interesse comercial como, *Cocos nucifera*, coco (Verdeil *et al.*, 1994); *Elaeis guineenses*, dendê (Teixeira *et al.*, 1993; Balzon *et al.*, 2013); *Phoenix dactylifera*, tâmara (Fki *et al.*, 2003; Sané, 2006; Othmani *et al.*, 2009); *Euterpe edulis*, juçara (Guerra & Handro, 1988, 1998); *Euterpe oleracea*, açaí (Scherwinski-Pereira *et al.*, 2012; Freitas *et al.*, 2016); *Acrocomia aculeata*, macaúba (Moura *et al.*, 2009); *Bactris gasipaes*, pupunha (Steinmacher *et al.*, 2007b; Heringer *et al.*, 2014) apresentam metodologias para propagação com a técnica de embriogênese somática. Para espécies com dificuldades de propagação vegetativa a embriogênese somática tem se tornado uma ferramenta útil na propagação *in vitro*, devido à alta taxa de multiplicação comparada a qualquer outro processo de propagação, permite estabelecer o período desejado para a obtenção de material propagativo e obter plantas geneticamente iguais à planta matriz (Zimmerman, 1993). Por exemplo, a tamareira, tradicionalmente, pode ser propagada vegetativamente, mas a propagação massal tem sido realizada,

principalmente, via embriogênese somática seguida da organogênese (Alkhateeb, 2008; Naik & Al-Khayri, 2016).

2.4.1 Embriogênese Somática

Embriogênese somática é o processo pelo qual células somáticas desenvolvem plantas diferenciadas através de estádios embriológicos característicos, sem a fusão de gametas (Williams & Maheswaran, 1986), num processo morfogenético que se aproxima da sequência dos eventos da embriogênese zigótica (Zimmerman *et al.*, 1993). Segundo Quiroz-Figueroa *et al.* (2006) a embriogênese somática é um processo no qual as células somáticas, em condições de indução, geram células embriogênicas, que passam por uma série de alterações morfológicas e bioquímicas resultando na formação de um embrião somático.

Essas características tornam a embriogênese somática um sistema modelo para o estudo de eventos morfológicos, fisiológicos, bioquímicos e moleculares ocorridos durante o início da embriogênese até o desenvolvimento da planta (Dodeman *et al.*, 1997). Somando-se às abordagens diferenciais da competência celular, conceituada como o potencial de reprogramação de uma célula em resposta a sinais específicos, por meio de processos de desdiferenciação e rediferenciação (Fehér *et al.*, 2003). Além disso, a embriogênese somática tem potencial para aplicações biotecnológicas como, por exemplo, a produção de sementes artificiais (Guerra *et al.*, 2001), micropropagação (Heringer *et al.*, 2014), regeneração de plantas transgênicas (Christou *et al.*, 1991).

A habilidade das células vegetais de desdiferenciar, dividir, diferenciar e regenerar um organismo completo se deve à totipotência, característica única das células vegetais. Células totipotentes apresentam a capacidade de se dividir e produzir todas as células diferenciadas no organismo, desde que estímulos e condições apropriadas sejam fornecidos, pois, qualquer célula vegetal nucleada possui a informação genética, necessária à regeneração de uma planta completa (Haberlandt, 1902). A capacidade de formar uma estrutura embrionária bipolar (embriões morfolologicamente normais) a partir de células somáticas é exclusiva das plantas (Zimmerman, 1993) evidenciando a totipotência da célula vegetal.

Durante o final da década de 1950, dois grupos de pesquisa independentes, Steward *et al.* e Reinert descobrem a embriogênese somática em cenoura (*Daucus*

carota), ambos em 1958, e desde então esta técnica é estudada e aplicada em uma grande diversidade de espécies vegetais.

A formação do embrião zigótico de organismos vegetais compreende dois processos fundamentais para o seu desenvolvimento, o padrão de formação e a citodiferenciação. O primeiro estabelece a organização espacial precisa dos componentes celulares derivados de uma única célula, a oosfera fecundada. O segundo compreende a diversificação celular dentro do embrião em desenvolvimento. Ambos os processos são altamente coordenados para criar uma estrutura morfológicamente reconhecível, o embrião (Lindsey & Topping, 1993).

Os embriões somáticos se diferenciam dos zigóticos devido ao seu desenvolvimento livre de correlações físicas, fisiológicas e genéticas que ocorrem durante o desenvolvimento dos embriões zigóticos (Zimmermann, 1993). Embriões somáticos não se tornam dormentes e não ocorre a formação do tegumento e nem do endosperma responsáveis pela conservação e germinação, respectivamente (Dodeman *et al.*, 1997). Apresentam um sistema vascular fechado, o qual não se conecta vascularmente com os tecidos do explante inicial. Esta característica, aliada à sua bipolaridade torna esse modelo morfogenético distinto dos processos de micropropagação e de organogênese (Guerra *et al.*, 1999).

As semelhanças entre embriões zigóticos e somáticos são a diferenciação de uma estrutura bipolar (ápice caulinar e radicular) ambos passam pelos estádios de desenvolvimento pró-embriônários e embriônários (no caso das dicotiledôneas: globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar; monocotiledôneas: globular, torpedo e cotiledonar) (Zimmerman, 1993; Zimmerman, 2014).

Existem dois tipos de embriogênese somática: a de ocorrência natural e a induzida *in vitro*. Por exemplo, em algumas espécies de *Citrus* sp., células do tecido embriônário podem ser direcionadas para uma rota morfogenética similar à embriogênese somática. Nessa rota embriões apomíticos se originam a partir de células do nucelo, que representam o genoma materno. Portanto, estes embriões são geneticamente idênticos à planta matriz permitindo a clonagem por meio de sementes (Guerra *et al.*, 1999). Outro exemplo ocorre em espécies do gênero *Kalanchoë* (Crassulaceae), os novos indivíduos, clones, surgem na margem das folhas (Garcês *et al.*, 2007).

A embriogênese somática *in vitro* é uma técnica da cultura de tecidos que permite manipular as condições de cultivo com o objetivo de direcionar o explante a seguir uma rota morfogênética específica, neste caso, a formação de embriões somáticos. Por isso a embriogênese somática tem importância tanto na conservação e melhoramento ou pré-melhoramento, quanto na propagação em escala de genótipos superiores. E também está sendo aplicada na regeneração de plântulas oriundas de células transformadas geneticamente (Zimmerman, 2014).

Duas rotas distintas podem ser observadas na embriogênese somática induzida *in vitro*, a direta e a indireta (Sharp *et al.*, 1980). A embriogênese somática direta consiste na formação de embriões somáticos diretamente do explante sem a formação de um tecido intermediário. Um exemplo desta rota direta foi demonstrado em um trabalho com a palmeira *Euterpe edulis* por Guerra & Handro (1988). Na segunda rota, embriogênese somática indireta, os embriões somáticos se formam a partir de um tecido intermediário, chamado de calo, definido como uma massa celular que apresenta crescimento com células em diferentes estádios de diferenciação e diferentes graus de determinação. Assim, a rota indireta requer um meio de cultivo mais complexo que induza à desdiferenciação e divisão celular. Um exemplo dessa rota indireta é o primeiro relato da embriogênese somática em cenoura, por Steward *et al.* (1958) e Reinert (1958). Essas células podem adquirir novas competências mediadas por mensageiros químicos específicos. Nas duas vias, direta e indireta, o embrião somático segue a mesma sequência de desenvolvimento do zigótico (Guerra *et al.*, 1999).

Na maioria dos modelos de embriogênese somática, as auxinas, são consideradas as substâncias responsáveis pelo desencadeamento dos processos de desdiferenciação (rota indireta) e rediferenciação (rota direta). Dentre as auxinas utilizadas para a indução da embriogênese somática, destacam-se o 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e o picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico), geralmente com o uso de altas concentrações, e a influência, de ambas as auxinas, na indução da embriogênese somática é descrita em vários trabalhos (Zavattiere *et al.*, 2010; Fehér, 2015).

Além das auxinas, outras condições de estresse são utilizadas na indução da embriogênese somática, estas incluem: estresse osmótico, estresse por metais pesados, alterações do pH do meio, temperatura (calor e frio), hipoxia, antibióticos, radiação ultravioleta e tratamentos mecânicos ou químicos (Zavattiere *et al.*, 2010). Inúmeras formas de estresse têm sido relatadas, e todas podem estar relacionadas com os níveis

hormonais endógenos intrínsecos à fonte do explante (Viñas & Jimenez, 2011). Mesmo considerando as auxinas como fundamentais no processo de indução provavelmente sua atuação é somada a outros fatores estressantes, já citados, e essas ações conjuntas desencadeiam o processo da embriogênese somática (Zavattiere *et al.*, 2010; Fehér, 2015).

Normalmente são empregados pelo menos dois meios de cultura diferentes no processo da embriogênese somática. O primeiro meio é otimizado visando à indução da embriogênese somática, enquanto que o segundo meio visa permitir o desenvolvimento dos embriões somáticos formados. As condições que favorecem a primeira fase, geralmente, inibem a segunda (Guerra *et al.*, 1999).

Assim, o processo de embriogênese somática geralmente é dividido em duas fases: a indução, na qual as células somáticas diferenciadas adquirem competência e proliferam como células embriogênicas; e a expressão, em que a morfogênese do embrião procede independentemente dos reguladores de crescimento exógenos (Fehér, 2015). Alguns autores ainda subdividem a fase de indução em duas etapas: aquisição de competência (as células somáticas adquirem competência para assumir um novo destino de desenvolvimento) e determinação celular (células ou tecidos competentes se comprometem com a formação de embriões em resposta ao suplemento de reguladores de crescimento). Embora o padrão de embriogênese somática de algumas espécies não siga as etapas estabelecidas, o primeiro passo do processo, a aquisição de competência, é o mais conservado e considerado como um passo essencial para esta rota morfogenética (Yang & Zhang, 2010). Segundo Zavattieri *et al.* (2010), não há um consenso internacional, entre pesquisadores, com relação à terminologia para cada etapa da embriogênese somática e as espécies associadas.

Viñas & Jimenez (2011) em sua revisão apontam quatro etapas gerais que compõem a fase de indução da embriogênese somática indireta em palmeiras: calo proembriogênico, desenvolvimento proembriogênico, maturação dos proembriões e desenvolvimento dos proembriões.

Primeiro deve-se estabelecer um estímulo celular para dar início à embriogênese somática, geralmente com o uso de auxinas (Guerra & Handro, 1998; Steinmacher *et al.*, 2007). De modo geral, na fase inicial as culturas são mantidas no escuro e geram complexos ou massas celulares proembrionárias, que por processos de embriogênese repetitiva resultam em um ciclo de divisões celulares, formando embriões somáticos

globulares em angiospermas e complexos celulares suspensor-embriionários, no caso de gimnospermas (Guerra *et al.*, 1999).

O desenvolvimento proembriogênico ocorre com o crescimento da massa proembriogênica na ausência de auxinas ou em baixas concentrações destas. A seguir deve-se estimular a conversão dos proembriões em embriões, seguido de um estímulo para o crescimento e o desenvolvimento desses embriões até a conversão em planta adulta. Este modelo de indução à embriogênese somática foi empregado em diferentes espécies, como palmeiras por Tisserat *et al.* (1980), gramíneas por Vasil & Vasil (1981), em espécies da família Magnoliaceae (Merkle, 1995), entre outras. Guerra & Handro (1998) obtiveram embriões somáticos de *Euterpe edulis* a partir de três tipos de explantes: embriões zigóticos, inflorescências de plantas adultas e folhas de plântulas cultivadas *in vitro*. Os embriões zigóticos utilizados como explantes deram origem a embriões somáticos por embriogênese somática direta. Além disso, foi possível regenerar estes embriões somáticos em plantas completas, porém não se obteve o mesmo sucesso com embriões oriundos de explantes de plântulas cultivadas *in vitro*.

A embriogênese somática apresenta algumas vantagens em relação a outras técnicas de micropropagação, por exemplo, a organogênese, devido a sua capacidade de produção de um grande número de embriões em um espaço limitado, esses embriões produzidos são individualizados e se desenvolvem diretamente em plantas. E ainda alguns procedimentos como a transformação genética e a criopreservação de muitas espécies vegetais são embasados em protocolos eficazes de embriogênese somática. Porém, apresenta a desvantagem da ocorrência de variação somaclonal quando o objetivo é propagação clonal e não a obtenção de variabilidade genética (Fehér, 2003).

A obtenção de um protocolo para indução à embriogênese somática é basicamente empírica, pois, requer certas condições experimentais que induzam as células somáticas a adquirirem seu potencial embriogênico. De acordo com Viñas & Jiménez (2011) essas condições são específicas ao genótipo, ao tecido, à fase de desenvolvimento da planta que se retira o explante, aos níveis hormonais; todos esses considerados fatores internos. Os fatores externos são o meio de cultura, reguladores de crescimento, luz e temperatura. Então, uma melhor compreensão desses fatores irá aumentar a eficiência dos protocolos. Contudo, muitos protocolos já foram desenvolvidos para diversas espécies e estão sendo melhorados de acordo com os resultados de pesquisas mais recentes disponíveis na literatura.

Assim, pode-se considerar que a indução à embriogênese somática *in vitro* vem a ser uma estratégia para a micropropagação de *B. odorata*. Dentro da família Arecaceae existe uma escassez de resultados e informações a este gênero em relação à embriogênese somática que até o momento relatam apenas a obtenção de calos sem a regeneração em plantas para *B. odorata*.

2.4.1.1 Fatores que afetam a embriogênese somática

Os principais fatores que influenciam o desenvolvimento do processo de embriogênese somática são: a condição fisiológica do explante, a composição do meio de cultura e as condições físicas do ambiente como luz e temperatura. Neste caso, podem-se destacar os fitorreguladores e o tipo de explante utilizado (tecidos de folhas, flores, embriões zigóticos) como os mais importantes e que irão definir e viabilizar os protocolos de embriogênese somática.

2.4.1.1.1 Explante

Em tese, todas as partes da planta podem ser usadas na indução da embriogênese somática: ápices caulinares, hipocótilos, discos e segmentos foliares, inflorescências, embriões, raízes, entre outros. De acordo com Viñas & Jiménez (2011) para a indução da embriogênese somática existem tecidos que respondem melhor que outros. No caso das monocotiledôneas, é muito importante a presença de regiões meristemáticas para a regeneração dos embriões somáticos na seleção do explante (Benson, 2000).

Por isso, em diversos trabalhos com palmeiras utilizam-se inflorescências imaturas, ápices e seções foliares basais (Guerra & Handro, 1999; Almeida & Almeida, 2006; Steinmacher *et al.*, 2007a). Wang *et al.* (2006) utilizaram folhas, raízes e seções caulinares de *Areca catechu*, cultivada *in vitro*, como fonte de explante. A resposta embriogênica pode variar em uma mesma espécie dependendo do tipo e idade (grau de maturação/desenvolvimento) do explante. Assim entende-se que determinadas formulações do meio de cultivo podem induzir embriogênese somática em um determinado tipo de explante e não induzir em outro, por exemplo.

A maioria dos trabalhos referentes à indução da embriogênese somática em palmeiras tem utilizado três fontes de explantes, folhas imaturas de *Phoenix dactylifera* (Fki *et al.*, 2003), inflorescências imaturas de *Cocos nucifera* (Verdeil *et al.*, 1994) e

embriões zigóticos de *Elaeis guineensis* (Rajesh *et al.*, 2003) e *Bactris gasipaes* (Steinmacher, 2007a).

Gueye *et al.* (2009) realizaram um estudo histológico com diferentes segmentos foliares de *Phoenix dactylifera*. Os resultados mostraram que entre as três zonas de divisão celular estudadas (segmento basal), alongação (segmento intermediário) e maturação (segmento distal) somente a zona de alongação respondeu ao tratamento com 2,4-D formando calos embriogênicos.

Diversos trabalhos demonstram a embriogênese somática induzida a partir de diferentes tipos de explantes (cotilédones, folhas, inflorescências, segmentos de caule, raízes, protoplastos, embriões zigóticos, micrósporos). Podendo ocorrer de forma direta do tecido do explante ou indiretamente após a formação do calo. Estudos anteriores apresentam a hipótese de que ambos os processos são extremos de uma via de desenvolvimento contínua em que o calo representa um passo de reprogramação de tecido não organizado que precede a formação de embriões (Fehér *et al.*, 2003, Yang e Zhang, 2010). Os mecanismos por trás da indução de cada padrão de desenvolvimento (direto e indireto) ainda permanecem mal compreendidos. A embriogênese direta foi induzida a partir da cultura de micrósporos (Perera *et al.*, 2009), folhas (Raju *et al.*, 2015) e embriões zigóticos (Guerra & Handro, 1988). A embriogênese indireta tem sido relatada com mais frequência, entre espécies de palmeiras, a partir de diferentes tipos de explantes (Wang *et al.*, 2006; Sané *et al.*, 2012 Freitas *et al.*, 2016). A embriogênese somática também pode ser induzida a partir de embriões somáticos desenvolvidos a partir de explantes primários, conhecida tecnicamente por embriogênese somática secundária.

2.4.1.1.2 Composição do meio nutritivo

O meio de cultivo gelificado ainda é o mais utilizado para indução da embriogênese (Viñas & Jiménez, 2011). Outros sistemas de cultivo, por exemplo, biorreatores têm sido utilizados em pesquisas mais recentes mostrando maior eficiência na formação de embriões somáticos (Steinmacher *et al.*, 2011), melhores resultados da aclimatização foram obtidos de plântulas oriundas do sistema RITA[®] (Recipient for Automated Temporary Immersion) (Heringer *et al.*, 2014) e o uso de biorreator de imersão temporária na otimização da regeneração e alongação dos embriões somáticos (Gomes *et al.*, 2016).

Os meios de cultura mais utilizados para indução da embriogênese somática em palmeiras são o MS (Murashigue & Skoog, 1962) e o Y3 (Eeuwens, 1976). De acordo com Viñas & Jiménez (2011) o aspecto mais importante para superar a recalcitrância durante o cultivo *in vitro* é a escolha adequada dos reguladores de crescimento que irão compor o meio de cultivo, independente da espécie vegetal que se trabalha (Benson, 2000). O balanço dos reguladores endógenos e exógenos é determinante para o resultado final porque os explantes estão sob o controle desses reguladores de crescimento (Benson, 2000).

No processo de embriogênese somática, entre os carboidratos constituintes do meio de cultura, a sacarose é a fonte mais usada para a indução da embriogênese somática. Em palmeiras a concentração de 3% de sacarose tem sido a mais utilizada (Ree & Guerra, 2015).

Substâncias reguladoras de crescimento como auxinas, citocininas, ácido giberélico e ácido abscísico são necessárias para indução e manutenção da embriogênese somática, algumas com maior necessidade de suplementação no meio de cultivo do que outras. As auxinas têm papel fundamental na indução da embriogênese somática de várias espécies (Dudits *et al.*, 1995).

Na maioria dos protocolos de indução à embriogênese somática, para grande parte das espécies vegetais, incluindo as palmeiras, as auxinas são os reguladores de crescimento mais amplamente utilizados para indução de calos com potencial embriogênico. As auxinas estão envolvidas com a indução e a iniciação de embriões somáticos. Em muitas espécies, a indução é verificada ao se cultivar o explante em meio com concentração relativamente elevada de 2,4-D (Guerra *et al.*, 1999; Fehér *et al.*, 2003). A maioria dos estudos utilizam altas concentrações da auxina 2,4-D, acima de 100 μM , Balzon *et al.* (2013) obtiveram uma frequência de calos embriogênicos, procedentes de embriões zigóticos de *Elaeis guineensis*, de 79,4 % em resposta ao uso de 450 μM de 2,4-D. Karun *et al.* (2004) utilizaram como fonte de explante folhas de plântulas cultivadas *in vitro* de *Areca catechu*, mas não obtiveram resposta quanto à produção de calos embriogênicos com a concentração de 68 μM de 2,4-D. Thi-Lan *et al.* (1999) observaram que concentrações maiores que 90,5 μM de 2,4-D inibiram a indução de calo embriogênico em *Phoenix canariensis*. Assim a concentração de auxina tem se mostrado variável entre as espécies de palmeiras estudadas.

Os embriões somáticos são desenvolvidos após a transferência do calo ou suspensão celular para outro meio com baixa concentração de auxinas ou estas são totalmente eliminadas do meio de cultura (Halperin & Wetherell, 1964), provavelmente porque após a iniciação, as auxinas, em particular o 2,4-D, inibem a sequência do desenvolvimento dos embriões, ou continuam induzindo a divisão.

Trabalhos realizados com palmeiras mostram que além do uso de 2,4-D outras auxinas são aplicadas nos protocolos como picloram e dicamba (ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico) (Steinmacher *et al.*, 2007a; Steinmacher *et al.*, 2011).

Segundo Guerra *et al.* (1999) as citocininas podem favorecer a produção de calo embriogênico. Muitos pesquisadores têm utilizado, em combinação com as auxinas, citocininas como BAP (6-benzilaminopurina) (Zouine & El Hadrami, 2007), 2iP (2-isopenteniladenina) (Badawy *et al.*, 2005; Eshraghi *et al.*, 2005) e o tidiazuron (TDZ) (Perera *et al.*, 2009; Sidky & Zaid, 2011) todos com resultados positivos para indução da embriogênese somática.

O ácido abscísico (ABA) é o regulador de crescimento mais utilizado no desenvolvimento das massas proembriogênicas, segundo Vinãs & Jiménez (2011), atuando na transição da proliferação para maturação dos embriões somáticos. Trabalhos mostram que o uso de ABA apresenta resultados positivos, por exemplo, em coqueiro (Fernando & Gamage, 2000), tamareira (Zouine *et al.*, 2005; Othmani *et al.*, 2009; Sghaier *et al.*, 2009) e *Phoenix canariensis* (Thi-Lan *et al.*, 1999). Sghaier *et al.* (2010) verificaram que a adição de ABA no meio de cultivo incrementou significativamente o conteúdo de proteína em embriões somáticos de *P. dactylifera*, principalmente proteínas abundantes durante o final da embriogênese, conhecidas como proteínas LEA (*late embryogeneses accumulated*), relacionadas com a proteção do embrião à dessecação.

2.4.1.1.3 Condições físicas de incubação

Segundo Saleh & Scherwinski-Pereira (2016), 30% dos protocolos de embriogênese somática transferiram os calos para condições de luz, com fotoperíodo que varia de 12 à 16h de luz na fase de indução da embriogênese, e na fase de maturação, o número chega a 50% dos protocolos. Durante a fase da regeneração em planta, todos os protocolos transferem os embriões para a luz, com fotoperíodo de 16h em 85% dos casos. As condições do cultivo *in vitro* podem representar uma combinação de fatores de estresse para o explante. A ausência de luz, por exemplo, é considerada

favorável, pois evita o aumento da atividade de enzimas relacionadas à oxidação e reduz a produção de fenóis (Marks & Simpson, 1990; Zavattieri *et al.*, 2010).

2.4.1.1.4 Oxidação e Carvão Ativado

Na cultura de tecidos, a oxidação do material vegetal (explante) é considerada um dos aspectos mais sérios que prejudica o desenvolvimento *in vitro*. Caracterizado pelo escurecimento rápido do tecido, geralmente, no local do corte. A oxidação pode ocorrer também nas extremidades do tecido resultando na liberação e oxidação de compostos fenólicos inibindo o crescimento do explante (Cid & Teixeira, 2014).

Existem diversos estudos a respeito da oxidação que mostram a eficácia do uso de substâncias antioxidantes como ácido ascórbico, ácido cítrico, carvão ativado, polivinilpirrolidona (PVP), adicionados ao meio de cultivo ou pela imersão dos explantes. O carvão ativado adsorve muitas substâncias presentes no meio de cultura (vitaminas, íons metálicos, reguladores de crescimento de plantas, e outros) e também pode liberar substâncias naturalmente presentes na sua constituição. O carvão ativado é frequentemente usado na cultura de tecidos para melhorar o crescimento e o desenvolvimento das células e desempenha um papel crítico na micropropagação, embriogênese somática, cultura de anteras, cultura de protoplastos, enraizamento, etc (Thomas, 2008).

Saézn *et al.* (2010) avaliaram os efeitos de oito tipos de carvão ativado sobre a auxina 2,4-D livre, pH, condutividade e osmolaridade do meio de cultura e também na frequência da indução de calos embriogênicos. Verificaram uma variação significativa dos diferentes tipos de carvão ativado em todas as variáveis analisadas. A maioria das pesquisas com palmeiras eliminam o carvão ativado durante as fases finais da embriogênese somática (Verdeil *et al.*, 1994; Steinmacher *et al.*, 2007b). Em outras, o carvão ativado é utilizado durante todas as fases da embriogênese somática (Eshraghi *et al.*, 2005; Steinmacher *et al.*, 2007a) e, em algumas, não se utiliza em nenhuma fase (Badawy *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006). Portanto, o uso do carvão ativado, no meio de cultura, pode ser considerado dependente da espécie, do tipo de explante e, principalmente, da concentração de reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura.

2.4.2 *Thin cell layer* TCL

A técnica *Thin cell layer* (TCL), ou camada de células finas, surgiu na década de 1970 com o trabalho de Tran Thanh Van (1973). No qual foram cultivados cortes transversais do caule de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) resultando na organogênese direta de botões florais. Esses botões florais originaram-se da epiderme dos TCLs, mostrando a eficiência da técnica na regeneração de órgãos de uma maneira rápida, a partir de diferentes regiões da planta utilizando uma pequena quantidade de material vegetal inicial.

A técnica TCL é baseada no uso de explantes com tamanho reduzido (escala em milímetros) que podem ser excisados de diferentes órgãos da planta (caule, folha, raiz, inflorescência, primórdio floral, ou órgãos florais, cotilédones, hipocótilo, epicótilo, zona apical ou embrião). Os explantes podem ser excisados longitudinalmente, TCLs longitudinais (lTCL) ou excisados transversalmente, TCLs transversais (tTCL). Os lTCLs com tamanho entre 1 mm x 0,5 ou 10 mm incluem apenas um tipo de tecido, por exemplo, uma monocamada de células epidérmicas (que poderiam ser descascadas dos órgãos) ou várias (3-6) camadas de células corticais enquanto que os tTCLs (tamanho entre 0,2 e 0,5 mm ou alguns mm de espessura) incluem um pequeno número de células de diferentes tipos de tecido (tecido epidérmico, cortical, cambial, perivascular e medular, assim como células de parênquima). O traço comum entre lTCL e tTCL é sua fina espessura, ou seja, um explante com um número tão pequeno de células quanto possível. A característica de ser uma camada fina é de suma importância porque as moléculas marcadoras de diferenciação podem ser localizadas *in situ* nas células alvo ou nas células sensíveis e tal localização permite circunscrever as células responsivas (Tran Thanh Van, 2003).

De acordo com Nhut *et al.* (2003) a técnica TCL permite a manipulação dos explantes de forma controlada e repetível para induzir a diferentes respostas morfogênicas (embriogênese somática e organogênese). Essas respostas são resultados de uma característica, única das células vegetais, a totipotência (Haberlandt, 1902). Com base nisso esta técnica pode ser aplicada também para a produção de embriões somáticos. Isso irá depender de inúmeros fatores, por exemplo, o estado fisiológico e a origem do TCL, as condições controladas (luz, pH, temperatura) e fatores de estresse aplicados ao TCL no meio de cultura (Silva & Nhut, 2003). Além disso, pode ser aplicada no aumento da produção de metabólitos secundários com fins farmacêuticos

por meio da cultura de órgãos transgênicos e no aumento da eficiência e controle da regeneração de tecidos transformados (Silva, 2003).

Trabalhos envolvendo embriogênese somática a partir de TCLs foram relatados em *Bambusa glaucescens*, com calogênese a partir de TCLs de folhas jovens (Jullien & Tran Tranh Van, 1994). Em *Agave fourcroydes* foi induzida embriogênese somática direta de tTCLs das bases de folhas de plântulas *in vitro* com 5-7cm de comprimento (Monja-Mio & Robert, 2013). Em *Rubus sanctus* e *Rubus hirtus* a partir de tTCLs de micro brotações *in vitro* com indução da embriogênese somática e posterior regeneração de plantas (Sabooni & Shekafandeh, 2017).

A aplicação da técnica TCL para indução da embriogênese somática tem sua eficiência comprovada por alguns poucos trabalhos com palmeiras, que utilizaram tTCLs a partir de plântulas germinadas *in vitro* Steinmacher *et al.* (2007), Scherwinski-Pereira *et al.* (2010), Padilha *et al.* (2015) e Bonetti *et al.* (2016). Outros trabalhos utilizaram TCLs a partir de explantes de inflorescências jovens (Guedes *et al.*, 2011).

2.5 Histologia

Para uma melhor compreensão dos eventos que ocorrem no âmbito tecidual e celular em espécies vegetais cultivadas *in vitro* é necessário o emprego de técnicas de análise anatômica que permitam a visualização e comprovação desses eventos celulares.

Estudos que empregam técnicas de análise anatômica podem ser realizados para identificar padrões morfogênicos diferentes dos expressados pela planta *in vivo* quando cultivada *in vitro* (Rodrigues *et al.*, 2004). Por exemplo, verificar e confirmar o desenvolvimento de embriões somáticos produzidos através da embriogênese somática e para definir sua origem uni ou multicelular. Essa abordagem permite a observação da origem tecidual do embrião somático e pode-se caracterizar morfológicamente o tecido. O estudo do desenvolvimento de células ou grupos de células por técnicas histológicas tem se mostrado muito útil para o entendimento da embriogênese em várias espécies *C. nucifera* (Chan *et al.*, 1998), *P. dactylifera* (Sané *et al.*, 2006), *Byrsonima intermedia* (Nogueira *et al.*, 2007), *Acrocomia aculeata* (Moura *et al.*, 2010).

Análises histológicas realizadas em calos embriogênicos, obtidos a partir de embriões zigóticos cultivados em meio semi-sólido, por Tisserat & DeMason (1980) mostraram a origem unicelular dos embriões somáticos de *P. dactylifera*.

Ao se utilizar embriões zigóticos de *C. nucifera* como explante para embriogênese somática, verificou-se que a origem da embriogênese somática ocorre na plúmula (Chan *et al.*, 1998), essa observação potencializou os protocolos de embriogênese dessa espécie. Por isso é importante fazer o acompanhamento e a identificação das estruturas presentes nos diferentes estádios durante a embriogênese somática por meio de estudos anatômicos para entender melhor os processos morfogênicos e aperfeiçoar os protocolos de micropropagação de plantas.

Sané *et al.* (2006) induziram embriogênese somática em folhas jovens de *P. dactylifera* e identificaram a primeira divisão celular próxima aos feixes vasculares, observaram proembriões delimitados por uma parede pectocelulósica, semelhanças entre a anatomia do embrião somático em relação ao zigótico e as diferenças como um déficit no acúmulo de proteína intracelular pelo embrião somático em relação ao embrião zigótico.

As massas proembriogênicas que apresentam a capacidade de produzir embriões somáticos são caracterizadas por formar aglomerados de massas com uma consistência rígida, de aspecto esbranquiçado e crescimento lento (Guimarães *et al.*, 1988). As células embriogênicas são pequenas (entre 100 e 200 μm), isodiamétricas, possuem alta razão núcleo/citoplasma, apresentam citoplasma denso e núcleo grande), cujo núcleo e nucléolo são densamente corados, sistema celular organizado, microvacúolos e amiloplastídeos, assemelhando-se com as células meristemáticas (Sharp *et al.*, 1982; Guerra *et al.*, 1999). As propriedades histoquímicas destas células sugerem intensa atividade metabólica e de síntese de RNA (Tisserat *et al.*, 1979; Sharp *et al.*, 1982). As células não embriogênicas se apresentam, na maioria dos casos, como células grandes, alongadas, vacuoladas, com espaços intercelulares e sistema celular desorganizado (Nogueira *et al.*, 2007). O calo não embriogênico cresce rapidamente e apresenta consistência mais friável.

De acordo com Guerra *et al.* (1999) células não embriogênicas originam-se de células pouco diferenciadas dividindo-se em uma única direção e se diferenciam em células parenquimáticas com vacúolos conspícuos e não apresentam amido e proteínas como substâncias de reserva. As células embriogênicas apresentam diversos planos de divisão e dão origem a células menores com pequenos grãos de amido. Testes histoquímicos permitem diferenciar calos embriogênicos dos não embriogênicos utilizando estas estruturas como marcadores.

2.6 *SERK*: Marcador molecular na expressão da embriogênese somática

O processo da embriogênese somática é o tipo de regeneração mais estudado e menos entendido. Pois, não se sabe o porquê e como uma célula vegetal diferenciada torna-se uma célula embrionária e por que esse fenômeno é restrito apenas a certos genótipos, explantes ou células (Fehér, 2015). Em um primeiro momento as pesquisas focam na busca por diferenças morfológicas e/ou celulares para descrever e caracterizar os passos relacionados com a aquisição da competência embriogênica. Mas até o momento não foi definido um marcador estrutural ou fisiológico reproduzível que possa ser aplicado a diferentes espécies de plantas (Namasivayam, 2007). Análises e estudos anatômicos ainda são as ferramentas fundamentais na comprovação e avaliação do processo de embriogênese somática.

As pesquisas com *Arabidopsis* e outras espécies, na área da biologia molecular e genética, têm verificado e rastreado a expressão de vários genes durante a embriogênese somática. Em um desses estudos com cenoura (*Daucus carota*) foi isolado o gene *SERK* (receptor de quinase na embriogênese somática) inicialmente identificado em culturas embrionárias de cenoura por Schmidt *et al.* (1997). Desde então o gene *SERK* tem sido considerado um marcador molecular para células competentes que irão formar embriões somáticos. Isto foi comprovado em experimentos de rastreamento celular onde se observou células individuais, que expressavam o *SERK*, podiam se desenvolver em embriões somáticos (Nolan *et al.*, 2003).

Os níveis de expressão deste gene foram associados à capacidade de desenvolvimento de células isoladas em embriões somáticos em uma grande variedade de espécies, por exemplo, *Dactylis glomerata*, (Somleva *et al.*, 2000); *Zea mays* L. (Baudino *et al.*, 2001), *Arabidopsis thaliana* (Hecht *et al.*, 2001), *Theobroma cacao* (Santos *et al.*, 2005), *Triticum aestivum* (Singla *et al.*, 2008). E entre as espécies de palmeiras o gene *SERK* foi identificado em *C. nucifera* (Pérez-Núñez *et al.*, 2009). Na cenoura, a expressão do *SERK* mostrou ser característico de culturas de células embriogênicas e embriões somáticos cuja expressão diminui após o estágio globular. O *SERK* pertence a uma grande e conservada superfamília de repetições ricas em leucinas, receptor do tipo quinase, (LRRRLK) e são responsáveis por uma variedade de sinais de processos de transdução em plantas (Baudino *et al.*, 2001; Nolan *et al.*, 2003; Albrecht *et al.*, 2005). Até o momento cinco membros da família *SERK* foram isolados em *A. thaliana* (*AtSERK1*, *AtSERK2*, *AtSER3*, *AtSERK4* e *AtSERK5*) e estes genes

demonstraram expressão específica em diferentes estágios da embriogênese somática (Hecht *et al.*, 2001). A expressão do *SERK*, ao longo do processo de embriogênese somática, não está limitada a um tipo de célula em particular, mas ocorre em células individuais morfologicamente distintas e agrupamentos de células pequenas. Esta expressão continua através da formação de uma massa proembriônica até que os embriões atinjam o estágio globular (Schmidt *et al.*, 1997). Além disso, embriões somáticos de diferentes espécies são formados de tipos de células morfologicamente distintas que expressam o gene *SERK*. Por exemplo, células alargadas e vacuoladas que são derivadas do procâmbio e expressam *SERK* foram embriogenicamente competentes em cenoura (Schmidt *et al.*, 1997).

Hecht *et al.* (2001) identificaram um homólogo em *Arabidopsis* do cDNA de *SERK* da cenoura e clonaram demonstrando que o gene *AtSERK1* é altamente expresso durante a formação de células embriônicas em cultura e durante a embriogênese precoce. E foi também estabelecido que o produto *AtSERK1* é suficiente para conferir competência embriônica. Somleva *et al.* (2000) verificaram a existência de um homólogo do *SERK* da cenoura em embriões de *Dactylis glomerata*, assim este gene pode ser utilizado como um marcador para monitorar a formação de células embriônicas também em espécies de monocotiledôneas (Nolan *et al.*, 2003).

2.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBRECHT, C. et al. The *Arabidopsis thaliana* somatic embryogenesis receptor-like kinases1 and 2 control male sporogenesis, **Plant Cell**, Rockville, v. 17, p. 3337–3349, 2005.

ALKHATEEB, A. A. A review the problems facing the use of tissue culture technique in date palm (*Phoenix dactylifera* L.). **Scientific Journal of King Faisal University**, Riyadh, v. 9, n. 2, p. 85-104, 2008.

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

BADAWY, E. M. et al. Propagation of date palm (*Phoenix dactylifera*) plants by using tissue culture technique. **Arab Journal of Biotechnology**, Giza, v. 8, n. 2, p. 343-354, 2005.

BALZON, T. A.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA. New approaches to improve the efficiency of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) from mature zygotic embryos. **In vitro Cellular Development Biology-Plant**, Cambridge, v. 49, p. 41-50, 2013.

BARBIERI, R. L. Butia. In: LOPES, Ricardo et al. **Palmeiras nativas do Brasil**. Brasília, DF: Embrapa, 2015. 432 p.

BASU, S.; SENGUPTA, R.; ZANDI, P. **Arecaceae**: the majestic family of palms. 2014. Disponível em: <<http://www.eoearth.org/view/article/53dc075c0cf2541de6d02774>>. Acesso em: 09 out. 2014.

BAUDINO, S. et al. Molecular characterization of two novel maize LRR receptor-like kinase, which belong to the *SERK* gene family. **Planta**, Berlin, n. 213, p. 1-10, 2001.

BENSON, E. E. In vitro plant recalcitrance: an introduction. **In Vitro Cellular and Development Biology - Plant**, Cambridge, n. 36, p. 141-148, 2000.

BESKOW, G. T. et al. Bioactive and yield potential of jelly palms (*Butia odorata* Barb. Rodr.). **Food Chemistry**, London, v. 172, p. 699–704, 2015.

BONETTI, K. A. P. et al. Somatic embryogenesis from zygotic embryos and thin cell layers (TCLs) of Brazilian oil palm (*Elaeis guineensis* × *Elaeis oleifera*). **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 15, n. 37, p. 2028-2037, 2016.

BÜTTOW, M. V. et al. Conhecimento tradicional associado ao uso de butiás (*Butia* spp., Arecaceae) no sul do Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 4, p. 1069-1075, 2009.

CHAN, J. I. et al. Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 17, p. 515-521, 1998.

CHRISTOU, P.; FORD, T. L.; KOFRON, M. Production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants from agronomically important indica and japônica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. **Nature Biotechnology**, New York, v. 9, p. 957-962, 1991.

CID, L. P. B.; TEIXEIRA, J. B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: CID, L. P. B. (Ed.). **Cultivo in vitro de plantas**. 3. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2014. p.15-49.

DEBLE, L. P. et al. Survey on *Butia* (Becc.) Becc. (Arecaceae) from Rio Grande do Sul state (Brazil). **Balduinia**, Santa Maria, n. 30, p. 3-24, 2011.

DEBLE, L. P. et al. *Butia quaraimana* (Arecaceae), uma nova espécie para o Rio Grande do Sul (Brasil). **Balduinia**, Santa Maria, n. 33, p. 9-20, 2012.

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

DORNELES, K. R.; ELOY, J.; DALLAGNOL, L. J. *Colletotrichum theobromicola* causing anthracnose on butia fruits in Brazil. **Forest Pathology**, Berlin, p. 1-3, 2017.

DUDITS, D.; BÖGRE, L.; GYÖRGYÉY, J. Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic cells in vitro. **Journal of Cell Science**, London, n. 99, p. 475-484, 1995.

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

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

FEDER, N.; O'BRIEN, T. P. Plant microtechnique. Some principles and new methods. **American Journal of Botany**, Lancaster, v. 55, p. 123-142, 1968.

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

FEHÉR, A. Somatic embryogenesis: stress-induced remodeling of plant cell fate. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1849, p. 385-402, 2015.

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

FERRÃO, T. S. et al. Evaluation of composition and quality parameters of jelly palm (*Butia odorata*) fruits from different regions of Southern Brazil. **Food Research International**, Barking, n. 54, p. 57–62, 2013.

FIOR, C. L. et al. Superação de dormência em sementes de *Butia capitata*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 7, p. 1150-1153, 2011.

FKI, L. et al. An optimised protocol for plant regeneration from embryogenic suspension cultures of date palm, *Phoenix dactylifera* L.; cv. Deglet Nour. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 21, p. 517-524, 2003.

FONSECA, L. X. **Caracterização de frutos de butiazeiro (*Butia odorata* Barb. Rodr.) Noblick & Lorenzi e estabilidade de seus compostos bioativos na elaboração e armazenamento de geleias**. 2012. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2012.

FREITAS, E. O. et al. Somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos of the açaí palm (*Euterpe oleracea*): induction of embryogenic cultures, morphoanatomy and its morphological characteristics. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 212, p. 126–135, 2016.

GARCÊS, H. M. P. et al. Evolution of asexual reproduction in leaves of the genus *Kalanchoë*. **PNAS**, Washington, v. 104, n. 39, p. 15578-15583, 2007.

GOMES, H. T. et al. Regeneration of somatic embryos of oil palm (*Elaeis guineensis*) using temporary immersion bioreactors. **Industrial Crops and Products**, New York, v. 89, p. 244-249, 2016.

GUEDES, R. S. et al. Initial requirements for embryogenic calluses initiation in thin cell layers explants from immature female oil palm inflorescences. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 10, n. 52, p. 10774-10780, 2011.

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

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

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, A. (Org.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CBAB, 1999. 354 p.

GUERRA, M. P. et al. Somatic embryogenesis in goiabeira serrana: genotype response, auxinic shock and synthetic seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 13, n. 2, p. 117-128, 2001.

GUEYE, B. et al. Acquisition of callogenic capacity in date palm leaf tissues in response to 2,4-D treatment. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v. 99, p. 35-45, 2009.

GUIMARÃES, M. L. S.; CRUZ, G. S.; MONTEZUMA-DE-CARVALHO, J. M. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 15, p. 161-167, 1988.

HABERLANDT, G. Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. **Sitzungsberichte der Bayerischen Akademie der Wissenschaften**, Wien, v. 111, p. 69-92, 1902.

HALPERIN, W.; WETHERELL, D. F. Adventive embryony in tissue cultures of the wild carrot, *Daucus Carota*. **American Journal of Botany**, Lancaster, v. 51, n. 3, p. 274-283, 1964.

HECHT, V. et al. The Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 127, p. 803–816, 2001.

HERINGER, A. S. et al. Improved high-efficiency protocol for somatic embryogenesis in Peach Palm (*Bactris gasipaes* Kunth) using RITA[®] temporary immersion system. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 179, p. 284–292, 2014.

HOFFMANN, J. F. et al. *Butia* spp. (Arecaceae): an overview. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 179, p. 122–131, 2014.

HOFFMANN, J. F. et al. Stability of bioactive compounds in butiá (*Butia odorata*) fruit pulp and nectar. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, London, v. 65, p. 523–532, 2017.

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

JULLIEN, F.; TRAN THANH VAN, K. Micropropagation and embryoid formation from young leaves of *Bambusa glaucescens* 'Golden goddess'. **Plant Science**, Limerick, v. 98, p. 199-207, 1994.

KARUN, A. et al. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from leaf and inflorescence explants of arecanut (*Areca catechu* L.). **Current Science**, Bengaluru, v. 86, n. 12, p. 1623-1628, 2004.

LINDSEY, K.; TOPPING, J. F. Embryogenesis: a question of pattern. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 44, n. 259, p. 359-374, 1993.

LORENZI, H. et al. **Flora Brasileira: Arecaceae**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2010.

MAIA, D. S. V. **Atividade antibacteriana de extrato de butiá (*Butia odorata*) contra bactérias patogênicas**. 2017. 51 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos – Microbiologia de Alimentos) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 2017.

MARKS, T. R.; SIMPSON, S. E. Reduced phenolic oxidation at culture initiation in vitro following the exposure of field-grown stockplants to darkness or low levels of irradiance. **Journal of Horticultural Science**, London, v.65, n.2, p.103-111, 1990.

MCDOWELL, E. M.; TRUMP, B.F. Histologic fixatives suitable for diagnostic light and electron microscopy. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, Chicago, v. 100, p. 405-414, 1976.

MERKLE, S.A. Somatic Embryogenesis in Magnoliaceae (*Liriodendron* e *Magnolia*). In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in Agriculture and Forestry**. Berlin: Springer, 1995. p. 388-403.

MISTURA, C. C. et al. Descriptors for on-farm conservation and use of *Butia odorata* natural populations. **Plant Genetic Resources: characterization and utilization**, Cambridge, v. 14, n.1, p. 35-40, 2016.

- MONJA-MIO, K. M.; ROBERT, M. L. Direct somatic embryogenesis of *Agave fourcroydes* Lem. through thin cell layer culture. **In Vitro Cellular Development Biology - Plant**, Cambridge, v. 49, p.541–549, 2013.
- MOORE, H. E.; UHL, N. W. Major trends of evolution in palms. **The Botanical Review**, Dordrecht, v. 48, n. 1, p. 1-69, 1982.
- MOURA, E. F. et al. Somatic embryogenesis in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from zygotic embryos. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 119, p. 447-454, 2009.
- MOURA, E. F.; VENTRELLA, M. C.; MOTOIKE, S. Y. Anatomy, histochemistry and ultrastructure of seed and somatic embryo of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 67, n. 4, p. 399-407, 2010.
- MOURELLE, D. et al. Comparative pollen morphology and viability among endangered species of *Butia* (Arecaceae) and its implications for species delimitation and conservation. **Palynology**, Dallas, v.40, n.2, p. 160-171, 2016.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, n. 3, p.473-497, 1962.
- NAMASIVAYAM, P. Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 90, p.1–8, 2007.
- NEUWALD, D. A. et al. Caracterização das curvas de respiração e síntese de etileno de frutos de *Psidium cattleianum* Sabine. e de *Butia capitata* (Mart.) Becc.. In: SIMPÓSIO NACIONAL DO MORANGO, 2.; ENCONTRO DE PEQUENAS FRUTAS E FRUTAS NATIVAS DO MERCOSUL, 1., 2004, Pelotas. **Anais...** Pelotas: EMBRAPA, 2004.
- NHUT, D. T.; SILVA, T. DA; ASWATH, C. R. The importance of the explant on regeneration in thin cell layer technology. **In Vitro Cellular and Development Biology-Plant**, Cambridge, v. 39, p. 266-276, 2003.
- NOBLICK, L. R. Validation of the Name *Butia odorata*. **PALMS**, Lawrence, v. 55, n. 1, p. 48-49, 2011.

NOGUEIRA, R. C. et al. Análise ultra-estrutural de calos embriogênicos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 48-50, 2007.

NOLAN, K. E.; IRWANTO, R. R.; ROSE, R. J. Auxin up-regulates *MtSERK1* expression in both *Medicago truncatula* root forming and embryogenic cultures. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 133, p. 218–30, 2003.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, Wien, n. 59, p. 367-373, 1964.

OTHMANI, A. et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration in date palm *Phoenix dactylifera* L., cv. Boufeggous is significantly improved by fine chopping and partial desiccation of embryogenic callus. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 97, p. 71-79, 2009.

PADILHA, H. K. M. et al. Avaliação da produção de cachos de frutas em palmeiras de Butiá (*Butia odorata* (Barb. Rodr.) Noblick & Lorenzi). **Magistra**, Cruz das Almas, BA, v. 28, n. 3/4, p. 419-426, 2016.

PADILHA, J. H. D. et al. Somatic embryogenesis in *Acrocomia aculeata* Jacq. (Lodd.) ex Mart using the thin cell layer technique. **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 29, n. 4, p. 516-523, 2015.

PERERA, P. I. P. et al. Effect of growth regulators on microspore embryogenesis in coconut anthers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 96, p. 171-180, 2009.

PÉREZ-NÚÑEZ, M. T. et al. Detection of a *SERK*-like gene in coconut and analysis of its expression during the formation of embryogenic callus and somatic embryos. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 28, p. 11–19, 2009.

PIAIA, A.; WIZNIEWSKY, J. G.; GODOY, C. M. T. Formas de uso e conservação do butiazeiro (*Butia odorata*) em unidades de produção de Santa Vitória do Palmar (RS). **Cadernos de Agroecologia**, Porto Alegre, v. 8, n. 2, 2013.

QUIROZ-FIGUEROA, F. R. et al. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 86, p. 285-301, 2006.

RAJESH, M. K. et al. Plant regeneration from embryo-derived callus of oil palm- the effect of exogenous polyamines. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 75, p. 41-47, 2003.

RAJU, C. S.; ASLAM, A.; SHAJAHAN, A. High-efficiency direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf base explants of turmeric (*Curcuma longa* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 122, n. 1, p. 79-87, 2015.

REINERT, J. Morphogenese und ihre kontrolle na gewebekulturen aus karotten. **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 45, p. 344-345, 1958.

REITZ, R. Palmeiras. In: REITZ, R. (Ed.). **Flora ilustrada catarinense**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1974. 189 p.

RIVAS, M.; BARBIERI, R. L. **Boas práticas de manejo para o extrativismo sustentável do butiá**. Brasília, DF: Embrapa, 2014. 59p.

RODRIGUES, L. R.; OLIVEIRA, J. M. S.; MARIATH, J. E. A. Anatomia vegetal aplicada ao estudo de sistemas androgênicos in vitro. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.2, n. 3/4, p. 159-167, 2004.

ROSA, L.; CASTELLANI, T. T.; REIS, A. Biologia reprodutiva de *Butia capitata* (Martius) Beccari var. *odorata* (Palmae) na restinga do município de Laguna, SC. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 21 n. 3, p. 281-287, 1998.

SABOONI, N.; SHEKAFANDEH, A. Somatic embryogenesis and plant regeneration of blackberry using the thin cell layer technique. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 130, n.2, p. 313-321, 2017.

SANÉ, D. et al. Histocytological analysis of callogenesis and somatic embryogenesis from cell suspensions of date palm (*Phoenix dactylifera*). **Annals of Botany**, Oxford, v. 98, p. 301–308, 2006.

SANÉ, D. et al. Influence of growth regulators on callogenesis and somatic embryo development in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) sahelian cultivars. **The Scientific World Journal**, Cairo, v. 2012, p. 1-8, 2012.

SANTOS, M. O. et al. Characterization of the cacao somatic embryogenesis receptor-like kinase (*SERK*) gene expressed during somatic embryogenesis. **Plant Science**, Limerick, v. 168, p. 723–729, 2005.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm using the thin cell layer technique. **In Vitro Cellular and Developmental Biology. Plant**, Cambridge, v. 46, p. 378–385, 2010.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration in açai palm (*Euterpe oleracea*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 109, p. 501–508, 2012.

SCHMIDT, E. D. et al. A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. **Development**, Cambridge, v. 124, p. 2049–2062, 1997.

SCHWARTZ, E. **Produção, fenologia e qualidade dos frutos de *Butia capitata* em populações de Santa Vitória do Palmar**. 2008. 92 f. Tese (Doutorado em Ciências – Fruticultura de Clima Temperado) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2008.

SCHWARTZ, E. et al. Avaliação de populações de *Butia capitata* de Santa Vitória de Palmar, **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 3, p.736-745, 2010.

SCIPIONI, M. C.; GALVÃO, F.; LONGHI, S. J. Composição florística e estratégias de dispersão e regeneração de grupos florísticos em florestas estacionais decíduais no Rio Grande do Sul. **Floresta**, Curitiba, v. 43, n. 2, p. 241 - 254, 2013.

SGHAIER B. et al. Effect of ABA, arginine and sucrose on protein content of date palm somatic embryos. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 120, p. 379-385, 2009.

SGHAIER, B. et al. Abscisic acid and sucrose increase the protein content in date palm somatic embryos, causing changes in 2-DE profile. **Phytochemistry**, London, n. 71, p.1223-1236, 2010.

SHARP, W. R. et al. The physiology of in vitro asexual embryogenesis. **Horticultural Reviews**, New York, v. 2, p. 268-310, 1980.

SHARP, W. R.; EVANS, D. A.; SONDAHL, M. R. Application of somatic embryogenesis to crop improvement. In: FUJIWARA, A. (Ed.). **Plant Tissue Culture**. Tokio: Maruzen, 1982. p. 759-762.

SIDKY, R. A.; ZAID, Z. E. Direct production of somatic embryos and plant regeneration using TDZ and CPPU of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). **International Journal of Academic Research**, Baku, Azerbaijan, v. 3, p. 792-796, 2011.

SILVA, J. A. T. Thin cell layer technology in ornamental plant micropropagation and biotechnology. **African Journal of Biotechnonology**, Nairobi, v. 2, n. 12, p. 683-691, 2003.

SILVA, J. A.; NHUT, D. T. Cells: functional units of TCLs. In: NHUT, D.T. et al. (Ed.) **Thin cell layer culture system: regeneration and transformation application**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2003. p. 65-134.

SINGLA, B.; KHURANA, J. P.; KHURANA, P. Characterization of three somatic embryogenesis receptor kinase genes from wheat, *Triticum aestivum*. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 27, p. 833–843, 2008.

SOARES, K. P.; LONGHI, S. J. Uma nova espécie de butia (becc.) Becc. (Arecaceae) para o Rio Grande do Sul. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 21, n. 2, p. 203-208, 2011.

SOARES, K. P. et al. Palmeiras (Arecaceae) no Rio Grande do Sul, Brasil, **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 65, n. 1, p. 113-139, 2014.

SOARES, K. Le Genre Butia. **Princeps**, San Diego, v. 1, p. 12-57, 2015.

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

STEINMACHER, D. A. et al. Somatic embryogenesis from peach palm zygotic embryos. **In Vitro Cellular and Development Biology - Plant**, Cambridge, n. 43, p. 124-132, 2007a.

STEINMACHER, D. A.; CLEMENT, C. R.; GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis from immature peach palm inflorescence explants: towards development of an efficient protocol. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v. 89, p.15-22, 2007b.

STEINMACHER, D. A. et al. Somatic embryogenesis in peach palm using the thin cell layer technique: induction, morpho-histological aspects and AFLP analysis of somaclonal variation. **Annals of Botany**, Oxford, v. 100, p. 699–709, 2007c.

STEINMACHER, D. A. et al. A temporary immersion system improves in vitro regeneration of peach palm through secondary somatic embryogenesis. **Annals of Botany**, Oxford, v., p. 1-13, 2011.

STEVENS, P. F. Angiosperm Phylogeny Website. Version 14. 2017. Disponível em: <www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/welcome.html>. Acesso em: 09 fev. 2017.

STEWART, F. C.; MAPES, M. O.; MEARS, K. Growth and organized development of cultured cells. II Organization in cultures grown from freely suspended cells. **American Journal of Botany**, Lancaster, v. 45, n. 10, p. 705-708, 1958.

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

THI-LAN, L. et al. Somatic embryogenesis in Canary Island date palm. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 56, p. 1-7. 1999.

THOMAS, T. D. The role of activated charcoal in plant tissue culture. **Biotechnology Advances**, New York, v. 26, p. 618–631, 2008.

TISSERAT, B.; ESAN, B. B.; MURASHIGE, T. Somatic embryogenesis in angiosperms. **Horticultural Reviews**, New York, v. 1, n. 1, p.78, 1979.

TISSERAT, B.; DEMASON, D. A. A histological study of development of adventive embryos in organ culture of *Phoenix dactylifera* L. **Annals of Botany**, Oxford, v. 46, p. 465–472, 1980.

TONIETTO, A.; SCHLINDWEIN, G; TONIETTO, S. M. **Usos e potencialidades do butiazeiro**. Porto Alegre: Fepagro, 2009. 28p. (Circular Técnica, 26)

TONIETTO, A.; SCHLINDWEIN, G. Ocurrence of *Revena plaumanni* BONDAR, 1943 (Coleoptera: Curculionidae) in pindo palm fruit. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, SP, v. 38, n. 3, [art.] e-012, 2016.

TORRES, A. C. et al. **Glossário de biotecnologia vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000.

TRAN THANH VAN, M. Direct flower neof ormation from superficial tissue of small explants of *Nicotiana tabacum* L. **Planta**, Berlin, v. 115, p. 87-92, 1973.

TRAN THANH VAN, K. Thin cell layer concept. In: NHUT, D.T. et al. (Ed.). Thin cell layer culture system: regeneration and transformation application. Dordrecht: Kluwer Academic, 2003. p. 1-16.

VASIL, V.; VASIL, K. V. Somatic embryogenesis and plant regeneration from tissue cultures of *Pennisetum americanum*, and *P. americanum* x *P. purpureum* Hybrid. **American Journal of Botany**, Lancaster, v. 68, n. 6, p. 864-872, 1981.

VERDEIL, J-L. et al. Plant regeneration from cultured immature inflorescences of coconut (*Cocos nucifera* L.): evidence for somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 13, p. 218–221, 1994.

VENZKE, T. S. Florística de comunidades arbóreas no Município de Pelotas, Rio Grande do Sul. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, n. 63, v. 3, p. 571-578, 2012.

VIÑAS, M.; JIMÉNEZ, V. M. Factores que influyen en la embriogénesis somática *in vitro* de palmas (Arecaceae). **Revista Colombiana De Biotecnología**, v. XIII, n. 2, p. 229-242, 2011.

WANG, H. C.; CHEN, J. T.; CHANG, W. C. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf, root and stem-derived callus cultures of *Areca catechu*. **Biologia Plantarum**, Heidelberg, v. 50, n. 2, p. 279-282, 2006.

WILLIAMS, E. G.; MAHESWARAN, G. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany**, Oxford, v. 57, n. 4, p. 443-462, 1986.

YANG, X.; ZHANG, XIANLONG. Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 29, n. 1, p. 36-57, 2010.

ZAVATTIERI, M. et al. Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v.13, n. 1, 2010.

ZIMMERMAN, J.L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **Plant Cell**, Rockville, v. 5, p. 1411-1423, 1993.

ZIMMERMANN, M. J. Embriogênese somática. In: CID, L. P. B. (Ed.). **Cultivo in vitro de plantas**. 3. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2014. p. 69-103.

ZOUINE, J. et al. Proliferation and germination of somatic embryos from embryogenic suspension cultures in *Phoenix dactylifera*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 82, p. 83-92, 2005.

ZOUINE, J.; EL HADRAMI, I. Effect of 2,4-D, glutamine and BAP on embryogenic suspension culture of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 112, p. 221-226, 2007.

3 CAPÍTULO 1

Embriogênese somática a partir de embriões zigóticos de *Butia odorata* (Barb. Rodr.) Noblick

RESUMO

Butia odorata (Barb. Rodr.) Noblick é uma palmeira nativa da região Sul do Brasil e Uruguai, não domesticada, muito apreciada pelos seus frutos e com potencial econômico. Porém, o extrativismo e a dificuldade de propagação da espécie têm levado ao declínio das populações naturais. O objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade da embriogênese somática em *B. odorata*. Embriões zigóticos maduros foram induzidos nos meios MS e Y3, combinados com as auxinas 2,4-D e picloram em cinco concentrações (2,4-D: 0, 361,99; 452,49; 542,99 e 633,48 $\mu\text{M/L}$; picloram: 0, 50, 150, 300 e 450 $\mu\text{M/L}$). Os resultados observados foram promissores durante a indução com a formação de calos embriogênicos e diferenciação de embriões somáticos. Contudo, a regeneração dos embriões somáticos foi deficiente devido, possivelmente, à ocorrência de embriões somáticos fusionados durante seu desenvolvimento. As raízes foram formadas, mas os cotilédones permaneceram fusionados, não completando seu desenvolvimento. A auxina picloram e o meio Y3 propiciaram as condições mais adequadas para calogênese, formação de calo embriogênico e embriões somáticos, nas concentrações de 150, 300 e 450 $\mu\text{M/L}$. Esta é a primeira descrição de indução à embriogênese somática em *B. odorata* que pode servir como trabalho de base para pesquisas futuras e ajustes da metodologia aqui proposta.

Palavras-chave: Butiá, picloram, 2,4-D, embrião somático, calo embriogênico.

ABSTRACT

Butia odorata (Barb. Rodr.) Noblick is a palm native to Southern Brazil and Uruguay, not domesticated, much appreciated for its fruits and with economic potential. However, the extractivism and the difficulty of propagation of the species have led to the decline of natural populations. The objective of this work was to evaluate the viability of somatic embryogenesis in *B. odorata*. Mature zygotic embryos were induced in the MS and Y3 media, combined with 2,4-D auxins and picloram in five concentrations (2,4-D: 0, 361,99, 452,49, 542,99 and 633,48 $\mu\text{M/L}$; picloram: 0, 50, 150, 300 and 450 $\mu\text{M/L}$). The results observed were promising during induction with the formation of embryogenic calli and differentiation of somatic embryos. However, the regeneration of somatic embryos was deficient, possibly due to the occurrence of fused somatic embryos during their development. The roots were formed, but the cotyledons remained fused, not completing its development. The auxin picloram and Y3 medium provided the most adequate conditions for calogenesis, formation of embryogenic callus and somatic embryos, in the concentrations of 150, 300 and 450 $\mu\text{M/L}$. This is the first description of somatic embryogenesis in *B. odorata* that can serve as a basic work for future research and adjustments of the methodology proposed here.

Keywords: Pindo palm, picloram, 2,4-D, somatic embryo, embryogenic callus.

3.1 Introdução

A espécie *Butia odorata* (Barb. Rodr.) Noblick pertence à família Arecaceae e tem sua origem na região Sul do Brasil e Uruguai (Noblick, 2011). Os frutos são conhecidos popularmente, no Rio Grande do Sul, como butiá e são consumidos *in natura* ou processados na forma de geleias, doces, sucos, sorvetes. O butiazeiro também pode ser utilizado como ornamental. Os frutos são ricos em vitamina C, carotenoides, fibras e, além disso, são fontes de compostos bioativos, apresentando alta concentração de fenóis totais que combatem os radicais livres (Fonseca *et al.*, 2012).

Segundo Rivas & Barbieri (2014) as áreas de butiazais da região sul do Brasil estão cada vez mais raras, devido à pressão da conversão destas áreas em lavouras, pelo crescimento urbano e pela presença do gado, sem um manejo adequado, que compromete a regeneração das populações devido ao pisoteio e pastejo das mudas de *B. odorata*. Remanescentes de ocorrência natural dos butiazais estão localizados em uma fazenda privada, em Tapes, com uma área de 750 ha. Nesta área foi criado um banco de germoplasma *in situ* para preservar uma população de 60.000 palmeiras adultas, a maioria com idade superior a 150 anos (Mistura *et al.*, 2015).

A propagação de *B. odorata* é exclusivamente feita por sementes, as quais apresentam dormência resultando em uma germinação lenta e desuniforme. Isto implica na baixa produção de mudas e torna o modo de produção extrativista, o que dificulta a conservação da espécie. Alternativas para superar a dormência em *B. odorata* foram propostas por Fior *et al.* (2011) e Schlindwein *et al.* (2013). Contudo essas metodologias são onerosas, demandam mão de obra e condições específicas para germinação. Somado ao longo período de germinação a produção de frutos inicia entre seis e 15 anos após a germinação da planta (Barbieri *et al.*, 2014) estendendo o período entre semeadura e produção. Investigações das características fitotécnicas irão auxiliar na produção de mudas, no cultivo e contribuir nos programas de melhoramento genético e conservação da espécie. A cultura de tecidos pode contribuir na redução do tempo, entre a semeadura e produção de frutos, e de custos na produção de mudas.

A cultura de tecidos tem desempenhado um papel importante na agricultura com múltiplas finalidades, como propagação de plantas, melhoramento genético, intercâmbio e conservação de germoplasma, entre outras. Dentre as técnicas presentes na cultura de tecidos a embriogênese somática tem sido aplicada com êxito para diferentes palmeiras como *Cocos nucifera* (Fernando & Gamage, 2000), *Elaeis guineensis* (Balzon *et al.*,

2013), *Euterpe edulis* (Guerra & Handro, 1988), *Acrocomia aculeata* (Moura *et al.*, 2009) entre outras. Os trabalhos realizados com essas espécies utilizaram embriões zigóticos como explante para indução da embriogênese somática com resultados positivos para a formação de embriões somáticos e conversão em plântulas. Dentre os fatores que influenciam no processo de embriogênese somática a escolha do explante inicial é essencial. No caso das palmeiras, que apresentam crescimento monopodial, as fontes de explantes que não prejudicam seu posterior crescimento são limitadas, o uso do embrião zigótico é a forma menos destrutiva de se obter explante em palmeiras, além de ser uma fonte menos propensa a incidência de contaminações (Ree & Guerra, 2015).

A embriogênese somática ocorre através de uma rota morfogenética que demonstra a totipotência celular das células vegetais, a partir de tecidos ou células cultivadas *in vitro*. Essa rota é um programa embriogênico no qual as células somáticas são induzidas a diferenciarem-se em células embriogênicas que passam por alterações morfológicas e bioquímicas para produzir embriões somáticos (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006).

A maioria dos protocolos de embriogênese somática, para palmeiras, tem relatado o uso das auxinas 2,4-D e picloram em altas concentrações para a indução, geralmente, acima de 200 $\mu\text{M/L}$, na presença de carvão ativado (Steinmacher *et al.*, 2007; Balzon *et al.*, 2013). Guerra & Handro (1998) testaram as auxinas ANA, picloram e 2,4-D, na presença de carvão ativado, mas só as concentrações de 226,24 e 454,48 $\mu\text{M/L}$ de 2,4-D foram efetivas para a espécie *E. edulis* Mart. Para *E. oleraceae*, Ledo *et al.* (2002) induziram embriões somáticos nas concentrações de 339,36 e 454,48 $\mu\text{M/L}$ de 2,4-D com carvão ativado e Scherwinski-Pereira *et al.* (2012) concluíram que a melhor concentração de picloram para indução de calos embriogênicos, na presença de carvão ativado foi de 225 $\mu\text{M/L}$. Para *C. nucifera* a concentração de 600 $\mu\text{M/L}$ de 2,4-D, com carvão ativado, estimulou a produção de calos embriogênicos a partir da plúmula do embrião zigótico (Pérez-Núñez *et al.*, 2006).

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi comprovar a possibilidade de induzir a embriogênese somática em *B. odorata*, a partir de embriões zigóticos maduros, verificar quais fatores estão relacionados com a indução e assim disponibilizar um protocolo de indução inicial visando à multiplicação *in vitro* da espécie.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Material vegetal

Em uma população natural de polinização aberta de *B. odorata*, foram feitas as coletas de cachos com frutos maduros, no município de Barão do Triunfo, RS. Os frutos foram lavados, despulpados e os diásporos foram acondicionados em sacos plásticos e armazenados em geladeira (aproximadamente quatro meses). Neste trabalho o endocarpo foi quebrado com auxílio de um torno de bancada para isolar as sementes e posterior extração asséptica dos embriões zigóticos utilizados como explante. As sementes passaram pelo processo de desinfestação em etanol 70% por um minuto e hipoclorito de sódio 2,5% por vinte minutos. Em seguida em câmara de fluxo de ar laminar, as sementes foram enxaguadas três vezes com água deionizada autoclavada. Os embriões foram retirados das sementes, com auxílio de pinça e bisturi, e dispostos em placas de Petri (15 x 90 mm) com aproximadamente 25 mL de meio de cultura. Após, as placas já com os embriões zigóticos foram levadas para sala de crescimento com temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e mantidas no escuro (330 dias), em todas as fases, exceto na regeneração. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos II da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, localizado em Brasília, DF.

3.2.2 Meio de cultura

Foram utilizados dois meios de cultura, um contendo os sais do meio MS (Murashige & Skoog, 1962) e o outro os sais do Y3 (Eeuwens, 1976). Em ambos os meios foram adicionados ferro EDTA, vitaminas do MS, glutamina (200 mg/L), asparagina (100 mg/L), arginina (100 mg/L), sacarose (30 g/L). Antes da autoclavagem o pH foi corrigido para 5,8. Após o ajuste de pH foi acrescentado 2,3 g/L de Phytigel (Sigma) e carvão ativado (2,0 g/L). Os meios foram autoclavados a 121°C e pressão de 1,3 atm durante 20 minutos.

3.2.3 Fatores de indução

Na fase de indução à embriogênese somática foram testados os meios de cultura MS e Y3 em combinação com as auxinas ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) e picloram em cinco concentrações (2,4-D: 0; 361,99; 452,49; 542,99 e 633,48 $\mu\text{M/L}$ e picloram: zero, 50, 150, 300 e 450 $\mu\text{M/L}$). Foi contabilizado o número de calos primários e quando formados, o número de calos embriogênicos. Nesta fase realizou-se apenas um

subcultivo aos 90 dias. Aos 150 dias os calos foram transferidos para um segundo meio de cultura para fins de multiplicação e manutenção.

3.2.4 Fatores de multiplicação/manutenção

Na fase seguinte, pós-indução, os calos foram mantidos nos meios de cultura de origem MS ou Y3 e foram testadas duas concentrações da auxina picloram (20 e 40 $\mu\text{M/L}$) associada à citocinina 2-isopenteniladenina (2iP) (10 $\mu\text{M/L}$). Nesta fase não foi utilizado o carvão ativado. Aos 90 dias (240 dias do início do experimento) os calos embriogênicos foram transferidos para o meio de diferenciação e maturação de embriões somáticos.

3.2.5 Fatores de diferenciação e maturação

Nesta fase os calos foram mantidos nos meios de origem MS ou Y3 e substituiu-se o picloram por ácido naftalenoacético (ANA) 0,54 $\mu\text{M/L}$ combinado com 2iP, 12,3 $\mu\text{M/L}$ para o desenvolvimento dos embriões somáticos. Nesta fase não foi utilizado o carvão ativado. Aos 90 dias (330 dias do início do experimento) os embriões somáticos foram transferidos para o meio de conversão em plântulas e o número de embriões somáticos foi contabilizado.

3.2.6 Conversão dos embriões somáticos em plântulas

Para regeneração dos embriões somáticos formados foi utilizado o meio de MS com metade da concentração salina (1/2 MS), sem adição de reguladores de crescimento, mas com acréscimo de carvão ativado (2,0 g/L). Os embriões somáticos foram inoculados em tubos de ensaio contendo 15 mL do meio de cultura e após levados para sala de crescimento em condições controladas com fotoperíodo de 16h com intensidade luminosa de $30 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas do tipo LED e temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$. Os embriões somáticos permaneceram por sete meses nesse meio com subcultivos para o mesmo meio em intervalos de 90 dias.

3.2.7 Morfologia externa, anatomia e histoquímica dos calos

Foram feitas amostragens dos calos obtidos em todos os tratamentos aos 45, 90, 180 e 270 dias. Nestas amostragens, fotomicrografias da morfologia externa desses

calos foram realizadas em estereomicroscópio Leica (M205FA), com câmera acoplada (DFC310FX).

As amostras também foram processadas para análise anatômica, sendo estas fixadas em glutaraldeído 1% e formaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2 (McDowell & Trump, 1976), desidratadas em série alcoólica crescente (10-100%GI) e infiltradas com metacrilato (Historesina Leica) de acordo com as recomendações do fabricante. O material emblocado foi cortado em micrótomo de rotação Leica (DM 2125RT) com espessura de 3 a 5 micrometros. Para anatomia foi utilizado o corante azul de toluidina 0,5% (O'Brien *et al.*, 1964) e para histoquímica foram utilizados o reagente de Lugol (amido) (Johansen, 1940), e os corantes ácido periódico-Schiff (PAS) (carboidratos neutros) (O'Brien & McCully, 1981) e Xylidine Posseau (XP) (proteínas) (Vidal, 1970). As lâminas foram montadas em Entelan, os cortes anatômicos foram analisados e registrados em microscópio óptico Leica (DM 750) com câmera acoplada (ICC50 HD).

3.2.8 Delineamento e Análise Estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado totalizando 18 tratamentos. Cada tratamento foi composto por 10 repetições com cinco embriões zigóticos por placa, num total de 50 embriões zigóticos por tratamento. As avaliações foram realizadas aos 150 dias para formação de calo primário (contabilizado sobre o número de explantes iniciais), embriões zigóticos germinados, embriões zigóticos inertes, oxidação e contaminação; aos 240 dias para formação de calo embriogênico (contabilizado sobre o número de calos primários), e aos 330 dias foi contabilizado o número médio de embriões somáticos formados. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Scott-knot a 5% de probabilidade utilizando-se o programa estatístico Assistat (Silva & Azevedo, 2016).

3.3. Resultados e discussão

3.3.1 Indução da embriogênese somática

Os embriões zigóticos maduros de *Butia odorata* (Figura 1A), utilizados como explantes, foram responsivos a todos os tratamentos testados, apresentando formação de calo primário durante a fase de indução. Não foi observada oxidação dos calos primários nesta fase, tampouco contaminação dos explantes, após a incubação. Foram

considerados calos primários qualquer tipo de calo formado que apresentasse mudanças morfológicas e teciduais diferentes das apresentadas pelo embrião zigótico. A completa formação do calo primário foi considerada quando este já não apresentava tecidos do explante inicial visível. Nos tratamentos controles (sem auxina) os embriões zigóticos germinaram com formação de raiz e parte aérea (Figura 1D).

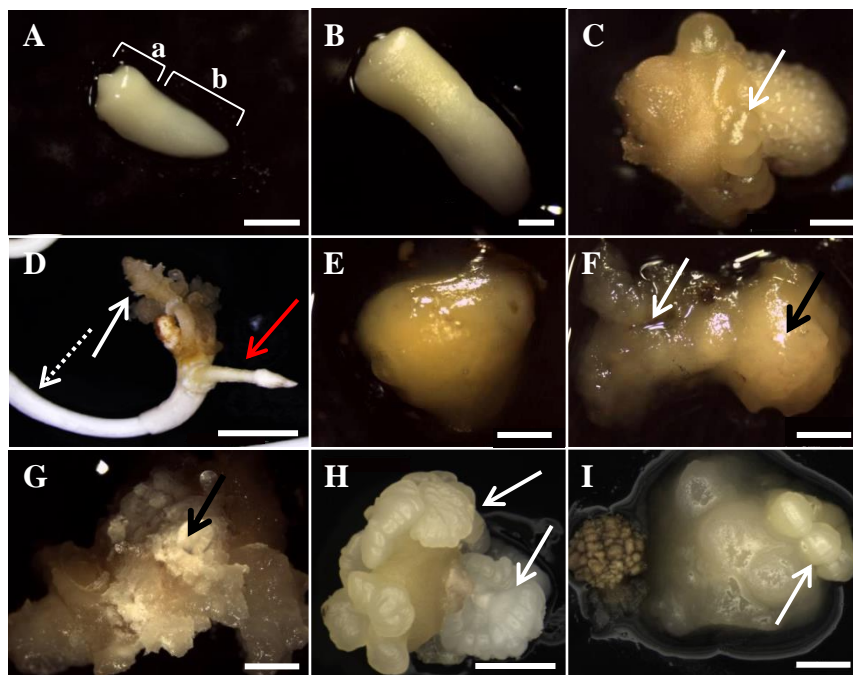


FIGURA 1. Calos primários e embriogênicos obtidos a partir do embrião zigótico (EZ) maduro de *B. odorata*. (A) EZ maduro no momento da inoculação, região proximal (a), região distal (b). (B) EZ intumescido durante a primeira semana. (C) Calo primário com estruturas translúcidas embriogênicas (seta). (D) Plântula com formação de calo (seta) com folha (seta tracejada) e raiz (seta vermelha). (E) Calo amarelo compacto liso. (F) Calo misto mucilaginoso (seta branca) e compacto (seta preta). (G) Calo friável (seta) e mucilaginoso. (H) Calo embriogênico. (I) Calo mucilaginoso com estruturas embriogênicas (seta). Escala: 1 mm (A e C), 0,5 mm (B), 5mm (D), 2 mm (E-I).

Tanto em meio de MS quanto em Y3, nos tratamentos sem auxina, a taxa de germinação foi de 56% em MS e 60% em Y3 (Tabela 1). No decorrer da primeira semana após a inoculação foi possível observar o intumescimento (aumento em espessura e alongamento) dos embriões zigóticos em todos os tratamentos (Figura 1B). Este mesmo comportamento pode ser observado quando o embrião zigótico isolado da semente germina *in vitro*. Guerra & Handro (1988) observaram a germinação de embriões zigóticos de *Euterpe edulis* em meio de indução com até 226,24 $\mu\text{M/L}$ de 2,4-

D. Ledo *et al.* (2002) observaram a germinação nas concentrações de 113,12 e 226,24 $\mu\text{M/L}$ de 2,4-D com desenvolvimento de plântulas normais de *Euterpe oleracea*. Neste trabalho as concentrações de 361,99 $\mu\text{M/L}$ de 2,4-D e 50 $\mu\text{M/L}$ de picloram induziram a germinação de alguns embriões zigóticos.

Na Tabela 1 são apresentadas as porcentagens de formação de calos primários e embriogênicos na fase de indução, ao final dos 150 e 240 dias, respectivamente. Porém, apesar de já aos 45 dias, a presença de calos primários já ser observada, optou-se por aguardar mais tempo para que todos explantes respondessem, no meio de indução. Esse comportamento mostra uma diferença temporal na resposta à indução do calo primário, até mesmo entre os explantes da mesma repetição. Foi possível também observar em alguns tratamentos a formação de calos embriogênicos, ainda em meio de indução, com características de cor amarela, compactos (duros) e nodulares. Apesar dessas observações de calos primários e embriogênicos, em tempos diferentes, nem todos os explantes responderam a indução de calogênese ou germinação. Alguns dos embriões zigóticos permaneceram com sua morfologia inicial e não apresentaram sinais de oxidação ou lesão por manipulação durante sua excisão da semente. Provavelmente eram embriões inviáveis, pois nos tratamentos controles observou-se comportamento semelhante para alguns embriões zigóticos que não germinaram o que resultou em baixas taxas de germinação (abaixo de 60%). Trabalhos realizados com a germinação de sementes das espécies de *Butia capitata* e *B. odorata in vitro* apresentaram taxas de germinação em torno de 90% (Fior *et al.*, 2011) e sementes de *B. odorata* germinadas em caixas gerbox, tendo como substrato areia média, apresentaram taxa de 72% de germinação (Fior *et al.*, 2013). Em ambos os trabalhos foi realizada a escarificação da semente com a remoção total do opérculo (abertura da cavidade embrionária).

O calo primário formado, a partir de embriões zigóticos maduros, apresentou diferentes morfologias (liso, nodular ou friável), colorações (branco, creme ou amarelo) e consistências (compacto ou mucilaginoso), ilustradas na Figura 1. Inicialmente, o embrião zigótico intumescceu e em seguida a região distal apresentou uma textura rugosa nodular, enquanto que a região proximal uma textura mais lisa. Já a região mediana apresentou um maior crescimento nodular (Figura 1C), até a completa formação do calo primário. Essas e outras modificações, durante o processo de calogênese, também foram observadas em embriões zigóticos de outras palmeiras. Em macaúba (*A. aculeata*) por Moura *et al.* (2009), aos 60 dias, em todos os tratamentos, exceto o controle, que

formaram calos do tipo esponjoso e nodular. Na indução da embriogênese somática em embriões zigóticos de açaí (*E. oleracea*), Freitas *et al.* (2016) observaram mudanças morfológicas na primeira semana e a formação de calos primários depois dos 60 dias de incubação em meio de indução. Após 90 dias, dois tipos de calos foram formados e classificados como calos embriogênicos, com aspecto nodular e amarelo, e calos não embriogênicos, com consistência esponjosa e esbranquiçada. Neste trabalho, vários tipos de calos foram formados, optando-se por classificar apenas como calos primários, calos embriogênicos (Figura 1H) e calos não embriogênicos (Figura 1 E-G).

TABELA 1. Porcentagem da germinação de embriões zigóticos (Germ.), embrião zigótico inerte (EZI) e calo primário (CP) aos 150 dias; calo embriogênico (CE) aos 240 dias de cultivo nos meios de cultura MS ou Y3 com as auxinas 2,4-D ou picloram em cinco diferentes concentrações e embrião somático (ES) aos 330 dias de cultivo.

Meio de cultura	2,4-D (µM/L)	picloram (µM/L)	Germ. (%)	EZI (%)	CP (%)	CE/CP (%)	ES/CE
MS	-	-	56,00	44,00	0,00c	0,00	0,00
MS	361,99	-	24,00	36,00	40,00b	7,50	21,00
MS	452,49	-	8,00	38,00	54,00b	19,50	4,80
MS	542,99	-	4,00	36,00	60,00b	33,00	2,18
MS	633,48	-	0,00	8,00	92,00a	20,50	1,30
MS	-	50	6,00	48,00	46,00b	0,00	0,00
MS	-	150	0,00	50,00	50,00b	12,33	2,60
MS	-	300	0,00	48,00	52,00b	31,50	1,00
MS	-	450	0,00	30,00	70,00a	46,00	4,71
Y3	-	-	60,00	40,00	0,00c	0,00	0,00
Y3	361,99	-	36,00	50,00	14,00c	0,00	0,00
Y3	452,49	-	36,00	32,00	32,00c	2,50	2,00
Y3	542,99	-	4,00	38,00	58,00b	8,50	12,75
Y3	633,48	-	0,00	38,00	62,00b	16,42	2,00
Y3	-	50	4,00	24,00	72,00a	0,00	0,00
Y3	-	150	0,00	28,00	72,00a	37,00	3,00
Y3	-	300	0,00	34,00	66,00a	31,17	2,67
Y3	-	450	0,00	16,00	84,00a	36,33	1,06

Letras minúsculas na vertical diferem entre si pelo teste de Scott-knott a 5% de probabilidade.

Os explantes mostraram mudanças na morfologia no decorrer da primeira semana, em todos os tratamentos, e aos 45 dias já era possível observar calos primários.

O período inicial de formação do calo primário tem se mostrado variável entre as espécies de palmeiras, inclusive para a mesma espécie, com observações aos 60 dias e após 30 dias em *A. aculeata* (Moura *et al.*, 2009; Luis & Scherwinski-Pereira, 2014), após 21 dias em *E. guineensis* Jacq. cv. 'Tenera' (Thuzar *et al.*, 2011), em *E. oleracea* após 30 dias (Scherwinski-Pereira *et al.*, 2012) e 60 dias (Freitas *et al.*, 2016).

Os tratamentos em meio de MS com 633,48 $\mu\text{M/L}$ de 2,4-D (92%) e 450 $\mu\text{M/L}$ de picloram (70%), em meio Y3 com picloram nas concentrações de 50 $\mu\text{M/L}$ (72%), 150 $\mu\text{M/L}$ (72%), 300 $\mu\text{M/L}$ (66%) e 450 $\mu\text{M/L}$ (84%) foram superiores aos demais tratamentos para a indução do calo primário. Além disso, esses tratamentos foram os que inibiram o embrião zigótico de seguir a rota germinativa, com exceção da concentração de 50 $\mu\text{M/L}$ de picloram em Y3 que apresentou 4% de germinação, ao contrário dos demais tratamentos onde ocorreu a germinação, mesmo que em baixa porcentagem, dos embriões zigóticos na presença das auxinas 2,4-D e picloram. Os dados obtidos corroboram a literatura, uma vez que são citadas ambas as auxinas 2,4-D e picloram apresentando alta eficiência na indução de calos primários (Guerra *et al.*, 1999; Fehér *et al.*, 2003; Karun *et al.*, 2004; Steinmacher *et al.* 2007; Balzon *et al.*, 2013).

Neste trabalho as diferentes concentrações de picloram se destacaram na formação de calos primários se comparada ao 2,4-D durante a embriogênese somática. O uso de picloram com carvão ativado tem mostrado resultados mais efetivos do que 2,4-D para algumas palmeiras. Para *E. oleraceae*, Scherwinski-Pereira *et al.* (2012), compararam picloram e 2,4-D em meio de MS e a concentração de 450 $\mu\text{M/L}$ de picloram foi a mais eficaz com 44,8% de formação de calo primário. Freitas *et al.* (2016) testaram 225 e 450 $\mu\text{M/L}$ de picloram e verificaram que 450 $\mu\text{M/L}$ em meio MS induziu 84,7% de calos embriogênicos. Por outro lado, Teixeira *et al.* (1993) utilizaram 500 $\mu\text{M/L}$ de 2,4-D em meio Y3 e induziram calogênese em embriões zigóticos maduros de *E. guineensis* com 93% de calos formados, porém nenhum desses calos se tonaram embriogênicos.

Nos tratamentos com as concentrações de 361,99 $\mu\text{M/L}$ (2,4-D) e 50 $\mu\text{M/L}$ (picloram), tanto em meio MS quanto em Y3, após a germinação dos embriões zigóticos, esses apresentaram a formação de calo friável na região do pecíolo cotiledonar, onde em condições naturais de germinação formaria o haustório (Figura 1D). Segundo Verdeil & Hoher (2002) o órgão denominado haustório é responsável

pela mobilização de reservas do endosperma e o mesmo surge do desenvolvimento da lâmina cotiledonar (região distal do cotilédone) e inicia com o início da germinação do embrião. Alguns destes calos oxidaram com o tempo, outros não se desenvolveram. Estes dados indicam que o isolamento desses calos seja necessário, transferindo para o meio de indução novamente, pois são calos com potencial embriogênico.

As respostas morfológicas apresentadas, durante a formação do calo primário em meio de indução, foram bem variadas, mas foi possível observar uma morfologia em comum em alguns calos primários, nos tratamentos, representada pelo calo compacto nodular amarelo (Figura 1C) observada até os 90 dias. Após esse período foi observado que alguns calos mudaram sua morfologia, por exemplo, passaram apresentar consistência mucilagínosa.

De forma geral, a combinação da auxina 2,4-D, tanto em meio MS, como em meio Y3, proporcionou um maior desenvolvimento de organogênese (raiz e/ou haustório) expressado principalmente pela formação de raízes nos calos primários. A auxina picloram no meio de cultura MS induziu a formação de muitos calos primários lisos, por outro lado, no meio de cultura Y3 induziu calos nodulares que aumentaram em tamanho, mas nem todos se tornaram embriogênicos.

A porcentagem de calo embriogênico em relação aos calos primários formados foi acima de 30% nos tratamentos em meio MS com 542,99 $\mu\text{M/L}$ de 2,4-D e 300 $\mu\text{M/L}$ de picloram, e em meio Y3 com 150, 300 e 450 $\mu\text{M/L}$ de picloram. O tratamento com 450 $\mu\text{M/L}$ de picloram em meio de MS apresentou a maior porcentagem com 46% de calos embriogênicos formados. Apesar das altas taxas de formação de calo primário nem todos os calos formados apresentaram ou adquiriram competência embriogênica.

Os tipos de calos formados foram bem heterogêneos, tanto entre calos do mesmo tratamento, quanto entre calos em diferentes concentrações de auxina. Entretanto, um padrão com relação ao meio utilizado pôde ser observado. Os calos formados em meio de MS com 2,4-D apresentaram tamanho menor, aspecto mais liso e mucilagínoso, quando comparados com os calos formados em MS com picloram. Os calos induzidos com picloram apresentaram cor amarela mais intensa, aspecto nodular e um crescimento mais rápido observado visualmente pelo aumento do tamanho dos calos, tanto em meio de MS quanto em Y3.

3.3.2 Multiplicação

Aos 150 dias todos os calos foram transferidos para o meio de multiplicação com picloram em duas concentrações, menores que as usadas no meio de indução, (20 e 40 $\mu\text{M/L}$) associadas à citocinina 2-isopenteniladenina (2iP) (10 $\mu\text{M/L}$) e sem adição de carvão ativado. Os calos foram mantidos no mesmo meio básico inicial (MS ou Y3). Durante a transferência foi observado que alguns calos apresentavam-se compactos ('duros'), característica descrita na literatura para calos embriogênicos que darão origem a embriões somáticos, quando fornecidas as condições necessárias. O objetivo da redução da auxina nessa fase é manter as linhagens embriogênicas em ciclos repetitivos de divisão celular, o que permite a multiplicação do calo embriogênico.

Aos 180 dias de cultivo (30 dias em meio de multiplicação) foi observado o escurecimento de alguns calos (oxidação), até então não observado (Figura 2A), possivelmente ocasionado pela retirada do carvão ativado do meio de cultura. Contudo, a oxidação foi mais expressiva nos tratamentos com 2,4-D em ambos os meios, MS e Y3, ao contrário dos calos induzidos com picloram que não oxidaram da mesma forma (Figura 2B).

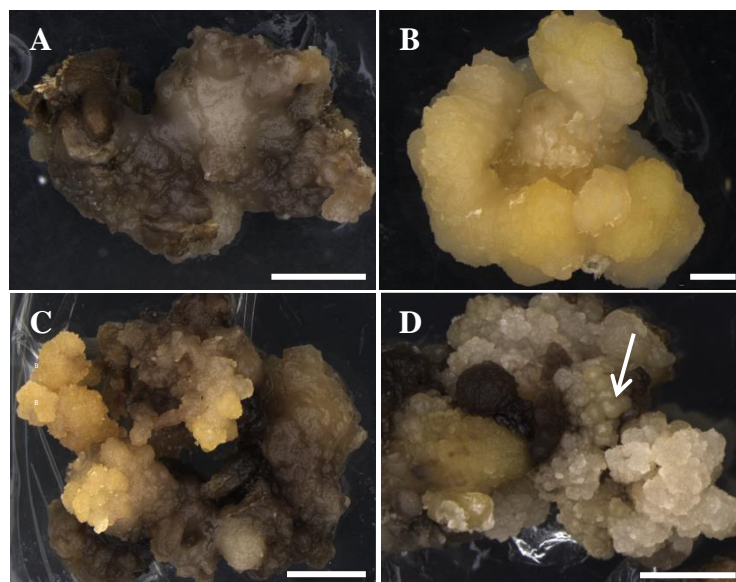


FIGURA 2. Morfologia dos calos em meio de multiplicação com 20 μM picloram, após 30 dias de cultivo (180 dias). (A) Calo oxidado em meio Y3 (induzido com 2,4-D). (B) Calo embriogênico em meio MS (induzido com picloram). (C) Calos amarelos com características embriogênicas sobre calo oxidado em meio Y3 (induzido com picloram). (D) Calo com embriões somáticos em meio MS (induzido com picloram) (seta). Escala: 5 mm (A, C, D), 2 mm (B).

Dados da literatura mostram que após a formação de calos embriogênicos recomenda-se a redução da auxina ou até mesmo sua eliminação do meio de cultura, pois a mesma pode ter efeito inibitório interferindo na formação dos embriões somáticos. A função do acréscimo de auxinas é estimular as células somáticas do explante a tornarem-se competentes e aptas para serem embriogênicas e formar embriões somáticos. Ao contrário da maioria dos estudos, Konan *et al.* (2010) observaram que os calos de *E. guineensis*, obtidos durante a fase de indução, continuaram multiplicando no mesmo meio de indução e não foram observadas perdas no crescimento e proliferação desses calos.

De acordo com Guerra & Handro (1998), subculturas sucessivas em meio de cultura com altas concentrações de auxina para multiplicação de calos embriogênicos podem afetar negativamente e até impedir o desenvolvimento de embriões somáticos. Balzon *et al.* (2013) observaram que a redução da concentração da auxina, de 450 para 40 $\mu\text{M/L}$, foi importante para estabelecer ciclos repetitivos de divisão celular, possibilitando, assim, a multiplicação dos calos de *E. guineensis*. As mesmas observações são descritas quando se reduz a auxina, para outras espécies como em *C. nucifera* (Fernando & Gamage, 2000) e *A. aculeata* (Luis & Scherwinski-Pereira, 2014). Neste trabalho a redução na concentração da auxina para 20 $\mu\text{M/L}$ com 10 $\mu\text{M/L}$ de 2iP manteve o crescimento visual dos calos e permitiu o desenvolvimento de zonas embriogênicas e embriões somáticos globulares.

Aos 210 dias, ainda no meio de multiplicação, alguns calos começaram a apresentar uma estrutura globular com a superfície lisa (Figura 2D). Algumas estruturas, com aparência esbranquiçada, apresentavam-se mais avançadas em seu desenvolvimento e com aspecto de embriões somáticos fusionados.

Aos 360 dias de cultivo, sobre os calos que oxidaram começaram a surgir novos calos amarelos e nodulares (Figura 2C). Aos 390 dias esses calos continuaram seu desenvolvimento. Alguns desses novos calos foram isolados do calo oxidado e repicados para meio de indução. Até os 60 dias apresentaram aumento de tamanho. Alguns desses calos nodulares apresentaram regiões meristemáticas e/ou células embriogênicas e a coloração do calo com um amarelo mais intenso quando comparado ao calo primário formado. A concentração de 20 $\mu\text{M/L}$ de picloram foi adequada para manter a multiplicação dos calos embriogênicos.

3.3.3 Diferenciação e maturação

Foram transferidos para o meio de diferenciação e maturação calos embriogênicos que apresentavam estruturas em processo de diferenciação, como embriões somáticos globulares e/ou estruturas esbranquiçadas e alongadas formadas ainda em meio de multiplicação (Figura 3).

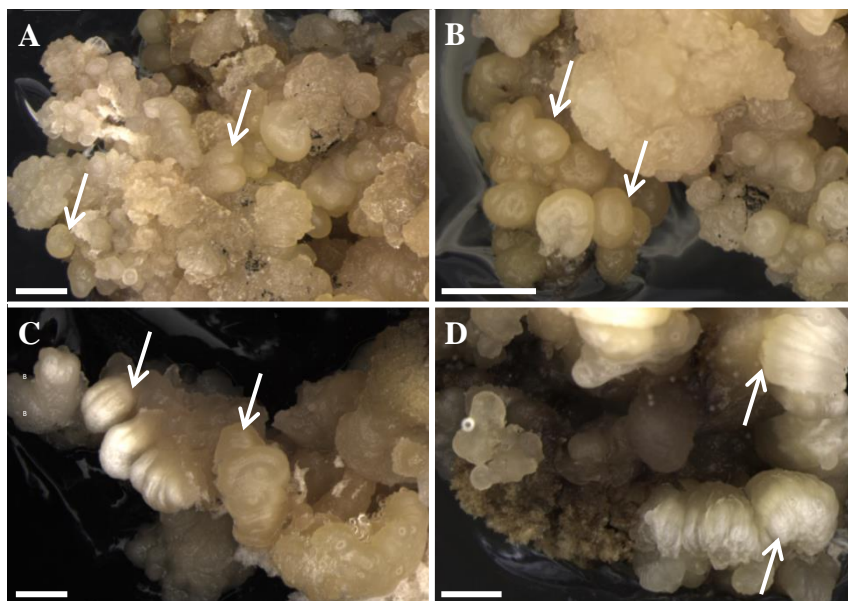


FIGURA 3. Imagens de calos embriogênicos com embriões somáticos. (A) Vista geral do calo embriogênico em meio MS. (B) Embriões somáticos globulares (setas). (C e D) Embriões somáticos mais desenvolvidos e fusionados (setas). Escala: 2 mm.

A finalidade deste meio é disponibilizar condições favoráveis aos proembriões para sua diferenciação em embriões somáticos e esses completarem seu desenvolvimento. Por isso, adicionou-se, ao meio de cultura, a auxina (ANA) e a citocinina (2iP), retirando-se o picloram ou o 2,4-D que poderiam impedir o desenvolvimento completo do embrião somático. Os calos embriogênicos apresentaram embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento. Embriões somáticos globulares com coloração amarela e textura lisa em diferentes tamanhos, além de embriões somáticos mais desenvolvidos apresentando uma estrutura mais alongada de coloração branca e sua base com coloração amarela, porém a parte aérea estava fusionada. Pode-se dizer que, com base em embriões somáticos de outras espécies, esses embriões somáticos fusionados (Figura 3D) estariam próximo do desenvolvimento dos embriões somáticos em estágio de torpedo, mas a fusão entre eles não permitiu seu

desenvolvimento individual. Características semelhantes foram observadas durante a formação de embriões somáticos em *Acca sellowiana* (Pescador *et al.*, 2008) e em *C. nucifera* (Montero-Córtes *et al.*, 2010).

A combinação ANA e 2iP é utilizada nesta fase, em grande parte dos protocolos de embriogênese somática, para espécies de palmeiras, com resultados que mostram a maturação dos embriões até a fase de torpedo (Balzon *et al.*, 2013; Freitas *et al.*, 2016).

3.3.4 Regeneração

Embriões somáticos, como os da Figura 4B, obtidos na fase de diferenciação e maturação foram isolados e transferidos para meio MS, com metade dos sais, sem fitorreguladores. A exposição à luz induziu a produção de cloroplastos tornando a parte aérea verde. Alguns desses embriões colapsaram, ou seja, não completaram o seu desenvolvimento.

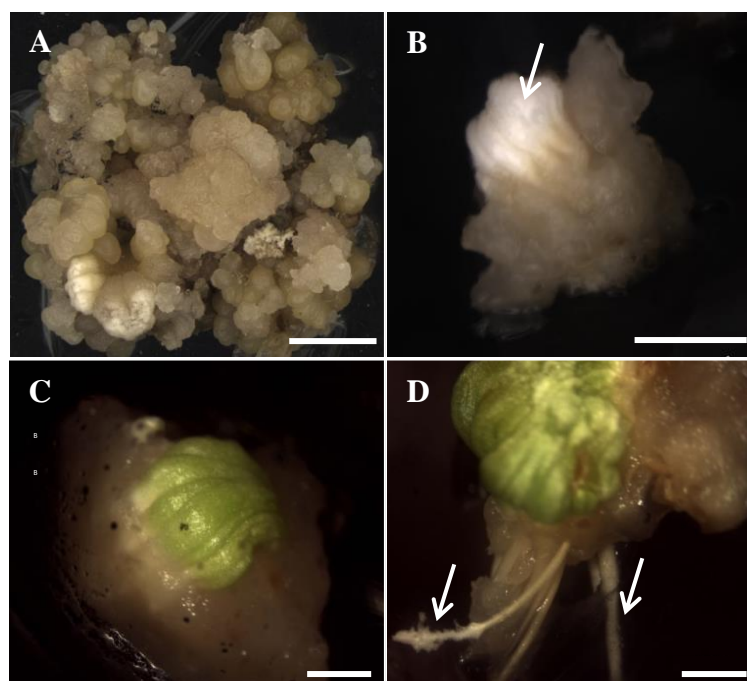


FIGURA 4. Germinação de embriões somáticos (ES). (A) Calo embriogênico com ES em diferentes fases (setas). (B) ES isolados do calo embriogênico, cotilédones (seta). (C e D) ES em meio de regeneração MS sem reguladores de crescimento (C) ES com cotilédones esverdeados (seta). (D) Presença de raízes (setas). Escala: 5 mm (A-B) e 2 mm (C-D).

Apesar da mudança de coloração a parte aérea não se desenvolveu individualmente, mantendo-se fusionadas. Por outro lado, ocorreu formação de raízes (Figura 4D). Possivelmente, cada embrião fusionado desenvolveu sua raiz, indicando que não há necessidade da adição de indutores para o enraizamento ao meio de cultura. Protocolos de embriogênese somática da espécie *P. dactylifera*, indicam o uso de ANA no meio de cultura, na fase de germinação, para o enraizamento dos embriões somáticos (Othmani *et al.*, 2009; Sané *et al.*, 2012).

A maioria dos protocolos indica que para germinar os embriões somáticos não há necessidade de reguladores de crescimento no meio de cultura (Guerra & Handro, 1998). Ledo *et al.* (2002) verificaram o início da germinação de embriões somáticos de açazeiro em meio de cultura de MS sem reguladores de crescimento aos 210 dias. Moura *et al.* (2009) não obtiveram a formação de plantas completas, pois não ocorreu a diferenciação da parte aérea, durante a germinação dos embriões somáticos de macaúba oriundos de embriões zigóticos. Luis & Scherwinski-Pereira (2014) observaram a germinação dos embriões somáticos em meio de regeneração sem auxinas, a partir dos 45 dias, com frequência máxima de regeneração de plantas de 31,9%. Os autores também observaram embriões somáticos anormais com o desenvolvimento normal da raiz, entretanto, o meristema apical pareceu estar ausente ou pouco desenvolvido, o que afetou o desenvolvimento da parte aérea das plantas.

Por outro lado, Freitas *et al.* (2016) utilizaram a citocinina BAP (N6-benzilaminopurina) e a giberilina AG₃ (ácido giberélico) no meio de regeneração nas concentrações de 1,0 µM/L e 0,5 µM/L, respectivamente. Os embriões somáticos iniciaram a germinação aos 60 dias e a maioria das plantas regeneradas apresentou desenvolvimento normal, com parte aérea e raízes desenvolvidas.

Mesmo sem entender totalmente o processo da embriogênese somática, dentre suas diferentes etapas, o grande gargalo parece ser a conversão dos embriões somáticos em plantas. A baixa conversão é relatada como uma das maiores dificuldades em desenvolver protocolos eficientes de embriogênese somática (Sáenz *et al.*, 2006; Pérez-Núñez *et al.*, 2006).

Outras observações realizadas neste trabalho foram em relação à combinação da auxina 2,4-D em meio Y3 que induziu a formação de raízes nos calos, nas diferentes concentrações testadas. A combinação 2,4-D e MS induziram raízes nas concentrações

de 361,99 e 452,49 $\mu\text{M/L}$ e uma pequena proporção em 542,99 e 633,48 $\mu\text{M/L}$ quando comparada à combinação picloram e MS ou Y3 que não formou raízes.

De forma geral, a rota morfogênica da embriogênese somática, nas condições estudadas, pode ser caracterizada como indireta e assincrônica para a espécie *B. odorata*. Esse mesmo modelo tem sido descrito para outras palmeiras que também utilizaram embrião zigótico como explante, por exemplo, açáí (Ledo *et al.*, 2002), pupunha (Steinacher *et al.*, 2007), dendê (Balzon *et al.*, 2013) e macaúba (Moura *et al.*, 2009; Luis & Scherwinski-Pereira, 2014). Muitos trabalhos testam tecidos embrionários como fonte de explante para embriogênese somática, isso porque os tecidos de embriões zigóticos são altamente responsivos à indução *in vitro*, causam o mínimo de dano à planta matriz e são naturalmente livres de patógenos (Ree & Guerra 2015). O embrião zigótico, oriundo de plantas alógamas, como fonte de explante para embriogênese somática não produzirá clones da planta matriz, mas as plântulas formadas irão auxiliar na conservação da espécie facilitando sua propagação e produção de mudas. Futuramente também podem contribuir em programas de melhoramento genético com cruzamentos controlados, além da transformação genética podendo ser usados em protocolos de regeneração dessas plantas.

3.3.5 Anatomia e histoquímica

As análises dos cortes anatômicos mostraram a presença de zonas meristemáticas formadas por aglomerados de células meristemáticas, na maioria dos calos primários, a partir dos 60 dias em meio de indução (Figura 5A-B). Durante os 150 dias do processo de indução foram visualizados, em todos os tratamentos, exceto os controles, células embriogênicas, proembriões e embriões somáticos nos calos embriogênicos (Figura 5C-D). As células meristemáticas são caracterizadas por serem isodiamétricas e apresentarem um núcleo de forma esférica contendo um ou mais nucléolos, citoplasma denso, um vacúolo altamente fragmentado. As células embriogênicas têm como características parede espessa, núcleo e nucléolo evidentes, citoplasma denso, redução ou ausência de vacúolos. Segundo Verdeil *et al.* (2007) o que distingue uma célula meristemática de uma célula embriogênica é a arquitetura nuclear e a estrutura da cromatina. Os núcleos de células meristemáticas apresentam forma esférica com vários nucléolos (geralmente pequenos). Os núcleos de células

embriogênicas possuem forma irregular com invaginações do invólucro nuclear (levando a vários lóbulos nucleares) e contêm apenas um nucléolo grande.

A presença de compostos fenólicos foi observada em vários calos primários, embriogênicos, próximo às zonas onde os proembriões iniciaram seu desenvolvimento (Figura 5D). A produção de compostos fenólicos pelas células parece ser uma resposta ao estresse (Taiz & Zaiger, 2009), neste caso, causado pela exposição às altas concentrações de auxinas e também devido a outros fatores estressantes referentes à condição *in vitro*.

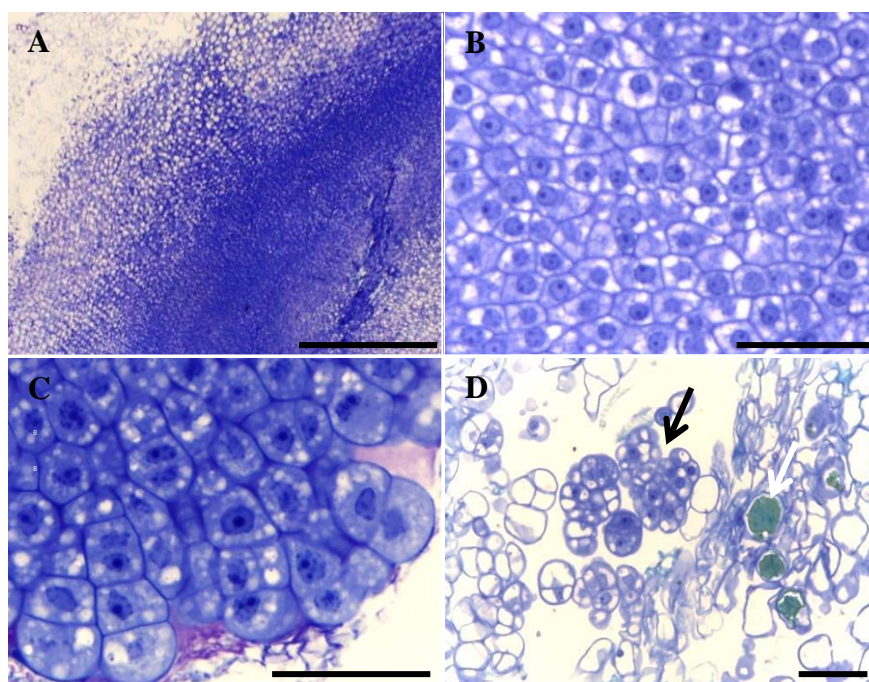


FIGURA 5. Anatomia de calos embriogênicos, com características nodulares, compactos e amarelos, corados com Azul de Toluidina. (A) Faixa de células meristemáticas. (B) Células meristemáticas. (C) Células embriogênicas. (D) Proembriões isolados (seta preta) e compostos fenólicos (seta vermelha). Escala: 500 μm (A) e 50 μm (B-D).

A maioria dos calos primários, formados aos 90 dias, apresentava morfologia semelhante aos calos primários apresentados na Figura 6 (A-C). Esses calos primários eram compactos, nodulares e com coloração amarela. Independente do tratamento, no qual foram induzidos, os calos apresentaram a formação de centros meristemáticos e/ou de estruturas embriogênicas. E de cada tratamento, exceto os controles e os tratamentos 50 $\mu\text{M/L}$ de picloram em MS, 361,99 $\mu\text{M/L}$ de 2,4-D e 50 $\mu\text{M/L}$ de picloram em Y3,

pelo menos um calo apresentou características embriogênicas ao longo dos 150 dias em meio de indução. Os cortes histológicos mostraram zonas meristemáticas (regiões mais coradas) com intensa divisão celular e em alguns calos formando faixas meristemáticas com células meristemáticas enfileiradas, como cordões (Figura 6 E-G). As células nas regiões meristemáticas são pequenas, isodiamétricas e com citoplasma denso (Figura 6F - detalhe).

Grãos de amido e carboidratos neutros foram detectados com o uso de reagentes e corantes histoquímicos (Figura 6I-J). Estes por sua vez são indicadores de células meristemáticas e embriogênicas. Por se tratarem de estruturas de reserva de energia para posterior uso no desenvolvimento de tecidos e órgãos como os embriões somáticos, além de indicarem alta atividade de divisão celular. Proteínas não foram detectadas nos calos embriogênicos (Figura 6H).

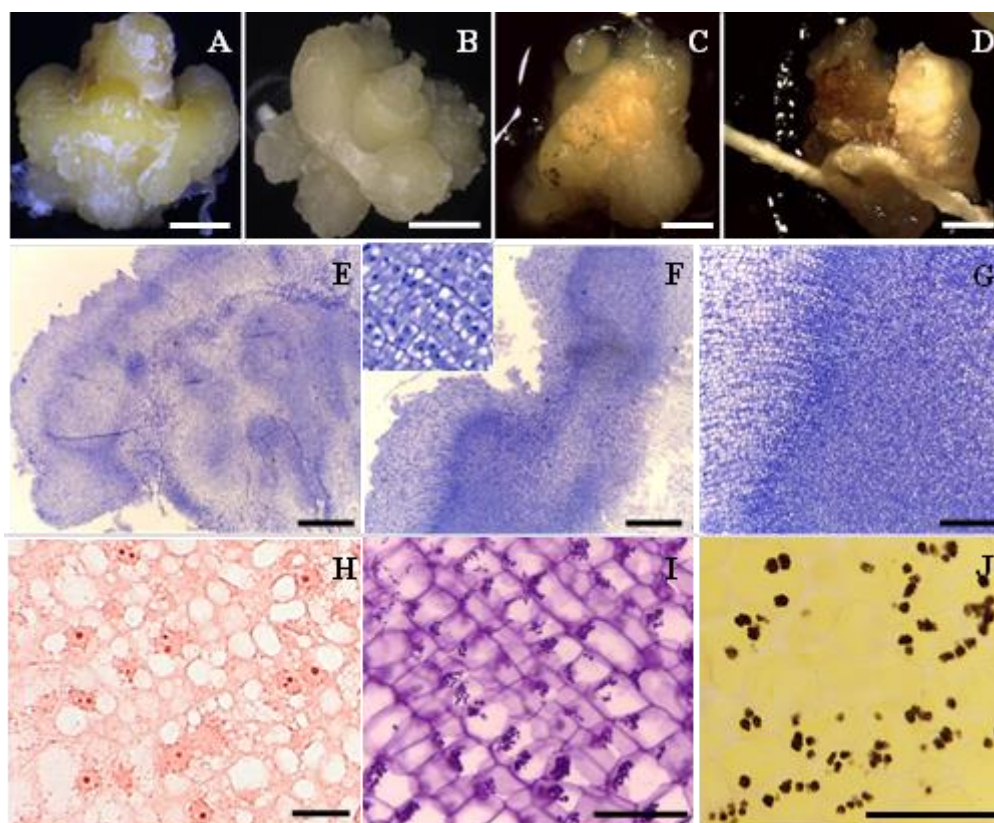


FIGURA 6. Morfologia e anatomia dos calos primários, aos 90 dias, em meio de indução à embriogênese somática. (A) Calo primário em meio MS com 300 $\mu\text{M/L}$ de picloram. (B) Calo primário em meio Y3 com 300 $\mu\text{M/L}$ de picloram. (C) Calo primário em meio MS com 633,48 $\mu\text{M/L}$ de 2,4-D. (D) Calo com raízes. (E) Corte anatômico do calo em (A). (F-G) Corte anatômico do calo em (B). (H) Células sem proteínas coradas com XP. (I) Células com carboidratos coradas com PAS. (J) Células com grãos de amido, reagente de Lugol. Escala: 1mm (A), 2 mm (B-D), 500 μm (E-F), 200 μm (G), 20 μm (H), 50 μm (I-J).

Na superfície dos calos embriogênicos, estruturas globulares foram visualizadas e classificadas como embriões somáticos (Figura 7D). A análise dos cortes histológicos mostrou que essas estruturas eram embriões somáticos, pois apresentavam a diferenciação de uma protoderme bem definida (Figura 7C), células meristemáticas e células parenquimáticas de preenchimento. Também foi possível visualizar a ausência de ligação vascular do embrião somático com o calo e a fusão da base desse embrião ao tecido de origem (Figura 7A) o que confere, ao embrião somático, uma origem multicelular.

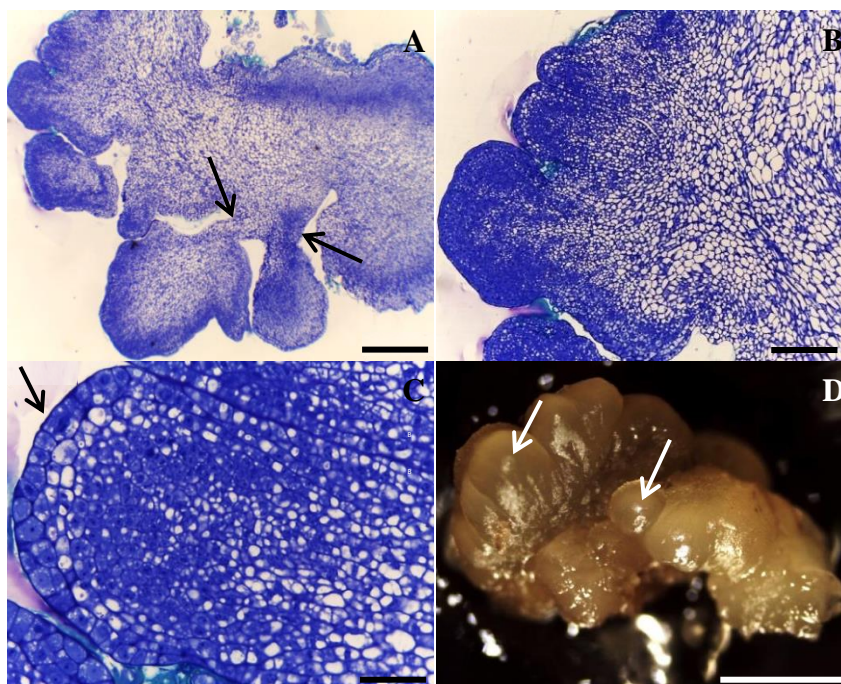


FIGURA 7. Anatomia e morfologia de um calo embriogênico com embriões somáticos. (A) embriões somáticos fusionados ao tecido de origem (setas). (B) Embriões somáticos delimitados pela protoderme. (C) Detalhe da protoderme (seta). (D) Embriões somáticos (setas). Escala: 500 μ m (A-B), 50 μ m (C), 2 mm (D).

Segundo Williams & Maheswaran (1986) a origem multicelular produz embriões somáticos fusionados ao tecido de origem. Os embriões somáticos são caracterizados, principalmente, pela presença de uma protoderme definida, bipolaridade devido à diferenciação dos cotilédones e presença de procâmbio. Essas características foram observadas e descritas para as espécies *C. nucifera* (Fernando *et al.*, 2003), *P. dactylifera* (Sané *et al.*, 2006), *E. guineensis* (Silva *et al.*, 2012) e *E. oleraceae* (Freitas

et al., 2016). Durante as avaliações anatômicas, a presença de procâmbio não foi visualizada. Isso pode indicar a necessidade da permanência destes embriões por mais tempo em meio de maturação até o seu completo desenvolvimento.

A presença de centros meristemáticos é uma característica marcante nos calos embriogênicos. Segundo Fehér *et al.* (2003) a presença desses centros primários seguidos da formação de um órgão, está relacionada à capacidade de uma célula em responder a sinais específicos como os gerados pela ação dos hormônios. Moura *et al.* (2009) relataram que em *A. aculeata* a formação de proembriões de origem unicelular e embriões somáticos globulares de origem multicelular também se formaram a partir de calos nodulares. Em *C. nucifera*, a embriogênese somática teve origem unicelular (Dussert *et al.*, 1995) e origem multicelular também foi observada a partir de regiões meristemáticas (Sáenz *et al.*, 2006). Balzon *et al.* (2013) também observaram embriões globulares de origem multicelular em calos embriogênicos de *E. guineensis*. Luis & Scherwinski-Pereira (2014) concluíram que as estruturas globulares aparentemente isoladas e formadas por células meristemáticas, observadas na região central do calo nodular, caracterizam a formação de embriões de origem multicelular em *A. aculeata*.

As análises anatômicas comprovaram a presença de células meristemáticas, células embriogênicas, massas proembriogênicas, proembriões e embriões somáticos na maioria dos tratamentos testados ao longo do processo de embriogênese somática. Porém, por fatores desconhecidos, mas que podem ser estudados, com mais detalhes em trabalhos futuros, podem ser encontrados de forma temporal (tempo de exposição) e espacial (fase do processo) o que inibiu ou o que não foi disponibilizado para que esses proembriões prosseguissem na rota de diferenciação em embriões somáticos e desenvolvimento em plântulas. Os embriões somáticos globulares obtidos e analisados anatomicamente (Figura 7) apresentaram origem multicelular, mas isso não exclui a possibilidade da ocorrência de origem unicelular. Para palmeiras, o relato de ambas as origens uni e multicelular é comum na mesma espécie. Por fim, a conversão do embrião somático em plântula normal, desenvolvimento de ambas as partes aérea e radicular, também necessita de estudos quanto ao tempo necessário para completar seu desenvolvimento entre o estágio globular aqui caracterizado (Figuras 3A-B e 7D) até o estágio de torpedo. Hipóteses sobre a não conversão pode ser devido ao tempo prolongado de exposição desses calos em meio com auxina e/ou necessidade do uso de

outros reguladores de crescimento nas fases seguintes à indução, como, por exemplo, ABA e/ou BAP não testados neste trabalho.

3.4 Conclusões

O presente trabalho apresenta a primeira descrição de indução à embriogênese somática para a espécie *Butia odorata*. A espécie foi responsiva ao induzir embriões zigóticos maduros como explantes. As melhores respostas foram em meio de cultura Y3 com a auxina picloram nas concentrações de 150, 300 e 450 µM/L. A embriogênese somática, nas condições de indução aqui relatadas, foi indireta e assincrônica.

3.5 Referências bibliográficas

BALZON, T. A.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA. New approaches to improve the efficiency of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) from mature zygotic embryos. **In vitro Cellular Development Biology-Plant**, Cambridge, v. 49, p. 41-50, 2013.

DUSSERT, S.; VERDEIL, J. L.; BUFFARD-MOREL, J. Specific nutrient uptake during initiation of somatic embryogenesis in coconut calluses. **Plant Science**, Limerick, v. 11, n. 1, p. 229-236, 1995.

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

FEDER, N.; O'BRIEN, T. P. Plant microtechnique. Some principles and new methods. **American Journal of Botany**, Lancaster, v. 55, p. 123-142, 1968.

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

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

FERNANDO, S. C. et al. Histological analysis of plant regeneration from plumule explants of *Cocos nucifera*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 72, p. 281-284, 2003.

FIOR, C. L. et al. Superação de dormência em sementes de *Butia capitata*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 7, p. 1150-1153, 2011.

FIOR, C. L.; SOUZA, P. V. D.; SCHWARZ, S. F. Emergência de plântulas de *Butia odorata* (barb. rodr.) noblick em casa de vegetação. **Revista Árvore**, Viçosa, v.37, n.7, p. 503-510, 2013.

FONSECA, L. X. **Caracterização de frutos de butiazeiro (*Butia odorata* Barb. Rodr.) Noblick & Lorenzi e estabilidade de seus compostos bioativos na elaboração e armazenamento de geleias**. 2012. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2012.

FREITAS, E. O. et al. Somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos of the açaí palm (*Euterpe oleracea*): induction of embryogenic cultures, morphoanatomy and its morphological characteristics. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 212, p. 126–135, 2016.

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

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

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, A. (Org.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CBAB, 1999. 354 p.

HABERLANDT, G. Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. **Sitzungsberichte der Bayerischen Akademie der Wissenschaften**, Wien, v. 111, p. 69-92, 1902.

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

KONAN, K. E. et al. In vitro conservation of oil palm somatic embryo for 20 years on a hormone-free culture medium: characteristics of the embryogenic cultures, derived plantlets and adult palms. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 29, p. 1–13, 2010.

LEDO, A. S. et al. Somatic embryogenesis from zygotic embryos of *Euterpe oleracea* Mart. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 3, p. 601-603, 2002.

LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. An improved protocol for somatic embryogenesis and plant regeneration in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from mature zygotic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 118, p. 485–496, 2014.

MCDOWELL, E. M.; TRUMP, B.F. Histologic fixatives suitable for diagnostic light and electron microscopy. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, Chicago, v. 100, p. 405-414, 1976.

MISTURA, C. C. et al. Descriptors for on-farm conservation and use of *Butia odorata* natural populations. **Plant Genetic Resources: characterization and utilization**, Cambridge, v. 14, n.1, p. 35-40, 2016.

MONTERO-CÓRTEZ, M. et al. GA3 stimulates the formation and germination of somatic embryos and the expression of a KNOTTED-like homeobox gene of *Cocos nucifera* (L.). **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 29, n. 9, p. 1049–1059, 2010.

MOREL, G. M.; WETMORE, R. H. Fern callus tissue culture. **American Journal of Botany**, Lancaster, v. 38, n. 2, p. 141-143, 1951.

MOURA, E. F. et al. Somatic embryogenesis in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from zygotic embryos. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 119, p. 447-454, 2009.

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

NOBLICK, L. R. Validation of the Name *Butia odorata*. **PALMS**, Lawrence, v. 55, n. 1, p. 48-49, 2011.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, Wien, n. 59, p. 367-373, 1964.

O'BRIEN, T. P.; MCCULLY, M. E, 1981 In: VENTRELLA, M. C; ALMEIDA, A. L.; NERY, L. A.; COELHO, V. P. M. **Métodos histoquímicos aplicados às sementes**, Viçosa, MG: Ed. UFV, p. 40, 2013.

OTHMANI, A. et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration in date palm *Phoenix dactylifera* L., cv. Boufeggous is significantly improved by fine chopping and partial desiccation of embryogenic callus. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 97, p. 71-79, 2009.

PÉREZ-NÚÑEZ, M. T. et al. Improved somatic embryogenesis from *Cocos nucifera* (L.) plumule explants. **In vitro Cellular Development Biology-Plant**, Cambridge, v. 42, p. 37-43, 2006.

PESCADOR, R. et al. Anomalous somatic embryos in *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 155-164, 2008.

QUIROZ-FIGUEROA, F. R. et al. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 86, p. 285-301, 2006.

REE, J. F.; GUERRA, M. P. Palm (Arecaceae) somatic embryogenesis. **In Vitro Cellular and Development Biology - Plant**, Cambridge, v.51, n.6, p. 589-602, 2015.

RIVAS, M.; BARBIERI, R. L. **Boas práticas de manejo para o extrativismo sustentável do butiá**. Brasília, DF: Embrapa, 2014. 59p.

SÁENZ, L. et al. Morphological and histological changes during somatic embryo formation from coconut plumule explants. **In Vitro Cellular and Development Biology - Plant**, Cambridge, v. 42, p. 19-25, 2006.

SANÉ, D. et al. Histocytological analysis of callogenesis and somatic embryogenesis from cell suspensions of date palm (*Phoenix dactylifera*). **Annals of Botany**, Oxford, v. 98, p. 301-308, 2006.

SANÉ, D. et al. Influence of growth regulators on callogenesis and somatic embryo development in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) sahelian cultivars. **The Scientific World Journal**, Cairo, v. 2012, p. 1-8, 2012.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration in açai palm (*Euterpe oleracea*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 109, p. 501-508, 2012.

SCHLINDWEIN, G. et al. Alleviation of seed dormancy in *Butia odorata* palm tree using drying and moist-warm stratification. **Seed Science & Technology**, Zurich, n. 41, p. 1-11, 2013.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. The assistat software version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. **African Journal Agriculture Research**, [Kenya], v. 11, n. 39, p. 3733-3740, 2016.

SILVA, R. C.; LUIS, Z. L.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Differential responses to somatic embryogenesis of different genotypes of Brazilian oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 111, p. 59-67, 2012.

STEINMACHER, D. A. et al. Somatic embryogenesis from peach palm zygotic embryos. **In Vitro Cellular and Development Biology - Plant**, Cambridge, n. 43, p. 124-132, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819 p.

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

THUZAR, M. et al. Efficient and rapid plant regeneration of oil palm zygotic embryos cv. 'Tenera' through somatic embryogenesis. **Acta Physiologiae Plantarum**, Warszawa, v. 33, p.123-128, 2011.

TORRES, A. C. et al. **Glossário de biotecnologia vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000.

VERDEIL, J-L; HOCHER, V. Digestion and absorption of food in plants: a plant stomach. **Trends in Plant Science**, Amsterdam, v.7, n. 6, p. 290-291, 2002.

VERDEIL, J-L. et al. Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? **Trends in Plant Science**, Amsterdam, v. 12, p. 245-252, 2007.

VIDAL, 1970 In: VENTRELLA, M. C; ALMEIDA, A. L.; NERY, L. A.; COELHO, V. P. M. **Métodos histoquímicos aplicados às sementes**, Viçosa, MG: Ed. UFV, p. 40, 2013.

WILLIAMS, E. G.; MAHESWARAN, G. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany**, Oxford, v. 57, n. 4, p. 443-462, 1986.

4 CAPÍTULO 2

Aplicação da técnica *Thin Cell Layer* (TCL) para indução da embriogênese somática a partir de plântulas *in vitro* de *Butia odorata* (BARB. RODR.)

NOBLICK

RESUMO

A palmeira *Butia odorata* (Barb. Rodr.) Noblick é nativa da região Sul do Brasil e Uruguai. Apresenta potencial econômico, pois seus frutos podem ser consumidos *in natura*, processados e também pode ser usada para o paisagismo. Como a maioria das palmeiras, sua propagação é exclusivamente por sementes, e essas possuem dormência, o que dificulta a produção de mudas. Existem técnicas da cultura de tecidos que podem auxiliar na propagação da espécie, como a embriogênese somática. A técnica da camada fina de células (*Thin Cell Layer* - TCL), também aplicada na cultura de tecidos, consiste na obtenção de pequenos explantes (escala em milímetros) e a conversão desses em plântulas ocorre via organogênese e embriogênese somática. A TCL em conjunto com a embriogênese somática tem apresentado bons resultados na multiplicação *in vitro* de espécies de palmeiras. O objetivo deste trabalho foi utilizar a técnica TCL, como alternativa de explante para a indução da embriogênese somática em *B. odorata*. Os TCLs foram obtidos de plântulas germinadas *in vitro*, a partir de cortes transversais com espessura entre 1 e 2 mm. Foram testados os meios de cultura MS e Y3, e as auxinas 2,4-D e picloram em quatro concentrações (0,00; 452,49; 542,99 e 633,48 $\mu\text{M/L}$). Após a indução os calos foram transferidos para o meio de multiplicação com redução gradual da auxina e mais a adição de 12,5 $\mu\text{M/L}$ BAP. Os tratamentos com os TCLs, da região basal aclorofilada de plântulas, nas concentrações de 452,49; 542,99 e 633,48 $\mu\text{M/L}$ de picloram em meio Y3 formaram calo primário, calo embriogênico e embriões somáticos. Apesar da alta eficiência na indução de calos primários, a auxina 2,4-D, não desenvolveu calos embriogênicos. A TCL juntamente com a embriogênese somática pode tornar-se uma alternativa para a multiplicação *in vitro* da espécie *B. odorata*.

Palavras-chave: Butiá, calo embriogênico, 2,4-D, picloram, embrião somático.

ABSTRACT

The palm *Butia odorata* (Barb. Rodr.) Noblick is native to the Southern region of Brazil and Uruguay. It presents economic potential because its fruits can be consumed *in natura*, processed and also can be used for landscaping. Like most palm trees, their propagation is exclusively by seeds, and these have dormancy, which makes it difficult to produce seedlings. There are tissue culture techniques that can aid in the propagation of the species, such as somatic embryogenesis. The Thin Cell Layer (TCL) technique, also applied in tissue culture, consists in obtaining small explants (scale in millimeters) and the conversion of these into seedlings occurs via organogenesis and somatic embryogenesis. TCL in conjunction with somatic embryogenesis has shown good results in *in vitro* multiplication of palm species. The objective of this work was to use the TCL technique as an explant alternative for the induction of somatic embryogenesis in *B. odorata*. TCLs were obtained from germinated seedlings *in vitro*, from cross sections with thickness between 1 and 2 mm. MS and Y3 culture media and 2,4-D and picloram auxins were tested at four concentrations (0,00; 452,49; 542,99 and 633,48 $\mu\text{M/L}$). After induction the callus was transferred to the medium of multiplication with gradual reduction of auxin plus the addition of 12,5 $\mu\text{M / L}$ BAP. The treatments with the TCLs, from the acolorophilic basal region of seedlings, at concentrations of 452,49; 542,99 and 633,48 $\mu\text{M/L}$ picloram in Y3 medium formed primary callus, embryogenic callus and somatic embryos. Despite the high efficiency of primary callus induction, 2,4-D auxin did not develop embryogenic calli. TCL together with somatic embryogenesis may become an alternative for the *in vitro* multiplication of *B. odorata* species.

Keywords: Pindo palm, embryogenic callus, 2,4-D, picloram, somatic embryo.

4.1. Introdução

A espécie *Butia odorata* (Barb. Rodr.) Noblick é uma palmeira nativa da região sul do Brasil e Uruguai. Pertence a um grupo de 15 espécies de palmeiras nativas distribuídas em seis gêneros descritos para o Estado do Rio Grande do Sul, sendo oito espécies pertencentes ao gênero *Butia* (Soares *et al.*, 2014). Atualmente muito apreciada pelos seus frutos *in natura* e processados (Rivas & Barbieri, 2014). Hoje restam remanescentes de butiazais na região sul, em propriedades privadas e ao longo das rodovias (Mistura *et al.*, 2015). Esforços têm sido feitos tanto pela comunidade quanto por empresas públicas de pesquisa para a conservação dessas áreas remanescentes como para o conhecimento das características fitotécnicas e posterior aplicação na exploração comercial da espécie. Estudos mostram características fitoquímicas de grande valor destacando a presença de vitamina C e antioxidantes (Fonseca, 2012).

Porém, existem restrições, quanto à produção de mudas, visto à dificuldade em germinar as sementes, pois é a única forma de propagação da espécie, a mesma não se reproduz vegetativamente. Uma alternativa para a propagação de *B. odorata* é a aplicação da embriogênese somática. Essa se caracteriza por ser uma rota morfogênica capaz de produzir embriões somáticos semelhantes aos embriões zigóticos (Zimmerman, 1993). A embriogênese somática tem como característica importante a produção de mais de uma planta, por explante induzido, quando comparada ao embrião zigótico, que germina uma única planta. Esta técnica tem sido aplicada com sucesso na propagação de palmeiras com interesse comercial, por exemplo, *Cocos nucifera* (Verdeil, *et al.*, 1994), *Phoenix dactylifera* (Fki *et al.*, 2003) e *Elaeis guiniensis* (Balzon *et al.*, 2013). Aliada a embriogênese somática *in vitro* pode-se utilizar a técnica *Thin Cell Layer* (TCL) como fonte alternativa de explante para obtenção de embriões somáticos e produção de mudas da espécie *B. odorata*.

A técnica da camada fina de células (*Thin Cell Layer* - TCL) foi descrita inicialmente por Tran Thanh Van em 1973. Em seu experimento foram cultivados cortes transversais do caule de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) resultando na organogênese direta de botões florais. Esses botões florais originaram-se da epiderme dos TCLs, mostrando a eficiência da técnica. Nesta técnica os explantes podem ser excisados, de duas formas, longitudinalmente, TCLs longitudinais (lTCL) ou excisados transversalmente, TCLs transversais (tTCL) (Tran Thanh Van, 2003).

A TCL tem sido aplicada na cultura de tecidos com inúmeras finalidades como a propagação massal de orquídeas e outras ornamentais (*Begonia rex* Putz.; *Lilium longiflorum* Thunb.), hortaliças (*Brassica napus* L.; *Spinacia oleracea* L.), grãos (*Phaseolus vulgaris* L.; *Sorghum bicolor*), espécie lenhosas (*Pinus radiata*; *Poncirus trifoliata*) entre outras espécies. E na recuperação de espécies medicinais ameaçadas de extinção (*Psychotria ipecacuanha*; *Ceropegia bulbosa* Roxb.), a regeneração *in vitro* ocorre via organogênese e embriogênese somática, ou seja, a TCL tem auxiliado na propagação massal, conservação de germoplasma e na produção de metabólitos secundários de diversas espécies (Silva & Dobranszki, 2015).

A técnica TCL também tem sido aplicada com sucesso na indução da embriogênese somática em espécies de palmeiras utilizando plântulas germinadas *in vitro* como fonte de explante em *Bactris gasipaes*, pupunheira (Steinmacher *et al.*, 2007), *Elaeis guinieensis*, dendezeiro (Scherwinski-Pereira *et al.*, 2010; Bonetti *et al.*, 2016) e *Acrocomia aculeata*, macaúba (Padilha *et al.*, 2015). Portanto, a TCL permite induzir a embriogênese somática utilizando-se tecidos de plântulas germinadas *in vitro* como alternativa de explante, já que as palmeiras têm uma fonte limitada de explantes, e o uso de folhas e inflorescências jovens podem levar a morte da planta de interesse. Além de plântulas *in vitro* outros tipos de explantes, por exemplo, TCLs de inflorescências imaturas foram capazes de induzir embriogênese somática em *E. guinieensis* (Guedes *et al.*, 2011).

Portanto, estudos na aplicação da TCL visando indução da embriogênese somática poderão auxiliar na propagação de *B. odorata* com a diversificação do tipo de explante inicial, e assim contribuir na sua conservação e produção de mudas com finalidades comerciais. Assim o objetivo desse trabalho foi verificar a aplicabilidade da técnica TCL e estabelecer um protocolo inicial de indução da embriogênese somática a partir de explantes de plântulas germinadas *in vitro* visando à multiplicação *in vitro* de *B. odorata*.

4.2 Material e métodos

Frutos maduros de *Butia odorata* foram coletados em uma população natural no município de Barão do Triunfo, RS. Os frutos foram despulpados e os diásporos quebrados para obtenção das sementes. As sementes foram submetidas à desinfestação em álcool 70% por um minuto e hipoclorito de sódio 2,5% (cloro ativo) por 20 minutos.

Em seguida, em câmara de fluxo de ar laminar foram realizadas três lavagens com água destilada autoclavada. Os embriões foram isolados e colocados em tubos de ensaio contendo meio de cultura MS ou Y3 para germinar. Após, foram acondicionados em sala de crescimento com temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16h. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos II da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, localizado em Brasília, DF.

Aos 150 dias, após a germinação, plântulas com dois a quatro centímetros de comprimento, foram selecionadas e suas folhas, raízes e o pecíolo cotiledonar foram removidos. Cortes transversais entre um e dois milímetros de espessura foram realizados, totalizando seis cortes por plântula (dois cortes para cada região aclorofilada: basal, mediana e apical) utilizados como explantes para indução da embriogênese somática. Os cortes finos transversais (tTCLs) utilizados neste trabalho foram baseados em trabalhos realizados com outras palmeiras, nos quais, os autores relatam que os tecidos mais próximos da base da plântula e aclorofilados são os mais responsivos: Steinmacher *et al.* (2007) testaram 13 tTCLs (explantes) por plântulas de pupunha (*B. gasipae*), Scherwinski-Pereira *et al.* (2010) testaram 18 tTCLs em plântulas de dendê (*E. guinieensis*) e Padilha *et al.* (2015) testaram oito tTCLs em plântulas de macaúba (*A. aculeata*).

4.2.1 Meio de cultura para indução do calo primário

Os explantes foram dispostos em placas de Petri com 25 mL de meio de cultura. As placas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, no escuro. Para a fase de indução, durante 180 dias, foram testados os sais dos meios MS (Murashige & Skoog, 1962) e Y3 (Eeuwens, 1976). Em ambos os meios foram adicionados ferro EDTA e vitaminas do MS, glutamina (200 mg/L), asparagina (100 mg/L), arginina (100 mg/L), sacarose (30 g/L) e carvão ativado (2,0 g/L). Antes da autoclavagem o pH foi corrigido para 5,8. Após o ajuste de pH foi acrescentado Phytigel (Sigma) (2,3 g/L). Os meios foram autoclavados a 121°C e pressão de 1,3 atm, durante 20 minutos.

Além dos meios de cultura MS e Y3 foram testadas as auxinas ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) e picloram em quatro concentrações (0,00; 452,49; 542,99 e 633,48 $\mu\text{M/L}$). As avaliações foram realizadas com a contagem do número de calos primários formados.

4.2.2 Meio de cultura para manutenção e multiplicação dos calos embriogênicos

Nesta fase foi testada a redução gradual da auxina em associação com uma citocinina. Para isso utilizou-se o mesmo meio de indução, MS ou Y3, alterando a concentração de picloram ou 2,4-D, acrescentando Benzilaminopuirina (BAP).

A primeira combinação consistiu na combinação 40 $\mu\text{M/L}$ de picloram ou 2,4-D mais 12,5 $\mu\text{M/L}$ de BAP. A segunda combinação foi de 20 $\mu\text{M/L}$ de picloram ou 2,4-D mais 12,5 $\mu\text{M/L}$ de BAP. Os calos permaneceram durante 30 dias em cada uma das combinações de auxina e citocinina. As avaliações, nesta fase, foram realizadas com a contagem do número de calos embriogênicos sobre o número de calos primários formados por tratamento.

4.2.3 Meio de cultura para desenvolvimento dos embriões somáticos

Nesta fase retiraram-se as auxinas 2,4-D e picloram. Os calos embriogênicos que apresentavam embriões somáticos globulares foram transferidos para um meio, MS ou Y3, de acordo com o meio em que foi induzido, com 0,54 $\mu\text{M/L}$ de ANA (ácido naftalenoacético) combinado com 12,5 $\mu\text{M/L}$ de 2ip (2-isopenteniladenina).

4.2.4 Meio de cultura para germinação dos embriões somáticos

Nesta fase foi utilizado o meio de cultura sem fitorreguladores, apenas metade dos sais do MS com carvão ativado e os embriões somáticos foram expostos a fotoperíodo de 16 horas com intensidade luminosa de 30 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas do tipo LED. Os embriões somáticos permaneceram por sete meses com subcultivos a cada três meses para o mesmo meio.

4.2.5 Anatomia e Histoquímica

Foram feitas amostragens dos calos nas fases de indução, multiplicação e diferenciação. As amostras foram fixadas em glutaraldeído 1% e formaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2 (McDowell & Trump, 1976), desidratadas em série alcoólica crescente (10-100°Gl) e infiltradas com metacrilato (Historesina Leica) de acordo com as recomendações do fabricante. O material emblocado foi cortado em micrótomo de rotação Leica (DM 2125RT) com espessura de 3 a 5 micrometros. Para anatomia foi utilizado o corante azul de toluidina 0,5% (O'Brien *et al.*, 1964) e para

histoquímica os corantes Lugol (amido) (Johansen, 1940), ácido periódico-Schiff (PAS) (carboidratos neutros) (O'Brien & McCully, 1981) e Xylidine Posseau (XP) (proteínas) (Vidal, 1970). As lâminas foram montadas em Entelan, os cortes anatômicos foram analisados e registrados em microscópio óptico Leica (DM 750) com câmera acoplada Leica (ICC50 HD). Fotomacrografias da morfologia externa dos mesmos calos amostrados para anatomia e histoquímica foram registrados com estereomicroscópio Leica (M205FA) com câmera acoplada Leica (DFC310FX).

4.2.6 Delineamento e análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x2x4x3 (dois meios x duas auxinas x quatro concentrações x três posições). Cada tratamento foi composto por cinco repetições, cada repetição era composta por uma placa de Petri com seis cortes de camada fina por plântula (dois cortes basais, dois medianos e dois apicais). As avaliações de formação do calo primário e do calo embriogênico foram realizadas aos 180 e 270 dias, respectivamente. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 95% de significância com auxílio do programa estatístico Assistat (Silva & Azevedo, 2016).

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Indução de calos embriogênicos

Aos 30 dias foi possível observar a formação de calos nos tTCLs da região basal e mediana, aclorofilada, das plântulas germinadas *in vitro*. Ficou evidente, aos 180 dias de cultivo em meio de indução, que os tTCLs da região basal foram os mais responsivos à formação de calos primários do que os tTCLs da região mediana e apical, independente do meio de cultura, do tipo de auxina e da concentração utilizada. A interação entre auxina, concentração e posição do tTCL foi significativa ($p < 0,05$). Alguns tTCLs da região mediana e apenas um tTCL da região apical também formaram calos. Os resultados podem ser observados na Figura 1.

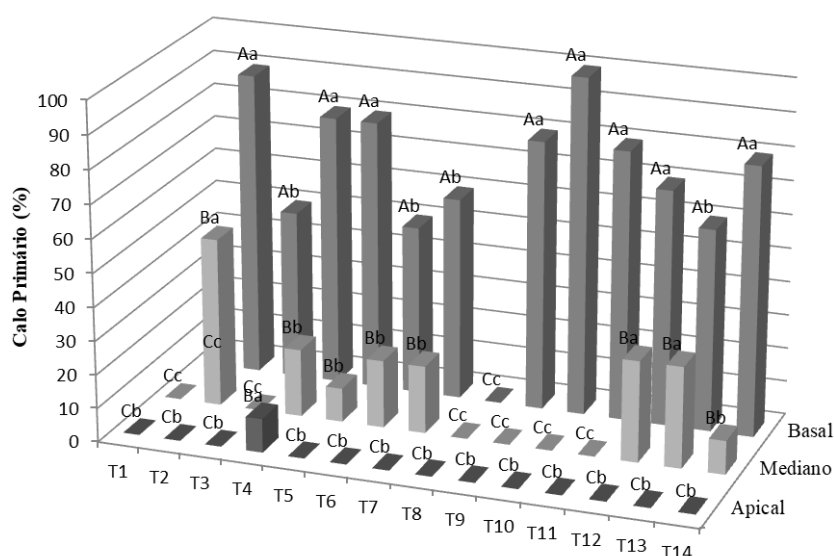


FIGURA 1. Interação da posição do explante com o tratamento durante a indução do calo primário aos 180 dias. T1: controle do meio MS sem auxina. MS + 2,4-D: T2 (452,49 $\mu\text{M/L}$), T3 (542,99 $\mu\text{M/L}$), T4 (633,48 $\mu\text{M/L}$). MS + picloram: T5(452,49 $\mu\text{M/L}$), T6 (542,99 $\mu\text{M/L}$), T7 (633,48 $\mu\text{M/L}$). T8: controle do meio Y3 sem auxina. Y3 + 2,4-D: T9 (452,49 $\mu\text{M/L}$), T10 (542,99 $\mu\text{M/L}$), T11(633,48 $\mu\text{M/L}$). Y3 + picloram: T12 (452,49 $\mu\text{M/L}$), T13 (542,99 $\mu\text{M/L}$), T14 (633,48 $\mu\text{M/L}$).

F (Auxina x Concentração x Posição): 2,1444*

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade

Médias seguidas da mesma letra, maiúscula na vertical referem-se a posição dentro do tratamento e minúsculas na horizontal referem-se a posição entre os tratamentos, não diferem entre si pelo teste

Essa resposta da formação de calo primário em relação à posição do explante, onde os TCLs obtidos da região basal das plântulas foram mais responsivos, foi descrito em outros trabalhos (Steinmacher *et al.*, 2007; Scherwinski-Pereira *et al.*, 2010; Padilha *et al.*, 2015). Neste trabalho, dos seis tTCLs das três regiões testadas, os responsivos à formação de calo primário foram a partir do tTCL da região basal da plântula até o quarto tTCL, região mediana da plântula. Os tratamentos controles não apresentaram formação de calo (T1 e T8) e os demais tTCLs que não formaram calo oxidaram com o passar do tempo (Figura 2A).

Os tratamentos mais eficientes na indução de calos primários foram com os tTCLs da região basal da plântula em meio MS com 452,49 μM (90%) e 633,48 μM (80%) de 2,4-D e 542,99 μM (80%) de picloram (T2, T4 e T5, respectivamente) e em meio Y3 com 452,49 μM (80%), 542,99 μM (100%) e 633,48 μM (80%) de 2,4-D (T9, T10, T11) e 452,49 μM (70%) e 633,48 μM (80%) de picloram (T12 e T14) (Figura 1). Para a espécie *Bactris gasipaes*, Steinmacher *et al.* (2007) observaram que a formação

do calo primário foi influenciada pela interação da concentração de picloram e a origem do explante (basal) e os resultados obtidos com 150 e 600 $\mu\text{M/L}$ de picloram se destacaram com a formação de 83 e 97% de calo primário, respectivamente.

A maioria dos calos primários formados apresentavam coloração branca e aspecto friável (Figura 2C). Alguns começaram a apresentar coloração amarela e em outros calos, um segundo tipo de morfologia foi observado, eram amarelos, translúcidos e lisos (Figura 2D), principalmente nos tratamentos com a auxina picloram em meio de cultura Y3. Outros tipos de calos foram formados como o da Figura 2B, por exemplo, mas, geralmente, esse tipo de calo não formou calo embriogênico.

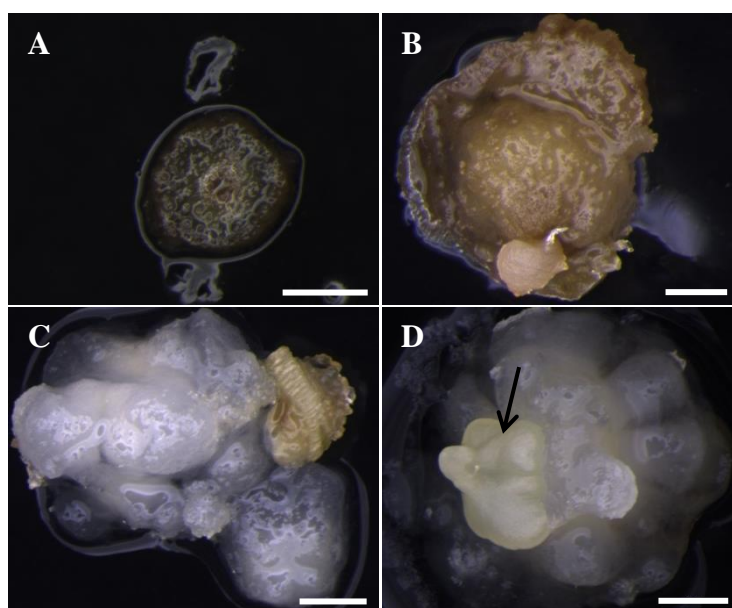


FIGURA 2. Calos primários formados aos 60 dias em meio de indução. (A) Explante sem formação de calo e oxidado. (B) Calo primário formado. (C) Calo mucilaginoso branco. (D) Calo mucilaginoso com estrutura embriogênica amarela e translúcida (seta). Escala: 1 mm (A, C e D) e 500 μm (B).

Aos 60 dias foram observadas estruturas embriogênicas translúcidas, compactas e lisas em calos de alguns tratamentos (Figura 3 A-C) em meio Y3. Com as concentrações de 452,49, 542,99 e 633,48 $\mu\text{M/L}$ de picloram. Ao final da fase de indução aos 180 dias (Figura 3 A2-C2) a formação de calos primários ficou acima de 80% para a maioria dos tratamentos com os tTCLs da região basal, com destaque para os tratamentos com 452,49 $\mu\text{M/L}$ de 2,4-D.

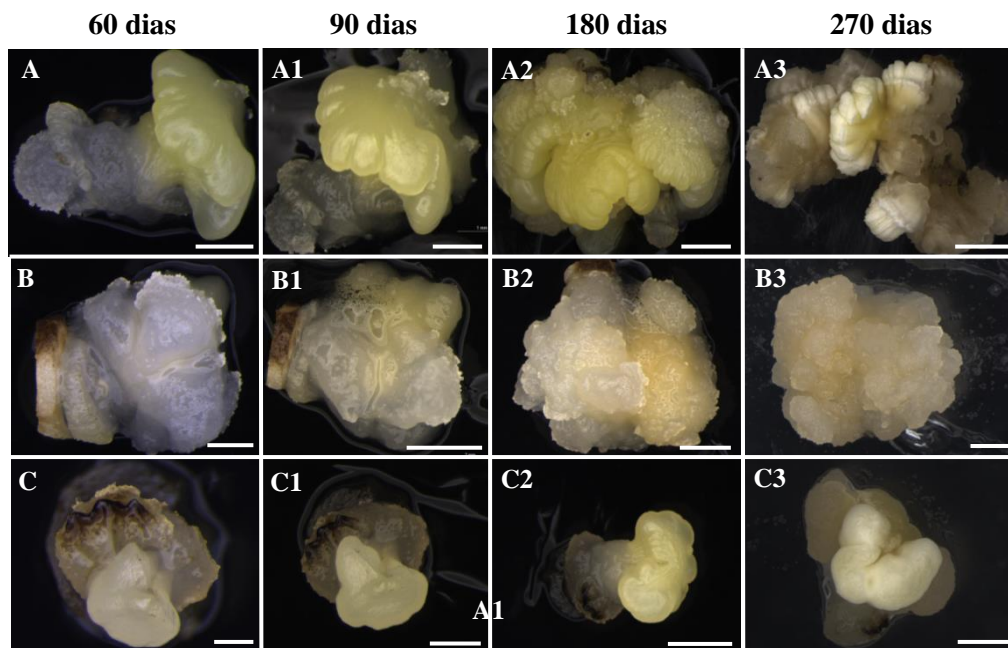


FIGURA 3. Desenvolvimento dos calos embriogênicos (CE) em *Butia odorata* a partir da técnica TCL, em meio Y3, aos 60, 90, 180 e 270 dias. A-A3: formação do CE com 452,49 $\mu\text{M/L}$ de picloram. B-B3: formação do CE com 542,99 $\mu\text{M/L}$ de picloram. C-C3: formação do CE com 633,48 $\mu\text{M/L}$ de picloram. Escala: 500 μm (C), 1 mm (A, A1, B, C1), 2 mm (A2, B1-B3, C2, C3), 5 mm (A3).

Entre as três regiões aclorofiladas das plântulas de *B. odorata* testadas a região basal foi a mais responsiva a indução com picloram em meio Y3 na formação de calo primário e embriogênico (Figura 1) ilustrados na Figura 3. Resultados semelhantes foram observados por Padilha *et al.* (2015), utilizando a técnica TCL para induzir embriogênese somática, verificaram que os tTCLs da região basal aclorofilada das plântulas de *A. aculeata* foram os mais responsivos. Esses autores classificaram os calos formados em três tipos, compacto, nodular e friável. Os mesmos foram obtidos nas concentrações de 150 e 300 $\mu\text{M/L}$ de picloram em meio Y3 com vitaminas de Morel e carvão ativado, os calos nodulares formaram clusters embriogênicos. Scherwinski-Pereira *et al.* (2010) observaram que inicialmente, na fase de indução, os calos apresentavam-se amarelos e translúcidos e aos 65 dias passaram de friáveis para embriogênicos. Período semelhante ao observado neste trabalho onde estruturas com características embriogênicas foram visualizadas (Figura 2D). E, os mesmos autores, concluíram que os TCLs da região basal foram os mais responsivos nas concentrações de 450 $\mu\text{M/L}$ de picloram seguida por 225 $\mu\text{M/L}$ de picloram e 2,4-D em meio de cultura MS com carvão ativado.

Ao contrário da maioria dos protocolos, Monja-Mio & Robert (2013) induziram embriogênese somática direta em TCLs, de plântulas germinadas *in vitro*, de *Agave fourcroydes* com a auxina dicamba em meio de cultura MS apenas com os TCLs da região basal aclorofilada, os segmentos foliares clorofilados testados não responderam. Para tTCLs de plântulas de *B. odorata* não foi observada embriogênese somática direta.

4.3.2 Manutenção e multiplicação dos calos embriogênicos

Apesar das altas taxas de calogênese a formação de calos embriogênicos foi baixa (Figura 4). Os tratamentos que desenvolveram calos embriogênicos foram os induzidos, a partir dos explantes de tTCLs da região basal, em meio MS com 633,48 $\mu\text{M/L}$ de 2,4-D e com picloram (452,49; 542,99 e 633,48 $\mu\text{M/L}$). E em meio Y3 os melhores tratamentos foram com picloram nas três concentrações testadas (T12, T13 e T14). Entre os calos primários formados, a partir dos explantes de tTCLs da região mediana, apenas os tratamentos T13 e T14 desenvolveram calos embriogênicos.

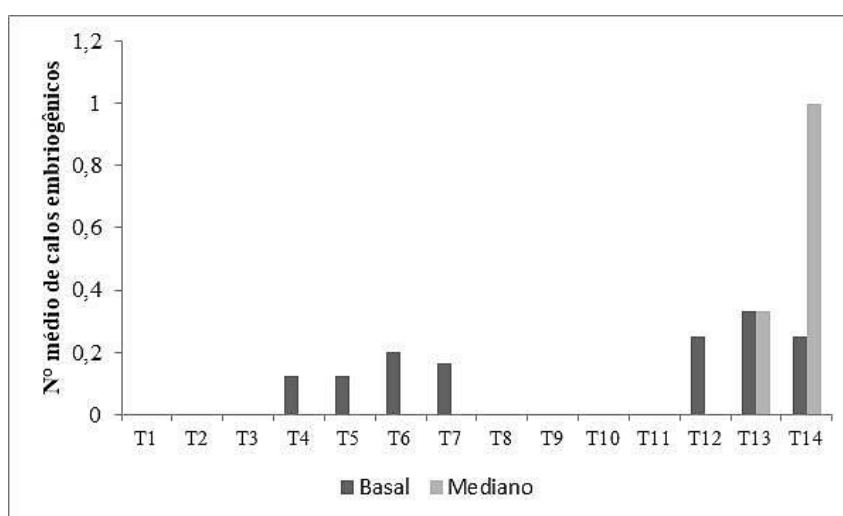


FIGURA 4. Número médio de calos embriogênicos, por calo primário formado em cada tratamento, aos 270 dias. T1: controle do meio MS sem auxina. MS + 2,4-D: T2 (452,49 $\mu\text{M/L}$), T3 (542,99 $\mu\text{M/L}$), T4 (633,48 $\mu\text{M/L}$). MS + picloram: T5 (452,49 $\mu\text{M/L}$), T6 (542,99 $\mu\text{M/L}$), T7 (633,48 $\mu\text{M/L}$). T8: controle do meio Y3 sem auxina. Y3 + 2,4-D: T9 (452,49 $\mu\text{M/L}$), T10 (542,99 $\mu\text{M/L}$), T11 (633,48 $\mu\text{M/L}$). Y3 + picloram: T12 (452,49 $\mu\text{M/L}$), T13 (542,99 $\mu\text{M/L}$), T14 (633,48 $\mu\text{M/L}$).

O tratamento T14 para tTCLs da região mediana apresentou o maior número médio de calos embriogênicos, pois o mesmo formou um calo primário que posteriormente, formou um calo embriogênico.

Após a fase de indução com altas doses de auxina, aos 180 dias, os calos primários e embriogênicos foram transferidos para meios com redução da concentração da auxina. Alguns desses calos já em meio com 40 $\mu\text{M/L}$ de picloram ou de 2,4-D combinado com 25 $\mu\text{M/L}$ BAP começaram a desenvolver zonas com características embriogênicas com estruturas lisas e amarelas. Essas estruturas eram parecidas com as estruturas embriogênicas de *C. nucifera*, *ear-like shape* (formato de orelha) observadas por Sáenz *et al.* (2006). Essas estruturas embriogênicas foram mudando sua morfologia externa até os 180 dias em meio de indução (Figura 3A3). E após 30 dias, foram transferidos para meio de cultura com 20 $\mu\text{M/L}$ de picloram ou de 2,4-D combinado com 25 $\mu\text{M/L}$ BAP. Os calos foram então transferidos para o meio de diferenciação, alguns desses calos já apresentavam estruturas semelhantes a embriões somáticos (Figura 3A2-B2).

A redução da auxina em duas etapas neste experimento foi realizada com o intuito de permitir que os calos primários (menos desenvolvidos ou com uma resposta mais lenta) prosseguissem com o processo de indução e para os calos embriogênicos manterem sua multiplicação. E a adição da citocinina BAP para auxiliar no processo de divisão celular. O desenvolvimento dos calos embriogênicos nas condições relatadas, também foram constatados por Padilha *et al.* (2015), onde a redução da auxina e o uso de BAP ou 2ip estimularam o crescimento e a diferenciação dos calos de *A. aculeata*. Bonetti *et al.* (2016) verificaram que para calos induzidos a partir de TCIs de plântulas *in vitro*, do híbrido BRS Manicoré (*Elaeis guineensis* x *Elaeis oleifera*), não houve necessidade da fase de multiplicação transferindo direto para meio com 100 μM de putrescina no qual os calos embriogênicos e embriões somáticos se desenvolveram.

Em *B. odorata* a indução com a auxina 2,4-D mostrou-se eficiente na formação de calos primários em meio MS e Y3, mas não demonstrou a mesma eficiência na formação de calos embriogênicos. Por outro lado, a indução com a auxina picloram apresentou resultados superiores na indução de calos embriogênicos, principalmente em meio Y3, com a formação de estruturas embriogênicas durante a fase de indução da embriogênese somática.

4.3.3 Diferenciação dos embriões somáticos

Aos 240 dias, todos os calos foram transferidos para um meio de diferenciação e maturação dos embriões somáticos com 0,54 μM de ANA combinado com 12,5 μM de

2ip. Aos 270 dias a maioria desses calos apresentavam-se friáveis amarelos claros quase brancos, alguns calos embriogênicos, compactos e amarelos, com poucas estruturas globulares e calos embriogênicos com estruturas alongadas, de cor branca aparentemente fusionadas (Figura 3A3 e Figura 5A). Estas estruturas, consideradas neste trabalho como embriões somáticos, foram então transferidas para o meio de germinação. Os calos embriogênicos formados no tratamento T4, região apical, não desenvolveram embriões somáticos.

4.3.4 Germinação dos embriões somáticos

Os embriões somáticos originados de calos embriogênicos, Figura 5 são semelhantes aos observadas no trabalho de indução da embriogênese somática a partir de embriões zigóticos de *B. odorata*. Porém, visualmente pareciam estar mais desenvolvidos e aparentemente menos fusionados na região da parte aérea. E apresentaram a mesma característica de uma extremidade esbranquiçada e a outra extremidade amarelada. A coloração verde iniciou logo que os embriões somáticos foram expostos à luz seguida do início de enraizamento.

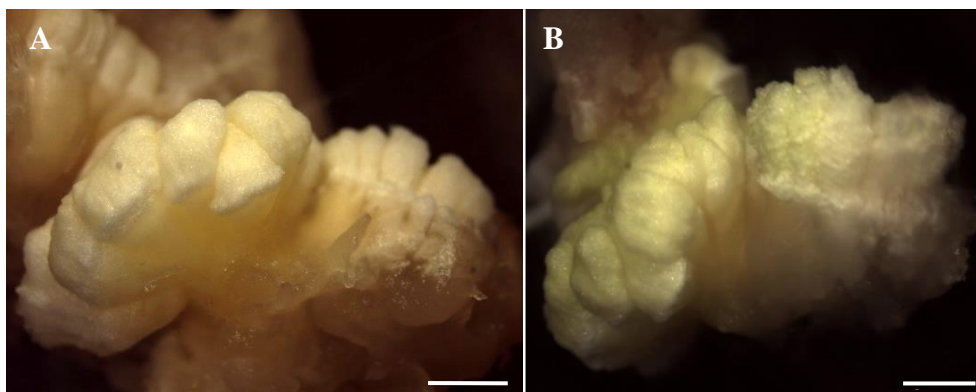


FIGURA 5. Embriões somáticos formados na concentração de 452,49 $\mu\text{M/L}$ de picloram em meio Y3. (A) Detalhes dos embriões somáticos fusionados. (B) Embriões em meio MS sem reguladores de crescimento na luz. Escala: 2 mm (A-B).

A indução de embriões somáticos foi possível pela técnica da TCL, mas a regeneração dos mesmos não foi completa. Inúmeros fatores podem ser citados como possíveis causas na regeneração anormal desses embriões. Padilha *et al.* (2015) utilizaram TCL de plântulas *in vitro* de *A. aculeata* e verificaram a formação de embriões anormais (malformações, epiderme irregular, parênquima solto ou a presença

de compostos fenólicos em células vasculares) que resultaram em uma baixa taxa de conversão 18% dos embriões somáticos em plantas. Independente da fonte de explante a embriogênese somática tem apresentado uma baixa conversão de embriões somáticos em plantas. Provavelmente isso se deve ao tipo de resposta genótipo dependente para expressão dessa rota morfogenética *in vitro*. Segundo Silva *et al.* (2012) o sucesso da embriogênese somática depende do genótipo da espécie. Corrêa *et al.* (2015) analisaram o controle genético das características relacionadas a produção de óleo e ao processo de clonagem, via embriogênese somática, para *E. guineensis* em uma coleção com 32 materiais elite, selecionaram oito genótipos responsivos, mas apenas seis desses genótipos formaram de fato linhagens embriogênicas.

4.3.5 Anatomia

Os cortes anatômicos dos embriões somáticos (Figura 6A-B) transferidos para o meio de germinação mostraram estruturas bem desenvolvidas com parte aérea e polo radicular em contato com o tecido de origem (Figura 6C). A partir da análise dos cortes anatômicos, foi possível visualizar uma protoderme bem definida, sem rupturas, individualizando cada embrião somático, além da presença de células de parênquima de preenchimento. Contudo, em meio de germinação não ocorreu crescimento individual de cada embrião somático, a parte aérea apresentou coloração verde e manteve-se fusionada e o enraizamento foi individual para cada embrião somático, como no trabalho de indução da embriogênese somática a partir de embriões zigóticos de *B. odorata*.

Padilha *et al.* (2015) observaram que embriões somáticos de *A. aculeata* apresentaram protoderme bem formada e alguns apareceram fusionados após 24 semanas. Observaram também alguns embriões somáticos com protoderme descontínua e os poucos embriões somáticos convertidos mostraram uma protoderme e radícula mal formadas e as plântulas não sobreviveram à fase de aclimação. Por outro lado, Scherwinsk-Pereira *et al.* (2010) obtiveram um protocolo completo de embriogênese somática usando TCL, para *E. guineenses*, e as análises anatômicas mostraram semelhanças entre o embrião zigótico e os somáticos obtidos com a presença de protoderme definida, plúmula e procâmbio sem anormalidades relatadas. A histoquímica dos calos embriogênicos revelou ausência de proteínas e presença de grãos de amido.

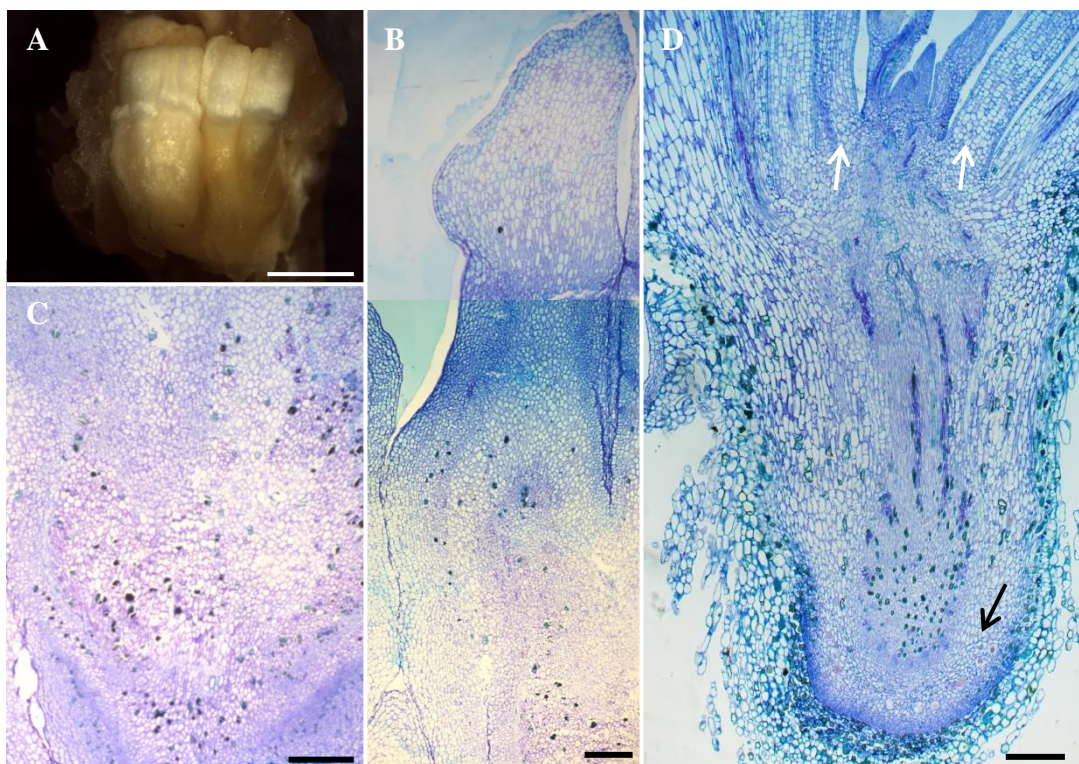


FIGURA 6. Embriões somáticos formados na concentração de 452,49 $\mu\text{M/L}$ de picloram em meio Y3. (A) Detalhes dos embriões somáticos fusionados. (B) Embriões em meio MS sem reguladores de crescimento na luz. Escala: 2 mm (A-B).

4.4. Conclusões

A técnica da camada fina de células (*Thin Cell Layer* – TCL) foi promissora na indução da embriogênese somática a partir de cortes transversais, entre um e dois milímetros de espessura, de plântulas *in vitro* da espécie *Butia odorata*. Apresentou formação de calos embriogênicos e embriões somáticos em meio Y3 com a auxina picloram. A aplicação em conjunto de ambas as técnicas pode tornar-se uma alternativa para a multiplicação *in vitro* da espécie *B. odorata*.

4.5. Referências bibliográficas

BALZON, T. A.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA. New approaches to improve the efficiency of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) from mature zygotic embryos. **In vitro Cellular Development Biology-Plant**, Cambridge, v. 49, p. 41-50, 2013.

BONETTI, K. A. P. et al. Somatic embryogenesis from zygotic embryos and thin cell layers (TCLs) of Brazilian oil palm (*Elaeis guineensis* \times *Elaeis oleifera*). **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 15, n. 37, p. 2028-2037, 2016.

CORRÊA, R. et al. Estimation of genetic parameters for in vitro oil palm characteristics (*Elaeis guineensis* Jacq.) and selection of genotypes for cloning capacity and oil yield. **Industrial Crops and Products**, New York, v. 77, p. 1033–1038, 2015.

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

FKI, L. et al. An optimised protocol for plant regeneration from embryogenic suspension cultures of date palm, *Phoenix dactylifera* L.; cv. Deglet Nour. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 21, p. 517-524, 2003.

FONSECA, L. X. **Caracterização de frutos de butiazeiro (*Butia odorata* Barb. Rodr.) Noblick & Lorenzi e estabilidade de seus compostos bioativos na elaboração e armazenamento de geleias**. 2012. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2012.

GUEDES, R. S. et al. Initial requirements for embryogenic calluses initiation in thin cell layers explants from immature female oil palm inflorescences. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 10, n. 52, p. 10774-10780, 2011.

GUEYE, B. et al. Acquisition of callogenic capacity in date palm leaf tissues in response to 2,4-D treatment. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v. 99, p. 35-45, 2009.

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

MCDOWELL, E. M.; TRUMP, B.F. Histologic fixatives suitable for diagnostic light and electron microscopy. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, Chicago, v. 100, p. 405-414, 1976.

MISTURA, C. C. et al. Descriptors for on-farm conservation and use of *Butia odorata* natural populations. **Plant Genetic Resources: characterization and utilization**, Cambridge, v. 14, n.1, p. 35-40, 2016.

MONJA-MIO, K. M.; ROBERT, M. L. Direct somatic embryogenesis of *Agave fourcroydes* Lem. through thin cell layer culture. **In Vitro Cellular Development Biology - Plant**, Cambridge, v. 49, p.541–549, 2013.

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

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, Wien, n. 59, p. 367-373, 1964.

O'BRIEN, T. P.; MCCULLY, M. E, 1981. In: VENTRELLA, M. C; ALMEIDA, A. L.; NERY, L. A.; COELHO, V. P. M. **Métodos histoquímicos aplicados às sementes**, Viçosa, MG: Ed. UFV, p. 40, 2013.

PADILHA, J. H. D. et al. Somatic embryogenesis in *Acrocomia aculeata* Jacq. (Lodd.) ex Mart using the thin cell layer technique. **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 29, n. 4, p. 516-523, 2015.

RIVAS, M.; BARBIERI, R. L. **Boas práticas de manejo para o extrativismo sustentável do butiá**. Brasília, DF: Embrapa, 2014. 59p.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm using the thin cell layer technique. **In Vitro Cellular and Developmental Biology. Plant**, Cambridge, v. 46, p. 378–385, 2010.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. The assistat software version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. **African Journal Agriculture Research**, [Kenya], v. 11, n. 39, p. 3733-3740, 2016.

SILVA, R. C.; LUIS, Z. L.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Differential responses to somatic embryogenesis of different genotypes of Brazilian oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 111, p. 59-67, 2012.

SILVA, J. A. T.; DOBRANSZKI, J. Plant thin cell layers: update and perspectives. **Folia Horticulturae**, Warsaw, v. 27, n. 2, p. 183-190, 2015.

SOARES, K. P. et al. Palmeiras (Arecaceae) no Rio Grande do Sul, Brasil, **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 65, n. 1, p. 113-139, 2014.

STEINMACHER, D. A. et al. Somatic embryogenesis in peach palm using the thin cell layer technique: induction, morpho-histological aspects and AFLP analysis of somaclonal variation. **Annals of Botany**, Oxford, v. 100, p. 699–709, 2007.

TRAN THANH VAN, M. Direct flower neof ormation from superficial tissue of small explants of *Nicotiana tabacum* L. **Planta**, Berlin, v. 115, p. 87-92, 1973.

TRAN THANH VAN, K. Thin cell layer concept. In: NHUT, D.T. et al. (Ed.). **Thin cell layer culture system: regeneration and transformation application**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2003. p. 1-16.

VIDAL, 1970, Proteínas. In: VENTRELLA, M. C. et al. **Métodos histoquímicos aplicados às sementes**. Viçosa: UFV, 2013. cap.2, p. 18.

VERDEIL, J-L. et al. Plant regeneration from cultured immature inflorescences of coconut (*Cocos nucifera* L.): evidence for somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 13, p. 218–221, 1994.

ZIMMERMAN, J.L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **Plant Cell**, Rockville, v. 5, p. 1411-1423, 1993.

5 CAPÍTULO 3

Ontogênese da formação do calo embriogênico durante a indução da embriogênese somática a partir de embriões zigóticos de *Butia odorata* (Barb. Rodr.) Noblick

RESUMO

Butia odorata (Barb. Rodr.) Noblick nativa da região Sul do Brasil e Uruguai é uma palmeira com grande potencial produtivo e ornamental, seus frutos são consumidos *in natura* ou processados. O modo de produção é extrativista, pois as sementes de *B. odorata* apresentam barreiras germinativas o que tem dificultado a produção de mudas. A embriogênese somática é uma alternativa na produção de mudas, mas apesar de ser uma técnica aplicada em palmeiras de importância econômica, ainda existem lacunas no seu processo que não foram elucidadas. Análises anatômicas e histoquímicas são ferramentas que auxiliam na melhoria dos protocolos de indução que ainda são feitos de forma empírica, principalmente com espécies que não apresentam relatos anteriores. Por isso, o objetivo deste trabalho foi acompanhar as principais mudanças durante o processo da embriogênese somática em *B. odorata*. Para isso calos foram induzidos a partir de embriões zigóticos maduros em meio MS e Y3 com as auxinas 2,4-D e picloram. A anatomia revelou que os processos celulares que ocorrem durante a embriogênese somática de *B. odorata* são os mesmos já descritos para a maioria das espécies. Em relação à origem do meio e a auxina usados na indução não houve diferenças na anatomia dos calos, mas foram verificadas diferenças na morfologia externa. A origem do embrião somático é multicelular, embora também tenha sido verificada origem unicelular em menor incidência. A presença de compostos fenólicos foi alta e próxima às células embriogênicas e proembriões. Os embriões globulares apresentaram protoderme definida e acúmulo de amido. Contudo, os embriões somáticos obtidos apresentaram cotilédones fusionados o que impossibilitou seu total desenvolvimento em plântula.

Palavras-chave: Butiá, embrião somático, picloram, auxina, anatomia.

ABSTRACT

Butia odorata (Barb. Rodr.) Noblick native of the Southern region of Brazil and Uruguay is a palm tree with great productive and ornamental potential, its fruits are consumed *in natura* or processed. The mode of production is extractive, because the seeds of *B. odorata* present germination barriers, which has made the production of seedlings difficult. Somatic embryogenesis is an alternative in the production of seedlings, but despite being a technique applied in palms of economic importance, there are still gaps in the process that were not elucidated. Anatomical and histochemical analyses are tools that assist in improving induction protocols that are still done empirically, especially with species that do not have early reports. Therefore, the objective of this work was to follow the main changes during the process of somatic embryogenesis in *B. odorata*. For these calluses were induced from mature zygotic embryos in MS and Y3 medium with 2,4-D and picloram auxins. The anatomy revealed that the cellular processes that occur during somatic embryogenesis of *B. odorata* are the same as described above for most species. In relation the origin of the medium and the auxin used in induction there were no differences between callus anatomy, morphological differences were verified. The origin of the somatic embryo is multicellular, although was also checked unicellular origin in a lower incidence. The presence of phenolic compounds was high and close to the embryogenic cells and proembryos. The globular embryos showed definite protoderm and accumulation of starch. However, the somatic embryos obtained showed a fused cotyledons, which prevented their full development in the seedling.

Keywords: pindo palm, somatic embryo, picloram, auxin, anatomy.

5.1 Introdução

Butia odorata é uma monocotiledônea da família Arecaceae nativa da região sul do Brasil e sudeste do Uruguai (Soares *et al.*, 2014), conhecida como butiazeiro. Apresenta potencial econômico, porém sua exploração é extrativista, devido às dificuldades na produção de mudas (Rivas & Barbieri, 2014), pois não é uma espécie domesticada. O entrave na produção de mudas é devido ao tipo de propagação exclusivo por sementes e principalmente pela sua dormência. A germinação das sementes de *B. odorata* é lenta e desuniforme, além disso, forma populações heterogêneas, que é importante para conservação e variabilidade genética, mas não é de interesse comercial, onde se objetiva plantas com características homogêneas.

Alguns trabalhos investigaram e encontraram alternativas para superar a dormência e otimizar a germinação das sementes de *B. odorata* para produção de mudas (Fior *et al.*, 2011; Schlindwein *et al.*, 2013). Além disso, técnicas do cultivo *in vitro* também podem ajudar nesta etapa de produção, seja com fins comerciais ou para conservação do germoplasma da espécie. Dentre as técnicas *in vitro* podemos citar a embriogênese somática como uma ferramenta potencial para produção de mudas de palmeiras. De acordo com Quiroz-Figueroa *et al.* (2006) a embriogênese somática é um processo no qual as células somáticas, em condições de indução *in vitro*, geram tecidos com características embriogênicas, que passam por uma série de alterações morfológicas e bioquímicas resultando na formação de embriões somáticos. Apesar de ser uma técnica não elucidada totalmente, apresenta bons resultados na clonagem e produção de plantas de diversas espécies, com destaque para palmeiras de interesse econômico como o coqueiro (*Cocos nucifera*) (Sáenz *et al.*, 2010), a tamareira (*Phoenix dactylifera*) (Sané *et al.*, 2006) e o dendezeiro (*Elaeis guineenses*) (Gomes *et al.*, 2016).

Informações relacionadas à anatomia e à histoquímica da calogênese na embriogênese somática indireta têm sido discutidas há décadas. Em palmeiras, existem relatos para diversas espécies, como *C. nucifera* (Chan *et al.*, 1998), *Euterpe edulis* (Guerra & Handro, 1998), *P. dactylifera* (Sané *et al.*, 2006), *Bactris gasipaes* (Steinmacher *et al.*, 2007) e *E. guineensis* (Silva *et al.*, 2014). Nesses trabalhos são citadas e descritas características morfológicas e celulares que são empregadas na identificação e classificação de calos embriogênicos. Conceitos a nível celular como a classificação de célula competente, célula meristemática, célula embriogênica tem sido

aplicados com base nas observações anatômicas e testes histoquímicos realizados em pesquisas sobre embriogênese somática.

A análise anatômica envolve o emprego de diversas técnicas que permitem detalhar os eventos que ocorrem quando espécies vegetais são cultivadas *in vitro*. Desta forma, é possível, por exemplo, conhecer e acompanhar o desenvolvimento do material vegetal durante a indução da embriogênese somática. Além disso, a capacidade de uma célula ou grupo de células de tornar-se embriogênicas também depende do seu estado fisiológico e de diferenciação. Nesse sentido, alterações histológicas associadas com a posição e a atividade das células competentes têm sido bastante estudadas durante a embriogênese somática (Rodrigues *et al.*, 2004; Gueye *et al.*, 2009). Deste modo, é possível acompanhar os eventos de divisão celular, monitorar o acúmulo ou a degradação de reservas nos tecidos e células a fim de entender o processo morfogênico *in vitro*.

O estudo do desenvolvimento de células ou grupos de células por técnicas histológicas tem se mostrado útil para o entendimento da embriogênese somática em várias espécies vegetais. Por exemplo, em *Acrocomia aculeata*, Moura *et al.* (2008) verificaram que a embriogênese somática, a partir de embriões zigóticos, originava-se de células do procâmbio ou de células perivasculares, que proliferavam produzindo massas meristemáticas em meio de indução. Outro exemplo da importância das análises anatômicas foi em relação à identificação da origem dos calos a partir da plúmula de embriões zigóticos maduros de *C. nucifera* otimizando o protocolo de embriogênese somática (Chan *et al.*, 1998).

O objetivo desse trabalho foi estudar o processo de formação do calo primário, calo embriogênico e embriões somáticos a nível celular com análises anatômicas e histoquímicas. Para obter informações de como as células do explante são estimuladas e como as mesmas respondem no espaço e tempo de exposição às auxinas utilizadas como agentes de estresse.

5.2 Material e métodos

5.2.1 Material vegetal e esterilização

Foram coletados frutos maduros em uma população natural de polinização aberta de *Butia odorata* no município de Barão do Triunfo, RS. Esses foram lavados, despolpados e o endocarpo quebrado com auxílio de um torno de bancada para isolar as

sementes e posterior extração asséptica dos embriões zigóticos utilizados como explante neste trabalho. As sementes foram desinfestadas em etanol 70% por um minuto e hipoclorito de sódio 2,5% por dez minutos. A seguir, na câmara de fluxo de ar laminar estéril, as sementes foram enxaguadas três vezes com água deionizada autoclavada. Os embriões foram retirados das sementes, com auxílio de bisturi e pinça, e dispostos em placas de Petri com aproximadamente 25 mL de meio. As placas foram levadas para sala de crescimento com temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e mantidas no escuro. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos II da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, localizado em Brasília, DF.

5.2.2 Meio de cultura

Foram utilizados dois meios de cultura, um contendo os sais do meio MS (Murashige & Skoog, 1962) e o segundo os sais do Y3 (Eeuwens, 1976). Em ambos os meios foram adicionados ferro EDTA e vitaminas do MS, glutamina (200 mg/L), asparagina (100 mg/L), arginina (100 mg/L), sacarose (30 g/L) e carvão ativado (2,0 g/L). Antes da autoclavagem o pH foi corrigido para 5,8. Após o ajuste de pH foi acrescentado Phytigel (Sigma) (2,3 g/L). Os meios foram autoclavados a 121°C e 1,3 atm de pressão, por 20 minutos.

Na fase de indução à embriogênese somática foram utilizados os meios de cultura MS ou Y3 combinados com as auxinas, ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) ou picloram, em quatro concentrações (2,4-D: 361,99; 452,49; 542,99 e 633,48 $\mu\text{M/L}$ e picloram: 50, 150, 300 e 450 $\mu\text{M/L}$). Os explantes permaneceram 180 dias no meio de indução com um subcultivo aos 90 dias. Na fase seguinte, pós-indução, manteve-se os meios de cultura MS e Y3 e foram adicionadas, a auxina picloram na concentração de 20 $\mu\text{M/L}$, e a citocinina 2 isopenteniladenina (2ip) (10 $\mu\text{M/L}$). Os calos permaneceram neste meio até o surgimento de estruturas embriogênicas, quando necessário o subcultivo para o mesmo meio foi realizado a cada três meses. Calos com estruturas embriogênicas foram transferidos para o meio de cultura com ácido naftalenoacético (ANA) 0,54 $\mu\text{M/L}$ combinado com 2ip, 12,3 $\mu\text{M/L}$ sem adição de carvão ativado.

Para regenerar os embriões somáticos formados foi utilizado o meio MS sem adição de reguladores de crescimento. Com acréscimo de glutamina (200 mg/L), asparagina (100 mg/L), arginina (100 mg/L), sacarose (30 g/L) e carvão ativado (2,0

g/L) e mantidos na luz, fotoperíodo de 16 horas com intensidade luminosa de 30 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas do tipo LED.

5.2.3 Anatomia, histoquímica e morfologia externa dos calos

Foram feitas amostragens dos calos em todos os tratamentos aos 5, 25, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135, 150 e 270 dias. As amostras foram então fixadas em glutaraldeído 1% e formaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2 (McDowell & Trump, 1976), desidratadas em série alcoólica crescente (10-100°Gl). Após as amostras foram infiltradas e emblocadas com metacrilato (Historesina Leica) de acordo com as recomendações do fabricante. O material foi cortado em micrótomo de rotação Leica (DM 2125RT) com espessura de 3 a 5 micrometros. Para anatomia foi utilizado o corante azul de toluidina 0,5% (O'Brien *et al.*, 1964) e para histoquímica o reagente Lugol para detectar amido (Johansen, 1940), os corantes ácido periódico-Schiff (PAS) para carboidratos neutros (O'Brien & McCully, 1981) e Xylidine Posseau (XP) para proteínas (Vidal, 1970). As lâminas foram montadas em Entelan, os cortes anatômicos foram analisados e registrados em microscópio óptico Leica (DM 750) com câmera acoplada Leica (ICC50 HD).

As fotomicrografias da morfologia externa, dos mesmos calos amostrados para anatomia e histoquímica, foram registradas com estereomicroscópio Leica (M205FA) com câmera acoplada Leica (DFC310FX).

5.3 Resultados e discussão

Este estudo apresenta a comparação de características morfológicas e anatômicas durante a formação de calos primários, embriogênicos, proembriões e embriões somáticos. A embriogênese somática foi induzida em embriões zigóticos de *B. odorata* e, de modo geral, as análises histológicas não mostraram diferenças celulares nos tecidos de calos oriundos do meio MS ou Y3 combinados com picloram ou 2,4-D, mas morfológicamente ocorreram pequenas diferenças como tamanho e aspecto do calo formado. O embrião zigótico de *B. odorata* (Figura 1A), utilizado como explante para indução, é pequeno, de coloração branca e pode ser dividido em duas regiões: região proximal (onde se encontra a plúmula) e região distal (pecíolo cotiledonar e haustório) (Figura 1B). Durante a primeira semana, após a inoculação, aos cinco dias, em todos os tratamentos, foi possível observar mudanças na morfologia externa. Então foi possível

perceber um padrão nessa mudança inicial: os embriões zigóticos intumesceram, alongaram, e na região distal iniciou-se uma leve estriação e a região proximal apresentou uma coloração amarela mais intensa (Figura 1C, D e E). Essas características foram observadas até os 30 dias quando a maioria dos calos primários começou a apresentar morfologias diferentes entre e dentro dos tratamentos.

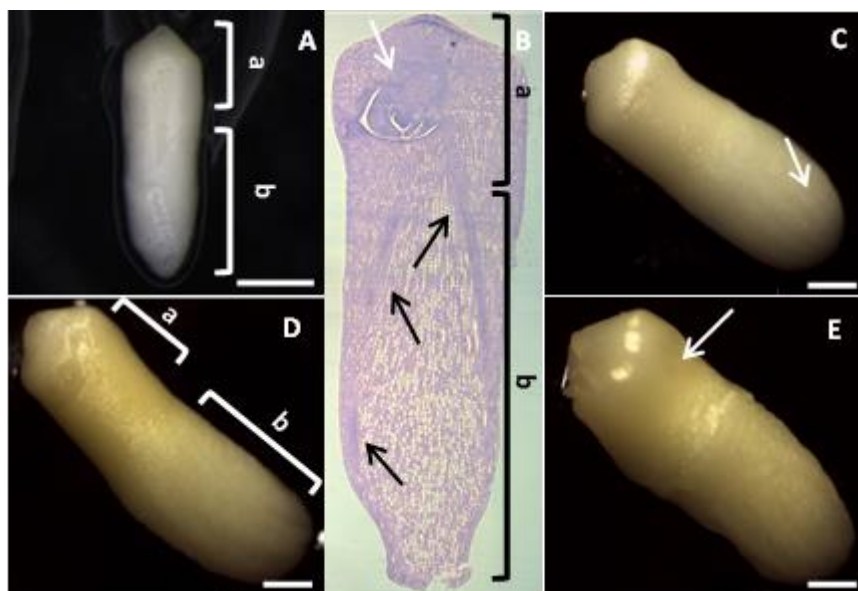


FIGURA 1. Mudanças morfológicas do embrião zigótico (EZ) durante os primeiros 10 dias em meio de indução. (A) EZ no momento da inoculação. (B) Anatomia do EZ, plúmula (seta branca) e feixes vasculares (setas pretas). (C) EZ aos cinco dias em meio de indução com estrias (seta branca). (D) EZ aos sete dias em meio de indução. (E) EZ aos 10 dias em meio de indução região proximal com cor amarelo intenso. (a) região proximal e (b) região distal. Escala: 1 mm (A), 200µm (B) e 0,5 mm (C, D e E).

Nos cortes anatômicos dos embriões zigóticos, aos cinco dias em meio de indução, foi observada a proliferação de células meristemáticas e embriogênicas ao longo de todo o explante (Figura 2A), principalmente, próximo à epiderme (Figura 2B e E), subepiderme (Figura 2C e F) e ao procâmbio (Figura 2D e G), locais de maior concentração das células responsivas à indução, caracterizadas pela intensa coloração do citoplasma, pelo formato esférico das células e com núcleo e nucléolo evidentes (Figura 2A). Silva *et al.* (2014) notaram, aos 14 dias, intensa divisão celular na região proximal do embrião zigótico de *E. guineenses* concluindo ser a região mais responsiva à indução. Já Guerra & Handro (1998) constataram que os processos embriogênicos foram induzidos por células do pecíolo cotiledonar de embriões zigóticos de *E. edulis*.

Moura *et al.* (2008) verificaram a presença de grupos isolados de células na protoderme e próximo da plúmula de *A. aculeata*, mas esses possíveis proembriões não se desenvolveram, apenas quando foram induzidos pela embriogênese secundária. Sané *et al.* (2006) induziram explantes foliares de *P. dactylifera*, cultivada *in vitro*, e observaram as primeiras divisões celulares, durante a embriogênese somática, em células adjacentes ao tecido vascular.

As células responsivas apresentaram características de células embriogênicas, formato arredondado, parede espessa, citoplasma denso, núcleo e nucléolo evidentes e vacúolo fragmentado ou ausente (Figura 2E-F). Essas características observadas são as mesmas descritas por Vasil & Vasil (1981) e Verdeil *et al.* (2001) e têm sido utilizadas para classificação e identificação de células responsivas em estudos anatômicos da embriogênese somática. Este mesmos autores observaram a formação de um tecido compacto composto de células pequenas, ricas em citoplasma e contendo amido. E então concluíram que, essas células diferenciadas e que atingiram a competência embriogênica durante os estágios iniciais da cultura (fase de indução), poderiam ser perpetuadas por subculturas (fase de multiplicação), dando origem a embriões somáticos e estes convertidos em plantas.

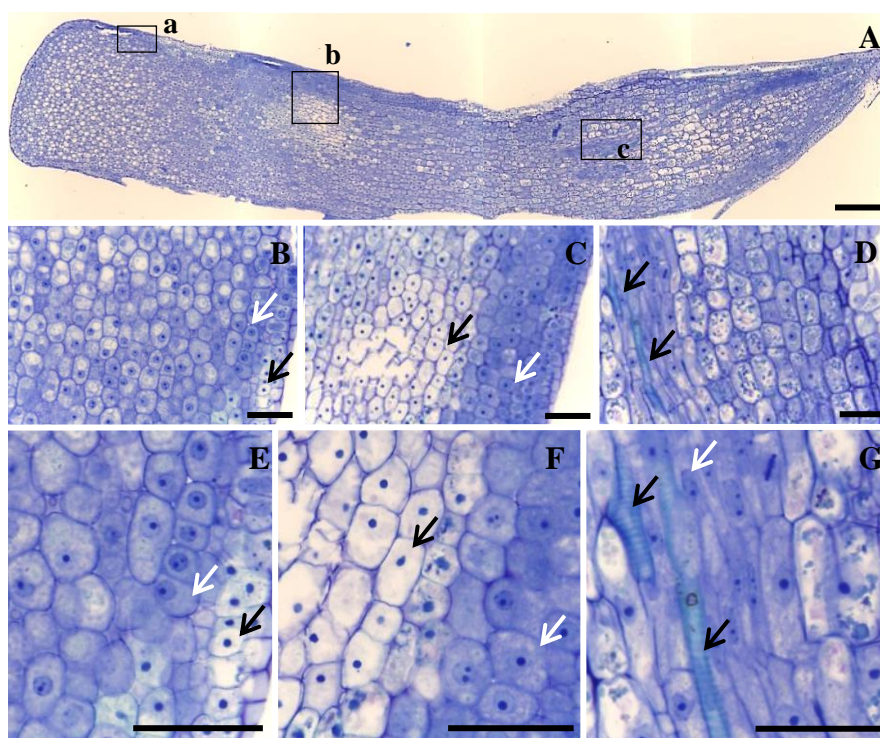


FIGURA 2. Anatomia do embrião zigótico aos cinco dias em meio de indução MS com 361,99 $\mu\text{M/L}$ de 2,4-D. (A) Vista geral do embrião zigótico. (B e E) Em a: protoderme com células embriogênicas (seta branca) e células do explante não responsivas (seta preta). (C e F) Em b: células não responsivas no centro (seta preta) e células embriogênicas na protoderme (seta branca). (D e G) Em c: região do feixe vascular com elementos de vaso (seta preta) e células responsivas (seta branca). Escala: 500 μm (A), 200 μm (B-D), 50 μm (E-F).

Também foi possível comparar, aos cinco dias, células com competência embriogênica com células não responsivas, do embrião zigótico, com núcleo pequeno, nucléolo não visível e citoplasma pouco denso (Figura 2E-F). Esse fato infere que essa mudança na morfologia celular pode ser um sinal de aquisição de competência embriogênica. As células embriogênicas competentes podem ser descritas como células isodiamétricas, pequenas e densamente citoplasmáticas (Fehér *et al.*, 2003).

Um panorama geral das mudanças morfológicas externas nos calos primários pode ser visualizado, na Figura 3, durante os 180 dias no meio de indução. A maioria dos calos apresentou estruturas lisas e translúcidas, nodulação e coloração amarela. Estas características podem ser consideradas como indicativas de calos com células meristemáticas e embriogênicas, pois são características marcantes nos calos de *B. odorata*, que formaram embriões somáticos. No entanto, segundo Pádua *et al.* (2013) a análise anatômica é muito importante para verificar o tipo de resposta obtida a nível celular, e relacionar os dados da análise anatômica com as características morfológicas observadas nos calos, como coloração, textura e consistência. Essa relação entre anatomia e morfologia podem auxiliar na classificação visual de calos embriogênicos e não embriogênicos.

Neste trabalho uma possível correlação foi observada em relação à anatomia e a morfologia dos calos formados. Geralmente calos amarelos, com estruturas translúcidas lisas ou apenas nodulares, demonstrados na Figura 3, apresentaram células em alta divisão celular, formando centros meristemáticos, principalmente nas concentrações acima de 300 $\mu\text{M/L}$ de ambas as auxinas, 2,4-D e picloram.

Em concentrações abaixo de 150 $\mu\text{M/L}$ das auxinas, e em alguns calos, o desenvolvimento da folha (Figura 3E1) e do haustório (Figura 3E1 e F2) foram observados, e também a germinação do embrião zigótico com folha e radícula formadas (Figura 3A1) foram visualizadas.

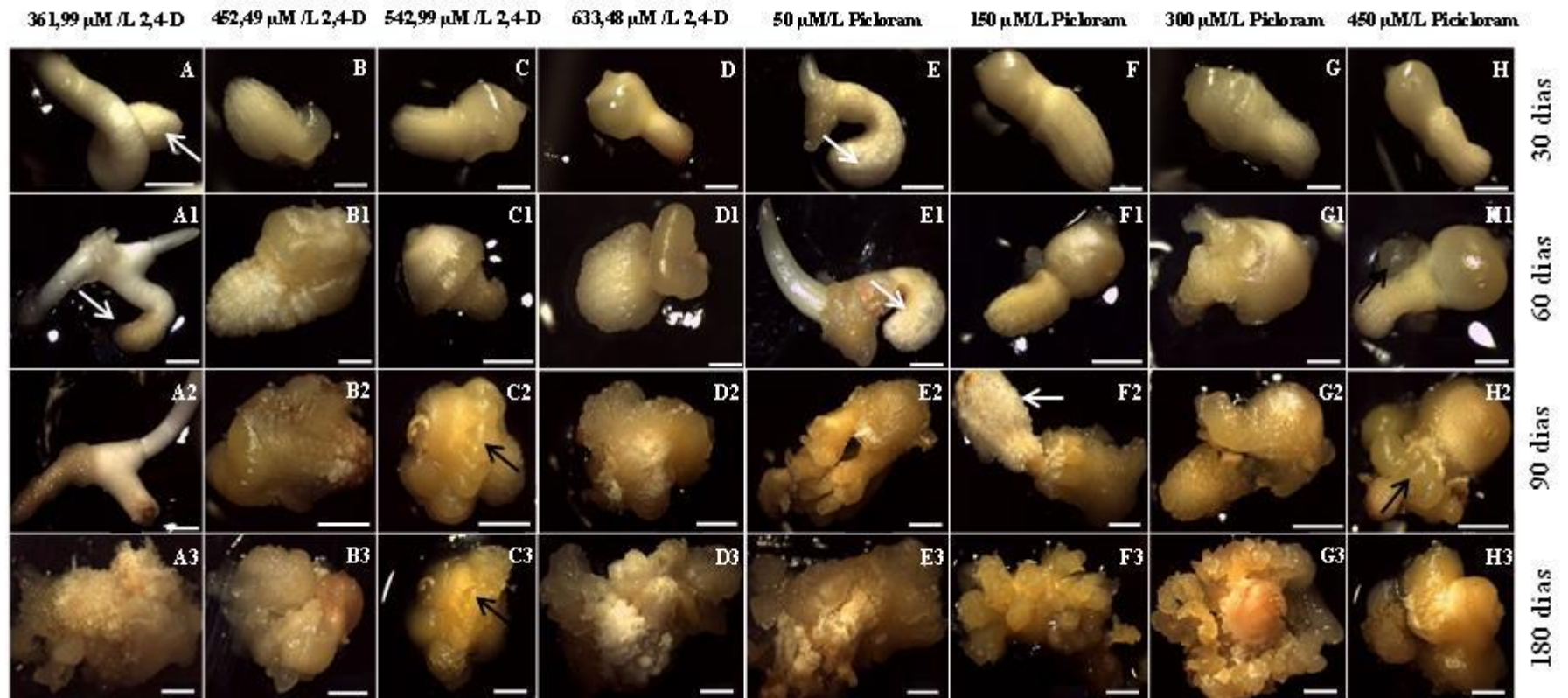


FIGURA 3. Imagens dos calos primários formados aos 30, 60, 90 e 180 dias (na linha) em meio MS nas concentrações de 2,4-D (361,99; 452,49; 542,99 e 633,48 $\mu\text{M/L}$) e picloran (50, 150 300 e 450 $\mu\text{M/L}$) na coluna. Setas brancas indicam estruturas embriogênicas. Setas pretas mostram desenvolvimento parcial do haustório. Escala: 1mm (B-B1; C-C1; D-D1; E-E1; F; G-G1; H-H1) e 2 mm(A-A3; B2-B3; C2-C3; D2-D3; E2-E3; F1-F3; G2-G3; H2-H3).

Alguns calos, aos 25 dias, já não apresentavam mais características morfológicas do explante inicial (embrião zigótico), originando assim o calo primário (Figura 4A). Estes calos anatomicamente podem ser classificados com potencial embriogênico, pois a presença de células meristemáticas e embriogênicas eram predominantes em sua totalidade como demonstrado na Figura 4B, onde as áreas coradas com azul mais intenso indicam que as células estão em alta atividade de divisão celular. Os cortes anatômicos corados com azul de toluidina possibilitaram a visualização de células com características meristemáticas próximas aos feixes vasculares (Figura 4E). Também foi verificada a presença de alguns proembriões (Figura 4F) na região próxima aos feixes e a região meristemática.

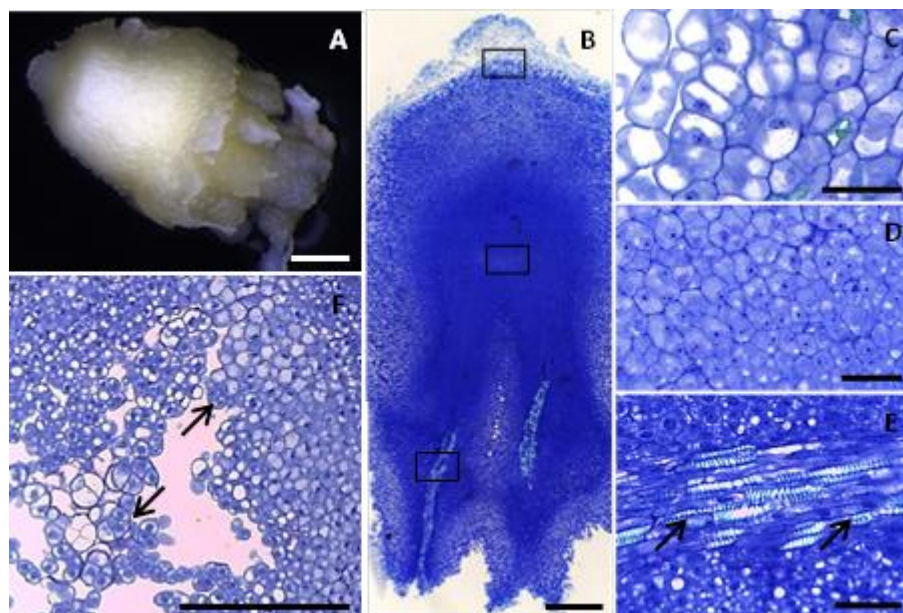


FIGURA 4. Morfologia e anatomia de calo primário aos 25 dias em meio Y3 com 633,48 $\mu\text{M/L}$ de 2,4-D. (A) Morfologia calo primário. (B) Corte anatômico do calo primário (A). (C) Células vacuoladas na região apical do calo primário. (D) Células embriogênicas na região próxima à plúmula. (E) Células meristemáticas e embriogênicas próximas ao feixe vascular (setas), região distal. (F) Detalhe dos proembriões mais isolados do tecido. Escala: 1 mm (A), 500 μm (B), 200 μm (C-F).

Aos 45 dias, em meio de indução MS com 300 $\mu\text{M/L}$ de picloram, alguns calos apresentaram estruturas translúcidas (Figura 5A). Estruturas semelhantes a essas foram descritas, também aos 45 dias, em calos de *C. nucifera* (Sáenz *et al.*, 2006). Os cortes anatômicos mostraram que essas estruturas translúcidas apresentavam uma protoderme definida (Figura 5D) e uma fusão da sua base com o tecido do calo do qual se

originaram (Figura 5B-C) sem a presença de feixes vasculares entre o calo e as estruturas embriogênicas diferenciando da organogênese, que apresenta essa ligação entre o órgão formado e o calo. A característica de protoderme definida é utilizada na descrição de embriões somáticos.

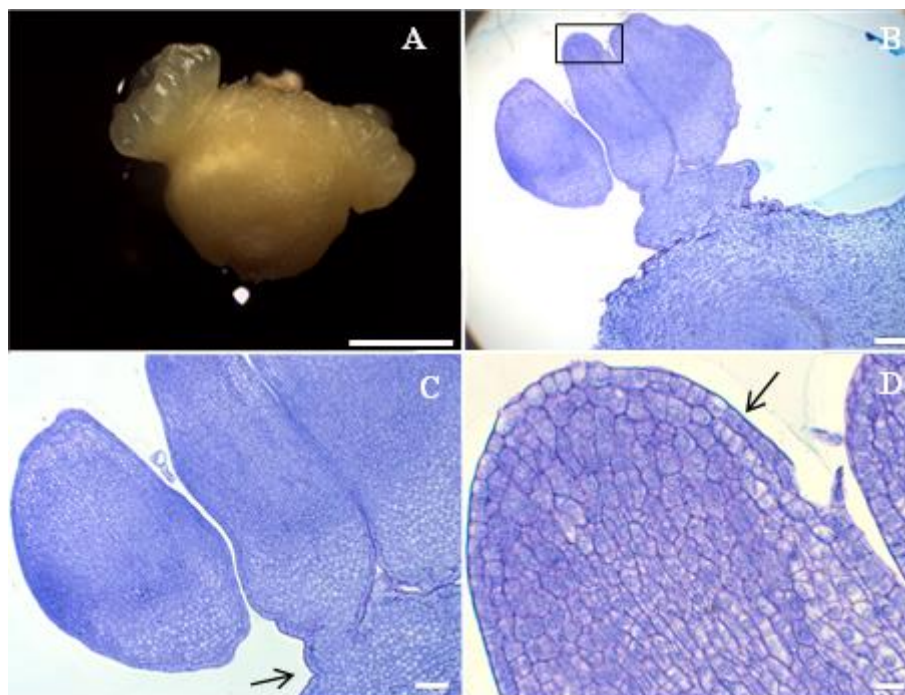


FIGURA 5. Calo embriogênico aos 45 dias em meio de indução. (A) Calo embriogênico com estruturas translúcidas em meio de indução MS com 300 μ M de picloram. (B) Corte anatômico do calo em A. (C) Detalhe do embrião fusionado ao tecido de origem (seta). (D) Detalhe da protoderme (seta) em B. Escala: 2 mm (A), 200 μ m (B), 100 μ m (C) e 20 μ m (D).

A presença de uma protoderme definida é uma das características identificada na análise de embriões somáticos, além da presença de plúmula e procâmbio (Steinmacher *et al.*, 2007; Moura *et al.*, 2009; Balzon *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2014). Para as espécies *C. nucifera* (Pérez-Núñez *et al.*, 2006) e *A. aculeata* (Moura *et al.*, 2009) os embriões somáticos ou estruturas embriogênicas translúcidas obtidos foram transferidos novamente para meio de indução formando novos embriões somáticos, denominados secundários. Esse processo caracteriza a embriogênese secundária e aplica-se quando embriões somáticos obtidos durante a primeira indução apresentam anormalidades morfológicas e na conversão em plântulas.

Aos 60 dias, a maioria dos calos primários apresentava zonas com coloração mais intensa formando faixas de células pequenas (Figura 6A) e intensa divisão celular. Essas zonas são classificadas como regiões meristemáticas (Figura 6C) e também foram identificadas em outros trabalhos de indução à embriogênese somática em embriões zigóticos de palmeiras como *B. gasipaes* (Steinmacher *et al.* 2007), *A. aculeata* (Moura *et al.*, 2008) e *E. oleracea* (Scherwinski-Pereira *et al.*, 2012). Sané *et al.* (2006) também verificaram a formação de calos primários em *P. dactylifera* após dois meses de cultivo em meio Y3.

A coloração com PAS para polissacarídeos totais detectou a presença de grãos de amido (Figura 6B e D) visualizados em células dispostas em toda a região periférica do calo, algumas destas células apresentavam formato arredondado (Figura 6B) e as demais células estavam próximas às faixas de células meristemáticas (Figura 6D). As células coradas com XP não apresentaram a presença de corpos proteicos (Figura 6F).

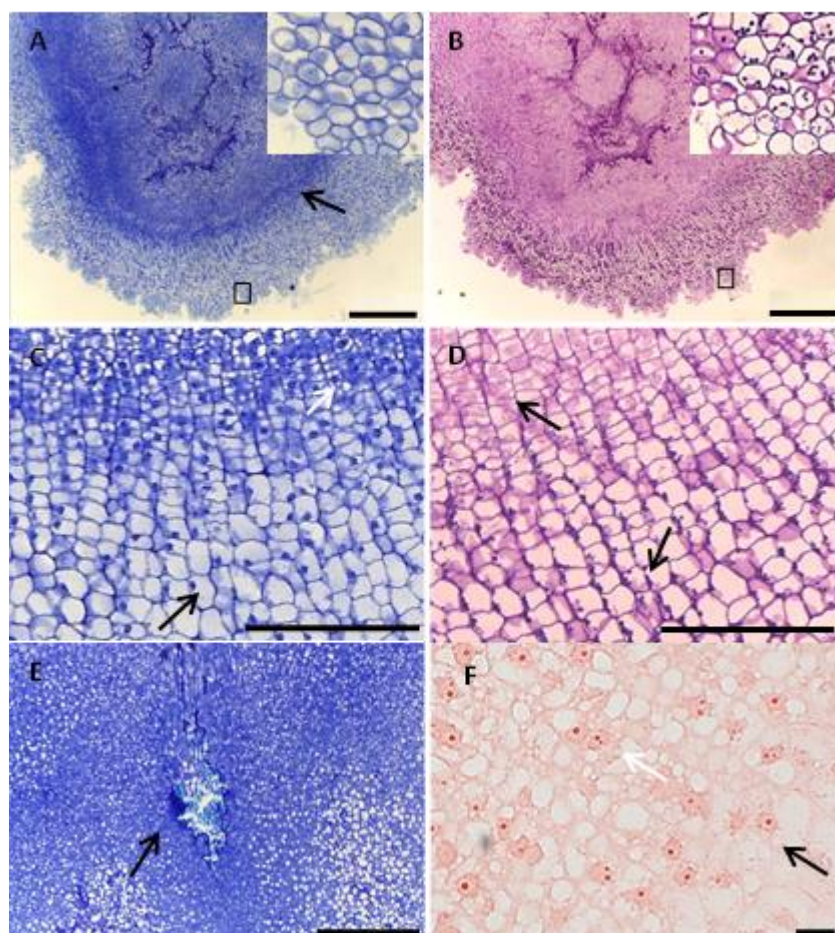


FIGURA 6. Cortes anatômicos de calo embriogênico aos 60 dias em meio Y3 com 450 µM/L de picloram. (A) Faixa de células meristemáticas abaixo da periferia do calo (seta). (B) Região corada com PAS, detalhe células com grãos de amido. (C) Cordões de células meristemáticas (seta branca) e células da periferia do calo. (D) Região corada com PAS, apenas células da periferia do calo com grãos de amido (seta preta). (E) Região central do calo, com feixe vascular e células embriogênicas em seu entorno. (F) Células coradas com XP sem proteínas. Escala: 500 µm (A-B), 200 µm (C-E), 20 µm (F).

Aos 90 dias, as características externas dos calos primários mostraram-se variáveis, a maioria dos calos apresentava cor amarela e textura compacta (Figura 7A), alguns calos tornaram-se friáveis com coloração esbranquiçada, outros ficaram mucilaginosos e marrons e a presença de raízes em alguns desses calos foi observada. Calos que apresentam a formação de raízes podem ser classificados como organogênicos e provavelmente perderam sua capacidade de formar embriões somáticos. A presença de células embriogênicas foi maior a partir dos 90 dias e essas células já apresentavam sinais de formação de clusters embriogênicos, ou seja, isolamento e agrupamento de algumas células embriogênicas, verificada pela coloração roxa devido ao extravasamento do conteúdo de células rompidas. Característica comum, visualizada nos cortes anatômicos (Figura 7B-C), foi o padrão de formação das camadas de células entre a região periférica do calo e a região central. Geralmente a camada mais externa do calo (periferia) era constituída por células maiores, vacuoladas e com grãos de amido (Figura 6B). Logo abaixo, surgiam as faixas de tecido formado por células meristemáticas organizadas em fileiras, formando os cordões meristemáticos (Figura 7C). Verdeil *et al.* (2001) verificaram, em calos de *C. nucifera*, que a zona meristemática encontrava-se na região periférica do calo primário, enquanto nas regiões mais internas foram observadas células parenquimáticas vacuoladas. Nas análises poucas células vacuoladas foram observadas na região interna dos calos primários. Essas células eram encontradas com maior frequência na zona periférica dos calos primários (Figura 6).

Abaixo dessa faixa meristemática, região mais interna do calo, surgiam células com características embriogênicas, sem uma organização espacial, como as meristemáticas. Essas células embriogênicas estavam sempre próximas aos feixes vasculares e, em alguns calos, nessa região foram visualizados compostos fenólicos.

Essas observações foram feitas, mais ou menos, até os 105 dias em meio de indução. Após esse período, os calos aumentavam seu tamanho até seu rompimento e na base destes surgiam novos calos em contato com o meio de cultura. Foi possível visualizar o isolamento das células embriogênicas, pela presença de uma parede mais espessa e pela coloração arroxeadada (Figura 7D) o que pode ser indicativo do extravasamento do conteúdo celular de outras células e tecido degradados.

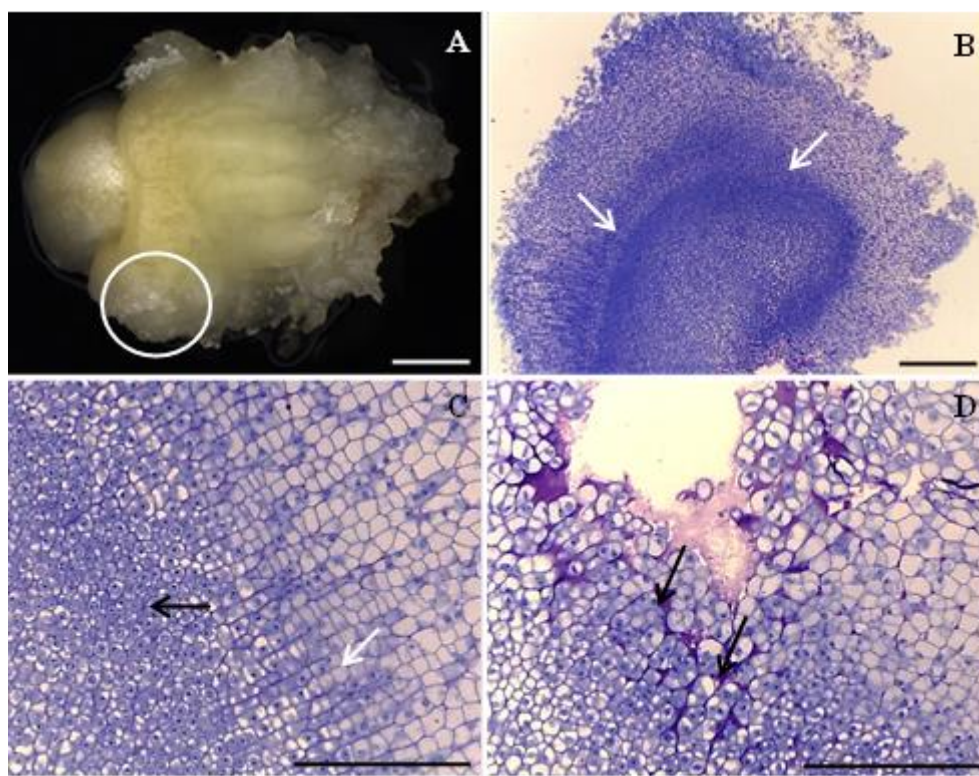


FIGURA 7. Calo embriogênico aos 90 dias em meio de indução Y3 com 450 $\mu\text{M/L}$ de picloram. (A) Morfologia do calo embriogênico. (B) Anatomia da área com círculo branco em A, zonas meristemáticas organizadas no interior do calo (setas), células vacuoladas na periferia. (C) Detalhes das células da periferia do calo, cordões meristemáticos logo abaixo (seta branca) e células embriogênicas ao centro (seta preta). (D) Células embriogênicas isoladas pela exsudação da parede primária (setas). Escala: 2 mm (A), 500 μm (B), 200 μm (C-D).

As observações realizadas após os 105 dias mostraram que os calos embriogênicos de *B. odorata* apresentavam em sua morfologia externa, principalmente os induzidos com picloram em meio Y3, crescimento e formação de novos calos, com textura friável (Figura 8A), na sua base em contato com o meio de cultura. O corte anatômico da região em destaque na Figura 8A revelou a presença de vários centros meristemáticos (Figura 8B). E a formação de proembriões, com espessamento da parede, foi verificada na região periférica do calo embriogênico (Figura 8C-D). Para *Euterpe oleracea*, Scherwinski-Pereira *et al.* (2012) constataram que a formação dos embriões somáticos iniciou-se com a proliferação de células meristemáticas da região periférica do calo pela via multicelular.

Ho & Vasil (1983) classificaram estes centros meristemáticos como embrióides (embriões somáticos). Outros autores sugerem que a presença destes centros meristemáticos indicariam processos morfogênicos capacitados para a formação de raízes e/ou proembriões. Em *C. nucifera*, Dussert *et al.* (1995) descreveram que as

estruturas globulares, presentes em calo embriogênicos, surgiram da fragmentação de zonas meristemáticas. Análises histológicas de calos primários, obtidos a partir de embriões zigóticos de *E. guineensis*, evidenciaram células meristemáticas formando zonas meristemáticas na parte mais interna do calo primário, constituída por células isodiamétricas com citoplasma denso e núcleo proeminente (Silva *et al.*, 2012; Balzon *et al.*, 2013). Pádua *et al.* (2013) verificaram diferentes tipos celulares, ao analisar massas celulares, induzidas a partir de folhas imaturas de dendezeiro, formadas por células vacuoladas grandes, parenquimáticas e meristemáticas. Neste trabalho foram visualizadas, durante a formação dos calos, células meristemáticas, embriogênicas, com núcleo e nucléolo evidentes diferindo na organização celular e no número de nucléolos, além de células maiores de preenchimento e vacuoladas.

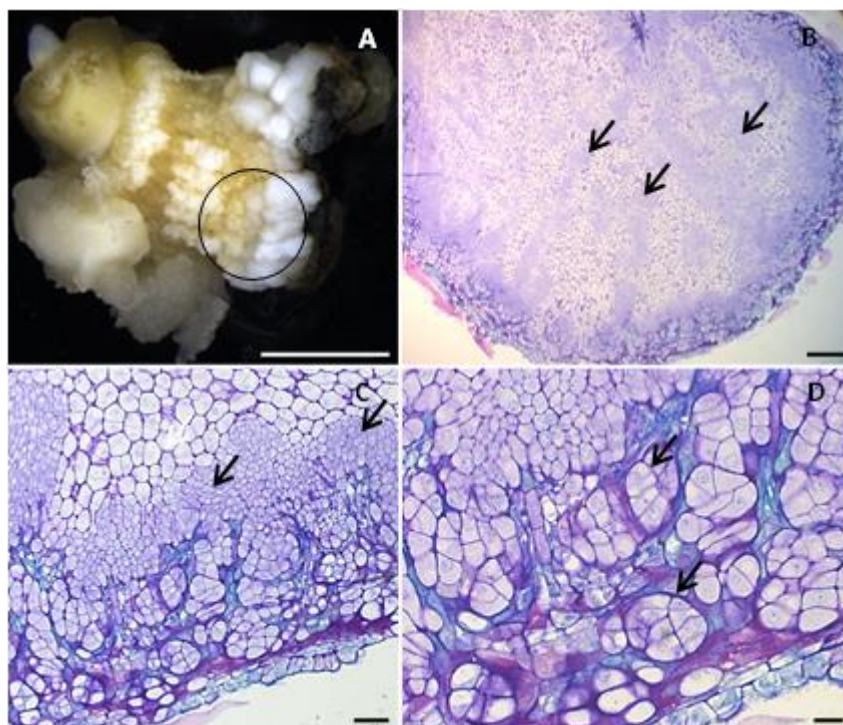


FIGURA 8. Calo embriogênico de *B. odorata* aos 105 dias em meio de indução MS com 100 mg/L de 2,4-D. (A) Morfologia calo embriogênico. (B) Vista de geral do corte na região do círculo preto em (A). (C) Detalhe na periferia com centros meristemáticos e proembriões. (D) Detalhe dos proembriões envolvidos pelo exsudado da parede celular (setas). Escala: 5 mm (A), 200 μ m (B), (C) 50 μ m, 20 μ m(D).

Os calos primários, na fase de indução, foram transferidos para meio de multiplicação com a concentração de picloram reduzida e sem carvão ativado. Durante os 30 dias iniciais desta fase muitos calos iniciaram o processo de oxidação, até então

não observado. Porém, alguns calos mantiveram-se com a mesma morfologia e coloração inicial. A oxidação ocorreu provavelmente por causa da retirada do carvão ativado. Geralmente o carvão ativado é utilizado no meio de indução devido às altas concentrações de auxina. Isto porque se supõe que o carvão ativado adsorve o 2,4-D do meio, modulando a concentração dessa auxina (Thomas, 2008), além de adsorver outras substâncias liberadas pelo explante no meio de cultura. A adição do carvão ou não depende da concentração dos reguladores de crescimento, tipo de explante, entre outros, o mesmo pode não ser adicionado ao meio, por exemplo, Sané *et al.* (2006) e Fki *et al.* (2003) não utilizaram carvão ativado na indução do calo primário em *P. dactylifera*. E o carvão ativado pode ser adicionado ao meio nas etapas de diferenciação, maturação e conversão dos embriões somáticos (Sáenz *et al.*, 2006; Moura *et al.*, 2009; Scherwinski-Pereira *et al.*, 2012).

Os embriões somáticos surgiram de calos embriogênicos (Figura 9A) induzidos em diferentes concentrações de 2,4-D e picloram em meio MS ou Y3. O período também foi variável com surgimento de embriões somáticos globulares aos 45 dias e a maioria a partir dos 90 dias em meio de indução. A anatomia permitiu acompanhar o desenvolvimento dos centros meristemáticos em calos primários, originando células embriogênicas que se isolaram, formando proembriões e embriões globulares até a formação de embriões somáticos fusionados.

A anatomia de embriões somáticos globulares mostrou a presença de uma protoderme definida, a fusão da base do embrião com o tecido do calo e a presença de células parenquimáticas de preenchimento e células meristemáticas. No entanto, não foi visualizada a formação de uma plúmula e de um procâmbio. Resultados semelhantes foram descritos por Steinmacher *et al.* (2011) onde induziram embriões somáticos em *Bactris gasipaes*, a partir de embriões zigóticos, e esses não apresentaram uma estrutura, como um suspensor, ligando os embriões somáticos aos tecidos de origem, mas apresentaram uma ampla área basal fundida ao tecido de origem, o que caracteriza uma origem multicelular desses embriões somáticos. Moura *et al.* (2009) visualizaram a presença de uma protoderme, revestindo um grupo de células embriogênicas que constituem o meristema fundamental, em cortes anatômicos dos embriões somáticos de *A. aculeata*, porém, sem o desenvolvimento de cordões procambiais. Sané *et al.* (2006) evidenciaram, em secções longitudinais de embriões somáticos em estágio torpedo, um sistema vascular bem desenvolvido distribuído ao longo do meristema fundamental do

cotilédone. O estágio de torpedo neste trabalho não foi bem definido morfologicamente devido à fusão dos cotilédones e um encurvamento dos embriões, mas na Figura 9 A é possível visualizar embriões alongados, semelhantes a embriões torpedos de outras espécies.

A reação positiva do reagente de Lugol foi observada em toda a periferia do embrião somático indicando o acúmulo de grãos de amido nas células desta região. De acordo com outras pesquisas com espécies de palmeiras as diferenças observadas entre embriões somáticos e zigóticos são em relação aos compostos de reserva. De forma geral, os embriões somáticos não apresentam acúmulo de proteínas e lipídeos e apresentam escassez de amiloplastos (Sané *et al.*, 2006; Moura *et al.*, 2010).

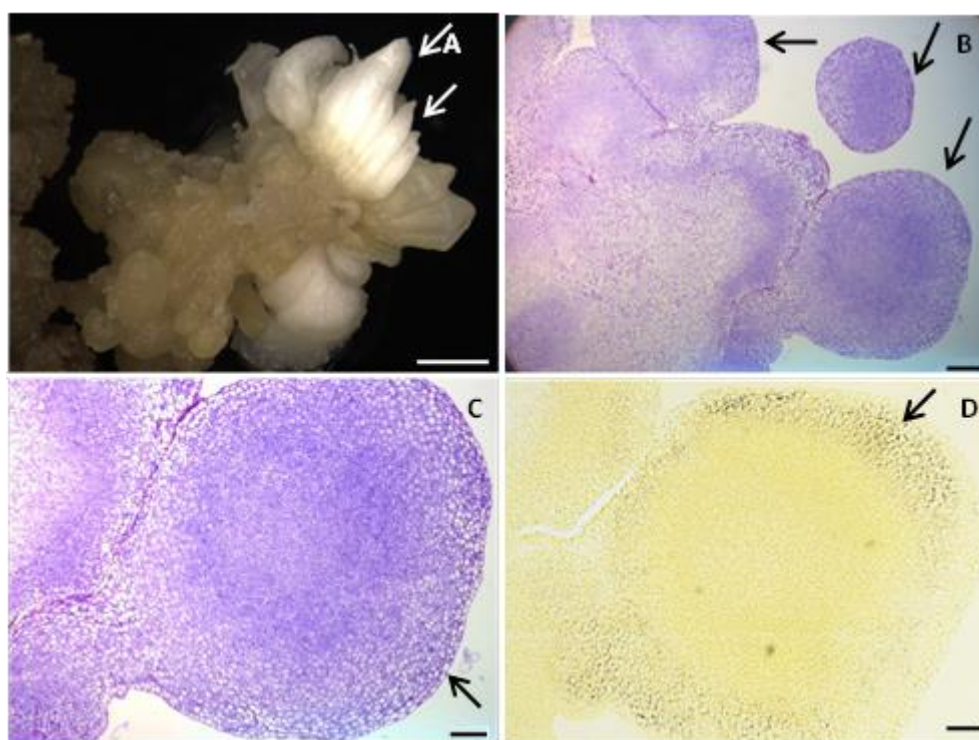


FIGURA 9. Morfologia, anatomia e histoquímica de embriões somáticos (ES). (A) ES fusionados (setas). (B) ES em estágio globular (setas). (C) ES globular com protoderme definida (seta), células meristmeáticas e parênquimáticas de preenchimento. (D) ES com amido em toda sua periferia (seta). Escala: 2 mm (A), 200 μ m (B), 100 μ m (C-D).

De acordo com Williams & Maheswaran (1986) os embriões de origem multicelular são fundidos histologicamente no tecido de origem. A fusão entre embriões somáticos pode ocorrer durante o seu processo de formação. Essa fusão foi observada

em outras espécies como *Acca sellowiana* (Pescador *et al.*, 2008), *A. aculeata* (Moura *et al.*, 2009) e *C. nucifera* (Montero-Córtés *et al.*, 2010). Neste trabalho, observou-se que a fusão dos cotilédones foi frequente nos embriões somáticos de *B. odorata* (Figura 9A).

Na macaúba (*A. aculeata*), foi observada a formação de embriões somáticos de origem unicelular e multicelular, porém os embriões de origem multicelular se desenvolveram somente quando os calos embriogênicos foram subcultivados no mesmo meio de indução. Isso levou à suposição de que a dose inicial de picloram era essencial para o desenvolvimento de embriões somáticos de origem multicelular, mas não foi possível regenerá-los em plantas (Moura *et al.*, 2009). A ocorrência das zonas meristemáticas verificadas nos calos embriogênicos de *B. odorata* caracterizam a origem multicelular dos embriões somáticos e poucas evidências levaram a hipótese de formação de origem unicelular. Silva *et al.* (2014) observaram os eventos de histodiferenciação envolvidos durante a aquisição e desenvolvimento da embriogênese somática de dendezeiro concluíram que a formação dos embriões somáticos teve origem unicelular devido ao isolamento físico dos embriões somáticos formados. Durante as análises anatômicas foram visualizados alguns proembriões isolados na região periférica dos calos que poderiam ser de origem unicelular, mas não foram visualizados embriões somáticos individualizados.

Dessa forma podemos inferir que os calos estão expostos à auxina em alta concentração por um tempo muito prolongado, pois muitos calos a partir dos 90 dias já apresentavam zonas meristemáticas e aos 105 dias proembriões foram visualizados (Figura 8C e D). Além disso, alguns calos aos 45 dias apresentavam estruturas embriogênicas. Essa variabilidade nas respostas morfogênicas, encontrada neste trabalho, poderia estar relacionada ao fato de que os explantes utilizados foram embriões zigóticos oriundos de plantas com polinização cruzada, gerando variabilidade genética entre os explantes. O desenvolvimento *in vitro* da embriogênese somática é dependente de vários fatores, como genótipo, fisiologia da planta matriz, e o tipo de explante (Viñas & Jiménez, 2011). E para as espécies de palmeiras o genótipo parece ser determinante. Silva *et al.* (2012) testaram nove genótipos comerciais de *E. guineensis* e concluíram que ocorre uma variação na resposta embriogênica em função do genótipo.

A exposição prolongada à auxina pode interferir nos processos seguintes à formação de proembriões, podendo ser uma razão para baixa taxa de formação de

embriões somáticos e a conversão destes em plântulas. E a baixa conversão também se deve ao fato recorrente da fusão dos cotilédones dos embriões somáticos. A adição de uma citocinina, poliamina ou outros reguladores de crescimento, nas diferentes etapas da embriogênese somática, podem contribuir para um melhor desenvolvimento dos calos e embriões somáticos. A anatomia mostrou neste trabalho, e em outros, que o evento da proliferação de zonas com células meristemáticas, durante a embriogênese somática, é recorrente nas diferentes espécies de palmeiras, com alta frequência de indução indireta da embriogênese somática, devido a formação de calo, e essa parece ser a rota mais comum entre espécies de palmeiras.

5.4 Conclusões

As análises anatômicas e histoquímicas revelaram que a embriogênese somática induzida em embriões zigóticos maduros de *B. odorata* segue os padrões da maioria das palmeiras já estudadas. As células somáticas foram induzidas por ambas as auxinas e desenvolveram estruturas características do processo como, centros meristemáticos, células meristemáticas e embriogênicas, proembriões, embriões globulares com protoderme definida e reservas de amido. A embriogênese somática em *B. odorata* ocorreu de forma indireta e não sincronizada.

5.5 Referências bibliográficas

CHAN, J. I. et al. Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 17, p. 515-521, 1998.

DUSSERT, S.; VERDEIL, J. L.; BUFFARD-MOREL, J. Specific nutrient uptake during initiation of somatic embryogenesis in coconut calluses. **Plant Science**, Limerick, v. 11, n. 1, p. 229-236, 1995.

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

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

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

FIOR, C. L. et al. Superação de dormência em sementes de *Butia capitata*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 7, p. 1150-1153, 2011.

FKI, L. et al. An optimised protocol for plant regeneration from embryogenic suspension cultures of date palm, *Phoenix dactylifera* L.; cv. Deglet Nour. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 21, p. 517-524, 2003.

GOMES, H. T. et al. Regeneration of somatic embryos of oil palm (*Elaeis guineensis*) using temporary immersion bioreactors. **Industrial Crops and Products**, New York, v. 89, p. 244-249, 2016.

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

GUEYE, B. et al. Acquisition of callogenic capacity in date palm leaf tissues in response to 2,4-D treatment. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v. 99, p. 35-45, 2009.

HO, W. J.; VASIL, I. K. Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) I: the morphology and physiology of callus formation and the ontogeny of somatic embryos. **Protoplasma**, Wien, v. 118, n. 3, p. 169–180, 1983.

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

MONTERO-CÓRTEZ, M. et al. GA3 stimulates the formation and germination of somatic embryos and the expression of a KNOTTED-like homeobox gene of *Cocos nucifera* (L.). **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 29, n. 9, p. 1049–1059, 2010.

MOURA, E. F. et al. Histological study of somatic embryogenesis induction on zygotic embryos of macaw palm (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Martius). **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v. 95, p. 175-184, 2008.

MOURA, E. F. et al. Somatic embryogenesis in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from zygotic embryos. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 119, p. 447-454, 2009.

MOURA, E. F.; VENTRELLA, M. C.; MOTOIKE, S. Y. Anatomy, histochemistry and ultrastructure of seed and somatic embryo of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 67, n. 4, p. 399-407, 2010.

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

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, Wien, n. 59, p. 367-373, 1964.

O'BRIEN, T. P.; MCCULLY, M. E, 1981. In: VENTRELLA, M. C; ALMEIDA, A. L.; NERY, L. A.; COELHO, V. P. M. **Métodos histoquímicos aplicados às sementes**, Viçosa, MG: Ed. UFV, p. 40, 2013.

PÁDUA, M. S. et al. C. Induction and characterization of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) pro-embryogenic masses. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 85, n. 4, p. 1545-1556, 2013.

PÉREZ-NÚÑEZ, M. T. et al. Improved somatic embryogenesis from *Cocos nucifera* (L.) plumule explants. **In vitro Cellular Development Biology-Plant**, Cambridge, v. 42, p. 37-43, 2006.

PESCADOR, R. et al. Anomalous somatic embryos in *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 155-164, 2008.

QUIROZ-FIGUEROA, F. R. et al. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 86, p. 285-301, 2006.

RIVAS, M.; BARBIERI, R. L. **Boas práticas de manejo para o extrativismo sustentável do butiá**. Brasília, DF: Embrapa, 2014. 59p.

RODRIGUES, L. R.; OLIVEIRA, J. M. S.; MARIATH, J. E. A. Anatomia vegetal aplicada ao estudo de sistemas androgênicos in vitro. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.2, n. 3/4, p. 159-167, 2004.

SÁENZ, L. et al. Morphological and histological changes during somatic embryo formation from coconut plumule explants. **In Vitro Cellular and Development Biology - Plant**, Cambridge, v. 42, p. 19–25, 2006.

SÁENZ, L. et al. Influence of form of activated charcoal on embryogenic callus formation in coconut (*Cocos nucifera*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 100, p. 301–308, 2010.

SANÉ, D. et al. Histocytological analysis of callogenesis and somatic embryogenesis from cell suspensions of date palm (*Phoenix dactylifera*). **Annals of Botany**, Oxford, v. 98, p. 301–308, 2006.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration in açai palm (*Euterpe oleracea*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 109, p. 501–508, 2012.

SCHLINDWEIN, G. et al. Alleviation of seed dormancy in *Butia odorata* palm tree using drying and moist-warm stratification. **Seed Science & Technology**, Zurich, n. 41, p. 1-11, 2013.

SILVA, R. C.; LUIS, Z. L.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Differential responses to somatic embryogenesis of different genotypes of Brazilian oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 111, p. 59-67, 2012.

SILVA, R. C.; LUIS, Z. L.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Histodifferentiation events involved during the acquisition and development of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 72, p. 67-80, 2014.

SOARES, K. P. et al. Palmeiras (Arecaceae) no Rio Grande do Sul, Brasil, **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 65, n. 1, p. 113-139, 2014.

STEINMACHER, D. A. et al. Somatic embryogenesis from peach palm zygotic embryos. **In Vitro Cellular and Development Biology - Plant**, Cambridge, n. 43, p. 124-132, 2007.

STEINMACHER, D. A. et al. A temporary immersion system improves in vitro regeneration of peach palm through secondary somatic embryogenesis. **Annals of Botany**, Oxford, v., p. 1-13, 2011.

THOMAS, T. D. The role of activated charcoal in plant tissue culture. **Biotechnology Advances**, New York, v. 26, p. 618–631, 2008.

VASIL, V.; VASIL, K. V. Somatic embryogenesis and plant regeneration from tissue cultures of *Pennisetum americanum*, and *P. americanum* x *P. purpureum* Hybrid. **American Journal of Botany**, Lancaster, v. 68, n. 6, p. 864-872, 1981.

VERDEIL, J-L. et al. Ultrastructural changes in coconut calli associated with the acquisition of embryogenic competence. **Annals of Botany**, Oxford, v. 88, p. 9–18, 2001.

VIDAL, 1970 In: VENTRELLA, M. C; ALMEIDA, A. L.; NERY, L. A.; COELHO, V. P. M. **Métodos histoquímicos aplicados às sementes**, Viçosa, MG: Ed. UFV, p. 40, 2013.

VIÑAS, M.; JIMÉNEZ, V. M. Factores que influyen en la embriogénesis somática in vitro de palmas (Arecaceae). **Revista Colombiana de Biotecnología**, Bogotá, v. 13, n. 2, p. 229-242, 2011.

WILLIAMS, E. G.; MAHESWARAN, G. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany**, Oxford, v. 57, n. 4, p. 443-462, 1986.

6 CAPÍTULO 4

Identificação de uma sequência codificante do gene *SERK* em calos embriogênicos de *Butia odorata* (Barb. Rodr.) Noblick

RESUMO

Butia odorata (Barb. Rodr.) Noblick é uma palmeira nativa da região Sul do Brasil e Uruguai, apreciada pelos frutos saborosos. Esta espécie, como a maioria das palmeiras, apresenta propagação por sementes que apresentam dormência e dificultam a produção de mudas. A embriogênese somática *in vitro* é uma técnica da cultura de tecidos aplicada, como alternativa à propagação por sementes, na multiplicação *in vitro* de palmeiras. Apesar do amplo uso desta técnica, a mesma não foi totalmente elucidada e pode se dizer que é uma técnica empírica. Análises histológicas são utilizadas na identificação das respostas celulares durante o processo da embriogênese somática, mas nos últimos anos têm se buscado alternativas para identificar o processo através das áreas de metabolômica, proteômica e biologia molecular. Diversos genes foram associados à embriogênese somática, como o gene *SERK* que é considerado o marcador molecular mais específico na identificação de células com competência embriogênica. O objetivo deste trabalho foi isolar e sequenciar, em culturas de calos embriogênicos de *B. odorata*, o gene *SERK*. O RNA total foi extraído desses calos embriogênicos o cDNA foi sintetizado e utilizado como molde para amplificação do *SERK* com *primers* degenerados e específicos para *Cocos nucifera*. Após realizou-se a clonagem e o sequenciamento de um fragmento do *SERK* para *B. odorata*. A sequência parcial do *SERK* para *B. odorata* apresentou alguns dos domínios reportados para as outras espécies, como as cinco LRR, o domínio SPP e alguns dos domínios de transmembrana. Essa sequência parcial pode ser usada como um marcador para seleção de material responsivo a indução da embriogênese somática.

Palavras-chave: Butiá, embriogênese somática, 2,4-D.

ABSTRACT

Butia odorata (Barb. Rodr.) Noblick is a native palm tree from the southern region of Brazil and Uruguay, appreciated by tasty fruits. This species, like most palm trees, presents propagation by seeds that present dormancy and hinder the production of seedlings. Somatic embryogenesis *in vitro* is an applied tissue culture technique, as an alternative to the propagation by seed, in the *in vitro* multiplication of palms. Despite the wide use of this technique, the same has not been fully elucidated and can be said to be an empirical technique. Histological analyses are used in identification of cellular responses during the process of somatic embryogenesis, but in recent last years alternatives have been sought alternatives to identify the process through the areas of metabolomics, proteomics and molecular biology. Several genes have been associated with somatic embryogenesis, such as the *SERK* gene, which is considered the more specific molecular marker to identify cells with embryogenic competence. The objective of this work was to isolate and sequence, in cultures of embryogenic calli of *B. odorata*, the *SERK* gene. The total RNA was extracted from these embryogenic calli, the cDNA was synthesized and used as a template for *SERK* amplification with degenerate primers specific for *Cocos nucifera*. After the cloning and sequencing of a *SERK* fragment was performed for *B. odorata*. The partial sequence of *SERK* for *B. odorata* presented some of the domains reported for other species, such as the five LRRs, the SPP domain and some of the transmembrane domains. This partial sequence can be used as a marker for selection of material responsive to induction of somatic embryogenesis.

Keywords: Pindo palm, somatic embryogenesis, 2,4-D.

6.1 Introdução

A espécie *Butia odorata* (Barb. Rodr.) Noblick conhecida popularmente como butiá. É uma palmeira nativa da região sul do Brasil e Uruguai que tem suas populações naturais gradualmente sendo reduzidas devido à urbanização, ao avanço da agricultura e pelo próprio extrativismo, pois são escassas as iniciativas de cultivo dessa espécie, enquanto sua exploração é cada vez mais frequente. Apresenta potencial econômico, pois seus frutos são muito apreciados e consumidos *in natura* ou processados (Rivas & Barbieri, 2014). Não diferente da maioria das espécies de palmeiras, *B. odorata*, apresenta restrições à propagação vegetativa, sendo, até o presente, propagada exclusivamente por sementes, as quais apresentam dormência, o que torna a germinação lenta e desuniforme.

A embriogênese somática é uma técnica da cultura de tecidos muito promissora na propagação de espécies que apresentam entraves na produção comercial de mudas. Segundo Quiroz-Figueroa *et al.* (2006) a embriogênese somática é um processo no qual as células somáticas vegetais, em condições de indução *in vitro*, geram células embriogênicas, que passam por uma série de alterações morfológicas e bioquímicas resultando na formação de um embrião somático. Apesar da sua aplicação em inúmeras espécies e com sucesso, o processo em si ainda não é totalmente entendido. Isso torna os protocolos de embriogênese somática empíricos na sua aplicação. Principalmente em espécies nativas que apresentam potencial econômico como o caso do *B. odorata*, pois geralmente não apresentam metodologias para esta técnica. Pesquisas com palmeiras de interesse econômico, como o dendezeiro (*Elaeis guineensis*) (Balzon *et al.*, 2013), o coqueiro (*Cocos nucifera*) (Chan *et al.*, 1998), a tamareira (*Phoenix dactylifera*) (Sané *et al.* 2012) possibilitaram a obtenção de mudas através da embriogênese somática, apresentando resultados promissores mesmo sem o conhecimento total do que envolve este processo. E a mesma técnica pode ser aplicada em palmeiras nativas com potencial econômico como a macaúba (*Acrocomia aculeata*) (Moura *et al.*, 2009) e a pupunha (*Bactris gasipaes*) (Heringer *et al.*, 2016).

Para auxiliar na identificação da embriogênese somática muitas pesquisas tentam definir marcadores para assinalar o processo, sejam eles morfológicos, bioquímicos ou moleculares. Análises anatômicas são muito úteis para distinguir a morfologia celular na identificação dos eventos que ocorrem no cultivo *in vitro* (Rodrigues *et al.*, 2004) durante a indução da embriogênese somática, mas os eventos que ocorrem durante a

transição não são detectados pela anatomia. Nesse caso é interessante o uso de marcadores moleculares para identificar esses eventos moleculares. Existem muitos genes já identificados que estão sendo utilizados como marcadores moleculares no processo da embriogênese somática, os quais atuam em diferentes fases ao longo do processo como o BABYBOOM (*BBM*) (Boutilier *et al.*, 2002) e o LEAFY COTYLEDON 1 (*LEC1*) (Lotan *et al.*, 1998).

Porém, tem-se obtido sucesso com o uso de um marcador molecular específico, o gene *SERK* (receptor quinase na embriogênese somática). Esse gene foi descrito, pela primeira vez, para culturas de suspensão celular de cenoura (*Daucus carota*), o gene *DcSERK*. Esse gene foi expresso no início do processo de indução de embriogênese somática, sendo detectado até o estágio de embrião globular (Schmidt *et al.*, 1997).

Genes com identidade molecular ao gene *SERK* têm sido identificados em inúmeras espécies como *Dactylis glomerata*, *Arabidopsis thaliana*, *Medicago truncatula*, *Helianthus annuus*, *Ocotea catharinensi*, *Citrus unshiu*, *Theobroma cacao*, entre outras. Segundo Hecht *et al.* (2001) plantas de *Arabidopsis thaliana* que superexpressaram o gene *AtSERK1* apresentaram um aumento de três a quatro vezes a iniciação de embriões somáticos. Apesar de não ser o único gene expresso durante o processo da embriogênese somática, desde a sua descoberta e validação funcional, o gene *SERK* é usado como marcador molecular, pois é o mais específico na identificação de células com competência embriogênica.

O gene *SERK* pertence a uma grande e conservada superfamília de repetições ricas em leucinas, receptor do tipo quinase (LRR-RLK) e são responsáveis por diversos processos de transdução de sinais em plantas (Baudino *et al.*, 2001; Nolan *et al.*, 2003, Albrecht *et al.*, 2005; Talapatra *et al.*, 2014). Até o momento, cinco membros da família *SERK* foram isolados em *A. thaliana* (*AtSERK1*, *AtSERK2*, *AtSERK3*, *AtSERK4* e *AtSERK5*) e estes genes demonstraram expressão específica em diferentes estágios da embriogênese somática (Hecht *et al.*, 2001).

A expressão do *SERK* tem sido detectada em calos embriogênicos de palmeiras como em *C. nucifera* (Pérez-Nuñez, 2009) e *E. guineenses* (Angelo *et al.*, 2013) e referenciado como um potencial marcador molecular do processo da embriogênese somática na identificação de células com competência embriogênica. O objetivo deste trabalho foi identificar e isolar o gene *SERK* em culturas de calos, considerados

embriogênicos, para verificar a expressão desse gene e também disponibilizar mais uma ferramenta na identificação da embriogênese somática *in vitro* para espécie *B. odorata*.

6.2 Material e métodos

6.2.1 Material vegetal e cultivo *in vitro*

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos II e no Laboratório de Regulação Gênica II, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, localizada em Brasília, DF.

Para análise de isolamento e caracterização do gene *SERK* foi extraído RNA total de calos embriogênicos, os quais foram obtidos a partir da indução de embriões zigóticos de *Butia odorata*. Os embriões zigóticos foram dispostos em placas de Petri com meio de cultura contendo os sais do meio MS (Murashige & Skoog, 1962), adicionado de ferro EDTA e vitaminas do MS, glutamina (200 mg/L), asparagina (100 mg/L), arginina (100 mg/L), sacarose (30 g/L), carvão ativado (2,0 g/L) e induzidos com 80 e 120 mg de 2,4-D. Antes da autoclavagem o pH foi corrigido para 5,8. Após o ajuste de pH foi acrescentado phytigel (2,3 g/L). Os meios foram autoclavados a 121°C e 1,5 atm de pressão, por 20 minutos. Os embriões foram retirados das sementes, com auxílio de bisturi e pinça, e dispostos em placas de Petri com aproximadamente 25 mL do meio de cultura. As placas foram levadas para sala de crescimento com temperatura de 25±2°C e mantidas no escuro. Foram utilizados calos embriogênicos com 90, 150 e 300 dias em meio de indução para extração de RNA total (Figura 1).

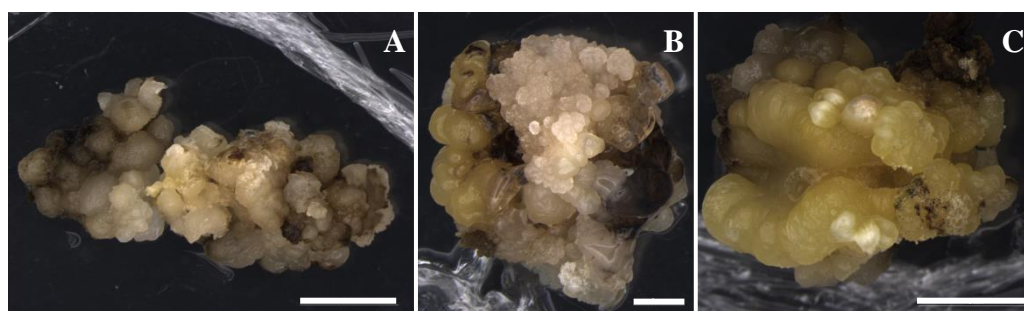


FIGURA 1. Calos embriogênicos de *B. odorata* utilizados para extração de RNA total e isolamento do gene *SERK*. Escala: 5 mm (A e C), 2 mm (B).

6.2.2 Identificação, isolamento e clonagem do gene *SERK*

6.2.2.1 Extração de RNA total

Para extração do RNA total dos calos embriogênicos amostrados foi utilizado o reagente Trizol (Invitrogen) de acordo com as especificações do fabricante. Todas as etapas durante a extração do RNA total foram realizadas em condições livres de ribonucleases. As amostras de calos embriogênicos (Figura 1) foram maceradas em nitrogênio líquido, com auxílio de gral e pistilo, e para cada 50 mg dos tecidos macerados utilizou-se um microlitro de Trizol para homogeneização das amostras. Ao final foram obtidas quatro amostras separadas em microtubos de dois mililitros. Em seguida adicionou-se betamercaptoetanol 1% na proporção de 10 μ L para cada microlitro de Trizol e as amostras foram homogeneizadas no vórtex por um minuto. Após cinco minutos no gelo as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 10°C a 12000 rotações por minuto (rpm). O sobrenadante foi recuperado e transferido para um novo tubo e incubado por mais cinco minutos no gelo. Adicionou-se 300 μ L de clorofórmio e levou-se ao vórtex por um minuto para homogeneizar. Após incubou-se no gelo os microtubos por três minutos e estes foram centrifugados por 15 minutos a 10°C. Em seguida foi coletado o sobrenadante e adicionou-se o mesmo volume de isopropanol para precipitação do RNA e as amostras foram então incubadas durante três horas a -20°C em ultrafreezer. Após os microcubos foram centrifugados a 10°C a 12000 rpm por 15 minutos. Os pellets formados foram lavados com 1 mL de etanol 75% e novamente centrifugados por mais 10 minutos a 12000 rpm. O sobrenadante foi descartado e os microtubos mantidos abertos em capela de fluxo laminar para secagem e retirada do excesso de etanol. Em seguida o RNA foi ressuspensionado em 30 μ L de água tratada com dietil pirocarbonato (DEPC) e mantidos a -20°C em ultra freezer.

As amostras foram quantificadas por espectrofotometria (Nanodrop 2000) com absorbância de 260 nm e a qualidade das amostras de RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1,2% livre de RNase.

6.2.2.2 Purificação do RNA e síntese de cDNA

As amostras de RNA total foram tratadas com DNase I, RNase Free (Fermentas), segundo protocolo do fabricante, para eliminar a presença de DNA genômico nas amostras. Para quantificação das amostras utilizou-se espectrofotômetro (Nanodrop 2000) e a integridade das amostras foi analisada por eletroforese em gel de

agarose 1,2%. A amostra foi incubada em tampão 10x, DNase I com água tratada DEPC.

O cDNA foi sintetizado, a partir das amostras de RNA total tratadas com DNase I, em reações de transcrição reversa utilizando-se o kit SuperScript II (Invitrogen) segundo as especificações do fabricante. Para a síntese do cDNA fita simples utilizou-se três microlitros de RNA total [2,58 µg], em um volume final de 10 µL em água DEPC. A mistura foi aquecida a 65°C para desnaturação por cinco minutos e, em seguida colocada no gelo por dois minutos. Foram então adicionados quatro microlitros de tampão de síntese da primeira fita de DNA, um microlitro da mistura de dNTPs (10 mM cada), dois microlitros de DTT e um microlitro (200 U) da enzima transcriptase reversa (SuperScript™ First-Strand Synthesis System, Invitrogen™). A reação de síntese ocorreu em um ciclo de 4°C durante 50 minutos seguidos de 15 minutos a 70°C para inativação da enzima no termociclador (Biocycler MJ25). O cDNA foi armazenado a -20°C, até o momento do uso. Para cada amostra foi feita um controle negativo (sem adição da transcriptase reversa). Para isolar sequências candidatas ao gene *SERK* em *B. odorata*, combinações de *primers* degenerados e específicos desenvolvidos para *C. nucifera* (Pérez-Núñez *et al.*, 2009) foram empregados neste estudo.

6.2.2.3 Amplificação do gene *SERK*

Para amplificar, a partir do cDNA, a sequência codificadora e isolar o gene de interesse realizou-se a amplificação com os seguintes *primers*: Forward 1: 5'-BCN ACT CTK GTT AAT CCA TG-3'; Forward 2: 5'-STT GAY CTT GGR AAT GCA M-3'; Reverse 1: 50-YGC CAT RCT AAT CAK YTC RAC Y-3'; Reverse 2: 5'-KGC YTC RAA STC YTC RTC C-3'; *CnSERK*-Fw: 5'-TAT CTG GTA CAT TGG TCC CTC-3'; *CnSERK*-Rv: 5'-CTC TTC AGC AGG CAC ATC-3'. Esses *primers* degenerados foram desenhados com base em sequências com regiões altamente conservadas para o *SERK* das espécies *A. thaliana*, *Zea mays* e *Helianthus* sp. (Perez-Nuñez *et al.*, 2009). Cada reação de amplificação continha um microlitro da reação de síntese do cDNA, um microlitro dos *primers*, cinco microlitros do tampão de amostra, quatro microlitros do mix de dNTP, dois microlitros de cloreto de magnésio (MgCl₂) e um microlitro µL da enzima Taq DNA polimerase (Kit Ludwig). A reação de PCR ocorreu em um volume final de 50 µL. O programa de amplificação seguido foi: desnaturação a 94°C por um minuto, 94°C por 40 segundos, seguido de 30 ciclos de 50°C por 40 segundos e 72°C

por 40 segundos, após um ciclo de 72°C por 30 minutos. As reações foram feitas em termociclador (Veriti - Applied Biosystems®) e após os produtos foram analisados em gel de agarose 1,2% em tampão TBE 0,5X contendo 15 µL de brometo de etídeo. O padrão de bandas do DNA foi visualizado sob luz ultravioleta e fotodocumentado (BioCell).

Como foram obtidas bandas inespecíficas além da banda de interesse, após realizar PCR e verificar o gel, adotou-se a técnica de purificação de banda extraída do gel de corrida com o Kit QIAquick Gel Extraction.

6.2.2.4 Clonagem dos fragmentos no vetor pGEM-T Easy

Os fragmentos purificados da amplificação foram ligados no vetor pGEM®-T Easy (Promega®), na proporção de 3:1 de inserto:vetor, com a enzima T4 DNA ligase (Promega®), de acordo com as recomendações do fabricante. Os plasmídeos obtidos foram introduzidos em células competentes de *Escherichia coli*, por eletroporação. Para a transformação por eletroporação foram utilizados dois microlitros da ligação (inserto) e 50 µL de células competentes *E. coli*, foram incubadas no gelo por um minuto. A mistura foi colocada em cubeta previamente gelada e colocada em câmara de eletroporação e um pulso foi aplicado. Em seguida as células transformadas foram ressuspendidas em 1 ml de meio LB líquido e incubadas à 37°C por uma hora. Após foram plaqueadas, 100 µL das células, em meio seletivo LB sólido (10 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de cloreto de sódio e 1,6% de ágar) contendo 40 µL de tetraciclina, 20 µL de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-d-galactopiranosídeo (X-Gal) e 80 µL de isopropil-beta-D (IPTG) e incubadas a 37°C, por aproximadamente 15 horas.

Para analisar os transformantes foram selecionadas colônias brancas e realizou-se o PCR para confirmação. Após a confirmação, o DNA plasmidial foi isolado pelo método de purificação em colunas, com o Kit Miniprep (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante.

Após os plasmídeos foram linearizados pela digestão de 1 µL [400 ng/µL] de DNA plasmidial com a enzima de restrição EcoRI, mais 3 µL de tampão da enzima para um volume total de 30 µL. A reação ocorreu em banho-maria a 37°C por duas horas. Após verificou-se o produto da linearização por eletroforese em gel de agarose 1,0 %.

6.2.2.5 Sequenciamento

O sequenciamento foi realizado com os clones recombinantes obtidos pela seleção de restrição da EcoRI nos sentidos senso e antisenso, em sequenciador automático de 96 capilares, no Laboratório de Genética Vegetal, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-DF. Para o sequenciamento foi usado o BigDye com os iniciadores universais M13. A análise dos cromatogramas obtidos e a montagem da sequência foi realizada com auxílio do programa BioEdit Sequence Alignment.

6.2.2.6 Comparação das sequências

As análises *in silico* da sequência parcial candidata ao *SERK* em *B. odorata* foram realizadas no National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) usando o BLAST (Altschul *et al.*, 1997) para encontrar similaridades com outras sequências depositadas no *Genbank*. A sequência dos alinhamentos múltiplos foi realizada usando o programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>).

6.3 Resultados e discussão

6.3.1 Análises da sequência e clonagem do gene *SERK*

Os *primers* degenerados não amplificaram sequências relacionadas à proteína *SERK*. Apenas os *primers* específicos de *C. nucifera* amplificaram um fragmento com 741 pares de base (pb), a partir do cDNA obtido dos calos embriogênicos de *B. odorata*. Esse fragmento foi então clonado e sequenciado. O alinhamento da sequência obtida foi realizado usando o algoritmo Blastn para comparar com as sequências de nucleotídeos depositados no banco de dados do NCBI. Semelhanças com as espécies *C. nucifera*, *Elaeis guineenses* e *Phoenix dactylifera* revelaram alta identidade e similaridade, todos acima de 90%. (Tabela 1). A provável sequência isolada do gene *SERK* apresentou semelhança com outras sequências descritas para os membros da família *SERK*, disponíveis no GenBank, principalmente, com as sequências dos genes *SERK1* e *SERK2* de outras espécies de palmeiras (Tabela 1).

O alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos das espécies que expressam proteínas da família *SERK* foi comparado com a sequência obtida do clone parcial do *SERK* (Figura 2). A análise do alinhamento permitiu inferir que a sequência parcial analisada tem alta similaridade com alguns domínios conservados no gene

SERK. O produto do gene *SERK* é uma proteína formada por um peptídeo sinalizador, um zíper de leucina (ZIP), um domínio extracelular com repetições ricas em leucina (LRR), um domínio rico em prolina (SPP), um domínio transmembrana (TM) e um domínio cinase intracelular (C-terminal) (Pérez-Núñez *et al.*, 2009).

TABELA 1. Comparação das sequências de nucleotídeos do *SERK* de *B. odorata* (741 pb), obtidas a partir de cDNA amplificado com a combinação dos *primers* específicos de *Cocos nucifera* (Pérez-Núñez *et al.*, 2009), com as sequências de outras espécies depositadas no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Acesso	Descrição	Cobertura (%)	E-Value	Identidade Máxima (%)
<i>SERK B. odorata</i>				
AY791293.2	<i>C. nucifera</i>	81	0,00	99
XM_010918641.1	<i>Elaeis guineenses</i> (<i>SERK1</i>)	81	0,00	98
KJ607989.1	<i>E. guineenses</i> (<i>SERK1</i>)	81	0,00	98
XM_008813000.2	<i>Phoenix dactylifera</i> (<i>SERK2</i>)	81	0,00	98
XM_008812999.2	<i>P. dactylifera</i> (<i>SERK2</i>)	81	0,00	98
KJ956013.1	<i>E. guineenses</i>	81	0,00	98
XM_008782598.2	<i>P. dactylifera</i>	81	0,00	94
XM_010927933.2	<i>E. guineenses</i> (<i>SERK2</i>)	80	0,00	94

As análises *in silico* da sequência parcial de 228 aminoácidos para o *SERK* de *B. odorata* confirmaram que este pertence à família *SERK*. Essa sequência parcial do *SERK* expresso durante a embriogênese somática de *B. odorata* apresenta, alguns dos domínios característicos da família *SERK*, as cinco repetições ricas em leucina (LRR), uma região rica em prolina (SPP) e alguns dos domínios de transmembrana (TM). As outras regiões conservadas como o peptídeo sinalizador, ZIP, TM e o domínio C-terminal não foram identificadas. Isso se deve ao fato de que a sequência da proteína isolada é um fragmento pequeno (228 aminoácidos), não contemplando os demais domínios que compõem o gene *SERK*. Para isso é necessário amplificar uma região mais abrangente com *primers* degenerados e assim detectar os domínios não presentes.

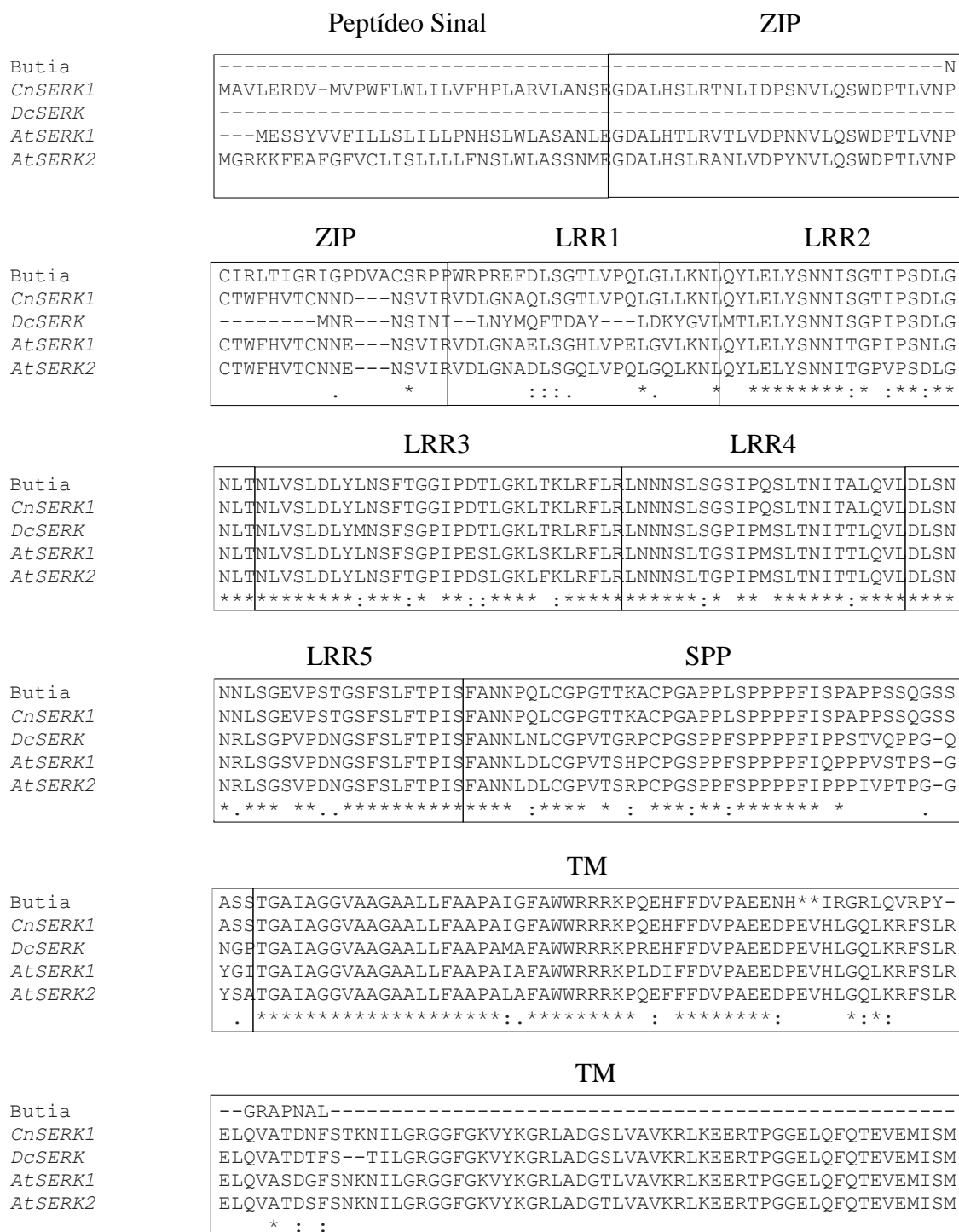


FIGURA 2. Alinhamento múltiplo das sequências de proteínas codificadas pelo gene *SERK* de *Cocos nucifera* (*CnSERK1*), *Daucus carota* (*DcSERK*), *Arabidopsis thaliana* (*AtSERK1* e *AtSERK2*) e a proteína expressa pelo gene parcial clonado de *Butia odorata*. Os domínios conservados foram localizados. SP = peptídeo sinal; ZIP = zíper de leucina; LRR = repetições ricas em leucina; SPP = região rica em prolina; TM = região transmembrana; * = identidade de todos os resíduos de aminoácidos na coluna indicada; : = similaridade dos aminoácidos alinhados na coluna; . = baixa similaridade dos aminoácidos na coluna.

Neste trabalho, a caracterização de uma sequência candidata ao gene *SERK* em *B. odorata* foi identificada. O uso de um agente estressor, a auxina 2,4-D, utilizada para induzir, neste caso, a embriogênese somática pode ter induzido a expressão do gene *SERK*. O gene *SERK* é responsável por codificar um receptor de transmembrana que apresenta um domínio intracelular de proteína quinase (LRR-RLK) e outro domínio extracelular rico em repetições de leucina (LRR) (Becraft, 1998 e 2002). O *SERK* pertence à superfamília de receptores do tipo quinase e estes fazem parte de um grupo de proteínas de sinalização em plantas e também são responsáveis pela transdução de sinais durante a embriogênese somática (Schmidt *et al.*, 1997; Somleva *et al.*, 2000; Nolan *et al.*, 2011).

A exposição dos explantes a uma condição estressante é suficiente para induzir a rota morfogenética da embriogênese somática (von Arnold *et al.*, 2002) e por consequência a expressão dos genes relacionados a essa rota. Segundo Baudino *et al.* (2001) os receptores quinases estão presentes em vários processos do desenvolvimento vegetal, atuando nas rotas de transdução de sinais, e assim desencadeando respostas celulares a sinais externos.

O cultivo *in vitro* gera níveis de estresse significativos aos explantes cultivados em diferentes meios de cultura. Contudo o resultado desse estresse irá depender do nível de estresse causado e o estado fisiológico das células. Quando o nível de estresse ultrapassar a tolerância celular causa a morte celular. Porém se o nível de estresse for baixo, levará à ativação de mecanismos capazes de induzir às células as novas condições (Fehér *et al.*, 2003). Isso pode explicar a transição da célula de um estado somático para o embriogênico e a importância da escolha do fator estressante e o tipo de explante utilizados para induzir a embriogênese somática.

No presente trabalho a expressão de um gene como *SERK* foi verificada em calos embriogênicos de *B. odorata*, a sequência foi isolada, sequenciada e comparada com outras sequências de genes *SERK* existentes no banco de dados do NCBI. A semelhança com os genes *SERK* de outras espécies de palmeiras foi alta, indicando que em *B. odorata* este gene também é conservado e parece estar relacionado com a programação do processo de embriogênese somática. Por se tratar de uma sequência parcial não foi possível classificar de qual dos cinco genes da família *SERK* esse clone é homólogo. A sequência parcial do *SERK* isolada dos calos embriogênicos de *B. odorata* pode ser usada como marcador para embriogênese somática aumentando a eficiência

dos protocolos. Mais investigações nessa área são necessárias para verificar a expressão de outros genes da família *SERK* e também outros genes relacionados ao processo da embriogênese somática em *B. odorata*.

6.4 Conclusões

Uma sequência parcial do gene *SERK*, foi isolada de calos embriogênicos e sequenciada, e está associada com a indução da embriogênese somática em *Butia odorata*, pois apresenta o domínio SPP característico do gene *SERK*. Assim, pode ser usado como um marcador potencial na identificação de células com competência embriogênica. O uso do gene *SERK* como marcador molecular é mais uma ferramenta que, aliada às análises anatômicas, irá auxiliar na geração e aprimoramento dos protocolos de indução à embriogênese para *B. odorata*.

6.5 Referências bibliográficas

ALBRECHT, C. et al. The Arabidopsis thaliana somatic embryogenesis receptor-like kinases1 and 2 control male sporogenesis, **Plant Cell**, Rockville, v. 17, p. 3337–3349, 2005.

ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, p.3389–3402, 1997.

ANGELO, P. C. S. et al. Histological analysis and transcription profiles on somatic embryogenesis in interspecific hybrids of *Elaeis guineensis* × *E. oleifera*. **Agricultural Sciences**, Irvine, v. 4, n. 11, p. 1-11, 2013.

BALZON, T. A.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA. New approaches to improve the efficiency of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) from mature zygotic embryos. **In vitro Cellular Development Biology-Plant**, Cambridge, v. 49, p. 41-50, 2013.

BAUDINO, S. et al. Molecular characterization of two novel maize LRR receptor-like kinase, which belong to the *SERK* gene family. **Planta**, Berlin, n. 213, p. 1-10, 2001.

BECRAFT, P. W. Receptor kinases in plant development. **Trends in plant science**, Amsterdam, v. 3, n. 10, p. 384-388, 1998.

BECRAFT, P. W. Receptor kinase signaling in plant development. **Annual Reviews of Cellular Developmental Biology**, Palo Alto, v. 18, p. 163-192, 2002.

BOUTILIER, K. et al. Ectopic expression of Baby Boom triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. **Plant Cell**, Rockville, v. 14, p. 1737–1749, 2002.

CHAN, J. I. et al. Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 17, p. 515-521, 1998.

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

HECHT, V. et al. The Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 127, p. 803–816, 2001.

HERINGER, A. S. et al. Improved high-efficiency protocol for somatic embryogenesis in Peach Palm (*Bactris gasipaes* Kunth) using RITA[®] temporary immersion system. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 179, p. 284–292, 2014.

LOTAN, T. et al. Arabidopsis LEAFY COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. **Cell**, Cambridge, v. 93, p. 1195–1205, 1998.

MOURA, E. F. et al. Somatic embryogenesis in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from zygotic embryos. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 119, p. 447-454, 2009.

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

NOLAN, K. E.; IRWANTO, R. R.; ROSE, R. J. Auxin up-regulates *MtSERK1* expression in both *Medicago truncatula* root forming and embryogenic cultures. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 133, p. 218–30, 2003.

NOLAN, K. E.; KURDYUKOV, S.; ROSE, R. J. Characterisation of the legume *SERK-NIK* gene superfamily including splice variants: implications for development and defence. **Plant Biology**, London, v. 11, n. 44, p. 1-16, 2011.

PÉREZ-NÚÑEZ, M. T. et al. Detection of a *SERK*-like gene in coconut and analysis of its expression during the formation of embryogenic callus and somatic embryos. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 28, p. 11–19, 2009.

QUIROZ-FIGUEROA, F. R. et al. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 86, p. 285-301, 2006.

RIVAS, M.; BARBIERI, R. L. **Boas práticas de manejo para o extrativismo sustentável do butiá**. Brasília, DF: Embrapa, 2014. 59p.

RODRIGUES, L. R.; OLIVEIRA, J. M. S.; MARIATH, J. E. A. Anatomia vegetal aplicada ao estudo de sistemas androgênicos in vitro. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.2, n. 3/4, p. 159-167, 2004.

SANÉ, D. et al. Influence of growth regulators on callogenesis and somatic embryo development in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) sahelian cultivars. **The Scientific World Journal**, Cairo, v. 2012, p. 1-8, 2012.

SCHMIDT, E. D. et al. A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. **Development**, Cambridge, v. 124, p. 2049–2062, 1997.

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

TALAPATRA, S.; GHOSHAL, N.; RAYCHAUDHURI, S. S. Molecular characterization, modeling and expression analysis of a somatic embryogenesis receptor kinase (*SERK*) gene in *Momordica charantia* L. during somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 116, n. 3, p. 271–283, 2014.

VON ARNOLD, S. et al. Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 69, p. 233-249, 2002.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Até o momento não foram encontrados na literatura trabalhos que relatem embriogênese somática para *Butia odorata*, considerando assim, as metodologias aqui descritas e analisadas como os primeiros relatos para a espécie. O objetivo principal desse trabalho foi disponibilizar alternativas para propagar a espécie, pela indução da embriogênese somática, que é a formação de embriões somáticos. De certa forma o objetivo foi alcançado, apresentando ao final a formação dos embriões somáticos, mas incompleto, pois não houve a conversão de uma plântula *in vitro* ‘perfeita’ para completar a multiplicação *in vitro* e gerar mudas da espécie.

Por ser o primeiro relato de um protocolo de indução da embriogênese somática este requer mais adequação dos parâmetros, com base nos resultados expostos. As análises dos resultados indicam a possibilidade de induzir outros tipos de explantes, por exemplo, folhas e inflorescências imaturas, raízes de plântulas *in vitro*. Pois a espécie é responsiva à embriogênese somática, o que pode ser comprovado, principalmente, pela expressão do gene *SERK*, que foi isolado e sequenciado de calos embriogênicos obtidos com as metodologias de indução propostas neste trabalho. E, até o momento, é o marcador molecular mais específico utilizado na identificação de células com competência embriogênica. E com base nas análises anatômicas e histoquímicas que apresentaram a maioria das características, observadas em outros trabalhos, do processo da embriogênese somática.

Sabe-se que para induzir a embriogênese somática os fatores mais importantes, entre outros, são o explante e o tipo de estresse. Os embriões zigóticos e TCLs de plântulas *in vitro* apresentaram bons resultados como explantes iniciais. Já as auxinas, agentes estressantes, 2,4-D e picloram foram importantes na indução da embriogênese somática. Em todas as suas combinações com os meios MS e Y3, e em diferentes concentrações, porém altas, acima de 150 µM/L, devido à presença de carvão ativado no meio de cultura, formaram calos embriogênicos e embriões somáticos. Com base

nisso, o próximo passo é aperfeiçoar as metodologias a fim de restringir a duas ou três concentrações de auxina e um meio de cultura para o processo de embriogênese somática. A anatomia e histoquímica aqui relatadas e mais o uso da sequencia isolada do gene *SERK*, como marcador molecular, irão auxiliar nas tomadas de decisões para adequar os futuros protocolos de embriogênese somática.

O entrave da não conversão dos embriões somáticos em plântulas, e observado nas duas metodologias testadas, é uma característica comum a todos os protocolos de embriogênese somática, onde se relata que o gargalo deste processo está em sua última fase, e a mais importante, que é conversão em plantas. Nesse trabalho o maior impedimento, ou talvez o mais visível, da conversão em plântula foi a fusão dos cotilédones dos embriões somáticos.

Algumas hipóteses sobre essa fusão são o tempo demasiado dos calos em altas concentrações de auxina. Pois, as auxinas, em especial o 2,4-D exerce dupla função, assim como induz a embriogênese pode também inibir essa mesma rota. Então um primeiro passo seria definir o período de permanência mais adequado no meio de indução. Assim, alternativas como o choque de auxina, ou seja, deixar o explante exposto a uma solução de auxina e depois inocular em meio de cultura, pode aumentar a eficiência da ação da auxina. O picloram também se mostrou eficaz na indução da embriogênese somática, apesar de ambas as auxinas, induzirem a formação de embriões somáticos, suas formas de atuação são diferentes na questão da fisiologia das células. Então é provável que a concentração ideal, o tempo de exposição, meio de cultura e outros fatores sejam diferentes para essas duas auxinas. E também diferentes dependendo do tipo de explante que se esteja trabalhando. Outra hipótese pode estar relacionada ao uso de outros fitorreguladores, não testados neste trabalho, como ABA e GA3 nas fases iniciais da embriogênese somática.

Outras sugestões são a indução de embriogênese secundária, esta se tem mostrado mais eficaz na formação de embriões somáticos e sua conversão, por exemplo, em *C. nucifera*. E o cultivo em meio líquido, na fase de multiplicação, é interessante e tem mostrado bons resultados na cultura de células. Pois, este tipo de cultivo expõe os tecidos e células responsivas em maior contato com o meio, quando comparado com o cultivo em meio sólido.