

CLÁUDIA ULISSES DE CARVALHO SILVA



**CULTIVO *IN VITRO* DE ESPÉCIES DE HELICÔNIA (*Heliconia* spp.)
MEDIANTE EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E EMBRIÕES ZIGÓTICOS.**

RECIFE - PE

2005

CLÁUDIA ULISSES DE CARVALHO SILVA

**CULTIVO *IN VITRO* DE ESPÉCIES DE HELICÔNIA (*Heliconia* spp.)
MEDIANTE EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E EMBRIÕES ZIGÓTICOS.**

TESE APRESENTADA AO PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE
PERNAMBUCO, COMO PARTE DOS REQUISITOS
PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM
BOTÂNICA.

Orientadora:

Dra. Terezinha Rangel Camara

Co-Orientadoras:

Dra. Lilia Willadino

Dra. Gladys Flávia Melo-De-Pinna

RECIFE - PERNAMBUCO

2005

**CULTIVO *IN VITRO* DE ESPÉCIES DE HELICÔNIA (*Heliconia spp.*) MEDIANTE
EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E EMBRIÕES ZIGÓTICOS.**

CLÁUDIA ULISSES DE CARVALHO SILVA

Tese defendida e aprovada pela banca examinadora:

Orientadora:

Dra. Terezinha Rangel Camara
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Examinadores:

Dra. Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho
Embrapa Agroindústria Tropical - CNPAT

Dra. Sayonara Maria de Assis Silvestre
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Dr. Júlio Zoé de Brito
Instituto de Pesquisa Agropecuária / Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Rejane Magalhães de Mendonça Pimentel
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dr. Reginaldo de Carvalho
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Aos meus maravilhosos pais, Laura Maria de Carvalho Silva e José Ulisses da Silva, pelo verdadeiro amor e valiosíssima contribuição na minha formação pessoal e profissional.

Aos meus queridos avós, Helena Santos de Carvalho (in memoriam) e Pedro Sérgio de Carvalho, pelo carinho singular e por participarem de forma ativa na minha vida.

Aos meus queridos irmãos, Clélia e Ulissinho por sempre me apoiarem e compreenderem.

Aos meus queridos sobrinhos, Luiz Henrique, Vinícius e Maria Luíza pela alegria que me proporcionam.

Aos meus verdadeiros amigos pelo companheirismo, solidariedade e amor.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A DEUS, que sempre me fortalece e me orienta, em todos os momentos de minha vida...

À minha orientadora e amiga Terezinha Rangel Camara, pela orientação e valiosa contribuição na minha formação científica e pessoal, e pelo constante apoio, principalmente nas horas em que eu mais precisei...

À minha co-orientadora e amiga Lilia Willadino, pelo exemplo de simplicidade, apoio e confiança que foram importantes na minha formação profissional, além da valiosa solidariedade em todos os momentos ...

À minha co-orientadora Gladys Flávia, pela orientação, confiança, amizade e acolhida durante o período que passei em São Paulo.

À minha querida amiga Cynthia Albuquerque, pela verdadeira e sincera amizade, pelo valioso companheirismo e solidariedade durante todo o período de convívio.

À minha amiga Sandra Roberta Maranhão, pela amizade e apoio em todos os momentos.

A Lílian Guimarães, pela sua amizade e contribuição nos trabalhos de computação gráfica.

Ao meu amigo Wellington Carneiro, pela amizade, solidariedade e valiosa colaboração. A você “Coisinha” minha eterna gratidão.

Ao amigo Júlio Zoé, pela amizade e confiança.

Às minhas amigas Virginia Sabino e Josabete Carvalho pela valiosa contribuição e apoio.

A Valéria, Moacir, Jamenson e Emmanuel do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais pelo verdadeiro apoio e valiosas colaborações.

À Coordenação do Curso de Pós Graduação em Botânica, especialmente à Dra. Ariadne Moura e à Dra. Sonia Barreto pela atenção e valiosa colaboração.

À Margarida, Simone e Silvana, da Secretaria do PPGB pela atenção e respeito. A vocês minha imensa gratidão.

A Jacira Andrade, pela compreensão e apoio nas horas de maior necessidade.

Ao Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho pelo apoio e oportunidade para a realização dos trabalhos de histologia e microscopia eletrônica de varredura no LIKA (Laboratório de Imunopatologia Keizo Azami).

A Carmelita Cavalcanti, pela valiosa colaboração na preparação das amostras para análise histológica e a Rafael Padilha e Sérgio Silva, pelo apoio nas análises de microscopia eletrônica de varredura.

A Ana Catarina (COMUT) e Waldestrudres (Tuzinha), funcionárias da Biblioteca da UFRPE, pelo respeito e presteza nas suas atividades, favorecendo o nosso trabalho.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação em Botânica, em especial Iranildo, Travassos, Giuliari e Gilberto pela contribuição nas horas que precisei.

A Emília, Carla, Aretuza e Shirley, do Laboratório de Anatomia Vegetal da UFPE pelo apoio na preparação das lâminas.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) minha eterna gratidão pela valiosa contribuição na minha formação acadêmica.

Aos professores da Universidade Federal Rural de Pernambuco que contribuíram para minha formação acadêmica, os meus sinceros agradecimentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Ensino Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao Banco do Nordeste do Brasil (BNB) pelo apoio financeiro para execução desse trabalho.

SUMÁRIO

	PAG.
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS	XI
RESUMO	XII
ABSTRACT	XIV
1.0 – INTRODUÇÃO GERAL	1
2.0 – OBJETIVOS	4
3.0 – REVISÃO DE LITERATURA	6
3.1 – Considerações gerais sobre a floricultura	7
3.2 – Considerações gerais sobre as helicônias	8
3.3 – Cultivo <i>in vitro</i>	10
3.3.1 – Micropropagação	10
a) Embriogênese somática	11
b) Cultivo <i>in vitro</i> de embriões zigóticos.....	13
3.4 – Utilização de isoenzimas como ferramenta para análise da variabilidade genética	15
4.0 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17
5.0 – TRABALHOS	25
TRABALHO I: Embriogênese somática em helicônia a partir de secções de ovários e embriões zigóticos.	26
• RESUMO	28
• ABSTRACT	29
• INTRODUÇÃO	30
• MATERIAL E MÉTODOS	31
• RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
• CONCLUSÕES	43
• AGRADECIMENTOS	44
• REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

TRABALHO II: Propagação de <i>Heliconia bihai</i> (L.) L. cv. Lobster Claw Two mediante o cultivo <i>in vitro</i> de embriões zigóticos.	50
• RESUMO	52
• ABSTRACT	53
• INTRODUÇÃO	54
• MATERIAL E MÉTODOS	55
• RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
• CONCLUSÕES	70
• AGRADECIMENTOS	70
• REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
6.0 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	75
7.0 – ANEXOS	78
Anexo 1 – Composição dos sais inorgânicos do meio nutritivo Murashige & Skoog (1962).	79
Anexo 2 – Composição das soluções tampões utilizadas na análise isoenzimática.	79
Anexo 3 – Protocolos de revelação para cada sistema isoenzimático utilizado.....	79
Anexo 4 – Normas da Revista Acta Botanica Brasilica.....	81
Anexo 5 – Normas da Revista Brasileira de Botânica.....	84

LISTA DE FIGURAS

	PAG.
REVISÃO DE LITERATURA	
Figura 1 – Aspecto geral do rizoma de helicônia	9
Figura 2 – Inflorescências de helicônias: <i>H. chartacea</i> Lane ex Barreiros cv. Sexy Pink (A) (Barra= 10 cm); <i>H. chartacea</i> Lane ex Barreiros cv. Sexy Scarlet (B) (Barra= 13,33 cm) e <i>H. bihai</i> (L.) L. cv. Lobster Claw Two (C) (Barra= 10 cm).	9
Figura 3 – Reinterpretação da hipótese proposta por Christianson e Warnick (1988) citada por Peres (2002) para o entendimento da competência organogenética. Genes de sensibilidade = envolvidos na percepção e transdução do sinal para auxinas (AIA e 2,4-D) e citocininas (Cks); genes de metabolismo hormonal = responsáveis pelo estabelecimento hormonal endógeno necessário para a regeneração; genes homeóticos = controlam a formação de órgãos e, portanto podem estar associados à regeneração de novas gemas caulinares ou raízes.	13
TRABALHO I	
Figura 1 – Aspecto geral dos calos, visualização de células pró-embriogênicas e avaliação histológica dos calos da cv. Sexy Pink aos 90 dias de cultivo: (1A) Calos com nódulos amarelados e embriões somáticos (setas) obtidos no tratamento A2,5D5 (Barra = 1,25mm); (1B) Presença de estrutura esverdeada (seta) no tratamento A1,5D3 (Barra = 0,83mm); (1C) Células pró-embriogênicas mostrando reações à presença do carmim acético no tratamento A2,5D5 (Barra = 1mm); (1D) Seção longitudinal do calo mostrando a proliferação de células pró-embriogênicas na superfície do nódulo (seta), no tratamento A2,5D5 (Barra = 25mm).	37
Figura 2 – Aspecto geral de células embriogênicas em calos da cv. Sexy Pink em microscopia eletrônica de varredura (MEV), aos 90 dias de cultivo no tratamento A2,5D5: (2A) Visão geral do agrupamento de células embriogênicas com aspecto globular; (2B) Divisão anticlinal da célula embriogênica (seta); (2C) Células em processo de divisão (seta) e presença de embrião globular (EG); (2D) Embrião somático de forma cilíndrica (seta).....	38
Figura 3 - (3A) Calos obtidos na cv. Sexy Scarlet no tratamento A1D5, provenientes de secções de ovário aos 90 dias de cultivo (seta) (Barra = 1,25mm); (3B) Calos obtidos na cv.	

Sexy Pink no tratamento A1D10, provenientes de secções de ovário após 30 dias de cultivo (setas) (Barra = 1,2 mm). 41

Figura 4 – Aspecto geral e histológico do calo e do embrião zigótico de *H. bihai* (L.) L. cv. Lobster Claw Two aos 90 dias de cultivo em meio MS sem regulador de crescimento: **(4A)** Calos nodulares a partir de embrião zigótico provenientes de fruto maduro, apresentando características embriogênicas (Barra = 1,25mm); **(4B)** Vista longitudinal de embriões somáticos (setas) a partir de embrião zigótico provenientes de fruto maduro (C = Coleoptile; MAC = Meristema apical caulinar) (Barra = 0,25mm); **(4C)** Embrião zigótico provenientes de fruto imaturo intumescido (Barra = 0,83mm)..... 43

TRABALHO II

Figura 1 – Seção longitudinal em embriões zigóticos de *H. bihai* (L.) L. cv. Lobster Claw Two: **(1A)** Embrião zigótico proveniente de fruto imaturo, evidenciando o opérculo (OP), a parede do opérculo (PO), o endosperma (END) e o início da diferenciação do ápice caulinar (AC) (Barra = 1mm); **(1B)** Embrião zigótico proveniente de fruto maduro apresentando a região do ápice caulinar (AC), a protoderme (PD), o meristema fundamental (MF) e o procâmbio (PC) (Barra = 1mm). 60

Figura 2 – Plantas de *H. bihai* (L.) L. cv. Lobster Claw Two proveniente do cultivo *in vitro* de embriões zigóticos maduros aos 60 dias de cultivo: **(2A)** Planta cultivada em meio ½ MS com 30 g.L⁻¹ de sacarose (Barra = 1,19cm); **(2B)** Planta cultivada em meio ½ MS com 30 g.L⁻¹ de glicose (Barra = 0,83cm). 62

Figura 3 – Representação esquemática dos zimogramas dos sistemas isoenzimáticos (Peroxidase, Esterase e Fosfatase ácida) das plantas micropropagadas a partir de embriões zigóticos (C) e da planta mãe (PM) de *Heliconia bihai* (L.) L. cv. Lobster Claw Two..... 68

Figura 4 – Representação esquemática dos zimogramas dos sistemas isoenzimáticos (Malato desidrogenase, Álcool desidrogenase e Glutamato Oxaloacetato Transaminase) das plantas micropropagadas a partir de embriões zigóticos (C) e da planta mãe (PM) de *Heliconia bihai* (L.) L. cv. Lobster Claw Two. 69

LISTA DE TABELAS

	PAG.
TRABALHO I	
Tabela 1 - Índice de formação de calos (IFC) a partir de secções de ovário de <i>H. chartacea</i> Lane ex Barreiros cv. Sexy Pink aos 90 dias em meios com diferentes combinações de AIA+2,4-D (Ensaio I) e BAP+2,4-D (Ensaio II) (mg.L ⁻¹).	34
Tabela 2 - Índice de formação de calos (IFC) a partir de secções de ovário das cultivares 'Sexy Pink' e 'Sexy Scarlet' da espécie <i>H. chartacea</i> Lane ex Barreiros aos 90 dias, em meios com diferentes combinações de AIA e 2,4-D (mg.L ⁻¹) (Ensaio III).	39
TRABALHO II	
Tabela 1 – Desenvolvimento de plantas de <i>H. bihai</i> (L.) L. cv. Lobster Claw Two, a partir de embrião zigótico proveniente de fruto maduro, aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i> , sob diferentes fontes de carboidratos e concentrações de sais no meio MS.	62
Tabela 2 – Desenvolvimento de plantas de <i>H. bihai</i> (L.) L. cv. Lobster Claw Two, a partir de embrião zigótico proveniente de fruto maduro, aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i> , sob diferentes fontes de carboidratos e concentrações de GA ₃ em meio MS.	63
Tabela 3 - Desenvolvimento de plantas de <i>H. bihai</i> (L.) L. cv. Lobster Claw Two, a partir de embrião zigótico proveniente de fruto maduro, aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i> , sob diferentes concentrações de GA ₃ e de sais do meio MS.....	64
Tabela 4 – Desenvolvimento de gemas de <i>H. bihai</i> (L.) L. cv. Lobster Claw Two aos 45 dias durante a fase de multiplicação.	65
Tabela 5 – Efeito da época de subcultivo sobre a multiplicação e tamanho das gemas e a altura das plantas de <i>H. bihai</i> (L.) L. cv. Lobster Claw Two.	65

RESUMO

Visando estabelecer protocolos para a indução de calos embriogênicos em espécies de helicônia, foram realizados dois experimentos, onde o primeiro constou de três ensaios. O primeiro ensaio consistiu de combinações de AIA (ácido 3-indolilacético) (0; 1; 1,5; 2 e 2,5 mg.L⁻¹) com 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) (0; 3; 4; e 5 mg.L⁻¹) e o segundo ensaio combinou o BAP (6-benzilaminopurina) (0; 1; 1,5; 2; 2,5 mg.L⁻¹) com 2,4-D (0; 3; 4; e 5 mg.L⁻¹), utilizando em ambas seções de ovários de *H. chartacea* Lane ex Barreiros cv. Sexy Pink. O terceiro ensaio foi estabelecido a partir de combinações entre três níveis de AIA (0; 1 e 2 mg.L⁻¹) e cinco níveis de 2,4-D (0; 5; 10; 15 e 20 mg.L⁻¹), utilizando como explante, seções de ovários das cultivares 'Sexy Pink' e 'Sexy Scarlet' da espécie *H. chartacea*. No segundo experimento foi utilizado como explante, embriões zigóticos de *H. bihai* (L.) L. cv. Lobster Claw Two em combinações de AIA (0; 1 e 2 mg.L⁻¹) e 2,4-D (0; 5; 10; 15 e 20 mg.L⁻¹). As avaliações em ambos experimentos foram realizadas aos 30, 60 e 90 dias após a inoculação, considerando o aspecto dos calos e a presença de nódulos, através de observações visuais com o auxílio de estereomicroscópio, além de análises citoquímica, histológica e de microscopia eletrônica de varredura. No experimento 1 o índice de formação de calos nos explantes tratados com AIA+2,4-D (Ensaio I), foi superior àquele observado com as combinações de BAP+2,4-D (Ensaio II), ao final dos 90 dias de cultivo, onde observou-se a presença de células pró-embriogênicas. No terceiro ensaio a cultivar 'Sexy Pink' apresentou um maior índice de formação de calos do que a cultivar 'Sexy Scarlet', mas, esses calos não apresentaram a formação de embriões somáticos ao final dos 90 dias de cultivo. No segundo experimento, a formação de pró-embriões somáticos ocorreu apenas nos embriões zigóticos provenientes de frutos maduros de *H. bihai* (L.) L. cv. Lobster Claw Two cultivados na ausência de reguladores de crescimento. Objetivando avaliar o processo de micropropagação a partir do cultivo de embriões zigóticos, foi realizada inicialmente uma análise da estrutura interna do embrião proveniente de frutos imaturos e maduros. Para isto, foram incluídos em parafina e seccionados em micrótomo. Os embriões provenientes de frutos imaturos e maduros foram inoculados em meio MS (Murashige e Skoog) com diferentes concentrações de sais (MS completo e ½ MS), de GA₃ (ácido giberélico) (0; 2,5 e 5,0 mg.L⁻¹), além de sacarose ou glicose (30 g.L⁻¹), para avaliar a conversão do embrião em planta. As avaliações considerando o desenvolvimento da parte aérea e o número de raízes foram realizadas aos 15, 30 e 60 dias após a inoculação, com base em observações visuais e parâmetros quantitativos. Em seguida, as plantas obtidas foram repicadas e transferidas para meio MS (MS completo ou ½ MS), acrescido de 0 ou 2,5 mg.L⁻¹ BAP com o objetivo de avaliar a multiplicação aos 30 e 45 dias após a inoculação. Para avaliar a variabilidade genética das plantas provenientes de embriões zigóticos, utilizou-se sistemas isoenzimáticos (PO, EST, ACP, GOT,

ADH e MDH). Avaliando a estrutura interna dos embriões, observou-se que os embriões maduros apresentam tecidos em estádios de diferenciação mais avançados do que os embriões imaturos, como já era esperado. Na fase de conversão dos embriões em plantas, observou-se que 85% dos embriões provenientes de frutos maduros converteram-se em plantas normais em meio MS reduzido à metade da concentração dos sais, utilizando a sacarose como fonte de carboidrato, enquanto que os embriões cultivados em meios com glicose, apenas 41% converteram-se em plantas. Na fase de multiplicação, as plantas cultivadas em meio MS com 50% da concentração dos sais acrescido de 2,5 mg.L⁻¹ de BAP, apresentaram maior número de gemas aos 45 dias de cultivo. Quanto a análise isoenzimática foi observado algumas alterações nos padrões isoenzimáticos no que se refere a intensidade de coloração e a migração de algumas bandas. Esses comportamentos podem estar associados respectivamente, a diferença de idade entre a planta matriz e as plantas obtidas *in vitro* e/ou alguma variação no fenótipo eletroforético das plantas provenientes do cultivo *in vitro* de embrião zigótico.

Palavras-chave: helicônia; calogênese; regulador de crescimento; micropropagação; sacarose; glicose; histologia; microscopia eletrônica de varredura; isoenzimas.

ABSTRACT

The aim of this work was to establish protocols for the induction of embryogenic calluses in heliconia species. Two experiments were carried out. The first one had three assays. The first assay consisted of combinations of AIA (indole-3-acetic) (0, 1, 1.5, 2, and 2.5 mg.L⁻¹) with 2,4-D (2,4-dichlorofenoxyacetic acid) (0, 3, 4, and 5 mg.L⁻¹) and the second assay combined BAP (6-benzylamino purine) (0, 1, 1.5, 2, and 2.5 mg.L⁻¹) with 2,4-D (0, 3, 4, and 5 mg.L⁻¹). Sections of ovaries of *H. chartacea* Lane ex Barreiros cv. Sexy Pink were used in the assays above. The third assay was established from combinations among three levels of AIA (0, 1 and 2 mg.L⁻¹) and five levels of 2,4-D (0, 5, 10, 15, and 20 mg.L⁻¹) within cultivars 'Sexy Pink' and 'Sexy Scarlet' of *H. chartacea*. The second experiment used explant zygotic embryos of *H. bihai* cv. (L.) L. Lobster Claw Two in combinations of AIA (0, 1 and 2 mg.L⁻¹) and 2,4-D (0, 5, 10, 15, and 20 mg.L⁻¹). Evaluations in both experiments were carried out on days 30, 60 and 90 after inoculation. Aspects of the callus and the presence of nodules were assessed by visual observations with the help of a stereomicroscope and cytochemical, histologic and scanning electron microscopy analyses were performed. At the end of experiment 1, the index of formation of callus in explants treated with AIA+2,4-D (Assay 1) was greater than that observed with the combinations of BAP+2,4-D (Assay 2). The AIA+2,4-D assay also produced proembryonary cells. In the third assay the 'Sexy Pink' cultivar showed a greater index of formation of callus than the 'Sexy Scarlet' cultivar, but these calluses didn't show somatic embryos at the end of 90 days of cultivation. In the second experiment, formation of somatic proembryos occurred only in zygotic embryos from mature fruit of *H. bihai* (L.) L. cv. Lobster Claw Two cultivated in the absence of growth regulators. The objective of the second work was to evaluate micropropagation processes for cultivation of zygotic embryos. Initially, an analysis of the internal structure of the embryo was carried out using immature and mature fruits. This was accomplished by embedding the fruits in paraffin and sectioning them with a microtome. Embryos from immature and mature fruits were inoculated in an MS (Murashige and Skoog) environment with different concentrations of salts (full MS and ½ MS), AG₃ (0, 2.5 and 5 mg.L⁻¹) and saccharose or glucose (30 g.L⁻¹), and their development was evaluated. Evaluations were carried out 15, 30 and 60 days after inoculation based on visual observations, quantitative parameters, and number of roots. Then, plants were replicated and transferred to an MS environment (full MS or ½ MS), added 0 or 2.5 mg.L⁻¹ BAP, with the objective to evaluate their development after 30 and 45 days after inoculation. The genetic variability of plants from zygotic embryos was estimated using isoenzymatic analyses (PO, EST, ACP, GOT, ADH, and MDH). The internal structure of mature embryos showed tissues in more advanced stages of differentiation than immature embryos, as expected. In the ½ MS environment

with saccharose, 85% of the inoculated embryos were converted into plants, just 41% converted into plants in the glucose environment. During the multiplication phase, plants cultivated in an MS environment with a 50% concentration of salts and 2.5 mg.L⁻¹ of BAP showed a greater number of buds. The isoenzymatic analyses showed some changes of isoenzymatic patterns, for example in intensity of coloration and migration of some bands. These results can be associated respectively with the difference of the ages among mother plant and plants obtained *in vitro* and/or variations in eletrophoretic phenotypes of the plants from *in vitro* cultivation of zygotic embryos.

Keywords: heliconia, callogenesis, growth regulator, micropropagation, saccharose, glucose, histology, scanning electron microscopy, isozymes.

1.0 - INTRODUÇÃO GERAL

A floricultura, em seu sentido mais amplo, abrange o cultivo de plantas ornamentais, desde flores de corte e plantas envasadas, floríferas ou não, até a produção de sementes, bulbos e mudas de árvores de grande porte. É um setor agrícola altamente competitivo, que exige a utilização de tecnologias avançadas, um profundo conhecimento técnico pelo produtor e um sistema eficiente de distribuição e comercialização (SILVEIRA, 1993).

As espécies de flores tropicais, devido à sua beleza, exotividade e durabilidade pós-colheita, têm atraído o mercado de flores. Nesse cenário, o Brasil possui grande contingente de espécies nativas ou introduzidas de flores e plantas ornamentais, que se enquadram nesses padrões de referência, e as helicônias destacam-se dentro desse panorama (LOPES; GRAZIANO, 2001).

Jamaica, Costa Rica, Estados Unidos (Havaí e Flórida), Honduras, Porto Rico, Suriname e Venezuela são os principais produtores de helicônia. Os cultivos comerciais na Holanda, Alemanha, Dinamarca e Itália são mantidos sob condições de temperatura, umidade e luminosidade controlada, o que encarece o produto (BERRY E KRESS, 1991; CASTRO, 1995; LAMAS, 2001). No Nordeste do Brasil pode ser praticado um menor preço na comercialização do produto, tendo em vista o mais baixo custo de produção devido às condições edafoclimáticas favoráveis para o cultivo de espécies tropicais (CHAGAS, 2000).

As helicônias são propagadas convencionalmente a partir dos rizomas. Esse sistema de propagação vegetativa, além de limitar a quantidade de mudas disponíveis, apresenta sérios riscos de disseminação de pragas e doenças que podem comprometer a produção e, conseqüentemente, a comercialização do produto final (CRILEY, 1989; CASTRO, 1995). A ausência de mudas de qualidade fitossanitária compromete tanto a produção de mudas de helicônia pelos métodos convencionais, como a produção das inflorescências. Portanto, a propagação vegetativa convencional é um dos obstáculos para a comercialização de espécies com potencial econômico.

A micropropagação é uma excelente alternativa para proporcionar a produção massiva de mudas de espécies de *Heliconia* spp. Dentre as técnicas de micropropagação, a embriogênese somática e o cultivo de embriões zigóticos são umas das mais viáveis para obtenção de mudas de helicônia isentas de patógenos, pois a micropropagação via ápices caulinares, depara-se com problemas de contaminação endofítica, impossibilitando a micropropagação a partir desse explante, conforme registrado por diversos autores (NATHAN et al., 1992; NANNETTI, 1994; GUAMANTICA, 1998; ATEHORTUA et al., 1999; SANTOS, 2000; DIAS; RODRIGUES, 2001). Sendo assim, se faz necessário avaliar novos explantes, e conseqüentemente, outras técnicas de micropropagação para viabilizar a multiplicação *in vitro* de helicônias, pois trata-se de uma cultura com grande expansão no setor agrícola mundial.

Dentre as técnicas de micropropagação destacam-se a embriogênese somática utilizando explantes florais como uma das alternativas viáveis para contornar o problema de contaminação endofítica (ATEHORTUA et al., 1999) e o cultivo *in vitro* de embriões zigóticos (DURVAL, 2004).

A embriogênese somática, também conhecida como embriogênese adventícia ou assexual, é o processo pelo qual células haplóides ou somáticas se desenvolvem através de diferentes estádios embriogênicos dando origem a uma planta, sem que ocorra a fusão de gametas (WILLIAMS; MAHESWARAN, 1986). Esse processo constitui um exemplo da expressão da totipotencialidade das células das plantas, postulado por Haberlandt (1902).

O cultivo *in vitro* de embriões zigóticos é uma das técnicas de micropropagação que tem sido usada para: 1) superar a dormência de sementes, devido à imaturidade do embrião ou à presença de substâncias inibidoras no endosperma; 2) estudar os aspectos nutricionais e fisiológicos do desenvolvimento do embrião; 3) testar a viabilidade de sementes; 4) recuperar híbridos raros de cruzamentos incompatíveis; e 5) como fonte de explantes com tecido de elevada totipotência. Atualmente, uma das aplicações da técnica de cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de maior relevância é a micropropagação clonal, devido ao alto potencial regenerativo do embrião, como consequência da sua natureza juvenil (HU; FERREIRA, 1997).

Dessa forma, embriogênese somática e o cultivo *in vitro* de embriões zigóticos despontam como alternativas viáveis e seguras para a produção em grande escala de mudas isentas de patógenos. Contudo, o sucesso da produção em larga escala depende do ajuste de um protocolo adequado para cada uma das técnicas e, conseqüentemente, para cada espécie ou variedade a ser multiplicada *in vitro* (TORRES et al., 1998). Considerando a importância das helicônias e as vantagens das técnicas aplicadas ao cultivo *in vitro*, torna-se necessária à realização de estudos que avaliem essas técnicas de micropropagação, na tentativa de solucionar o problema da produção de mudas de helicônia com qualidade fitossanitária.

2.0 - OBJETIVOS

2.1 – Objetivo Geral

- Estabelecer protocolos para indução de embriogênese somática e o cultivo *in vitro* de embriões zigóticos, visando a micropropagação de espécies de helicônia (*Heliconia* spp.).

2.2 – Objetivos Específicos

- Estabelecer meios de cultivo que proporcionem a obtenção de embriões somáticos a partir de secções de ovários de *Heliconia chartacea* Lane ex Barreiros cv. Sexy Pink e *H. chartacea* Lane ex Barreiros cv. Sexy Scarlet e, a partir de embriões zigóticos de *H. bihai* (L.) L. cv. Lobster Claw Two;
- Identificar meios que favoreçam o desenvolvimento de embriões zigóticos de *H. bihai* (L.) L. cv. Lobster Claw Two para a produção de mudas através da micropropagação;
- Verificar a variabilidade genética das plantas provenientes dos embriões zigóticos de *H. bihai* (L.) L. cv. Lobster Claw Two, através de análises isoenzimáticas.

3.0 - REVISÃO DE LITERATURA

3.1 – Considerações gerais sobre a floricultura

A floricultura é uma das atividades mais adiantadas da evolução agrícola, pois exige alta tecnologia e um sistema rápido de distribuição e comercialização. Esse setor agrícola apresenta alta rentabilidade por área, demanda grande quantidade de mão-de-obra, gerando, conseqüentemente, grande quantidade de empregos. Além disso, apresenta-se como uma valiosa opção de fixação do homem no campo e também de melhor aproveitamento dos minifúndios, antes considerados impróprios para outras atividades agropecuárias (SATURNINO, 1979).

Em alguns países da Europa, nos Estados Unidos, Japão e Israel, a floricultura está bem difundida comercialmente. Em Israel, tem sido uma opção para o pequeno agricultor que busca aumentar seus lucros com a agricultura intensiva. Além disso, Israel tem exportado flores para a Europa, quando os países europeus se encontram em épocas de condições climáticas desfavoráveis (SELIGMAN, 1983). O mercado mundial de flores vem apresentando crescimento anual de 10% desde a década de 90, tornando-se um dos segmentos econômicos de grande importância para a Organização Mundial de Comércio (OMC) (FERREIRA et al., 2002). Atualmente, a tendência do mercado mundial de flores está voltada para as espécies tropicais, por sua beleza exótica e durabilidade na pós-colheita.

No Brasil, o interesse pela floricultura e plantas ornamentais teve início na década de 70, a princípio, de maneira bem amadora, mas logo cresceu e adquiriu aspecto comercial. A floricultura brasileira vem se expandindo e colhendo resultados positivos, mesmo em períodos de crise (FERREIRA et al., 2002). A profissionalização e o dinamismo comercial da floricultura são fenômenos relativamente recentes no Brasil. Até o ano de 2001, no entanto, essa atividade já contabilizava mais de 2,6 mil produtores, cultivando uma área de cerca de 5,2 mil hectares, em 304 municípios brasileiros. Apenas na atividade agrícola, a floricultura gera, na média nacional, 3,7 empregos diretos por hectare, sendo que 94,4% deles são preenchidos com mão-de-obra permanente (NOGUEIRA JÚNIOR, 2001).

Durante os seis primeiros meses de 2003, os resultados das exportações brasileiras de flores e plantas ornamentais mantiveram-se em permanente crescimento em relação ao mesmo período dos anos anteriores, o que resultou numa efetiva expansão de negócios de 20,13% em relação aos meses de janeiro a junho de 2002 e na manutenção da expectativa de fechamento do ano com vendas externas próximas a US\$ 20 milhões. As flores frescas cortadas (flores de corte), decididamente representam um dos mais altos potenciais de crescimento das exportações da floricultura nacional, agregando produtos de alta qualidade e competitividade no mercado internacional e introduzindo novos produtos, como as flores tropicais nordestinas, entre as quais destacam-se as helicônias. O setor saltou de um patamar de vendas de US\$ 151 mil, de janeiro a junho de 2001, para US\$ 473 mil, no mesmo período em 2002 e US\$ 802 mil, em 2003. O mercado

de maior expansão vem sendo o dos Estados Unidos, que absorveu no ano de 2003, 82,6% das vendas, no valor de US\$ 662,7 mil. Outros compradores importantes são Holanda, Portugal, Espanha e Uruguai (JUNQUEIRA; PEETZ, 2003).

No Brasil, o Estado de São Paulo é o maior pólo de produção de flores. Outros estados, entretanto, principalmente os estados da região Nordeste, começaram a investir na floricultura tropical e ampliaram significativamente a produção nos últimos anos, pois nessa região as condições edafoclimáticas são extremamente favoráveis para o cultivo de plantas ornamentais tropicais, favorecendo significativamente o desenvolvimento da floricultura nessa região (CHAGAS, 2000).

3.2 – Considerações gerais sobre as helicônias

As helicônias estão entre as plantas ornamentais tropicais mais apreciadas pelos consumidores, principalmente em função da beleza e longevidade das suas inflorescências. O gênero *Heliconia*, pertencente à família Heliconiaceae da ordem Zingiberales, é constituído por plantas herbáceas, eretas, de 0,5 a 10,0 m de altura, conforme a espécie, e com folhas de vários tamanhos (CASTRO, 1995). As helicônias apresentam rizoma subterrâneo (Figura 1) e pseudocaulé formado pela justaposição dos pecíolos das folhas. Essas plantas emitem inflorescências terminais, eretas ou pendentes, com brácteas coloridas, principalmente em tons vermelho, alaranjado a amarelo. São utilizadas, principalmente, em jardinagem e como flores de corte (DANIELS; STILES, 1979; CASTRO, 1995; PAIVA, 1998). As inflorescências de helicônias, além da beleza e exotividade, apresentam resistência ao transporte e durabilidade pós-colheita. Esses fatores conferem a essas espécies, perspectivas bastante promissoras como flor de corte, tanto no mercado interno como no externo (CASTRO, 1995). Entre as espécies de helicônia podemos destacar *H. chartacea* Lane ex Barreiros cv. Sexy Pink e cv. Sexy Scarlet, devido à beleza e exotividade da inflorescência, pois são plantas que tanto a inflorescência como a muda, alcançam altos valores no mercado. As cultivares ‘Sexy Pink’ e ‘Sexy Scarlet’ apresentam inflorescências pendentes em mais de um plano, onde a cv. Sexy Pink possui brácteas de coloração rósea com bordas esverdeadas, enquanto que a cv. Sexy Scarlet as brácteas são avermelhadas com as bordas também esverdeadas (Figura 2) (ABALO, 1999). O cultivo dessas cultivares ainda é restrito, pois pertencem a uma espécie com baixa produção de mudas. A espécie *Heliconia bihai* (L.) L. cv. Lobster Claw Two apresentam inflorescências eretas de coloração vermelho-alaranjada com as bordas verdes (Figura 2). Essa espécie apresenta resistência e facilidade ao transporte, durabilidade na pós-colheita, sendo uma espécie de grande importância econômica nos mercados nacional e internacional.

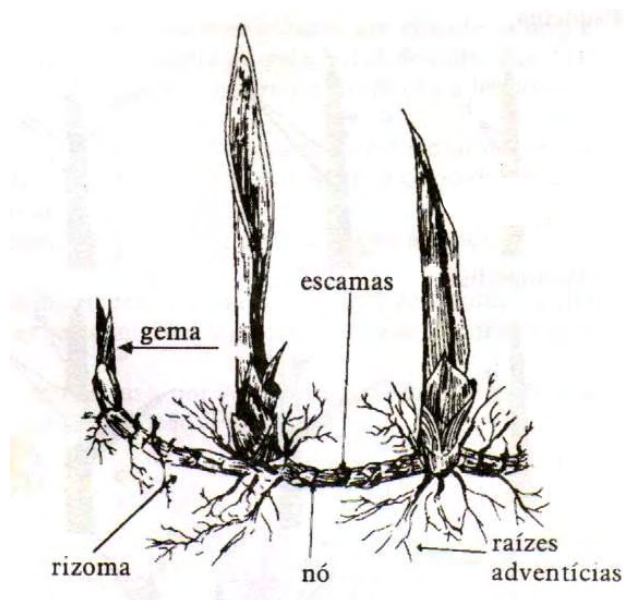


Figura 1 – Aspecto geral do rizoma de helicônia.



Figura 2 – Inflorescências de helicônias: *Heliconia chartacea* Lane ex Barreiros cv. Sexy Pink (A) (Barra= 10 cm); *H. chartacea* Lane ex Barreiros cv. Sexy Scarlet (B) (Barra= 13,33 cm) e *H. bihai* (L.) L. cv. Lobster Claw Two (C) (Barra= 10 cm).

3.3 – Cultivo *in vitro*

3.3.1 – Micropropagação

A propagação vegetativa *in vitro*, também denominada de micropropagação devido ao tamanho dos propágulos utilizados, é a aplicação mais prática do cultivo *in vitro* de vegetais e a de

maior impacto para agricultura. Conforme o explante utilizado e sua subsequente manipulação, a micropropagação pode ser conduzida de três maneiras: (1) a partir da multiplicação por meio de gemas; (2) a partir da multiplicação mediante indução de gemas adventícias, ou seja, por organogênese; (3) ou a partir da multiplicação via embriogênese somática (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Dentro da terminologia do cultivo *in vitro* de vegetais, explante é qualquer segmento de tecido oriundo de uma planta matriz utilizado para iniciar o desenvolvimento de uma cultura *in vitro*, normalmente com o objetivo de estabelecer um protocolo para propagação de um genótipo com características agronômicas satisfatórias. Assim, o explante pode ser um ápice caulinar, uma gema axilar, um segmento de folha jovem, uma antera, um ovário ou até um embrião zigótico (CID, 2001). Em helicônias, alguns desses explantes vêm sendo utilizados, no entanto, sem resultados muito expressivos. Nathan et al. (1992) relataram a obtenção de plantas de *H. psittacorum* a partir de ápices caulinares cultivados *in vitro*. Por outro lado, Nannetti (1994) observou que o cultivo *in vitro* de ápices caulinares de *Heliconia* sp. apresentavam crescimento bastante lento e também mostravam alto índice de oxidação e necrose dos tecidos. Além disso, tem-se observado que durante a fase inicial do estabelecimento dos explantes (ápices caulinares) de helicônia, ocorre com frequência o aparecimento de uma bactéria endofítica (*Pseudomonas solanacearum*) (DIAS; RODRIGUES, 2001), interferindo de forma negativa no desenvolvimento do explante. Esse comportamento já foi observado por diversos autores (NATHAN et al., 1992; NANNETTI, 1994; GUAMANTICA, 1998; ATEHORTUA et al., 1999; SANTOS, 2000). Portanto, se faz necessário buscar alternativas para solucionar o problema de contaminação, como a seleção de novos explantes, sugerido por Atehortua et al. (1999).

Teoricamente, qualquer tecido pode ser utilizado como explante, em vista da totipotência das células vegetais. Na prática, entretanto, procura-se utilizar explantes que contenham maior proporção de tecido meristemático ou que tenham maior capacidade de expressar a totipotência (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Dependendo da técnica a ser aplicada, a seleção do explante é primordial. Embriões zigóticos, por exemplo, são utilizados atualmente com muita frequência como fonte de explantes com tecido de elevada totipotência. Além disso, estão alojados dentro de um ambiente estéril, protegidos pelas paredes dos ovários (HU; FERREIRA, 1998), representando, portanto, uma excelente alternativa para micropropagar plantas livres de contaminação.

O cultivo *in vitro* de embriões zigóticos e a embriogênese somática são técnicas de micropropagação, que podem viabilizar o processo de produção de mudas de *Heliconia* spp. *in vitro*, com qualidade fitossanitária.

a) Embriogênese Somática

A embriogênese somática consiste em eventos ontogenéticos do processo embrionário zigótico a partir de células somáticas, sendo considerada uma das técnicas de micropropagação com grande potencial de aplicação para a propagação em larga escala de genótipos superiores (Guerra et al., 1999).

A embriogênese somática permite uma grande produção de plantas, com aplicação direta na agricultura (CUNHA; FORTES, 1992; KUEHNLE et al., 1992; HAMIDAH et al., 1997; SANCHEZ et al., 2000), sendo também utilizada para a produção de plantas transgênicas e de sementes sintéticas (GUERRA et al., 2001). Devido a essas aplicações, o controle da regeneração de plantas por embriogênese somática é, atualmente, um dos principais objetivos da biotecnologia vegetal.

A embriogênese somática caracteriza-se pelo desenvolvimento de embriões a partir de células somáticas ou células haplóides, por meio de diferentes estádios embriogênicos, originando uma planta sem que ocorra a fusão de gametas (WILLIAMS; MAHESWARAN, 1986). Na embriogênese somática *in vitro* ou induzida, células haplóides ou diplóides (somáticas) em diferentes estádios de diferenciação podem, se adequadamente induzidas por estímulos ambientais ou químicos, serem reprogramadas e adquirirem novas competências morfogênicas (GUERRA et al., 1997). Essa técnica foi descrita, pela primeira vez por Steward et al. (1958) e Reinert (1958), em cenoura. A embriogênese somática tem sido relatada para mais de 300 espécies (BAJAJ, 1995).

Segundo Sharp et al. (1980), existem dois padrões básicos de expressão da embriogênese somática *in vitro*, o primeiro corresponde ao modelo direto (embriogênese direta), no qual os embriões somáticos originam-se dos tecidos-matrizes sem a formação de estádios intermediários de calo e o segundo padrão refere-se ao modelo indireto (embriogênese indireta), no qual os embriões somáticos formam-se a partir de um calo, que apresenta células em diferentes estádios de determinação, as quais podem adquirir novas competências, mediadas por mensageiros químicos específicos.

Independente do padrão direto ou indireto, as células-mães embriogênicas apresentam um conjunto de características comuns ao comportamento de células embrionárias em divisão ativa. Essas características incluem um tamanho reduzido ou variando entre 100-200µm, conteúdo citoplasmático denso, núcleos grandes com nucleólos proeminentes, vacúolos pequenos e presença de grãos de amido. As propriedades histoquímicas dessas células indicam intensa atividade metabólica e de síntese de RNA (TISSERAT et al., 1979; SHARP et al., 1980; VASIL, 1982; DURZAN, 1988; GUERRA et al., 1999; MATHEW; PHILIP, 2003; KIM et al., 2003).

O desenvolvimento da embriogênese somática pode ser caracterizado por duas fases: a primeira fase denominada de fase de indução, onde as células somáticas diferenciadas adquirem

competência embriogênica e se multiplicam como células embriogênicas, e a segunda fase, denominada de fase de expressão, na qual as células embriogênicas exibem a sua competência embriogênica, diferenciando-se em embriões somáticos (JIMÉNEZ, 2001).

O processo inicial para a formação de células embriogênicas requer a utilização de explantes apropriados e a adição de reguladores de crescimento de plantas (RCPs) ao meio nutritivo, com destaque para as auxinas e as citocininas (MATSUMOTO et al., 1996; TOMBOLATO; QUIRINO, 1996). As auxinas promovem a formação de células embriogênicas, possivelmente por iniciar a ativação dos genes. Segundo Pierik et al. (1979) e Sánchez et al. (2000), a presença de uma fonte de auxina (2,4-diclofenoxiacético) e outra de citocinina (6-benzilaminopurina) promoveram o aparecimento de embriões somáticos de *Anthurium andraeanum*. Em *H. psittacorum* a formação de calos organogênicos só foi possível em presença de altas concentrações de auxina (17,68 mg. L⁻¹ de 2,4-D) (GOH et al., 1995). Por outro lado, alguns explantes possuem células embriogênicas pré-existent, formando embriões somáticos *in vitro* independente de RCPs (TRIGIANO; GRAY, 2000).

O metabolismo hormonal do explante é um fator associado à competência organogênica, pois é ele quem determinará, o balanço hormonal endógeno para indução da organogênese ou embriogênese (Figura 3). Portanto, o efeito diferencial dos vários tipos de auxinas e citocininas quando aplicados ao meio de cultura, pode ser também correlacionado com o fato de cada um deles interferir de modo particular no metabolismo hormonal endógeno (PERES, 2002). Segundo Ammirato (1983), o tipo e o estágio de desenvolvimento do explante, além das condições ambientais em que as plantas matrizes são mantidas, influenciam de forma expressiva a capacidade embriogênica.

Pedroso e Pais (1995) observaram que, em *Camellia japonica*, determinadas regiões do explante foliar apresentaram embriogênese somática direta, enquanto que em outras regiões da folha ocorreu rizogênese direta e calos organogênicos. Cunha e Fortes (1992) notaram que a região da base da folha de kiwi (*Actinidia deliciosa*), próxima ao pecíolo, apresentou maior taxa de formação e de crescimento de calos. Esses resultados comprovam que em um mesmo explante podem existir células em diferentes estádios de diferenciação.

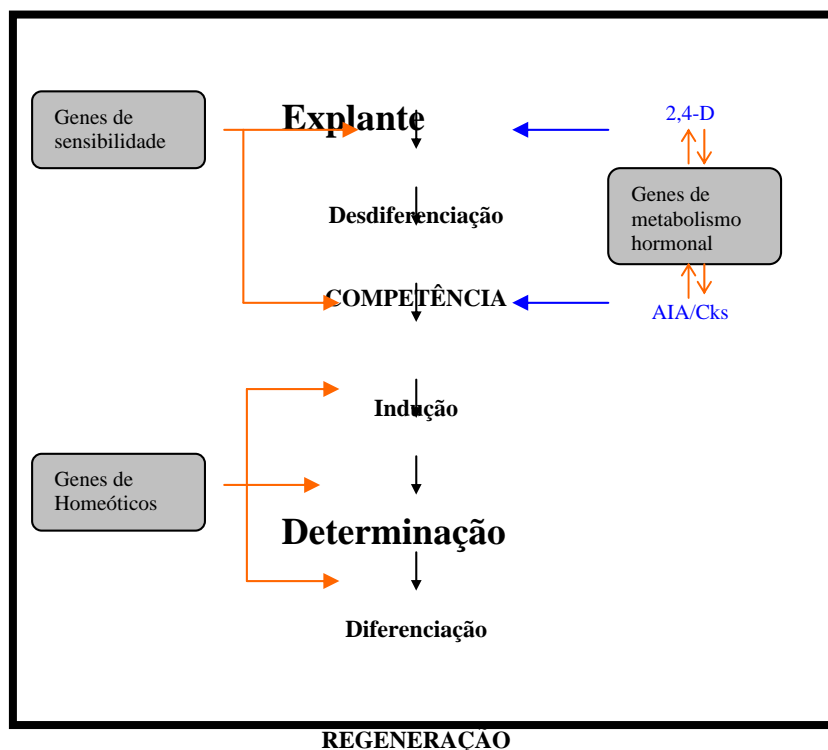


Figura 3 – Reinterpretação da hipótese proposta por Christianson e Warnick (1988) apud Peres (2002) para o entendimento da competência organogênica. **Genes de sensibilidade** = envolvidos na percepção e transdução do sinal para auxinas (AIA e 2,4-D) e citocininas (Cks); **genes de metabolismo hormonal** = responsáveis pelo estabelecimento hormonal endógeno necessário para a regeneração; **genes homeóticos** = controlam a formação de órgãos e, portanto podem estar associados à regeneração de novas gemas caulinares ou raízes.

b) Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos

A terminologia “cultura de embrião” tem sido empregada para descrever o processo de crescimento do embrião *in vitro*, independente da idade, tamanho e estágio de desenvolvimento no qual o embrião foi excisado. Entretanto, o estágio de desenvolvimento do embrião determina suas exigências em nível nutricional, e isso é fundamental para o desenvolvimento de uma metodologia de cultivo (PAPPAPORT, 1954 apud TORRES, LACORTE, 1997).

Os meios de cultivo incluem, na sua composição, os elementos essenciais necessários ao crescimento da planta *in vivo*, os quais têm papel fisiológico distinto no metabolismo da planta (TORRES et al., 2001).

Diversos fatores podem afetar a eficiência e o sucesso da cultura de embriões, porém, as condições gerais foram testadas e determinadas por vários pesquisadores, em trabalhos clássicos, desde o início do século (TORRES; LACORTE, 1997). O trabalho pioneiro foi de Hanning em 1904, quando cultivou embriões maduros de *Raphanus sativus*, *R. landra*, *R. caudatus* e *Cochlearia*

danica, cujas exigências nutricionais consistiam de sais minerais, açúcares e aminoácidos. Nesse experimento Hanning observou que a inclusão de sacarose era necessária para a germinação (RAGHAVAN, 1976).

A sacarose é o carboidrato mais comum utilizado como fonte energética, em alguns casos, especialmente para gramíneas, outros açúcares como a maltose (SCOTT; LYNE, 1994; STIVAL, 1995), ou frutose (FOLEY, 1992) são mais eficientes, enquanto que Guerrero et al. (1998) comentam que a glicose geralmente é empregada no cultivo de monocotiledôneas. Segundo Hu et al. (1979), a presença de glicose e açúcares não redutores (sacarose, rafinose, estaquiase) no meio de cultura promovem o crescimento embrionário. O açúcar é um importante componente do meio nutritivo, utilizado como fonte de carbono e energia, sendo essencial para o crescimento e desenvolvimento do explante *in vitro*, uma vez que a fotossíntese é ineficiente em função de uma variedade de fatores, como a insuficiente organização celular, a deficiência de clorofila, as limitações das trocas gasosas entre o ambiente e os frascos de cultivo e a baixa disponibilidade de luz (BEYL, 2000; TRIGIANO; GRAY, 2000).

Entre as numerosas aplicações da cultura de embriões, destaca-se a micropropagação clonal, como uma das técnicas viáveis para a multiplicação de plantas em larga escala. Devido a sua natureza juvenil com alto poder regenerativo, os embriões zigóticos são excelentes explantes para propagação clonal *in vitro* (TORRES; LACORTE, 1997). A regeneração de plantas tem sido obtida de tecidos derivados de subculturas de embriões maduros de arroz (JOÃO, 1987) e de outras gramíneas (MCDANIEL et al., 1982).

Ferreira et al. (1991, 1995) afirmam que as respostas à embriogênese zigótica *in vitro* podem ser diferentes para cada material genético ou estágio de maturidade do fruto. *In vitro*, a concentração de sais e de reguladores de crescimento (HU; FERREIRA, 1998), além da fonte de carboidrato (DAVIS, 1989; HU et al., 1979; LOPEZ, 1990; ROJAS et al., 1996) no meio de cultivo, podem influenciar o desenvolvimento embrionário. Hu e Ferreira (1998) também comentam que as respostas de desenvolvimento do embrião zigótico *in vitro* e *in situ* são regidas pela constituição genética, bem como pelas condições ambientais e suas interações.

Embora no cultivo em laboratório as condições sejam mais uniformes, estas não o eram anteriormente, durante a formação da semente de onde os explantes foram retirados. Além disso, em campo, a variabilidade genética é maior, principalmente quanto menos tenha sido domesticada a espécie em estudo. Portanto, se faz necessário avaliar a variabilidade genética das plantas obtidas a partir de embriões zigóticos desenvolvidos *in vitro* através de análise genética (HU; FERREIRA, 1998).

3.4 – Utilização de isoenzimas como ferramenta para análise da variabilidade genética.

As plantas provenientes do cultivo *in vitro* podem apresentar uma maior frequência de variações que modificam, em alguns casos, o fenótipo e/ou genótipo dos indivíduos resultantes (TULMANN NETO et al., 1998). A análise isoenzimática tem sido bastante utilizada para estimar a variabilidade em várias espécies provenientes do cultivo *in vitro*: *Lycopersicon esculentum* (EVANS et al., 1984); *Solanum phureja* (PEHU et al., 1986); *Rubus idacus* (COUSINEAU; DOUNELLY, 1989); *Ipomoea batatas* (ALVES et al., 1994); *Sacharum officinalis* (TAYLOR et al., 1995); *Musa sp.* (ULISSES et al., 2002) e *Ananas comosus* (FEUSER et al., 2003), colaborando de forma significativa na identificação de variações genéticas ao nível de enzimas ou de proteínas em plantas provenientes da micropropagação, possibilitando uma análise indireta de genes.

O termo isoenzimas, em termos gerais, referem-se às diferentes formas bioquímicas de uma enzima, as quais podem ser identificadas por migração e intensidade de coloração em gel (PINTO et al., 2001). As isoenzimas surgem por mecanismos genéticos ou epigenéticos. No primeiro caso, o gene que codifica a enzima é duplicado (o que ocorre ao longo da evolução) e, posteriormente, esse gene duplicado, por mutações de ponto, acaba por divergir do original, produzindo uma outra enzima. Nos mecanismos ditos epigenéticos, as alterações ocorrem após a tradução dos peptídeos, sendo responsável pelo surgimento das chamadas isoenzimas secundárias (ACCQUAAH, 1982).

A maioria dos sistemas isoenzimáticos localiza-se no citossol, em solução ou ligado às membranas celulares. A variação isoenzimática pode ocorrer nos diferentes compartimentos de uma célula, em células de um tecido ou nos diversos estádios ontogenéticos. A simplicidade da técnica de isoenzimas, aliada ao seu baixo custo em relação àquele dos marcadores baseados em polimorfismos de DNA, faz com que esse marcador continue a ser utilizado para responder às diversas questões que a pesquisa em genética nos impõe (PINTO et al., 2001).

A técnica de análise de isoenzimas consiste de três etapas: extração das enzimas do tecido vegetal, separação por eletroforese e coloração por métodos histoquímicos (PINTO et al., 2001). Sua utilização tem sido possível na pesquisa genética em um grande número de espécies vegetais (QUIRÓS, 1991). A análise eletroforética de isoenzimas permite estudar a variabilidade genética existente entre indivíduos ao nível de enzimas ou de proteínas, e os resultados obtidos com a eletroforese possibilitam uma análise indireta de genes (ALFENAS et al., 1991). Essa correlação baseia-se no fato de que a sequência de aminoácidos das proteínas é determinada pela sequência de nucleotídeos de genes estruturais, e portanto, o padrão eletroforético de enzimas e/ou proteínas corresponderia à expressão do produto primário do gene (GOTTILIEB, 1977).

As isoenzimas desempenham a mesma atividade catalítica, pois podem ter diferentes propriedades cinéticas e ser separadas por processos bioquímicos. Isto significa que as isoenzimas de um mesmo grupo diferem entre si na sequência de aminoácidos que possuem, o que, por

consequente, pode influir na natureza da estrutura protéica secundária, terciária e quaternária da enzima. O número de isoenzimas de uma determinada enzima está relacionado com o número de compartimentos subcelulares onde se realiza a mesma reação catalítica (GOTTLIEB, 1982).

Os marcadores isoenzimáticos apresentam algumas limitações, tais como, especificidade tissular de algumas formas isoenzimáticas e diferenciação da atividade das isoenzimas, associadas aos diferentes estádios de desenvolvimento (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996).

Segundo Crawford (1983) apud Oliveira-Paula (1993), alterações na seqüência de nucleotídeos de genes estruturais podem resultar em alterações na seqüência de aminoácidos das cadeias polipeptídicas que codificam, induzindo modificações na mobilidade das proteínas. Nesse caso, as diferenças eletroforéticas são o resultado de diferenças genéticas; como exemplo, a simples substituição de aminoácidos pode ser caracterizada de acordo com o efeito sobre a taxa de migração de bandas, onde as diferenças observadas equivalem a características fenotípicas particulares.

A premissa básica adotada ao se utilizar dados isoenzimáticos é que as diferenças na mobilidade eletroforética das isoenzimas são resultantes das diferenças ao nível de seqüências de DNA que codificam tais enzimas. Assim, se os padrões de bandas de dois indivíduos diferem, assume-se que essas diferenças possuam bases genéticas e sejam herdáveis (MURPHY, 1990).

A análise isoenzimática pode ser utilizada como marcador genético, a ser aplicado em muitos aspectos da pesquisa básica bem como para estimar os níveis e entender a estrutura da variabilidade genética de populações naturais, auxiliar na identificação de variedades e na seleção indireta de caracteres agronômicos, entre outros (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996).

4.0 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABALO, J. E. Heliconias for the ornamental industry. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 486, p.313-315, 1999.
- ACCQUAAH, G. **Practical protein electrophoresis for genetic reseach**. Discorides Press, 1982. 132 p.
- ALFENAS, A. C.; PETERS, I.; BRUNE, W. **Eletroforese de proteínas isoenzimas de fungos e essências vegetais**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1991. 243p.
- ALVES, J. M. C.; SIHACHAKR, D.; ALLOT, M. TIZROUTINE, S.; MUSSIO, I. SERVAES, A.; DUCREUX, G. Isozyme modifications and plant regeneration through somatic embryogenesis in sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). **Plant Cell Reports**, New York, v. 13, p.437-441. 1994.
- AMMIRATO, P. V. Embryogenesis. In: EVANS, D. A. et al. **Handbook of plant cell culture**. New York: MacMillan. 1983. 970 p.
- ATEHORTUA, L.; URREA, A. L.; GIL, U.; MORA, B.; VALENCIA, C.; CORRALES, M.; CARMONA, A.; VALLEJO, A. Heliconia Tissue Culture. **Bulletin of Heliconia Society International**, v. 9, n. 4, p. 16-17. 1999.
- BAJAJ, Y. P. S. Somatic embryogenesis and its application for crop improvement. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Somatic embryogenesis and synthetic seeds. Biotechnology in agriculture and forestry**. Berlin: Springer-Verlag, 1995. v. 30, p. 87-101.
- BERRY, F.; KRESS W. J. Heliconia: An identification Guide. Smithsonian Institution Press. 1991, 334p. il.
- BEYL, C. A. Getting started with tissue culture: media preparation, sterile technique and laboratory equipament. In: TRIGIANO, R. N.; GRAY, D. J. (Ed.). **Plant Tissue Culture: concepts and laboratory exercises**. New York: CRC Press, 2000, 454p.
- CASTRO, C. E. F. de **Helicônia para exportação: aspectos técnicos da produção**. Brasília: [s.n], 1995. 44p. (FRUPEX. Publicações Técnicas, 16).
- CID, L. P. B. A propagação *in vitro* de plantas. O que é isso? **Revista Biotecnologia Ciência e desenvolvimento**, Brasília, ano 3, n. 19, mar./abr. p. 16-21. 2001.
- CHAGAS, A. J. C. **Floricultura tropical na Zona da Mata de Pernambuco**. Recife: SEBRAE/PE, 2000. 24 p.
- COUSINEAU, J. C.; DOUNELLY D. J. Identification of raspberry cultivars *in vivo* and *in vitro* using isozymes analysis. **Hortscience**, Alexandria, v. 24, p.490-492, 1989.
- CRILEY, R. A. Development of Heliconia and Alpinia in Hawaii: cultivar selection and culture. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 246, p.247-258, 1989.
- CUNHA G. G.; FORTES, G. R. de L. Calogênese e organogênese de *Actinidia deliciosa* a partir de explantes foliares. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.14, n.3, p.197-202, 1992.
- DANIELS, G. S; STILES, F. G. The heliconia taxa of costa Rica. Keys & Descriptions. **Brenesia**, v. 15, n. 1, 1979. 150p.

- DAVIS, B. D. Growth of excised pea embryonic axes on different sugars. **American Journal Botanic**, Iowa, v.70, n.6, p. 816-820. 1989.
- DIAS, M. A.; RODRIGUES, P. H. V. Fontes de explantes e contaminantes isolados em cultivo *in vitro* de helicônia. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas. v.7, n. 2, p. 165-168, 2001.
- DURVAL, F. **Cultivo de embrião e anatomia do desenvolvimento do embrião zigótico de *Heliconia rostrata***. 2004. 87f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília. Brasília.
- DURZAN, D. J. Somatic polyembryogenesis for the multiplication of tree crops. **Biotechnology and Genetic Engineering Review**, v. 6 p. 341-378, 1988.
- EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; MEDINA FILHO, H. P. Somaclonal and gametoclonal variation. **American Journal Botanical**, v. 71, p.759-774, 1984.
- FERREIRA, A. G.; CUNHA, G. G.; SILVEIRA, T. S.; HU, C. Y. *In vitro* germination of immature embryos of *Ilex paraguariensis* St. Hil. **Phyton**, v. 52, n. 1, p. 27-32. 1991.
- FERREIRA, A. G.; ALMEIDA-CORTEZ, J. S.; CUNHA, G. G. Fisiocologia de *Ilex paraguariensis* com ênfase na embriologia experimental. In: WINGE, H. et al. **Erva-mate: biologia e cultura no Cone Sul**. Porto Alegre: UFRGS, 1995, p. 161-172.
- FERREIRA, M. E.; GRATAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2. ed. Brasília. EMBRAPA, 1996. 220p.
- FERREIRA, A.; SOUZA FILHO, I da. C.; ALBUQUERQUE, S. R. C. BRASIL, H. S. **Panorama global da floricultura em Pernambuco: Floricultura em Pernambuco**. Recife: SEBRAE-PE, 2002. p. 22-59.
- FEUSER, S.; MELER, K.; DAQUINTA, M.; GUERRA, M. P. Genotypic fidelity of micropropagated pineapple (*Ananas comosus*) plantlets assessed by isozyme and RAPD markers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 72, p.221-227, 2003.
- FOLEY, M. E. Effect of soluble sugars and gibberelic acid in breaking dormancy of excised wild oat (*Avena fatua*) embryos. **Weed Science**, Chanpaigne, v. 40, p.208-214, 1992.
- GOH, C. J.; NATHAN, M. J.; KUMAR, P. P. Direct organogenesis and induction of morphogenic callus through thin section culture of *Heliconia psittacorum*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 62, p.113-120. 1995.
- GOTTILIEB, L. D. Eletroforetic evidence and plant systematics. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, Davis, v.64, p.161-180, 1977.
- GOTTLIEB, F. **Conservation and duplication os isozymes in plants**. Washington: Science, 1982. v.216, p. 373-380.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1998. p.183-260. 1998.

GUAMANTICA, E. G. C. **Micropropagação *in vitro* de três espécies de helicônias através da cultura de meristemas**. 1998. 77f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e semente sintética. In: TORRES, A. C. **Curso de sistemas de micropropagação de plantas**. Brasília. 1997. p.147-170. Apostila.

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

GUERRA, M. P.; FERREIRA, F. C.; PAIVA, S. A. V. de. **Meio e condições de incubação para a cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 2001. (Circular Técnica, 24).

GUERRERO, A. J. R.; PIZARRO, F.C.; REYES, A.J.; VIEYRA, R. J.; SOLÍS, T. F. Influencia de diferentes carboidratos en el establecimiento y desarrollo *in vitro* de ápices de papa (*Solanum tuberosum* L.) cv. Alpha. **Livro de Resumos do III Encuentro Latino Americano de Biotecnología Vegetal**, Havana, 1998, p. 151-152.

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

HAMIDAD. M.; KARIM, A. G. A.; DEBERGH, P. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Anthurium scherzerianum*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.48. p.189-193. 1997.

HANNIG, E. Zur physiologie pflanzlicher embryonen. 1. Ueber die cultur von cruciferen-embryonen ausserhalb des embyosack. **Bot. Ztg.** 62. p. 45-80. 1904.

HU, C. Y.; ROGALSKI, F.; WARD, C. Factors maintaining *Ilex rudimentary* embryos in the quiescent state and the ultrastructural changes during *in vitro* activation. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 140, p.272-279, 1979.

HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. Cultura de embriões 2. In: TORRES, A.C. **Curso de sistemas de micropropagação de plantas**. Brasília, 1997. p.133-146. Apostila.

HU, C. Y., FERREIRA, A. G. Cultura de Embriões. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/CNPH, 1998. v.1, p.371-393.

JIMÉNEZ, V. M. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 13, n.2, p. 196-223. 2001.

JOÃO, K. H. L. **Regeneração de calos de arroz selecionados para resistência ao NaCl**. 1987. 112f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. da S. Exportações brasileiras de flores e plantas ornamentais: crescimento sustentado garante expansão no primeiro semestre de 2003. **IBRAFLOR**. Ano 9, n. 4,

jul./ago. 2003. Disponível em: <<http://www.ibraflor.com.br/ibraflor/index.php?id=282>>. Acesso em: 05/maio/2004.

KUEHNLE, A. R.; CHEN, F.; SUGII, N. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Anthurium andraeanum* hybrids. **Plant Cell Reports**, New York, v. 11, p. 438-442, 1992.

KIM, S. W.; OH, S. C.; IN, D. S.; LIU, J. R. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration in zygotic embryo cultures of japanese honeysuckle. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 72. p.277-280, 2003.

LAMAS, A. da M. **Floricultura tropical: técnicas de cultivo**. Recife: SEBRAE/PE, 2001. 88 p.

LOPES, C. S.; GRAZIANO, T. T. A produção e a comercialização de *Heliconia* spp. no Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v.7. n.2. p.81-88, 2001.

LOPEZ, C. Cultivo de embriones y óvulos. In: LÓPEZ, C. **Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales**. Roma: FAO, 1990. 112 p.

McDANIEL, J. K.; CONGER, B. V.; GRAHAM, E. T. A histological study of tissue proliferation, embryogenesis and organogenesis from tissue cultures of *Dactylis glomerata* L. **Protoplasma**, New York, n. 110, p. 121-128, 1982.

MATHEW, M. M; PHILIP, V. J. Somatic embryogenesis versus zygotic embryogenesis in *Ensete superbum*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrech, v. 72. p.267-275, 2003.

MATSUMOTO, T. K.; WEBB, D. T.; KUEHNLE, A. R. Histology and origin of somatic embryos derived from *Anthurium andraeanum* Linden ex André Lamina. **Journal American Society Horticulturæ Science**, v.121, n.3, p.404-407, 1996.

MURPHY, R.W. Proteins I: isoenzyme electrophoresis. In: HILLIS, O. M.; MORITZ, C. **Molecular Systematics**. Sunderland: Sinauer Associates, 1990. p. 45-126.

NANNETTI, D. C. **Utilização da cultura de tecidos vegetais na micropropagação e manutenção de *Heliconia* sp.** 1994. 106f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras.

NATHAN, M. S.; GOH, C. J.; KUMAR, P. P. *In vitro* propagation of *Heliconia psittacorum* by bud culture. **Hortsience**, Alexandria, v. 27, p. 450-452, 1992.

NOGUEIRA JÚNIOR, S. P. Programa *Flora Brasílis*: Base produtiva da floricultura nacional aumenta o desempenho exportador. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas. v.7, n.2, p.79-80, 2001.

OLIVEIRA-PAULA, A. de P. **Caracterização genético-bioquímica de sete cultivares de batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) do banco de germoplasma da UFRPE**. 1993. 149f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

PAIVA, W. O. **Cultura de helicônias**. Fortaleza: EMBRAPA-CNPAT, 1998. 20 p. (EMBRAPA-CNPAT. Circular técnica, 2)

- PEDROSO, M. C.; PAIS, M. S. Explant region-specific embryogenic competence and plant recovery in *Camellia japonica*. **In vitro Cellular & Developmental Biology**, Gaithersburg, v. 31, p. 8-14. 1995.
- PEHU, E.; GASSMAN, C. VEILLEUX, R.; KALB, T. Changes in isozyme patterns and ultrastructure of calus tissue of *Solanum phureja* during regeneration. **HortScience**, Alexandria, v. 21, p.251, 1986.
- PERES, L. E. P. Bases Fisiológicas e Genéticas da Regeneração de Plantas *in vitro*. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n. 25, março/abril. p.44-48, 2002.
- PIERIK, R. L. M.; LEEUWEN, P. V.; RIGTER, G. C. M. Regeneration of leaf explants of *Anthurium andraeanum* Lindl *in vitro*. **Neth. Journal Agriculture Science**, Wageningen, v. 27, p.221-226. 1979.
- PINTO, L. R. de; VIEIRA, M. L. C.; SOUZA, A. P. de; SOUZA JÚNIOR, C. L. Isoenzimas e microsátélites em plantas. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 20, maio/junho. p. 16-19, 2001.
- QUIRÓS, C. F. Isoenzimas como marcadores genéticos para identificar híbridos en el cultivo de tejidos. IN:ROCA, W. M.; MROGÍNSKI, L. A. **Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones**. Cali: CIAT, 1991. cap.37, p.857-876.
- RAGHAVAN, V. **Experimental embryogenesis in vascular plants**. New York: Academic Press, 1976. 603 p.
- REINERT, J. Morphogenese und ihre kontrolle na geweberkulturen aus karotten. **Naturwissenschaften**, New York, v. 45, p. 344-345, 1958.
- ROJAS, R. CUBA, M. MARTÍNEZ, M. GRACIA, D. MONTES, S. Influencia de diferentes fuentes de carbono en la germinación y el desarrollo de embriones de *Coffea arabica* variedad 9722. **Cultivos Tropicales**, Havana, v.17, n.1, p.82-84, 1996.
- SANTOS, M. H. L. C. **Efeito de bactérias promotoras de crescimento no cultivo *in vitro* e em casa de vegetação de *Heliconia psittacorum* Sessé & Moc (Heliconiaceae)**. 2000. 119f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- SÁNCHEZ, R. T. LAFFITTE, O. C.; GRADAILLE, M. D.; BORRERO, L. N.; AVILA, M. B. Propagacion *in vitro* de *Anthurium andraeanum* Lind. Variedad “Sonate”. **Biotecnologia Vegetal**, v.1, p.33-38, 2000.
- SATURNINO, H. M. A floricultura no Brasil. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES EM FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 1. 1979, Viçosa, MG. **Anais Viçosa: UFV**, 1979. p.11-18.
- SCOTT, P.; LYNE, R. L. Initiation of embryogenesis from cultured barley microspores: a further investigation into the toxic effects of sucrose and glucose. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, n. 37, p. 61-65, 1994.
- SELIGMAN, R. La floricultura em Israel: exportacion multicolor. **Cultivo y Reverdecimento**. Jerusalém, n.2, p. 29-33, 1983.

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

SILVEIRA, R. B. de A. **Floricultura no Brasil: pesquisa na UESB**. 1993. Disponível em: <<http://www.uesb.br/flower/florbrasil.html>>. Acesso em: 30 set. 2001.

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

STIVAL, A. L. **Aspectos fisiológicos, anatômicos e agrônômicos da indução e regeneração de duplo-haplóides androgenéticos em genótipos brasileiros de cevada (*Hordeum vulgare* L.)**. 1995. 101f. Dissertação (Mestrado em Botânica) –Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS.

TAYLOR, P. W. J.; GEIJSKES, J. R.; KO, H. L.; FRASER, T. A.; HENRY, R. J.; BIRCH, R. G. Sensitivity of random amplified polymorphic DNA analysis to detect genetic change in sugarcane during tissue culture. **Theoretical Applied Genetic**, v. 90, p.1169-1173, 1995.

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

TOMBOLATO, A. F. C.; QUIRINO, E. A. Multiplicação *in vitro* de novas seleções de *Anthurium andreanum* Lindl. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v.2, n.1, p.37-46, 1996.

TORRES, A. C.; BARBOSA, N. V. dos r.; WILLADINO, L.; GUERRA, M. P.; FERREIRA, C. F.; PAIVA, S. A.V. de. **Meio e condições de incubação para a cultura de tecidos de plantas**. Brasília, [s.n], 2001. (Circular Técnica, 24).

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1998. v. 1. 864 p.

TORRES, A. C.; LACORTE, C. Cultura de embriões 1. In: TORRES, A. C. **Curso de sistemas de micropropagação de plantas**, Brasília, 1997. p.129-132. Apostila.

TRIGIANO, R. N.; GRAY, D.J . **Plant tissue culture concepts and laboratory exercises**. New York: CRC Press, 2.ed. 2000. 584p.

TULMANN NETO, A.; MENDES, B. M. J.; ANDO, A. Progressos na indução e uso de mutações *in vitro*. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1998. v.1, p. 459-506.

ULISSES, C.; CAMARA, T. R.; WILLADINO, L.; ALBUQUERQUE, C. C. de; MARTINS, L. S. S.; FREITAS, N. S. A. de. Caracterização isoenzimática de clones de bananeira nanicação submetidos à salinidade. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 6, n.2, p.358-361, 2002.

VASIL, I. K. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cereals and grasses. In: FUJIWARA, A. **Plant Tissue Culture**, Tokyo: Ed. Maruzen, 1982.p. 101-103.

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

5.0 – TRABALHOS

TRABALHO I

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM HELICÔNIAS A PARTIR DE SECÇÕES DE OVÁRIO
E DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS¹**

Trabalho a ser publicado na Revista Acta Botanica Brasilica

¹ Trabalho realizado com o apoio do Programa de Pós-Graduação em Botânica da UFRPE.

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM HELICÔNIAS A PARTIR DE SECÇÕES DE OVÁRIO E
DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS

Cláudia Ulisses¹

Terezinha Rangel Camara²

Gladys Flávia Melo-De-Pinna³

Lilia Willadino⁴

Cynthia Cavalcanti de Albuquerque¹

¹Doutoranda em Botânica – UFRPE; ²Dept^o. de Química – UFRPE; ³Dept^o. de Botânica – USP; ⁴Dept^o. de Biologia – UFRPE.

Autor para correspondência: Cláudia Ulisses e-mail: claudia@nlink.com.br

(Embriogênese somática em helicônias a partir de secções de ovário e de embriões zigóticos).

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo estabelecer protocolos para a indução de calos embriogênicos em espécies de helicônia. Foram realizados dois experimentos, o primeiro constou de três ensaios. O primeiro ensaio consistiu de combinações de AIA (ácido 3-indolilacético) (0; 1; 1,5; 2 e 2,5 mg.L⁻¹) com 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético) (0; 3; 4; e 5 mg.L⁻¹) e o segundo combinou o BAP (6-benzilaminopurina) (0; 1; 1,5; 2; 2,5 mg.L⁻¹) com 2,4-D (0; 3; 4; e 5 mg.L⁻¹) na espécie *Heliconia chartacea* cv. Lane ex Barreiros cv. Sexy Pink. O terceiro ensaio contou de combinações entre AIA (0; 1 e 2 mg.L⁻¹) e 2,4-D (0; 5; 10; 15 e 20 mg.L⁻¹), nas cultivares ‘Sexy Pink’ e ‘Sexy Scarlet’ da espécie *H. chartacea*. Em todos os ensaios, utilizaram-se secções de ovários como explantes. No segundo experimento utilizaram-se embriões zigóticos provenientes de frutos imaturos e maduros de *H. bihai* (L.) L. cv. Lobster Claw Two em combinações de AIA (0; 1 e 2 mg.L⁻¹) e 2,4-D (0; 5; 10; 15 e 20 mg.L⁻¹). As avaliações em ambos experimentos foram realizadas aos 30, 60 e 90 dias após a inoculação, considerando o aspecto dos calos e a presença de nódulos, através de observações em estereomicroscópio, além de análises citoquímica, histológica e de microscopia eletrônica de varredura. No experimento 1, o índice de formação de calos nos explantes tratados com AIA+2,4-D, foi superior àquele observado com as combinações de BAP+2,4-D, na qual observou-se a presença de células pró-embriogênicas. No terceiro ensaio, a ‘Sexy Pink’ apresentou maior índice de formação de calos quando comparada com a ‘Sexy Scarlet’. No segundo experimento a formação de embriões somáticos ocorreu apenas nos embriões zigóticos provenientes de frutos maduros cultivados na ausência de reguladores de crescimento.

Palavras-chave: *Heliconia*; calogênese; regulador de crescimento; histologia; microscopia eletrônica de varredura.

(Somatic embryogenesis in heliconias from sections of ovary and of zygotic embryos)

ABSTRACT

The aim of current work was to establish protocols for the induction of embryogenic callus in heliconia species. Two experiments were carried out; the first one had three essays. The first essay consisted of combinations of AIA (indole-3-acetic acid) (0; 1; 1,5; 2 and 2,5 mg.L⁻¹) with 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic) (0; 3; 4 and 5 mg.L⁻¹) and the second combined BAP (6-benzylamino purine) (0; 1; 1,5; 2 and 2,5 mg.L⁻¹) with 2,4-D (0; 3; 4 and 5 mg.L⁻¹). On the essays above, sections of ovaries of *H. chartacea* Lane ex Barreiros cv. Sexy Pink was used as explants. The third essay counted on combinations among AIA (0; 1 and 2 mg.L⁻¹) and 2,4-D (0; 5; 10; 15 and 20 mg.L⁻¹) at cultivars 'Sexy Pink' and 'Sexy Scarlet' of *H. chartacea* species. On the second experiment was used zygotic embryos came from immature and mature fruits of *H. bihai* cv. (L.) L. Lobster Claw Two in combinations of AIA (0; 1 and 2 mg.L⁻¹) and 2,4-D (0; 5; 10; 15 and 20 mg.L⁻¹). Valuations in both experiments were achieved at 30, 60 and 90 days after inoculation, considering the aspects of the callus and the presence of nodules, by observations in stereomicroscope, besides citochemical, histologic and scanning electron microscopy analyses. On the experiment 1, the rate of callus formation on treated explants with AIA+2,4-D, was superior to that observed with the combinations of BAP+2,4-D, in which observed presence of proembryonic cells. On the third essay, 'Sexy Pink' showed a major rate of formation of callus compared with 'Sexy Scarlet'. At the second experiment the formation of somatic embryos took place just in zygotic embryos came from mature fruit cultivated at the absence of growth regulators.

Keys-words: *Heliconia*; callogenesis; growth regulator; histology; scanning electron microscopy.

Introdução

As espécies de plantas ornamentais tropicais têm atraído o mercado de flores devido à beleza, exotividade e durabilidade pós-colheita das inflorescências. Nesse cenário, o Brasil possui grande contingente de espécies nativas ou introduzidas que se enquadram nesses padrões de referência. As helicônias destacam-se neste panorama e dentre elas, as cultivares ‘Sexy Pink’ e ‘Sexy Scarlet’, da espécie *Heliconia chartacea* Lane ex Barreiros, estão entre as mais valorizadas no mercado. Outro destaque é a espécie *H. bihai* (L.) L. cv. Lobster Claw Two que, além de apresentar durabilidade pós-colheita, é uma das cultivares de grande interesse para comercialização (Abalo, 1999).

As helicônias possuem um rizoma subterrâneo, comumente usado para propagação, a partir do qual se desenvolvem as gemas florais e os novos perfilhos (Castro, 1995). Esse sistema de propagação vegetativa, além de limitar a quantidade de mudas disponíveis, apresenta sérios riscos de disseminação de pragas e doenças. A micropropagação surge como uma importante alternativa para proporcionar a produção em larga escala de mudas de helicônia com elevado padrão de qualidade. Entretanto, a micropropagação de helicônias via ápices caulinares depara-se com problemas de contaminação endofítica, dificultando a multiplicação do explante, conforme registrado por diversos autores (Nathan *et al.*, 1992; Atehortua *et al.*, 1999; Dias & Rodrigues, 2001). Diante desse problema, se faz necessário à utilização de outros tipos de explantes associados a outras técnicas de micropropagação.

A embriogênese somática é uma das técnicas de micropropagação que se destaca por apresentar algumas vantagens que aumentam as perspectivas no âmbito da biotecnologia vegetal, são elas: a obtenção de inúmeros propágulos a partir de um reduzido número de explantes (Vasil & Vasil, 1986; Vasil, 1988; Jiménez, 2001; Maciel *et al.*, 2003) e a propagação clonal de plantas transgênicas (Guerra *et al.*, 1999; Jiménez, 2001).

A adequação de um protocolo para micropropagação, a partir da embriogênese somática, envolve a definição de doses e combinações de reguladores de crescimento, além do tipo de explante para cada genótipo (Guerra *et al.* 1999). O sucesso da produção *in vitro* em larga escala depende do ajuste de um protocolo adequado para cada espécie ou variedade a ser micropropagada.

O presente trabalho objetivou estabelecer protocolos para a obtenção de embriões somáticos nas espécies *H. chartacea* Lane ex Barreiros cv. Sexy Pink e cv. Sexy Scarlet e *H. bihai* (L.) L. cv. Lobster Claw Two.

Material e métodos

As plantas matrizes das cultivares ‘Sexy Pink’ e ‘Sexy Scarlet’ da espécie *H. chartacea* Lane ex Barreiros, foram procedentes da Fazenda Mulata no município de Camaragibe, Estado de Pernambuco, enquanto que as plantas matrizes de *H. bihai* (L.) L. cv. Lobster Claw Two foram procedentes do Sítio São Tiago, localizado no município de Paulista, também no Estado de Pernambuco.

a) **Experimento 1:** Indução de embriogênese somática a partir de secções de ovário.

O primeiro experimento constou de três ensaios, onde os ovários retirados de inflorescências, com 4 brácteas abertas e 1 fechada, foram utilizados como fonte de explante. Inicialmente, esses explantes passaram por uma lavagem com detergente comercial puro e água corrente. Em seguida, em câmara de fluxo laminar, foram imersos em álcool 70%, por um minuto, seguindo de duas imersões em solução de hipoclorito de cálcio, a primeira a 3%, contendo três gotas de tween 20%, durante 20 minutos, e a segunda a 1,5%, contendo também três gotas de tween 20%, por 15 minutos e, finalmente, três lavagens com água destilada estéril para eliminar o excesso dos agentes desinfestantes. Após esse processo, os ovários foram seccionados transversalmente e as secções, medindo aproximadamente 0,7cm de diâmetro e 0,2cm de espessura, foram inoculadas em tubo de ensaio (2,5 x 15cm) contendo 10mL do meio nutritivo.

O primeiro ensaio, consistiu de combinações entre os níveis 0; 3; 4 e 5mg.L⁻¹ de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e 0; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5mg.L⁻¹ de AIA (ácido 3-indolilacético), de acordo com Valencia & Atehortua (1999). Num segundo ensaio, os mesmos níveis de 2,4-D foram combinados com os níveis 0; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5mg.L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina). Os ensaios supracitados foram realizados com a cv. ‘Sexy Pink’ e obedeceram a um esquema fatorial 5x4, inteiramente casualizado, com 10 repetições por tratamento. O terceiro ensaio foi estabelecido a partir de combinações entre três níveis de AIA (0; 1 e 2mg.L⁻¹) e cinco níveis de 2,4-D (0; 5; 10; 15 e 20mg.L⁻¹) nas cultivares ‘Sexy Pink’ e ‘Sexy Scarlet’, em esquema fatorial 3x5x2, com delineamento experimental inteiramente casualizado, com 10 repetições por tratamento.

O meio MS (Murashige & Skoog, 1962) básico, foi acrescido de 30g.L⁻¹ de sacarose e 2,0g.L⁻¹ de phytigel. O pH foi ajustado para 5,8 antes de esterilizar em autoclave a 121°C, durante 20 minutos. O material inoculado foi mantido no escuro, à temperatura de 25±2°C, durante 90 dias.

A avaliação foi realizada calculando-se um índice de formação de calos (IFC), a partir da fórmula: $IFC = EC/EI$ (onde: EC = número de explantes que formaram calos; EI = número de explantes inoculados), considerando também o aspecto dos calos e a presença de nódulos, com o auxílio de estereomicroscópio.

Ao IFC foi aplicado teste estatístico não paramétrico, baseado na distribuição de Qui-quadrado, utilizando um comparador de Tukey para ser empregado nos contrastes dos dados transformados em $\arcsen\sqrt{\%}$.

b) Experimento 2: Indução de embriogênese somática a partir de embriões zigóticos.

Nesse experimento foram utilizados como explante embriões zigóticos de *H. bihai* (L.) L. cv. Lobster Claw Two. Os frutos foram classificados mediante o grau de maturação: imaturo (branco) e maduro (azul escuro), sendo retirados das brácteas das inflorescências e submetidos a uma lavagem com detergente comercial puro em água corrente. Em seguida, em câmara de fluxo laminar, os frutos foram submetidos ao mesmo processo de assepsia descrito no experimento 1. O pericarpo dos frutos maduros e imaturos foram retirados com o auxílio de pinça e bisturi e, pressionando a semente na região da radícula com um alicate, o embrião foi extraído. Os embriões extraídos foram inoculados separadamente em tubo de ensaio (2,5 x 15cm) contendo 10mL de meio nutritivo MS, acrescido de 30g.L⁻¹ de sacarose e 2,0g.L⁻¹ de phytigel. O ajuste do pH e a esterilização do meio nutritivo foram feitos como descrito anteriormente. Os embriões foram mantidos no escuro, em temperatura de 25±2°C.

Os tratamentos foram estabelecidos a partir de combinações entre três níveis de AIA (0; 1 e 2mg.L⁻¹); cinco níveis de 2,4-D (0; 5; 10; 15 e 20mg.L⁻¹) e o estágio de maturação do fruto (imaturo e maduro), dentro de um esquema fatorial 3x5x2, inteiramente casualizado, com 10 repetições por tratamento.

As avaliações em ambos experimentos, foram realizadas aos 30, 60 e 90 dias após a inoculação, com base em observações visuais e características qualitativas, com o auxílio de estereomicroscópio.

Aos 90 dias em meio de indução, em ambos experimentos, foram selecionados os calos que apresentaram superfície nodular e coloração amarelada, onde parte desses calos foi preparada para análise citoquímica e histológica, e a outra parte foi transferida para meio de expressão (conversão dos embriões somáticos). O meio de expressão foi o MS acrescido de 30g.L⁻¹ de sacarose, 2,0g.L⁻¹ de phytigel e 1,0mg.L⁻¹ de BAP. Os calos foram mantidos à temperatura de 25±2°C, com fotoperíodo de 16 horas e luminosidade de 50μmols m².s⁻¹, durante 60 dias.

- Análise citoquímica

Calos selecionados provenientes do meio de indução foram corados com azul de Evans (0,1%) e carmin acético (2%) para visualização de pró-embrião somático, seguindo a metodologia de Guerra (2001). Os calos foram observados e fotografados com o auxílio de um fotomicroscópio

óptico, no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA).

- Análises histológicas

- a) Microscopia ótica

Foram selecionados calos que apresentaram estruturas nodulares na superfície e, em seguida, foram desidratados e infiltrados no aparelho histotécnico automático e incluídos em parafina em emblocador Tissue-Tec. Posteriormente, foram procedidos os cortes histológicos seriados, com espessura variando de 4µm a 6µm, em micrótomo horizontal. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina. O preparo das lâminas foi realizado no setor de Patologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA). As lâminas foram analisadas e fotografadas ao microscópio ótico do Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade de São Paulo (USP).

- b) Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os calos foram fixados em solução de glutaraldeído a 3% e desidratados em uma série gradativa de álcool etílico (50%, 70%, 90% e 100%). Em seguida foi realizada a secagem pelo método do ponto crítico com CO₂. Os calos foram metalizados com uma camada de ouro de 300Å e observados ao microscópio eletrônico de varredura, operando a 15kv. Essas análises foram realizadas no setor de Microscopia Eletrônica do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA).

Resultados e discussão

- a) **Experimento 1:** Indução de embriões somáticos a partir de secções de ovário.

Após 30 e 60 dias de cultivo, observou-se intumescimento nas bordas das secções de ovário inoculadas em todos os tratamentos dos ensaios com AIA+2,4-D (Ensaio I) e com BAP+2,4-D (Ensaio II). Aos 90 dias de cultivo, o índice de formação de calos (IFC) nos explantes tratados com AIA+2,4-D foi superior àquele observado com as combinações de BAP+2,4-D (Tab. 1). Os calos obtidos nos tratamentos com AIA e 2,4-D, apresentaram-se como um grupamento de células nodulares de coloração creme a amarelada, facilmente destacáveis. Essas características são atribuídas a calos embriogênicos friáveis em café (Söndahl & Sharp, 1977). Calos semelhantes foram observados por Almeida *et al.* (2001) em *Carica papaya* (mamoeiro). Esses resultados discordam de alguns autores (Chalupa, 1987; Kurten *et al.*, 1990; Mathew & Philip, 2003), os quais admitem que a combinação de concentrações entre auxina e citocinina no meio nutritivo favorece a indução e proliferação da embriogênese. Os calos formados a partir dos tratamentos com BAP e

2,4-D apresentavam esbranquiçados e aquosos. No presente trabalho, na maioria dos tratamentos a presença de BAP exerceu um efeito deletério sobre a formação de calos em *Heliconia chartacea* cv. Sexy Pink. Resultados similares foram alcançados por Martini *et al.* (2001), que observaram uma ação inibitória do BAP na indução e proliferação de calos de orquídea (*Gongora quinquenervis*). Segundo Williams & Maheswaran (1986), o BAP atua de forma considerada, na polaridade das células, favorecendo o processo de diferenciação dos calos embriogênicos em plantas.

Na ausência das auxinas (Controle: A0D0), não houve a formação de calos. No tratamento com 1 mg.L⁻¹ de AIA, na ausência de 2,4-D, registrou-se um baixo IFC, que anulou-se com o aumento do nível de AIA, sem adição de 2,4-D (Tab. 1).

Tabela 1 - Índice de formação de calos (IFC) a partir de secções de ovário de *H. chartacea* Lane ex Barreiros cv. Sexy Pink aos 90 dias em meios com diferentes combinações de AIA+2,4-D (Ensaio I) e BAP+2,4-D (Ensaio II) (mg.L⁻¹).

Tratamentos (mg.L ⁻¹)	Índice de formação de calos (IFC)	Tratamentos (mg.L ⁻¹)	Índice de formação de calos (IFC)
0 AIA + 0 2,4-D (A0D0)	0 b	0 BAP + 0 2,4-D (B0D0)	0 b
0 AIA + 3 2,4-D (A0D3)	1 a	0 BAP + 3 2,4-D (B0D3)	1 a
0 AIA + 4 2,4-D (A0D4)	0,7 ab	0 BAP + 4 2,4-D (B0D4)	1 a
0 AIA + 5 2,4-D (A0D5)	1 a	0 BAP + 5 2,4-D (B0D5)	1 a
1 AIA + 0 2,4-D (A1D0)	0,3 ab	1 BAP + 0 2,4-D (B1D0)	0 b
1 AIA + 3 2,4-D (A1D3)	0,8 ab	1 BAP + 3 2,4-D (B1D3)	0,2 ab
1 AIA + 4 2,4-D (A1D4)	1 a	1 BAP + 4 2,4-D (B1D4)	0,4 ab
1 AIA + 5 2,4-D (A1D5)	0,8 ab	1 BAP + 5 2,4-D (B1D5)	1 a
1,5 AIA + 0 2,4-D (A1,5D0)	0 b	1,5 BAP + 0 2,4-D (B1,5D0)	0 b
1,5 AIA + 3 2,4-D (A1,5D3)	0,6 ab	1,5 BAP + 3 2,4-D (B1,5D3)	0,2 ab
1,5 AIA + 4 2,4-D (A1,5D4)	1 a	1,5 BAP + 4 2,4-D (B1,5D4)	0 b
1,5 AIA + 5 2,4-D (A1,5D5)	0,6 ab	1,5 BAP + 5 2,4-D (B1,5D5)	0 b
2 AIA + 0 2,4-D (A2D0)	0 b	2 BAP + 0 2,4-D (B2D0)	0 b
2 AIA + 3 2,4-D (A2D3)	1 a	2 BAP + 3 2,4-D (B2D3)	0,2 ab
2 AIA + 4 2,4-D (A2D4)	1 a	2 BAP + 4 2,4-D (B2D4)	0 b
2 AIA + 5 2,4-D (A2D5)	1 a	2 BAP + 5 2,4-D (B2D5)	0,2 ab
2,5 AIA + 0 2,4-D (A2,5D0)	0 b	2,5 BAP + 0 2,4-D (B2,5D0)	0 b
2,5 AIA + 3 2,4-D (A2,5D3)	1 a	2,5 BAP + 3 2,4-D (B2,5D3)	0 b
2,5 AIA + 4 2,4-D (A2,5D4)	1 a	2,5 BAP + 4 2,4-D (B2,5D4)	0 b
2,5 AIA + 5 2,4-D (A2,5D5)	1 a	2,5 BAP + 5 2,4-D (B2,5D5)	0 b

Médias seguidas de letras diferentes entre cada linha, diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

As diferenças quanto ao metabolismo e à estabilidade das auxinas no tecido vegetal podem contribuir para as diferenças observadas na resposta *in vitro*, onde o 2,4-D freqüentemente induz a formação de calo e pode ser importante em sistemas de embriogênese somática (Caldas *et al.*, 1998). O 2,4-D é considerado uma substância capaz de desencadear processos de desdiferenciação

(modelos indiretos) e rediferenciação (modelo direto), alterando a determinação celular e conferindo novas competências às células responsivas presentes nos explantes (Guerra *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2001 apud Nowak & Shulaev, 2003). Admite-se que a massa celular pro-embriogênica cultivada em presença de auxina tem capacidade de sintetizar as proteínas necessárias para formar o embrião em estágio globular (Zimmerman, 1993).

Goh *et al.* (1995), trabalhando com secções finas do pseudocaulo de *Heliconia psittacorum*, observaram que em presença de $2,21\text{mg.L}^{-1}$ de 2,4-D houve a formação de raízes, enquanto que em concentrações mais altas ($8,84$ e $17,68\text{mg.L}^{-1}$) ocorreu a formação de calos.

Cruz *et al.* (1990), Rodriguez & Wetzstein (1998) e Flores *et al.* (2003) demonstraram que em *Feijoa sellowiana*, *Carya illinoensis* e *Fragaria* sp., respectivamente, o 2,4-D foi mais efetivo na formação de calos do que o AIA. No entanto, Radojevic (1979) observou que a formação de embriões somáticos de *Paulownia tomentosa* foi induzida especificamente por AIA. Esses diferentes resultados em relação à fonte de auxina utilizada podem estar relacionados com a constituição genética do material vegetal que tem grande influência na resposta obtida *in vitro* (Hu & Ferreira, 1998).

Valencia & Atehortua (1999), induzindo a formação de calos a partir de gema floral de *Heliconia stricta*, observaram que as melhores respostas quanto à formação de calos embriogênicos foram obtidas em meio MS suplementado com 3 a 5mg.L^{-1} de 2,4-D e 1 a $2,5\text{mg.L}^{-1}$ de AIA. A formação desses calos embriogênicos ocorreu após quatro a seis meses de cultivo, período mais longo quando comparado com o período alcançado no presente trabalho, no qual a formação de calos embriogênicos e embriões somáticos foi registrada aos três meses de cultivo (Fig. 1A).

A combinação de AIA com 2,4-D favoreceu a formação de nódulos de coloração amarelada (Fig. 1A), especialmente nos tratamentos A1,5D3; A2D5 e A2,5D5. No tratamento com A1,5D3 observou-se acima do tecido caloso a presença de uma estrutura clorofilada (Fig. 1B), indicando ser o início do processo organogênico. Essa estrutura não se desenvolveu quando transferida para o meio de expressão ($1,0\text{mg.L}^{-1}$ de BAP). Segundo Inoue *et al.* (2000), a competência organogenética geralmente é regulada por citocininas, fato esse observado anteriormente em *Santalum album* L. (Rai & McComb, 2002) e em *Musa* (Lee *et al.*, 1997; Novak *et al.*, 1989; Jarret *et al.*, 1985; Cronauer-Mitra & Krikorian, 1984). No entanto, não foi observada a continuidade do processo no presente trabalho, utilizando no meio de expressão uma citocinina como fonte indutora para organogênese.

Segundo Peres (2002), diferenças significativas na capacidade organogenética *in vitro* são encontradas ao se variar a composição mineral, as vitaminas e as fontes de açúcar do meio nutritivo. Contudo, os componentes mais críticos adicionados ao meio de cultura são os reguladores de crescimento vegetais. No processo de organogênese, a competência seria entendida como a

capacidade de responder ao estímulo hormonal necessária à indução da formação do órgão. A falha de competência de um tecido poderia refletir, portanto, a falta de receptores que interagem com hormônios, induzindo o processo organogênico nas células. Diante dos resultados obtidos nesse trabalho, faz-se necessário avaliar meios com diferentes concentrações de sais, outros reguladores de crescimento, fontes de carboidratos, entre outros, para favorecer a capacidade de expressão dos embriões somáticos de *H. chartacea* cv. Sexy Pink em plantas.

As células dos calos formados na maioria dos tratamentos com as combinações de AIA+2,4-D apresentaram tamanho reduzido, conteúdo citoplasmático denso e intensa atividade metabólica, traduzida pela reação ao carmim acético, apresentando coloração vermelha (Fig. 1C). De acordo com Guerra *et al.* (1999), a coloração com carmim acético evidencia a presença de substâncias de reserva, as quais poderão favorecer na formação do tecido. As células que apresentam as características supracitadas são consideradas células embriogênicas (Durzan, 1988; Mathew & Philip, 2003; Kim *et al.*, 2003).

Os calos friáveis apresentando nódulos amarelados nas extremidades são considerados embriogênicos (Falco *et al.*, 1996; Donato *et al.* 2000). Os calos obtidos no presente trabalho apresentavam as características supracitadas e quando foram analisados histologicamente, observaram-se células protuberantes, extremamente coradas, consideradas pró-embriogênicas, localizadas na camada superficial dos nódulos (Fig. 1D). Em *Eucalyptus gunnii* Hook, Hervé *et al.* (2001) também observaram a presença de uma protuberância na camada superficial do calo, sendo considerada uma região com células pró-embriogênicas.

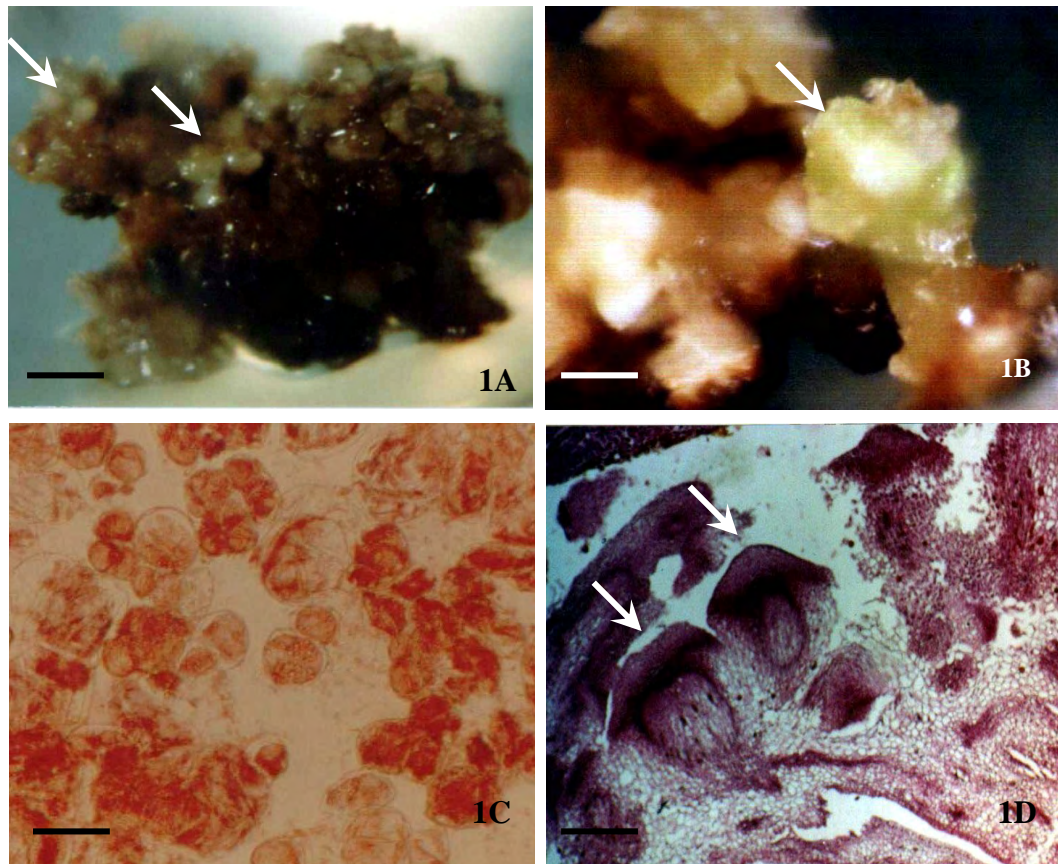


Figura 1 – Aspecto geral dos calos, visualização de células pró-embriogênicas e avaliação histológica dos calos da cv. Sexy Pink aos 90 dias de cultivo: **(1A)** Calos com nódulos amarelados e embriões somáticos (setas) obtidos no tratamento A2,5D5 (Barra = 1,25mm); **(1B)** Presença de estrutura esverdeada (seta) no tratamento A1,5D3 (Barra = 0,83mm); **(1C)** Células pró-embriogênicas mostrando reações à presença do carmim acético no tratamento A2,5D5 (Barra = 1mm); **(1D)** Seção longitudinal do calo mostrando a proliferação de células pró-embriogênicas na superfície do nódulo (seta), no tratamento A2,5D5 (Barra = 25mm).

As imagens obtidas na microscopia eletrônica de varredura permitem observar um tecido embriogênico com várias células esféricas pequenas (Fig. 2A), evidenciando células em divisão no tratamento A2,5D5 (Fig. 2B e 2C). Na figura 2C evidenciou-se a presença de células em divisão anticlinal que permaneceram conectadas ao tecido de origem (célula mãe). Aspectos similares foram observados por Söndahl *et al.* (1979), os quais admitem que o tecido embriogênico é constituído por células esféricas e pequenas, apresentando divisões no início do desenvolvimento. Ainda na figura 2C observa-se a presença de embrião somático em estágio globular (EG). Embriões similares foram observados por Rodriguez & Wetzstein (1998) em *Carya illinoensis*. Observa-se na figura 2D a presença de um embrião possivelmente de forma cilíndrica, ou seja, em estágio mais avançado que o globular. Esses resultados comprovam a existência de células embriogênicas, mas que essas, não apresentaram capacidade para se converterem em plantas nos tratamentos utilizados.

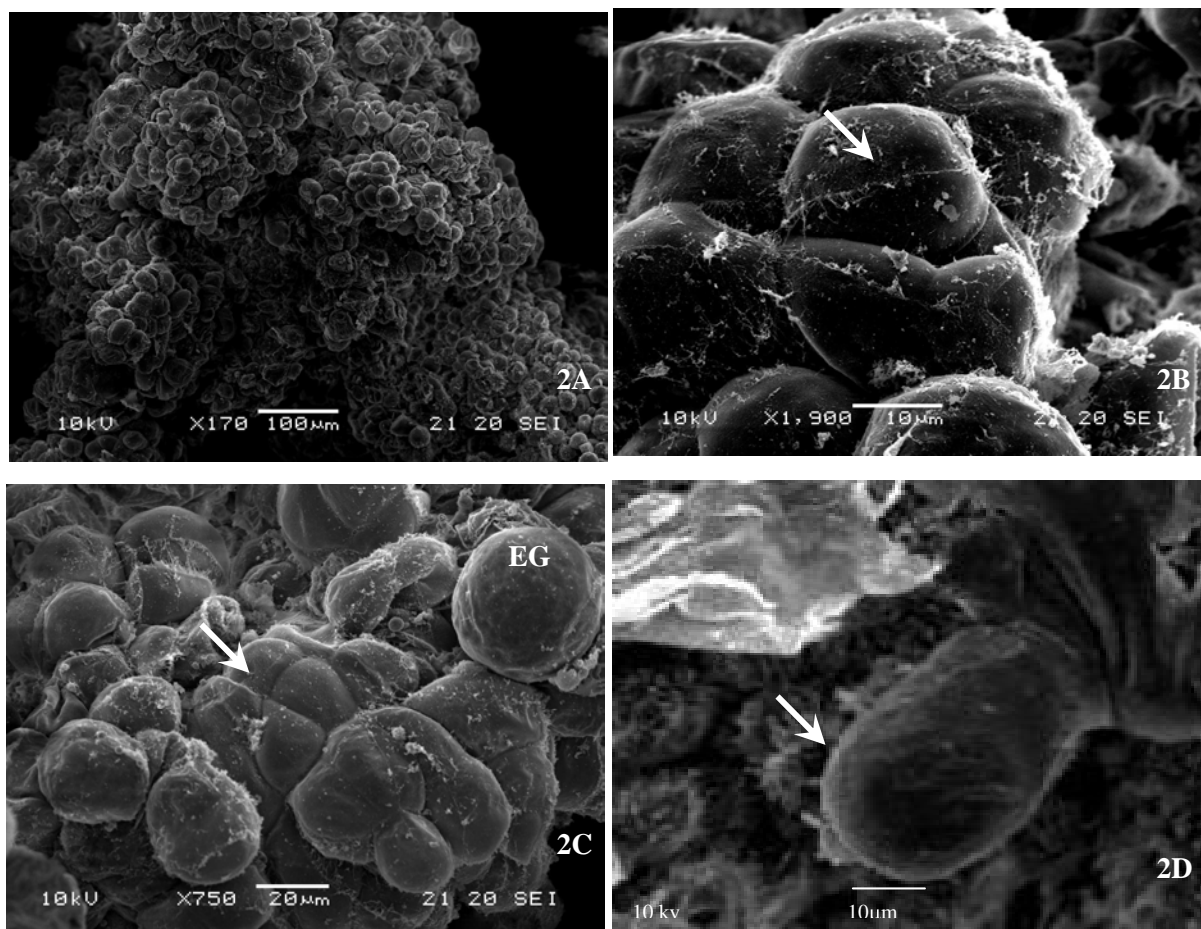


Figura 2 – Aspecto geral de células embriogênicas em calos da cv. Sexy Pink sob microscopia eletrônica de varredura (MEV), aos 90 dias de cultivo no tratamento A2,5D5: **(2A)** Visão geral do agrupamento de células embriogênicas com aspecto globular; **(2B)** Divisão anticlinal da célula embriogênica (seta); **(2C)** Células em processo de divisão (seta) e presença de embrião globular (EG); **(2D)** Embrião somático de forma cilíndrica (seta).

Considerando o IFC e o aspecto dos calos descritos no ensaio I, foram feitas combinações com as doses intermediárias de AIA elevando-se as concentrações de 2,4-D. Neste ensaio, a cultivar ‘Sexy Pink’ apresentou um maior índice de formação de calos em comparação com a cultivar ‘Sexy Scarlet’. Nos tratamentos A1D10 e A2D5, o IFC da cultivar ‘Sexy Pink’ foi igual a 1, o que correspondeu a 100% de formação de calos nos explantes inoculados (Tab. 2), demonstrando que o AIA associado ao 2,4-D apresentam respostas satisfatórias no IFC na cultivar estudada. Nathan *et al.* (1993) obtiveram 100% de formação de calos em tratamento com nível mais alto de 2,4-D ($17,68\text{mg.L}^{-1}$), utilizando como explante inicial segmentos de brotos de *H. psittacorum* obtidos *in vitro*.

Tabela 2 - Índice de formação de calos (IFC) a partir de secções de ovário das cultivares ‘Sexy Pink’ e ‘Sexy Scarlet’ da espécie *H. chartacea* Lane ex Barreiros aos 90 dias, em meios com diferentes combinações de AIA e 2,4-D (mg.L⁻¹) (Ensaio III).

Tratamentos (mg.L ⁻¹)	Índice de formação de calos (IFC)	
	Sexy Pink	Sexy Scarlet
0 AIA + 0 2,4-D (A0D0)	0 b	0 a
0 AIA + 5 2,4-D (A0D5)	0,8 a	0 a
0 AIA + 10 2,4-D (A0D10)	0,6 ab	0 a
0 AIA + 15 2,4-D (A0D15)	0,8 a	0 a
0 AIA + 20 2,4-D (A0D20)	0,2 ab	0 a
1 AIA + 0 2,4-D (A1D0)	0,4 ab	0 a
1 AIA + 5 2,4-D (A1D5)	0,6 ab	0,4 a
1 AIA + 10 2,4-D (A1D10)	1 a	0 a
1 AIA + 15 2,4-D (A1D15)	0,8 a	0,2 a
1 AIA + 20 2,4-D (A1D20)	0,8 a	0,2 a
2 AIA + 0 2,4-D (A2D0)	0,6 ab	0 a
2 AIA + 5 2,4-D (A2D5)	1 a	0,2 a
2 AIA + 10 2,4-D (A2D10)	0,8 a	0,4 a
2 AIA + 15 2,4-D (A2D15)	0,6 ab	0,2 a
2 AIA + 20 2,4-D (A2D20)	0 b	0,2 a

Médias seguidas de letras diferentes entre as linhas dentro de cada coluna, diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

O fato da cultivar ‘Sexy Scarlet’ não ter respondido aos tratamentos aplicados pode estar associado a diversos fatores, dentre eles o genótipo (recalcitrante). Mesmo sendo cultivares da mesma espécie (*H. chartacea* cv. Sexy Pink e Sexy Scarlet), o genótipo exerceu uma influência no comportamento *in vitro* e isso pode estar associado à recalcitrância de determinadas monocotiledôneas (Liliopsidas). Vários pesquisadores têm observado essa influência, os quais sugerem que genes dominantes controlam a formação de calos embriogênicos e a regeneração de plantas no cultivo *in vitro* (Green & Rhodes, 1982; Tomes, 1985).

Em um grande número de processos, o controle da atividade gênica na transcrição e tradução está diretamente relacionado com as células responsivas (Guerra *et al.*, 1999). Segundo Van Der Linde (1990) apud Guerra *et al.* (1999), as células responsivas são caracterizadas pela presença de receptores que se ligam ao hormônio e, subseqüentemente, iniciam a resposta na célula. Esses receptores geralmente são de origem protéica.

Observou-se que a maioria das secções de ovário da cv. Sexy Scarlet usadas como explante não apresentaram intumescimento durante os 90 dias de cultivo, exceto nos tratamentos A1D5 e A2D10, nos quais surgiram calos friáveis de coloração amarela esbranquiçada desenvolvendo-se mais na porção central do explante (Fig. 3A). Não houve a formação de embriões somáticos a partir

desses calos. Por outro lado, aos 30 e 60 dias de cultivo, a maioria dos explantes da cv. Sexy Pink apresentou intumescimento nas bordas, que progrediram para calos com características friáveis, de coloração creme a amarelada (Fig. 3B). Mas, ao final dos 90 dias, não se observou a presença de estruturas embriogênicas, ou seja, os calos apresentaram apenas uma massa celular, sem a formação de nódulos que caracterizam a presença de embriões somáticos. A análise citoquímica desses calos não mostrou a presença de células pró-embriogênicas. Esse fato pode ser atribuído as concentrações altas de auxinas utilizada nesse ensaio, interferindo na formação de embriões somáticos, como foi observado no tratamento com 2mg.L^{-1} de AIA e 20mg.L^{-1} de 2,4-D (A2D20) (Tab. 2). Diante dos resultados obtidos constatou-se uma dependência de auxina exógena para a indução de calos, visto que no tratamento controle (A0D0) não houve a formação de calos, mas que concentrações elevadas desse regulador de crescimento também inibem a calogênese.

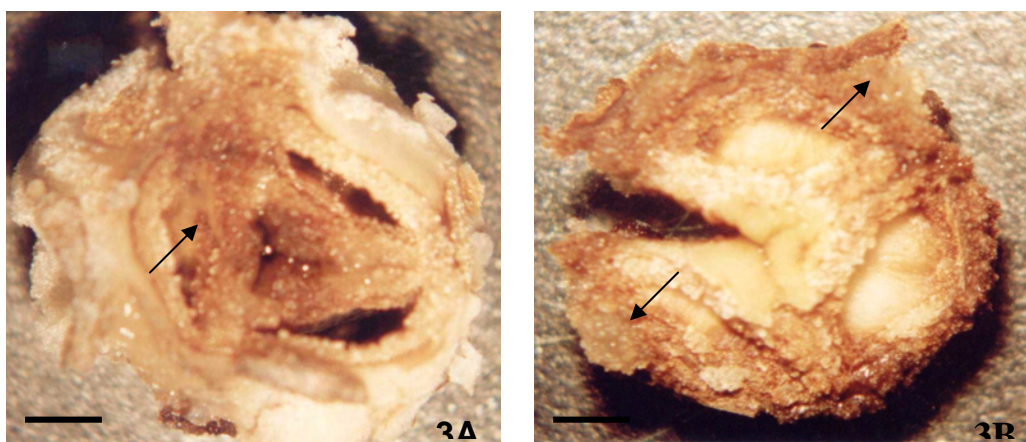


Figura 3 - (3A) Calos obtidos na cv. Sexy Scarlet no tratamento A1D5, provenientes de secções de ovário aos 90 dias de cultivo (seta) (Barra = 1,25mm); (3B) Calos obtidos na cv. Sexy Pink no tratamento A1D10, provenientes de secções de ovário após 30 dias de cultivo (setas) (Barra = 1,25mm).

b) **Experimento 2:** Indução de embriões somáticos a partir de embriões zigóticos.

Os embriões zigóticos imaturos de *Heliconia bihai* cv. (L.) L. Lobster Claw Two apresentaram-se mais intumescidos, ao final de 90 dias de cultivo, do que os embriões maduros. Entretanto, só foram visualizados nódulos de coloração amarelada com características embriogênicas em calos provenientes de 2 dos 10 embriões zigóticos extraídos de frutos maduros, cultivados no tratamento sem auxinas (Controle: A0D0) (Fig. 4A). Foram observados embriões somáticos em corte histológico desses nódulos, mostrando uma estrutura cilíndrica no ápice (coleoptile) e o meristema apical caulinar posicionado lateralmente (Fig. 4B).

Segundo Beltrati (1994), o desenvolvimento embrionário em monocotiledôneas e dicotiledôneas é similar até o estágio globular e posteriormente nas monocotiledôneas, o cotilédone inicia-se cilíndrico, já que apenas um coleoptile (cotilédone) é formado e o meristema apical caulinar é lateral em relação ao coleoptile. Dessa forma, pode-se afirmar que alguns dos embriões observados no presente trabalho já não se apresentavam em estágio globular, mas sim no estágio cilíndrico, com o início da formação do coleoptile (Fig. 4B)

Devido ao maior intumescimento dos embriões zigóticos provenientes de frutos imaturos, alguns autores (Vasil *et al.*, 1983; Kamo *et al.*, 1985; Cruz *et al.*, 1990; Guerra e Handro, 1988 e 1991; Vikrant & Rashid, 2002) admitiram que a utilização de tecidos indiferenciados é um fator essencial para a obtenção de resultados satisfatórios na indução de embriogênese somática. Entretanto, a conversão dos calos em embriões somáticos pode ser induzida *in vitro*, como foi observada no presente trabalho e também em *Lonicera japonica* (Kim *et al.*, 2003), a partir de tecidos considerados diferenciados, como embriões zigóticos provenientes de frutos maduros. Resultados similares também foram alcançados por Zale *et al.* (2004), os quais observaram que os embriões zigóticos maduros de cultivares de *Triticum monococcum* e *T. tauschii* foram eficientes na indução de embriões somáticos e na conversão desses em plantas.

Kerbaui (1999) sugere a existência de níveis endógenos de auxinas ou de substâncias receptoras de origem protéica no explante, que possam desencadear uma resposta da célula, quando associadas às substâncias do meio nutritivo, induzindo a formação de calos. Snowball *et al.* (1991) detectaram, em *Citrus paradisi*, a presença de maiores concentrações de uma proteína específica nos tecidos maduros (proteína de maturação), quando comparados em tecidos similares de plantas juvenis, sugerindo que a presença de determinadas proteínas em alguns tecidos maduros, os tornem mais responsivos ao cultivo *in vitro*.

Vikrant & Rashid (2002) observaram um aumento na frequência de embriões somáticos provenientes de embrião zigótico maduro de *Paspalum scrobiculatum* L. após a adição de prolina ou triptofano ao meio de cultivo. Entretanto a indução de calos embriogênicos e, subsequentemente, de embriões somáticos, só foi possível utilizando concentrações relativamente baixas de 2,4-D (2 mg.L⁻¹), constatando que concentrações mais altas dessa auxina reduziram a capacidade de desdiferenciação das células.

Segundo Wareing & Al-Chalabi (1985) apud Kerbaui (1999), as diferenças entre calos oriundos de vários tecidos sugeriram que a divisão pode ser induzida em células maduras antes de sua completa desdiferenciação. Tal fato significaria que a expressão gênica original estaria, em certa extensão, sendo mantida mesmo após a retomada da mitose.

Nos tratamentos com combinações de AIA e 2,4-D, apesar do intumescimento do explante inoculado, não houve formação de calos durante os 90 dias de cultivo (Fig. 4C). Observou-se, além

do tratamento controle, maior intensidade de intumescimento nos embriões zigóticos cultivados nos meios nutritivos A1D0 e A2D0, para embrião imaturo e maduro, respectivamente, ou seja, em meio nutritivo desprovido de 2,4-D, demonstrando a ausência de tendência combinatória entre o explante e as concentrações de 2,4-D utilizadas.

De uma maneira geral, a embriogênese somática é induzida por auxinas fortes. Tanto as auxinas como os demais reguladores de crescimento não influenciaram as respostas do explante exclusivamente por meio de mudanças na sua concentração, mas essa regulação também pode ser exercida mediante alterações na sensibilidade das células responsivas do próprio explante. Dessa maneira, a resposta a um determinado hormônio pode ser alterada por algumas mudanças, tais como: o número e afinidade de receptores e o nível de substâncias endógenas (hormônios, proteínas, etc.) no explante. Esses aspectos analisados em conjunto explicam porque determinados explantes são competentes para a embriogênese somática e outros não.

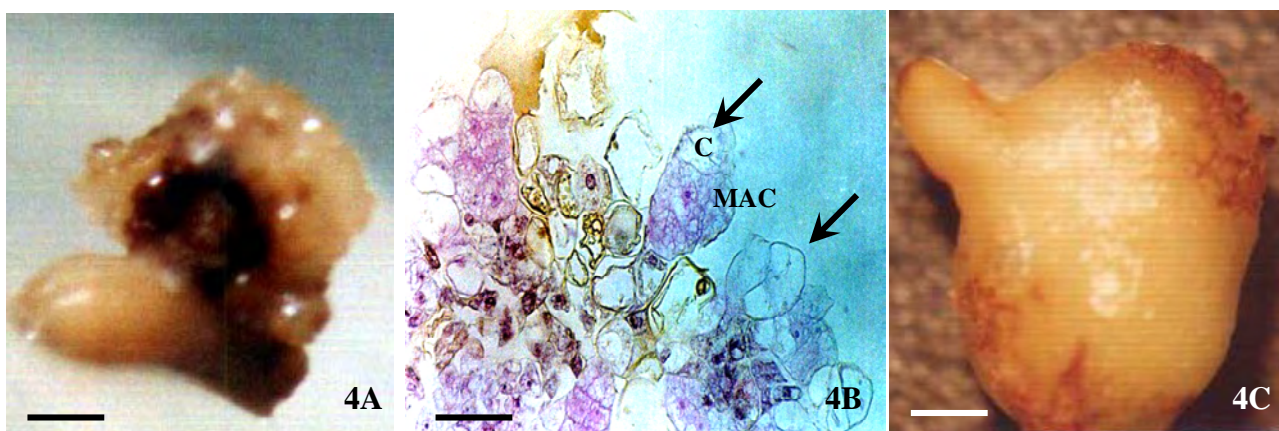


Figura 4 – Aspecto geral e histológico do calo e do embrião zigótico de *H. bihai* (L.) L. cv. Lobster Claw Two aos 90 dias de cultivo em meio MS sem regulador de crescimento: **(4A)** Calos nodulares a partir de embrião zigótico provenientes de fruto maduro, apresentando características embriogênicas (Barra = 1,25mm); **(4B)** Vista longitudinal de embriões somáticos (setas) a partir de embrião zigótico provenientes de fruto maduro (C = Coleoptile; MAC = Meristema apical caulinar) (Barra = 0,25mm); **(4C)** Embrião zigótico provenientes de fruto imaturo intumescido (Barra = 0,83mm).

Conclusões

A indução de embriogênese somática a partir do cultivo *in vitro* de secções de ovário de *H. chartacea* Lane ex Barreiros cv. Sexy Pink em meio MS, só é possível mediante a adição de auxinas (AIA e/ou 2,4-D), independente da presença de BAP;

A *H. chartacea* Lane ex Barreiros cv. Sexy Scarlet mostrou-se menos responsiva do que a cv. Sexy Pink, à indução de embriogênese somática a partir de secções de ovários, em meio MS acrescido de auxinas (AIA e 2,4-D);

Os embriões zigóticos provenientes de frutos maduros de *H. bihai* cv. (L.) L. Lobster Claw Two favoreceram a formação de embriões somáticos em meio MS sem regulador de crescimento.

Agradecimentos

A Prof^a Isabelle Meunier pela orientação estatística; ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Azami (LIKA) pelas análises realizadas; ao Banco do Nordeste do Brasil (BNB) e a CAPES pelo apoio financeiro para a realização desse trabalho.

Referências bibliográficas

Abalo, J. E. 1999. Heliconias for the ornamental industry. **Acta Horticulturae**. **486**, p.313-315.

Almeida, E. P. de; Oliveira, R. P. de. & Dantas, J. L. L. 2001. Indução e desenvolvimento de calos e embriões somáticos em mamoeiro. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, **58** (1): 51-54.

Atehortua, L.; Urrea, A. L.; Gil, U.; Mora, B.; Valencia, C.; Corrales, M.; Carmona, A. & Vallejo, A. 1999. Heliconia Tissue Culture. **Bulletin of Heliconia Society International**, **9** (4): 16-17.

Beltrati, C. M. 1994. **Morfologia e Anatomia de Sementes**. Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Área de Biologia Vegetal. Depto. de Botânica. UNESP. 108p.

Caldas, L. S.; Haridasan, P. & Ferreira, M. E. Meios nutritivos. In: A. C. Torres; L. S. Caldas & Buso, J. A. 1998. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI, v. 1, p.87-132.

Castro, C. E. F. de. 1995. **Helicônia para exportação: Aspectos técnicos da produção**. Brasília: editora, 44p. (FRUPEX. Publicações Técnicas, 16).

Chalupa. 1987. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Picea*, *Quercus*, *Betula*, *Tilia*, *Robinia*, *Fagus* and *Aesculus*. **Commun. Inst. For. Cec.**, **15**, p.133-148.

- Cronauer-Mitra, S. S.; Krikorian, A. D. 1984. Multiplication of *Musa* from excised stem tips. **Annals of Botany**, **53**. London, p. 321-328.
- Cruz, G. S.; Canhoto, J. M. & Abreu, M. A. V. 1990. Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryos of *Feijoa sellowiana* Berg. **Plant Science Limerick**, v. 66, p.263-270.
- Dias, M. A. & Rodrigues, P. H. V. 2001. Fontes de explantes e contaminantes isolados em cultivo *in vitro* de helicônia. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, **7**. Campinas. (2): 165-168.
- Donato, V. M. T. S.; Andrade, A. G.; Cabral, J. B. & Alves, G. T. 2000. Embriogênese somática *in vitro* em couve comum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, **35**. Brasília. (4): 711-718.
- Durzan, D. J. 1988. Somatic polyembryogenesis for the multiplication of tree crops. **Biotechnology and Genetic Engineering Review**, **6**. p. 341-378.
- Falco, M. C.; Mendes, B. M. J.; Tulmann Neto, A. & Glória, B. A. da. 1996. Histological characterization of *in vitro* regeneration of *Saccharum* sp. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, **8**. Londrina, (2): 93-97.
- Flores, R. Peters, J. A.; Fortes, G. R. de L. & Oliveira, M. de F. 2003. Efeito de concentrações de 2,4-D, picloram e BAP na indução de calos e regeneração de plantas de morangueiro cv. Vila Nova. **Revista Ciência Rural**, **8**. Santa Maria, (2): 87-91.
- Goh, C. J.; Nathan, M. J.; Kumar, P. P. 1995. Direct organogenesis and induction of morphogenic callus through thin section culture of *Heliconia psittacorum*. **Scientia Horticulturae**, **62**. Amsterdam, , p.113-120.
- Green, C. E. & Rhodes, C. A. 1982. Plant regeneration in tissue culture of maize, SHERIDAN, W. F (Ed.) In: **Maize for biological research**. Univ. Press, Univ. Dakota, Grand Forks. p.367-372.
- Guerra, M. P. & Handro, W. 1988. Somatic embryogenesis and plant regeneration in embryo culture of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae). **Plant Cell Reports**, **7**. New York, , p.505-552.

Guerra, M. P. & Handro, W. 1991. Somatic embryogenesis in tissue cultures of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae). In: AHUJA, R. (Ed.) **Woody Plant Biotechnology**, New York: Plenum. p.189-196.

Guerra, M. P., Torres, A. C. & Teixeira, J. B. 1999. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: Torres, A. C.; Caldas, L. S.; Buso, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. 2**. Brasília: EMBRAPA-SPI, , p.533-568.

Guerra, M. P. 2001. Protocolo para visualização de pró-embrião somático. **Curso de Técnicas Avançadas de Micropropagação de Plantas**. Recife, p. 35. Apostila.

Hervé, P.; Jauneau, A.; Pâques, M.; Marien, J.; Boudet, A. M. & Teulière. 2001. A procedure for shoot organogenesis *in vitro* from leaves and nodes of an elite *Eucalyptus gunnii* clone: comparative histology. **Plant Science**, **161**. Limerick, , p.645-653.

Hu, C. Y., Ferreira, A. G. 1998. Cultura de Embriões. In: A. C. Torres; L. S. Caldas; J. A. Buso (eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. 1**. Brasília: EMBRAPA-SPI, p.371-393.

Inoue, T.; Higuchi, M.; Hashimoto, Y.; Seki, M.; Kobayashi, M.; Kato, T.; Tabata, S.; Shinozaki, K. Kakimoto, T. 2000. Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. **Nature**, **409**, p.1060-1063.

Jarret, R. L. Fisher, J. B.; Litz, R. E. 1985. Organ formation in *Musa* tissue cultures. **Plant Physiology**, **121**. Rockville,., p. 123-130.

Jiménez, V. M. 2001. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, **13** (2). Londrina, p.196-223. Review.

Kamo, K. K., Becwar, M. R.; Hodges, T. K. 1985. Regeneration of *Zea mays* L. from embryogenic callus. **Botanical Gazette**, **146**. Chicago, , p.327-334.

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

- Kim, S. W.; Oh, S. C.; In, D. S. & Liu, J. R. 2003. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration in zygotic embryo cultures of japanese honeysuckle. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **72**. Dordrecht, p.277-280.
- Kurten, U.; Nautila, A. M.; Kauppinen, V. & Rousi, M. 1990. Somatic embryogenesis in cell cultures of birch (*Betula pendula* Roth.) **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, **23**. Dordrecht, p.101-105.
- Lee, K. S.; Zapata-Arias, F. J. Brunner, H. & Afza, R. 1997. Histology of somatic embryo initiation and organogenesis from rhizome explants of *Musa* spp. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **51**. Dordrecht. p. 1-8.
- Maciel, A. L. R.; Pasqual, M; Pereira, A. R.; Rezende, J. C.; Silva, A. B. & Dutra, L. F. 2003. Embriogênese somática indireta em explantes foliares de *Coffea arabica* L. cv. Oboatã. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, **27** (1): 107-116.
- Martini, P. C.; Willadino, L.; Alves, G. D. & Donato, V. M. T. S. 2001. Propagação de orquídea *Gongora quinquenervis* por sementeira *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, **36** (10): Brasília, 1319-1324.
- Mathew, M. M. & Philip, V. J. 2003. Somatic embryogenesis versus zygotic embryogenesis in *Ensete superbum*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **72**. Dordrecht, p. 267-275.
- Murashige, T.& Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, **15**. Copenhagen, p. 473-497.
- Nathan, M. S.; Goh, C. J. & Kumar, P. P. 1992. *In vitro* propagation of *Heliconia psittacorum* by bud culture. **Hortscience**, **27**. Alexandria, p. 450-452.
- Nathan, M. S.; Kumar, P. P. & GOH, C. 1993. High frequency plant regeneration in *Heliconia psittacorum* L.f. **Plant Science**, **90**, p.63-71.

Novak, F. J.; Afza, R. Van Duren, M.; Perea-Dallos, M. Conger, B.V. & Xiaolang, T. 1989. Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of dessert (AA and AAA) and cooking (ABB) bananas (*Musa spp.*). **Biotechnology**, **7**, p. 154-159.

Nowak, J.; Shulaev, V. 2003. Priming for transplant stress resistance in *in vitro* propagation. **In Vitro Cell. Development Biol. Plant**, **39**, p.107-124.

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

Radojevic, L. 1979. Somatic embryos and plantlets from callus cultures of *Paulownia tomentosa* Steud. **Zeitschrift fur Pflanzenphysiol.** **91**, p.57-62.

Rai, V. R.; McComb, J. 2002. Direct somatic embryogenesis from mature embryos of sandalwood. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **69**. Dordrecht, p.65-70.

Rodriguez, A. P. M.; Wetzstein, H. Y. 1998. A morphological and histological comparison of the initiation and development of pecan (*Carya illinoensis*) somatic embryogenic cultures induced with naphthaleneacetic acid or 2,4-D dichlorophenoxyacetic acid. **Protoplasma**, **204**. New York, p.71-83.

Snowball, A. M.; Zeman, A. M.; Tchan, Y.T.; Mullins, M.G.; Goodwin, P.B. 1991. Phase change in *Citrus*. Immunologically detectable differences between juvenile and mature plants. **Australian Journal of Plant Physiology**, **18**, p.385-396.

Söndahl, M. R.; Sharp, W. R. 1977. High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. **Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie**, **81** (5): 395-408.

Söndahl, M. R.; Salisbury, J. L.; Sharp, W. R. 1979. SEM characterization of embryogenic tissue and globular embryos during high frequency somatic embryogenesis in coffee callus cells. **Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie**, **94**, p.185-188.

Tomes, D. T. 1985. Cell culture, somatic embryogenesis and plant regeneration in maize, rice, sorghum and millets. Brigh, S.W.J. & Jones, M.G.K. (Eds.). In: Martinus Nijhoff / Dr. W. Junk Publishers. **Cereal tissue and cell culture**, Dordrecht, Boston, p. 175-205.

Valencia, C.; Atehortua, L. 1999. Somatic embryogenesis in *Heliconia stricta* Huber. **The Bulletin**. May, p.14.

Vasil, V.; Lu, C. Y.; Vasil, I. K. 1983. Proliferation and plant regeneration from the nodal region of *Zea mays* L. (maize, gramineae) embryos. **American Journal of Botany**. **70**, p. 951-954.

Vasil, I. K.; Vasil, V. 1986. In cell culture and somatic cell genetics of plants. **Academic Press**, **3**. Orlando, Florida., p.121-150.

Vasil, I. 1988. Progress in the regeneration and genetic manipulation of cereal crops. **Biotechnology**, **6**, p.397-402.

Vikrant; Rashid, A. 2002. Somatic embryogenesis from immature and mature embryos of a minor millet *Paspalum scrobiculatum* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **69**. Dordrecht, p.71-77.

Williams, E. G.; Maheswaran, G. 1986. Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany**, **57**. London, p.443-462.

Zale, J. M.; Borchardt-Wier, H.; Kidwell, K. K.; Steber, C. M. 2004. Callus induction and plant regeneration from mature embryos of a diverse set of wheat genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **76**. Dordrecht, , p.277-281.

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

TRABALHO II

PROPAGAÇÃO DE *Heliconia bihai* (L.) L. cv. Lobster Claw Two MEDIANTE O CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS¹

Trabalho a ser publicado na Revista Brasileira de Botânica.

¹ Trabalho realizado com o apoio do Programa de Pós-Graduação em Botânica da UFRPE.

Propagação de *Heliconia bihai* (L.) L. cv. Lobster Claw Two mediante o cultivo *in vitro* de embriões zigóticos

CLÁUDIA ULISSES¹; TEREZINHA RANGEL CAMARA²; GLADYS FLÁVIA MELO-DE-PINNA³;
LILIA WILLADINO⁴; CYNTHIA CAVALCANTI DE ALBUQUERQUE¹.

¹Doutoranda em Botânica – UFRPE; ²Dept^o. de Química – UFRPE; ³Dept^o. de Botânica – USP; ⁴ Dept^o. de Biologia – UFRPE.

Rua D. Manoel de Medeiros s/n Dois Irmãos Recife – PE CEP 51.171-900

Autor para correspondência: Cláudia Ulisses e-mail: claudia@nlink.com.br

Propagação de *Heliconia bihai* (L.) L. cv. Lobster Claw Two mediante o cultivo *in vitro* de embriões zigóticos

RESUMO

O objetivo do trabalho foi avaliar o processo de micropropagação a partir do cultivo de embriões zigóticos de *H. bihai* (L.) L. cv. Lobster Claw Two. Inicialmente, parte dos embriões provenientes de frutos maduros e imaturos foram incluídos em parafina e seccionados em micrótomo, para avaliar a estrutura interna e a outra parte foi inoculada em meio MS (Murashige e Skoog) com diferentes concentrações de sais (MS completo e ½ MS), de GA₃ (ácido giberélico) (0; 2,5 e 5,0 mg.L⁻¹), além de sacarose ou glicose (30 g.L⁻¹) para avaliar a conversão do embrião em planta. Em seguida, as plantas obtidas foram repicadas e transferidas para meio MS (MS completo e ½ MS), com 0 e 2,5 mg.L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina). Avaliou-se a multiplicação aos 30 e 45 dias após a inoculação. Para verificar a variabilidade genética das plantas, utilizou-se sistemas isoenzimáticos (PO, EST, ACP, GOT, ADH e MDH). A observação da estrutura interna dos embriões revelou que os embriões maduros apresentaram tecidos em estádios de diferenciação mais avançados do que os embriões imaturos, fato já esperado. Na fase de conversão dos embriões em plantas, 85% dos embriões provenientes de frutos maduros converteram-se em plantas normais em meio ½ MS, acrescido de sacarose, enquanto que os embriões cultivados em meios com glicose, apenas 41% converteram-se em plantas. Na fase de multiplicação, as plantas cultivadas em meio ½ MS com 2,5 mg.L⁻¹ de BAP apresentaram maior número de gemas aos 45 dias de cultivo. Em alguns sistemas isoenzimáticos utilizados foram observadas variações isoenzimáticas que podem estar associadas a diferença de idade entre a planta matriz e as plantas obtidas *in vitro*, como também variações no fenótipo eletroforético das plantas obtidas a partir de embriões zigóticos.

Palavras-chave: helicônias; micropropagação; sacarose; glicose; histologia; isoenzimas.

Propagation of *Heliconia bihai* (L.) L. cv. Lobster Claw Two by cultivation *in vitro* of zygotic embryos

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate micropropagation processes from the cultivation of zygotic embryos of *H. bihai* (L.) L. cv. Lobster Claw Two. Initially, the internal structure of embryos from immature and mature fruits was compared. The embryos were embedded in paraffin and divided into sections using a microtome. Embryos from immature and mature fruits were inoculated in MS (Murashige and Skoog) environments of different concentrations of salts (full MS and ½ MS) and AG₃ (gibberellic acid) (0, 2.5 and 5 mg.L⁻¹), using either saccharose or glucose (30 g.L⁻¹) and their conversion into plants was evaluated. Then, plants were replicated and transferred to an MS environment (full MS or ½ MS) with 0 or 2.5 mg.L⁻¹ concentrations of BAP (6 benzyllamino purine), with the objective to evaluate their multiplication 30 and 45 days after inoculation. The genetic variability of plants from zygotic embryos was estimated using isoenzymatic analyses (POD, EST, ACP, GOT, ADH, and MDH). The internal structure of mature embryos showed tissues in more advanced stages of differentiation than immature embryos, as expected. During the conversion phase, 85% of the inoculated embryos were converted into plants in the ½ MS environment using saccharose as a source of carbohydrate, while only 41% of the embryos cultivated with glucose converted into plants. In the multiplication phase, plants cultivated in the ½ MS environment and with 2.5 mg.L⁻¹ of BAP showed more buds. The isoenzymatic analyses showed some changes on isoenzymatic patterns in intensity of coloration and migration of some bands. These results can be associated respectively with the difference of the ages among mother plant and plants obtained *in vitro* and/or variations in eletrophoretic phenotypes of the plants from *in vitro* cultivation of zygotic embryos.

Keywords: heliconia, micropropagation, saccharose, glucose, histology, isozymes

Introdução

O mercado nacional e internacional de flores e plantas ornamentais começa a se interessar por produtos diferenciados, dando destaque às espécies tropicais da ordem Zingiberales, pertencente à família Heliconiaceae (IBRAFLOR, 2001). O gênero *Heliconia* está constituído por cerca de 250 espécies, sendo a maioria nativa dos trópicos do continente americano (Criley 1989). As plantas desse gênero possuem rizoma, são herbáceas, eretas, com altura variando entre 0,5 e 10 m, conforme a espécie. Dentre as helicônias, a espécie *Heliconia bihai* (L.) L. cv. Lobster Claw Two está entre as mais comercializadas, por apresentar inflorescência ereta contendo brácteas de cor laranja-forte com bordos esverdeados e frutos de coloração branca quando imaturos e azulada quando maduros (Paiva 1998).

A propagação dessa espécie para fins comerciais é realizada vegetativamente, o que favorece a disseminação de fitopatógenos entre as áreas de cultivo por gerações sucessivas. O cultivo *in vitro* vem sendo utilizado na horticultura ornamental como um sistema rápido de multiplicação, possibilitando a produção de propágulos vegetais livres de doenças (Chu 1985 & Sato *et al.* 1999).

Em helicônia, o estabelecimento *in vitro* de explantes provenientes de ápices caulinares é freqüentemente prejudicado por contaminações endofíticas, conforme registrado por diversos autores (Nathan *et al.* 1992, Atehortua *et al.*, 1999, Dias & Rodrigues 2001). Portanto, torna-se necessária a utilização de outros tipos de explantes para o estabelecimento dessa cultura *in vitro*, visto que trata-se de uma cultura de grande importância econômica e que se faz necessário viabilizar o processo de micropropagação com a finalidade de beneficiar a produção de flores, pois a floricultura é um dos segmentos agrícolas que se encontra em grande expansão.

Diante desse problema de contaminação endofítica em ápices caulinares de helicônia, os embriões zigóticos podem ser uma alternativa como fonte de explante para a propagação clonal *in vitro*, devido a sua natureza juvenil com alto potencial regenerativo, além de estarem encerrados

dentro de um ambiente estéril, pois os mesmos se encontram alojados em óvulos protegidos pelas paredes do ovário (Hu & Ferreira 1998).

Para favorecer o desenvolvimento do embrião zigótico *in vitro* até a formação de planta e posteriormente, a multiplicação das mudas a partir de gemas laterais, se faz necessário a adequação da concentração dos sais do meio nutritivo, de fontes de carboidratos e de reguladores de crescimento que possibilite a micropropagação de helicônia a partir desse explante.

Um dos entraves da utilização do embrião zigótico como explante inicial para a micropropagação é a segregação genética, sendo necessária a avaliação genética das plantas provenientes desse tipo de propagação (Hu & Ferreira 1998). No entanto, ecologistas admitem que o cruzamento interespecífico entre as helicônias normalmente não é muito comum, devido a alguns fatores como a adaptação dos polinizadores para determinada espécie e a existência de barreiras fisiológicas, entre elas a superfície estigmática, a qual é receptiva por apenas 4 a 5 horas após a abertura da flor e a alta especificidade de grande parte dos pólenes que não fecundam os óvulos de plantas de outra espécie de helicônia (Criley & Broschat 1992). Esses fatos reduzem as chances de cruzamentos entre as plantas.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a micropropagação de mudas de *H. bihai* (L.) L. cv. Lobster Claw Two, a partir de embrião zigótico, analisando através de análise isoenzimática a identidade genética das plantas obtidas.

Material e métodos

a) Análise da estrutura interna do embrião zigótico.

Embriões zigóticos provenientes de frutos imaturos e maduros de *H. bihai* (L.) L. cv. Lobster Claw Two foram retirados de sementes, em seguida foram desidratados, infiltrados no aparelho histotécnico automático, incluídos em parafina em emblocador Tissue-Tec e submetidos a cortes histológicos seriados, com espessura variando entre 4 μm a 6 μm , utilizando micrótomo horizontal. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina. A finalidade dessa fase foi verificar

a estrutura interna do embrião proveniente de fruto imaturo e maduro, de forma que pudesse auxiliar o processo de micropropagação a partir de embriões zigóticos. O preparo das lâminas foi realizado no setor de Patologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA). As lâminas foram analisadas e fotografadas ao fotomicroscópio ótico no Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade de São Paulo (USP).

b) Cultivo de embriões zigóticos

Frutos imaturos e maduros de *H. bihai* (L.) L. cv. Lobster Claw Two foram retirados de inflorescências procedentes do Sítio São Tiago, localizado no município de Paulista – PE e levados para o Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e em câmara de fluxo laminar, foram imersos em álcool 70%, por um minuto, seguindo de duas imersões em solução de hipoclorito de cálcio, a primeira a 3% contendo três gotas de tween 20%, durante 20 minutos, e a segunda, a 1,5% contendo, também, três gotas de tween 20%, por 15 minutos. Finalmente, foram feitas três lavagens com água destilada estéril. Logo após a desinfestação dos frutos retirou-se o pericarpo dos mesmos com auxílio de pinça e bisturi, e em seguida, pressionando a semente na região da radícula com um alicate, o embrião foi extraído. Os embriões provenientes, tanto de frutos imaturos como maduros, foram inoculados em meio MS (Murashige & Skoog 1962) com a concentração salina original ou com a metade dessa concentração, acrescido de ácido giberélico (GA_3) nos níveis de 0; 2,5 e 5,0 $mg.L^{-1}$, combinados com duas fontes de carboidratos (sacarose ou glicose) na concentração de 30 $g.L^{-1}$, dentro de um esquema fatorial 2x3x2, inteiramente casualizado, com 10 repetições. Foram utilizados tubos de ensaio (2,5 x 15 cm) contendo 10 mL de meio nutritivo, gelificado com 2,0 $g.L^{-1}$ de phytagel. O pH do meio nutritivo foi ajustado para 5,8 antes de esterilizar em autoclave a 121°C, durante 20 minutos.

Os embriões provenientes de frutos imaturos e maduros foram mantidos no escuro em sala de crescimento durante os primeiros oito dias após a inoculação, com a finalidade de evitar a

oxidação. Em seguida, foram submetidos a um fotoperíodo de 16 horas e luminosidade de $50 \mu\text{mols m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ durante 52 dias. Durante todo o período de incubação a temperatura da sala de crescimento foi mantida a $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Aos 15 dias e 30 dias após a inoculação, foram realizadas avaliações qualitativas do desenvolvimento dos explantes e aos 60 dias foram avaliados o desenvolvimento de parte aérea (altura e número de folhas) e o número de raízes. Os dados das variáveis analisadas aos 60 dias foram normalizados pela transformação $\sqrt{x + 0,5}$ para a análise de variância e a comparação de médias foi realizada pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

c) Indução de Multiplicação

As plantas provenientes dos embriões zigóticos extraídos de frutos maduros foram repicadas, ficando uma unidade propagativa (ápice caulinar) com aproximadamente 1 cm sendo esta, transferida para meio MS completo ou com metade da concentração salina ($\frac{1}{2}$ MS), combinado com $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ BAP (6-benzilaminopurina) e sem esse regulador de crescimento (controle).

Os tubos de ensaio contendo os ápices caulinares foram mantidos na sala de crescimento do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 16 horas e luminosidade de aproximadamente $50 \mu\text{mols m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

As avaliações foram realizadas aos 30 e 45 dias após a inoculação, determinando-se: número e tamanho das gemas formadas a partir do explante inicial (ápice caulinar) e altura da planta formada a partir das gemas. O experimento foi conduzido em arranjo fatorial 2×2 ; no delineamento experimental inteiramente casualizado, com 10 repetições. Os valores obtidos foram normalizados pela transformação $\sqrt{x + 0,5}$ para a análise de variância e a comparação de médias das variáveis analisadas foi realizada pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Ao final da fase de multiplicação, as plantas com aproximadamente 5 cm foram aclimatizadas em copos descartáveis com capacidade para 250 mL, contendo substrato comercial (Golden Mix), e mantidas em telado com irrigação diária, até o início da drenagem, durante 60 dias, onde receberam quinzenalmente, solução nutritiva contendo 742,86 mg.L⁻¹ de fertilizante solúvel (Kristalon® - 3% N; 11% P₂O₅; 38% K₂O; 4% MgO; 11% S; 0,025% B; 0,004% Mo; 0,01% Cu-EDTA; 0,025% Zn-EDTA,; 0,07% Fe-EDTA e 0,04% Mn-EDTA) e 840 mg.L⁻¹ de nitrato de cálcio (BarcoViking – 15,5% N e 19% Ca).

d) Análise isoenzimática das plantas

No presente trabalho foram estudados os sistemas peroxidase (PO), esterase (EST), fosfatase ácida (ACP), malato desidrogenase (MDH), álcool desidrogenase (ADH) e glutamato oxaloacetato transaminase (GOT) no Laboratório de Genética Bioquímica da UFPE.

Inicialmente retiraram-se aproximadamente 300 mg de tecido foliar jovem de 10 plantas provenientes do cultivo *in vitro* de embriões zigóticos e da planta matriz e, em seguida, foram macerados, individualmente, em solução extratora até total homogeneização. Cada amostra recebeu 1,5 mL da solução extratora, composta pelos tampões Borato de lítio e Tris-citrato, além de 600 mg de sacarose e 600 mg de PVP (polivinilpirrolidona). Os homogeneizados foram colocados em tubos de microcentrífuga e centrifugados a 12.000 rpm durante 10 minutos, a 4^oC. Em seguida, adicionou 10 µL do sobrenadante nos poços dos géis do sistema de eletroforese horizontal e descontínuo.

Os géis de poliacrilamida, a 7% foram preparados segundo a metodologia de Scandalios (1969). Nas cubas foi utilizada a solução tampão Borato de lítio. Os géis foram postos a migrar a uma temperatura aproximada de 4^oC, até que a linha de frente atingisse 5 cm do ponto de aplicação das amostras. Durante a migração foi utilizada uma corrente de 9,0 volts.cm⁻¹.

Após a corrida eletroforética foi efetuada a revelação específica das proteínas para cada sistema enzimático. Os protocolos de revelação foram baseados nos trabalhos de Poulik (1957), para PO e GOT, e de Scandalios (1969), para EST, ACP, ADH e MDH. Posteriormente, os

zimogramas foram elaborados, sendo avaliados número e intensidade das bandas isoenzimáticas reveladas, para a definição dos padrões eletroforéticos das amostras utilizadas.

Resultados e discussão

a) Avaliação da estrutura interna do embrião zigótico.

A análise da estrutura interna do embrião zigótico proveniente de fruto imaturo revelou a presença de um opérculo (estrutura localizada na região micropilar) com coloração amarelada, além do endosperma e início da diferenciação do ápice caulinar (Figura 1). Já o embrião proveniente de fruto maduro, não se observou a presença do opérculo, mas, apresentava o processo de formação do ápice caulinar em estágio mais avançado, além do procâmbio (tecido meristemático do sistema vascular), da protoderme, que dará origem a epiderme e do meristema fundamental, que produzirá o córtex e a medula (Figura 1).

Nos embriões provenientes de frutos maduros, como já era esperado, os tecidos estavam em estádios de diferenciação mais avançados, enquanto que nos embriões provenientes de frutos imaturos ficou evidente a ausência de determinados tecidos. Esse fato pode ter dificultado o desenvolvimento dos embriões *in vitro*, pois, segundo Hu & Ferreira (1998), quanto mais jovem o embrião, mais complexa será a exigência nutricional que permita o seu desenvolvimento *in vitro*.

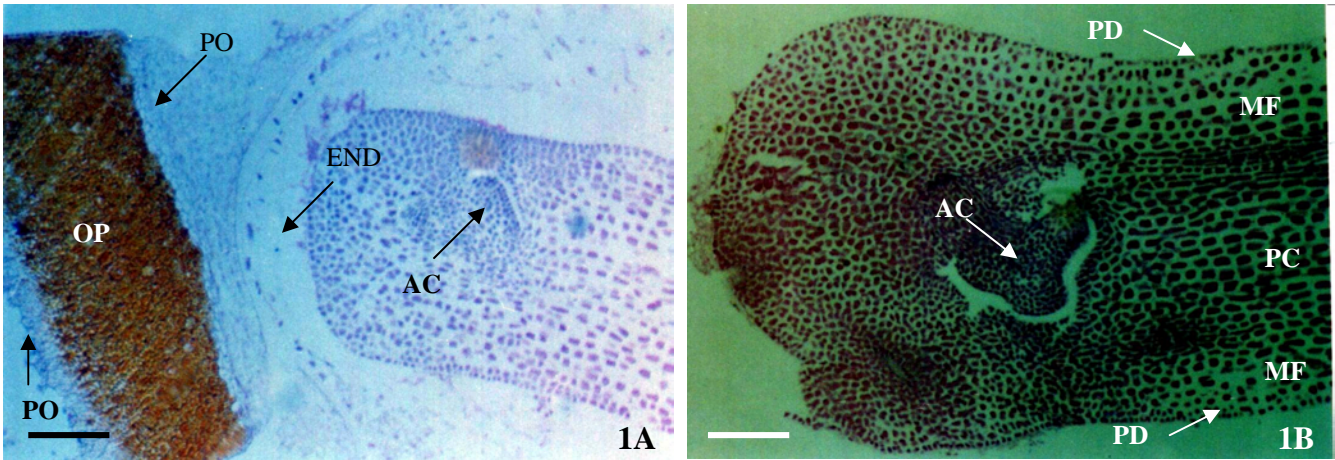


Figura 1 – Seção longitudinal de embriões zigóticos de *H. bihai* (L.) L. cv. Lobster Claw Two: (1A) Embrião zigótico proveniente de fruto imaturo, evidenciando o opérculo (OP), a parede do opérculo (PO), o endosperma (END) e o início da diferenciação do ápice caulinar (AC) (Barra = 1 mm); (1B) Embrião zigótico proveniente de fruto maduro apresentando a região do ápice caulinar (AC), a protoderme (PD), o meristema fundamental (MF) e o procâmbio (PC) (Barra = 1 mm).

b) Cultivo de embriões zigóticos

Aos 15 dias de cultivo iniciou-se o processo de conversão dos embriões provenientes de frutos maduros, formando inicialmente a parte aérea, enquanto que nos embriões provenientes de frutos imaturos não ocorreu o processo de conversão dos mesmos em planta durante os 60 dias de cultivo. Esse fato pode estar associado à estrutura interna do embrião imaturo, na qual foi observada a ausência de alguns tecidos, além da presença do endosperma (Figura 1), que, segundo Hu & Ferreira (1998), tanto a imaturidade do embrião como a presença de substâncias inibidoras no endosperma, podem interferir no processo de conversão do embrião em planta.

Dependendo da espécie, o embrião imaturo pode ser estimulado a crescer por alguns reguladores de crescimento, dentre eles as giberelinas (Hu & Ferreira, 1998). No presente trabalho, mesmo com a adição de ácido giberélico ao meio nutritivo, não houve a conversão do embrião imaturo em planta.

O período alcançado na conversão dos embriões em plantas foi de aproximadamente 30 dias, o qual foi considerado relativamente curto, comparando com trabalhos com *Avena sativa* L., no qual só foi observado o desenvolvimento da planta inteira aos 12 meses de cultivo (Lamb *et al.*, 2002). Em orquídea (*Gongora quinquenervis*), a formação de parte aérea e raízes das plantas de origem zigótica ocorreu aos 180 dias após a inoculação em meio MS na ausência de regulador de crescimento (Martini *et al.*, 2001).

Com relação à fonte de carboidratos, avaliou-se que 85% dos embriões provenientes de frutos maduros cultivados em meio contendo sacarose converteram-se em plantas normais ao final dos 60 dias. Enquanto que, daqueles cultivados em meios com glicose, apenas 41% se converteram em plantas. Resultados similares foram obtidos com *Persea americana* Mill (Llano_Agudelo *et al.*, 1995) e com *Euterpe oleracea* Mart (Ledo *et al.*, 2001), com um percentual de conversão de 85% para *P. americana* e 84% para *E. oleracea*, em meio MS com sacarose. Gollagunta *et al.* (2004) também observaram que a sacarose favoreceu o desenvolvimento *in vitro* de *Hosta tokudama*.

Em presença de glicose a conversão dos embriões em plantas foi inferior àquela registrada para sacarose, tanto no que se refere ao número de embriões convertidos, como ao aspecto geral das plantas formadas. As plantas cultivadas em meio com sacarose apresentaram folhas vigorosas de coloração verde intensa, enquanto aquelas cultivadas em meio com glicose, não se desenvolveram e, ao final dos 60 dias, apresentaram regiões necrosadas (Figura 2).

As plantas obtidas a partir do cultivo de embriões zigóticos provenientes de frutos maduros apresentaram melhor desenvolvimento, no que se refere aos parâmetros avaliados, nos tratamentos em meio ½ MS, independente da fonte de carboidrato. Vale destacar, entretanto, que o melhor desenvolvimento de parte aérea e raízes foi registrado no tratamento com sacarose (Tabela 1).

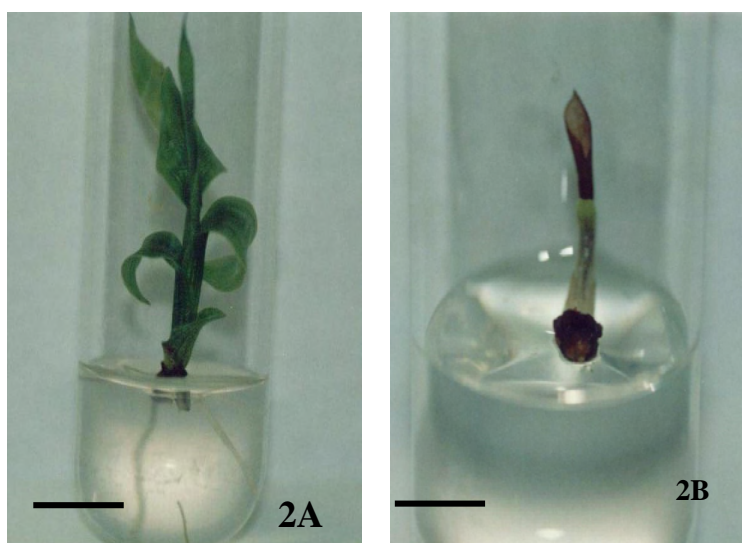


Figura 2 – Plantas de *H. bihai* (L.) L. cv. Lobster Claw Two provenientes do cultivo *in vitro* de embriões zigóticos aos 60 dias de cultivo: **(2A)** Planta cultivada em meio ½ MS com 30 g.L⁻¹ de sacarose (Barra = 1,19 cm); **(2B)** Planta cultivada em meio ½ MS com 30 g.L⁻¹ de glicose (Barra = 0,83 cm).

Tabela 1 – Desenvolvimento de plantas de *H. bihai* (L.) L. cv. Lobster Claw Two, a partir de embrião zigótico proveniente de fruto maduro, aos 60 dias de cultivo *in vitro*, sob diferentes fontes de carboidratos e concentrações de sais no meio MS.

Meios nutritivos / Fonte de carboidrato	Altura (cm)		Número de folhas		Número de raízes	
	½ MS	MS completo	½ MS	MS completo	½ MS	MS completo
Sacarose	1,48 aA	0,97 bA	1,63 aA	1,52 bA	3,87 aA	0,69 bA
Glicose	0,68 aB	0,09 bB	1,22 aB	1 bB	1,44 aB	0 bB

Médias seguidas de mesma letra, minúsculas dentro de cada linha e maiúscula dentro de cada coluna, não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

A sacarose geralmente é o carboidrato mais utilizado como fonte energética (Hu & Ferreira, 1998), pois explantes cultivados *in vitro* são heterotróficos e dependem de fonte externa de energia e carbono. Rojas *et al* (1996) admitem que a resposta do desenvolvimento do explante a uma determinada fonte de carbono depende da constituição genética da espécie. Esses autores observaram que aos 40 dias de cultivo, 75% das sementes de *Coffea arabica* germinaram *in vitro*,

tanto utilizando a sacarose como outras fontes de carbono (lactose e glicose), enquanto que no desenvolvimento de parte aérea apenas a glicose beneficiou o desenvolvimento das plantas.

As giberelinas estão relacionadas com a ativação do crescimento vegetativo do embrião, o enfraquecimento da camada do endosperma que envolve o embrião e restringe seu crescimento, assim como com a mobilização das reservas energéticas do endosperma (Taiz & Zeiger, 2004). No presente trabalho a adição de GA₃ aos meios contendo glicose coincidiu com um aumento na altura da parte aérea, número de folhas e de raízes. Apesar do efeito estimulador do GA₃ sobre a parte aérea e raízes das plantas cultivadas com glicose, os resultados mostram que a presença da sacarose foi mais eficaz na promoção do crescimento, em especial na ausência dessa giberelina. A presença de GA₃ no meio de cultivo exerceu um efeito inibitório sobre o número de folhas nos tratamentos com sacarose (Tabela 2) independente concentração de sais no meio MS (Tabela 3). Esse fato pode estar associado à exigências fisiológicas do explante. Embriões excisados no estágio maduro, ou próximo a esse, em geral, dependendo da espécie, não necessitam de suplementação de reguladores de crescimento (Hu & Ferreira 1998). Em *Euterpe oleracea* Mart a formação de plantas completas a partir de embriões zigóticos ocorreu em meio MS na ausência de reguladores de crescimento (Yokoo *et al.* 1992).

Tabela 2 – Desenvolvimento de plantas de *H. bihai* (L.) L. cv. Lobster Claw Two, a partir de embrião zigótico proveniente de fruto maduro, aos 60 dias de cultivo *in vitro*, sob diferentes fontes de carboidratos e concentrações de GA₃ em meio MS.

Fonte de carboidrato/ Níveis de GA ₃ (mg.L ⁻¹)	Altura (cm)		Número de folhas		Número de raízes	
	Sacarose	Glicose	Sacarose	Glicose	Sacarose	Glicose
0	1,98 aA	0,15 bC	3,38 aA	1,15 bB	2,58 aA	0,15 bC
2,5	0,78 aC	0,25 bB	1 aB	1 aC	2,06 aB	0,51 bB
5,0	1,00 aB	0,75 bA	1 bB	1,18 aA	1,50 aC	1,30 bA

Médias seguidas de mesma letra, minúsculas dentro de cada linha e maiúscula dentro de cada coluna, não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

Tabela 3 - Desenvolvimento de plantas de *H. bihai* (L.) L. cv. Lobster Claw Two, a partir de embrião zigótico proveniente de fruto maduro, aos 60 dias de cultivo *in vitro*, sob diferentes concentrações de GA₃ e de sais do meio MS.

Meios Nutritivos/ Níveis de GA ₃ (mg.L ⁻¹)	Altura (cm)		Número de folhas		Número de raízes	
	½ MS	MS completo	½ MS	MS completo	½ MS	MS completo
0	1,17 aB	0,68 bA	2,28 aA	1,85 bA	1,80 aC	0,59 bA
2,5	0,61 aC	0,40 bB	1 aC	1 aB	2,26 aB	0,39 bB
5,0	1,46 aA	0,38 bC	1,18 aB	1 bB	3,70 aA	0 bC

Médias seguidas de mesma letra, minúsculas dentro de cada linha e maiúscula dentro de cada coluna, não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

Considerando as variáveis avaliadas: altura da parte aérea, número de folhas e número de raízes, o melhor tratamento para a conversão de embriões zigóticos em plantas, no cultivo *in vitro*, foi o meio MS com a metade da concentração salina, acrescido de 30 g.L⁻¹ de sacarose, sem regulador de crescimento.

c) Indução de Multiplicação

As plantas cultivadas no tratamento com ½ MS e 2,5 mg.L⁻¹ de BAP apresentaram maior número de gemas durante a fase de multiplicação. Oliveira *et al.* (2001) observaram que as maiores taxas de multiplicação em bananeira (*Musa* sp.) cv FHIA-01 foram alcançadas na presença de 4 mg.L⁻¹ de BAP, tendo uma média de 2,65 plântulas por subcultivo. Em algumas espécies de helicônia a concentração de 5 mg.L⁻¹ de BAP no meio nutritivo induziu a multiplicação de gemas (Atehortua *et al.* 1999). No entanto, no presente trabalho, foi alcançado um maior número de gemas utilizando 2,5 mg.L⁻¹ de BAP em meio MS reduzido à metade da concentração de sais (Tabela 4).

Segundo Smith (1988), a multiplicação de plantas com baixas concentrações de reguladores de crescimento diminuem os riscos de variação somaclonal, onde o BAP é um dos principais agentes causadores de alterações genotípicas. Portanto, os resultados obtidos no presente trabalho,

podem ser úteis à redução dos custos na produção comercial de mudas *in vitro* de *H. bihai* (L.) L. cv. Lobster Claw Two devido à redução da concentração de sais MS e do BAP no meio nutritivo.

Tabela 4 – Desenvolvimento de gemas de *H. bihai* (L.) L. cv. Lobster Claw Two aos 45 dias durante a fase de multiplicação.

Meio Nutritivo	Número de gemas	Tamanho das gemas (cm)	Altura das plantas (cm)
MS + 0mg.L ⁻¹ de BAP	1,19 d	0,22 d	0,79 b
MS + 2,5mg.L ⁻¹ de BAP	1,64 b	0,60 a	0 d
½ MS + 0mg.L ⁻¹ de BAP	1,21 c	0,24 c	0,82 a
½ MS + 2,5mg.L ⁻¹ de BAP	2,33 a	0,58 b	0,09 c

Médias seguidas de letras diferentes dentro de cada coluna, diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

Ao final dos 45 dias observou-se um aumento do número de gemas em relação aos 30 dias (Tabela 5). O mesmo comportamento foi observado por Nathan *et al.* (1992), que constataram um maior número de gemas de *H. psittacorum* aos 45 dias de cultivo em meio MS com 100% da concentração dos sais, acrescido de 2,25 mg.L⁻¹ de BAP.

Tabela 5 – Efeito da época de subcultivo sobre a multiplicação e tamanho das gemas e a altura das plantas de *H. bihai* L. (L.) cv. Lobster Claw Two.

Número de gemas		Tamanho das gemas (cm)		Altura das plantas (cm)	
30 dias	45 dias	30 dias	45 dias	30 dias	45 dias
1,45 b	1,57 a	0,44 b	0,49 a	0,22 b	0,31 a

Médias seguidas de letras diferentes dentro de cada linha, diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

As plantas provenientes do tratamento com ½ MS e 2,5 mg.L⁻¹ de BAP apresentaram um sistema radicular com raízes finas e secundárias, o que facilitou a absorção de nutrientes e favoreceu o bom desenvolvimento das plantas. Segundo Grattapaglia & Machado (1998), um

sistema radicular apresentando raízes curtas e finas são características que asseguram um bom índice de sobrevivência na aclimatização, como o que foi obtido neste trabalho, no qual obteve-se 95% de sobrevivência das plantas aclimatizadas, demonstrando que as condições de irrigação, nutrição, tipo de substrato, entre outros, foram satisfatórias para a aclimatização dessa cultivar de helicônia. Resultados similares foram obtidos por Nathan *et al.* (1992), em *H. psittacorum*, onde 90% das plantas aclimatizadas sobreviveram.

d) Análise isoenzimática das plantas

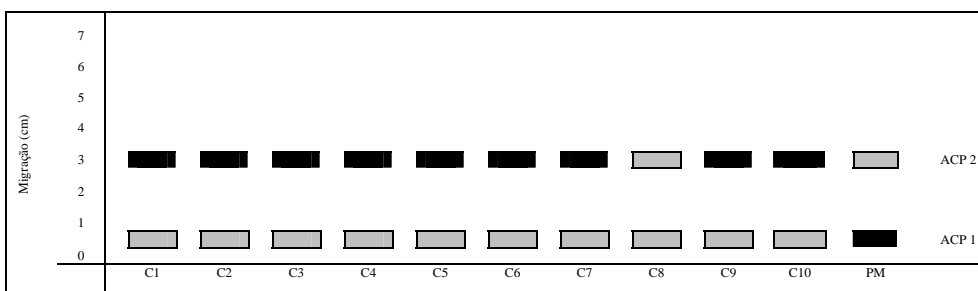
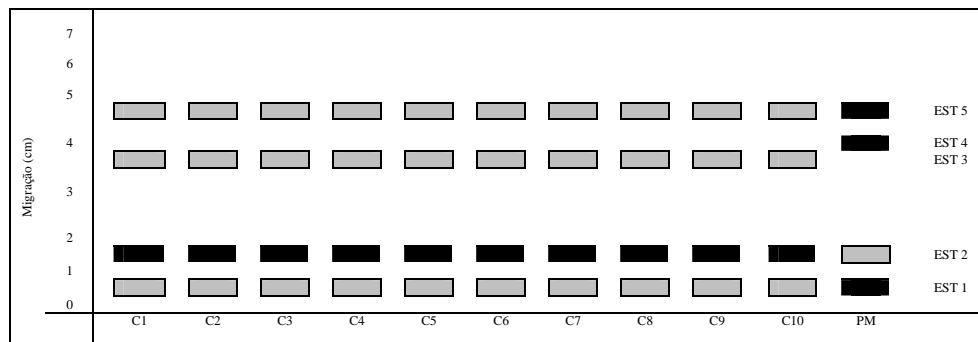
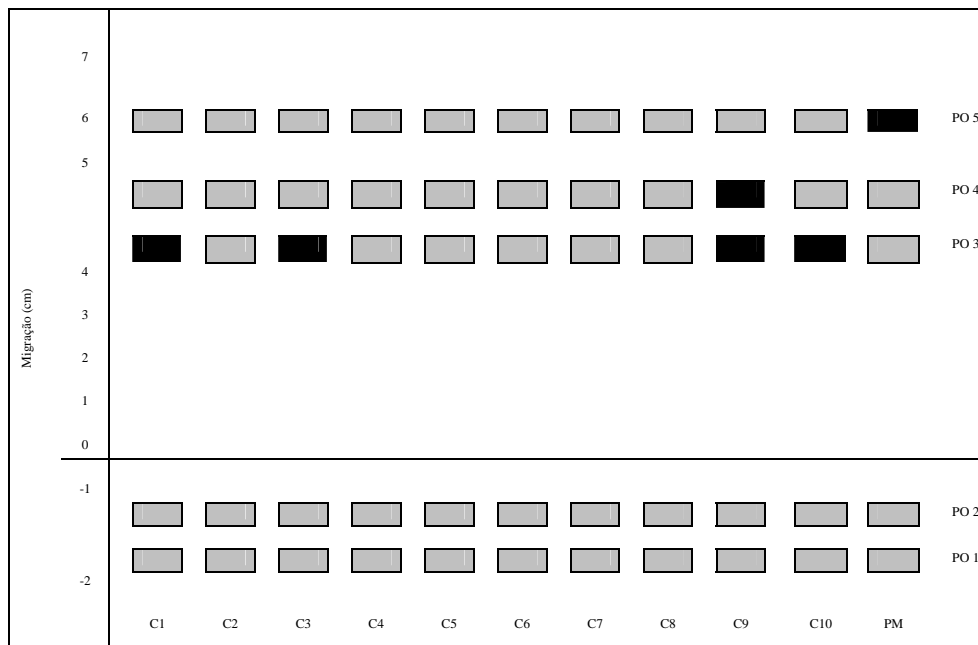
Os sistemas isoenzimáticos são ferramentas bioquímicas importantes para identificar híbridos interespecíficos e variantes genéticos, como também permitem detectar alterações gênicas em plantas provenientes do cultivo *in vitro* em várias espécies: *Lycopersicon esculentum* (Evans *et al.* 1984); *Solanum phureja* (Pehu *et al.* 1986); *Rubus idacus* (Cousineau & Dounelly, 1989); *Ipomoea batatas* (Alves *et al.* 1994); *Sacharaum officinalis* (Taylor *et al.* 1995); *Musa sp.* (Ulisses *et al.* 2002) e *Ananas comosus* (Feuser *et al.* 2003).

No presente trabalho, cinco (PO, EST, ACP, ADH e GOT) dos seis sistemas isoenzimáticos testados, o material vegetal apresentou comportamento similar, tanto em relação ao número de bandas quanto à mobilidade eletroforética, verificando-se alteração apenas na intensidade da coloração das bandas. A presença de bandas catódicas só foi observada nos sistemas PO, MDH e ADH. No sistema peroxidase (PO), as bandas catódicas apresentaram intensidade de coloração fraca, enquanto que nos sistemas MDH e ADH as bandas catódicas foram acromáticas (Figuras 3 e 4).

Nas bandas EST-1 e EST-2; ACP-1 e ACP-2 da planta matriz (PM) observou-se uma inversão na intensidade de coloração, pois quando a banda EST-1 ou ACP-1 apresentou coloração forte, nas demais plantas a intensidade da coloração foi fraca, enquanto que nas bandas EST-2 e ACP-2 a intensidade de coloração na planta matriz foi fraca e nas demais plantas foi mais forte (Figura 3). Este fato pode estar associado à diferença de idade entre a planta mãe e as plantas

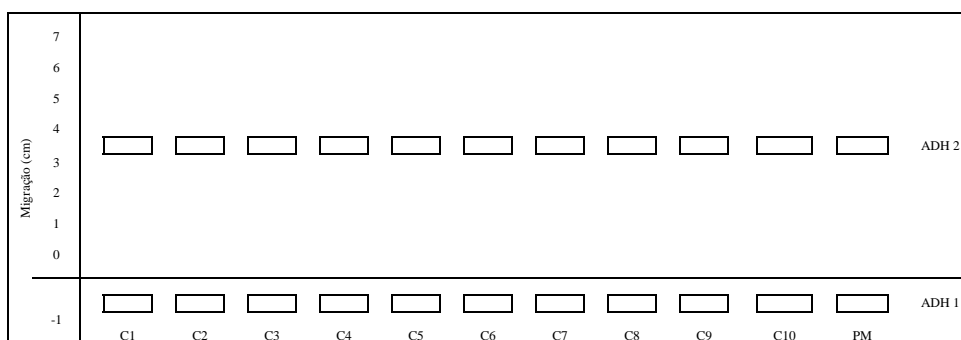
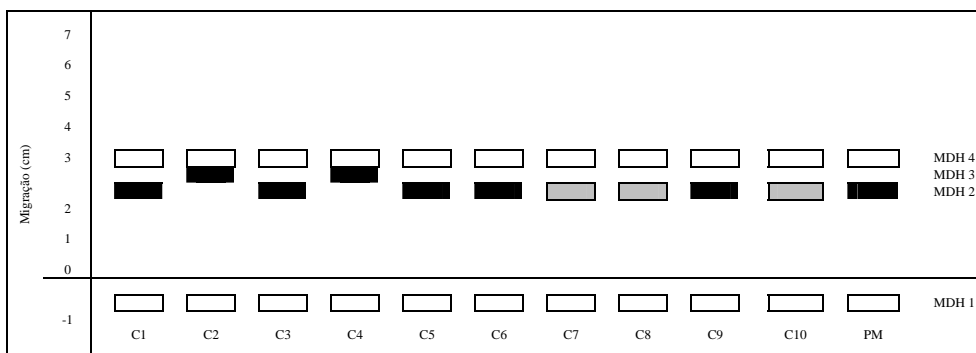
obtidas a partir do cultivo de embriões *in vitro*. No sistema malato desidrogenase (MDH) observou-se um avanço da banda MDH-2, formando então a banda MDH-3 nos clones C2 e C4 (Figura 4). Comportamento similar foi observado por Royo *et al.* (1994) e Sawazaki *et al.* (1996), os quais observaram que apenas no sistema GOT algumas bandas apresentavam-se mais avançadas ou mais retardadas que as demais, ou seja, apresentavam uma diversidade na migração das bandas. Os autores supracitados admitiram que essa diversidade pode estar associada apenas à velocidade de migração, visto que não foram realizados cruzamentos para a confirmação da herança mendeliana na planta estudada (*Vitis vinifera*). No entanto, Jarret & Litz (1986) e Rani & Raina (2000), admitiram que a presença ou ausência de bandas auxilia de forma significativa na identificação dos genótipos.

Apesar de Freitas *et al.* (1995) assegurarem a caracterização de clones de acerola com apenas a utilização de sistemas isoenzimáticos, os resultados obtidos no presente trabalho sugerem a necessidade de se averiguar a existência de alterações gênicas a partir de sistemas baseados em polimorfismo de DNA, para que se possa recomendar com maior segurança a utilização do embrião zigótico como fonte de explante no processo de micropropagação.

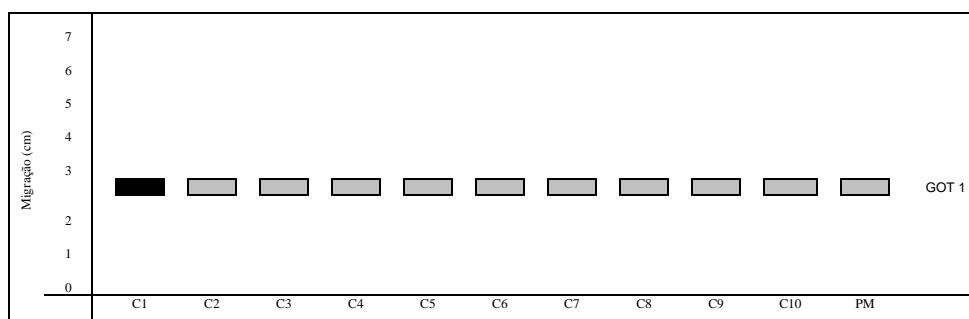


Banda Fraca
 Banda Média
 Banda Forte

Figura 3 – Representação esquemática dos zimogramas dos sistemas isoenzimáticos (Peroxidase, Esterase e Fosfatase ácida) das plantas micropropagadas a partir de embriões zigóticos (C) e da planta mãe (PM) de *Heliconia bihai* (L.) L. cv. Lobster Claw Two.



ÁLCOOL DESIDROGENASE (ADH)



Banda Fraca
 Banda Média
 Banda Forte
 Banda Acromática

Figura 4 – Representação esquemática dos zimogramas dos sistemas isoenzimáticos (Malato desidrogenase, Álcool desidrogenase e Glutamato Oxaloacetato Transaminase) das plantas micropropagadas a partir de embriões zigóticos (C) e da planta mãe (PM) de *Heliconia bihai* (L.) L. cv. Lobster Claw Two.

Conclusões

O cultivo *in vitro* de embriões zigóticos provenientes de frutos maduros de *H. bihai* L. (L.) cv. Lobster Claw Two em meio MS com a metade da concentração dos sais acrescido de sacarose, promove a regeneração de um maior número de plantas;

A adição de glicose ao meio MS inibe a conversão de embriões zigóticos de *H. bihai* L. (L.) cv. Lobster Claw Two em plantas;

A micropropagação por meio da formação de gemas provenientes do cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de *H. bihai* L. (L.) cv. Lobster Claw Two é estimulada pela presença de 2,5 mg.L⁻¹ de BAP em meio MS com a metade da concentração dos sais;

Subcultivos a cada 45 dias promovem um aumento do número de gemas de *H. bihai* L. (L.) cv. Lobster Claw Two favorecendo o processo de micropropagação.

Agradecimentos

À Prof^ª Isabelle Meunier pela orientação estatística, ao Banco do Nordeste do Brasil (BNB) e a CAPES pelo apoio financeiro para a realização desse trabalho.

Referências bibliográficas

ALVES, J. M. C.; SIHACHAKR, D.; ALLOT, M. TIZROUTINE, S.; MUSSIO, I. SERVAES, A.; DUCREUX, G. 1994. Isozyme modifications and plant regeneration through somatic embryogenesis in sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). Plant Cell Reports, New York, v. 13, p.437-441.

ATEHORTUA, L.; URREA, A. L.; GIL, U.; MORA, B.; VALENCIA, C.; CORRALES, M.; CARMONA, A.; VALLEJO, A. 1999. Heliconia Tissue Culture. Bulletin of Heliconia Society International, v. 9, n. 4, p. 16-17.

CHU, I. Y. E. 1985. The application of tissue culture to plant improvement and propagation in the ornamental horticulture industry, p.15-35. In: ZIMMERMAN, R. H.; GRIESBACH, R. J.; HAMMERSCHLAG, F. A.; LAWSON, R. H. (Eds.). Tissue culture as a plant production system for horticultural crops. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht. The Netherlands. p.15-135.

- CRILEY, R. A. 1989. Development of Heliconia and Alpinia in Hawaii: cultivar selection and culture. *Acta Horticulturae*, Wageningen, v. 246, p.247-258.
- CRILEY, R. A.; BROCHAT, T. K. 1992. Heliconia: botany and horticulture of a new floral crop. *Horticultural Reviews*, v.14. 55p.
- COUSINEAU, J. C.; DOUNELLY D. J. 1989. Identification of raspberry cultivars *in vivo* and *in vitro* using isozymes analysis. *Hortscience*, Alexandria, v. 24, p.490-492.
- DIAS, M. A.; RODRIGUES, P. H. V. 2001. Fontes de explantes e contaminantes isolados em cultivo *in vitro* de helicônia. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*, Campinas. v.7, n. 2, p.165-168.
- EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; MEDINA FILHO, H. P. 1984. Somaclonal and gametoclonal variation. *American Journal Botanical*, v. 71, p.759-774.
- FEUSER, S.; MELER, K.; DAQUINTA, M.; GUERRA, M. P. 2003. Genotypic fidelity of micropropagated pineapple (*Ananas comosus*) plantlets assessed by isozyme and RAPD markers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v. 72, p.221-227.
- FREITAS, N. S. A.; BURITY, H. A.; BEZERRA, J. E. F.; SILVA, M .V. 1995. Caracterização de clones de acerola (*Malpighia glabra* L.) através dos sistemas isoenzimáticos peroxidase-esterase. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 30, p. 1453-1457.
- GOLLAGUNTA, V. ADELBERG, J. W.; RIECK, J.; RAJAPAKSE, N. 2004. Sucrose concentration in liquid media affects soluble carbohydrates, biomass and storage quality of micropropagated hosta. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v.77, p.125-131.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. 1998. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. *Cultura de tecidos e transformação de plantas*. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH. p. 183-260.
- HU, C. Y., FERREIRA, A. G. 1998. Cultura de Embriões. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: EMBRAPA-SPI/CNPH, v.1, p.371-393.

IBRAFLOR. 2001. Informativo IBRAFLOR. Ano 7, v. 23, março.

JARRET, R. L.; LITZ, R. E. 1986. Isoenzymes as genetic markers in bananas and plantains. *Euphytica*, Wageningen, v. 35, n. 4, p.539-549.

LAMB, C. R. C.; MILACH, S. C. K.; PASQUAL, G.; BARRO, R. S. 2002. Embriogênese somática e regeneração de plantas a partir de embrião maduro de aveia. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 37, n. 2, p.123-130.

LLANO-AGUDELO, B. E.; GOZALEZ-ROSAS, H.; SALAZAR-GARCIA. 1995. *In vitro* culture of mature avocado embryos. *Fruits*, Paris, v.1, p.59-64.

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

MARTINI, P. C.; WILLADINO, L.; ALVES, G. D.; DONATO, V. M. T. S. 2001. Propagação de orquídea *Gongora quinquenervis* por sementeira *in vitro*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.36, n.10, p.1319-1324.

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

NATHAN, M. S.; GOH, C. J.; KUMAR, P. P. 1992. *In vitro* propagation of *Heliconia psittacorum* by bud culture. *Hortscience*, Alexandria, v. 27, p. 450-452.

OLIVEIRA, R.; P.; de.; SILVEIRA, D. G.; SILVA, S. de O. 2001. Concentração de BAP e a eficiência de micropropagação de bananeira tetraplóide (Grupo AAAB). *Scientia Agrícola*, v. 58, n. 1, p.73-78.

PAIVA, W. O. 1998. Cultura de helicônias. Fortaleza: (EMBRAPA-CNPAT, Circular técnica, 2) 20 p.

PEHU, E.; GASSMAN, C. VEILLEUX, R.; KALB, T. 1986. Changes in isozyme patterns and ultrastructure of calus tissue of *Solanum phureja* during regeneration. HortScience, Alexandria, v. 21, p.251.

POULIK, M. D. 1957. Starch gel eletrophoresis in a discontinuos system buffers. Nature, London. v.180. p.1477-1479.

RANI, V.; RAINA, S. N. 2000. Genetic fidelity of organized meristem-derived micropropagated plants: A critical reappraisal. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant, v. 36, p.319-330.

ROJAS, R.; CUBA, M.; MARTÍNEZ, M.; GARCÍA, D.; MONTES, S. 1996. Influencia de diferentes fuentes de carbono en la germinación y el desarrollo de embriones de *Coffea arabica* variedade 9722. Cultivos Tropicales, Havana, v.17, n.1, p.82-84.

ROYO, J. B.; MIRANDA, S.; ITOIZ, R.; CHOCARRO, A. 1994. Caracterización de variedades de vid (*Vitis vinifera* L.) mediante marcadores isoenzimáticos. Viticultura Enologia Profesional, Barcelona, v. 34, p.20-28.

SATO, A. Y.; NANNETTI, D. de C.; PINTO, J. E. B. P.; SIQUEIRA, J .O.; BLANK, M de F. A. 1999. Fungos micorrízicos-arbusculares no desenvolvimento de mudas de helicônia e gérbera micropropagadas. Horticultura Brasileira, Brasília. v. 17, n.1, p.25-28.

SAWAZAKI, H.; POMMER, C. V.; PASSOS, I. R. da S.; TERRA, M. M.; PIRES, E. J. P. 1996. Identificação de parentais e híbridos entre *Vitis vinifera* e *Vitis rotundifolia* utilizando polimorfismo enzimático e marcador RAPD. Bragantia, Campinas. v. 55, p.221-230.

SCANDALIOS, J. G. 1969. Genetc control of multiple molecular forms of enzymes in plants: a review. Biochemical Genetics, New York. v. 3, p.33-39.

SMITH, M. K. 1988. A review of factors influencing the genetic stability of micropropagated bananas. Fruits, v. 43, p. 219-223.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. 2004. Fisiologia Vegetal. 3. ed. Artmed. 719p.

TAYLOR, P. W. J.; GEJSKES, J .R.; KO, H. L.; FRASER, T. A.; HENRY, R. J.; BIRCH, R. G. 1995. Sensitivity of random amplified polymorphic DNA analysis to detect genetic change in sugarcane during tissue culture. Theorical Applied Genetic, v. 90, p.1169-1173.

ULISSES, C.; CAMARA, T. R.; WILLADINO, L.; ALBUQUERQUE, C. C. de; MARTINS, L. S. S.; FREITAS, N. S. A. de. 2002. Caracterização isoenzimática de clones de bananeira nanicaõ submetidos à salinidade. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, v. 6, n.2, p.358-361.

YOKOO, E. Y.; RAMOS, L. C. S.; BOVI, M. L. A. 1992. Cultura de tecidos de híbridos e espécies de palmitero no Instituto Agronômico. Campinas: (IAC. Boletim científico, 25), 24 p.

6.0 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

Diante dos resultados obtidos nos trabalhos apresentados nesta tese, admite-se que a obtenção de embriões somáticos a partir de secções de ovários de *H. chartacea* Lane ex Barreiros cv. Sexy Pink está atrelada à presença de auxinas, em especial o 2,4-D, mas o processo de expressão organogênica dos embriões somáticos não foi evidenciado. De acordo com as análises realizadas neste trabalho, principalmente a análise de MEV, observou-se a presença de células embriogênicas, as quais não foram capazes de se converterem em plantas. Esse comportamento pode estar associado a diversos fatores, tais como: o meio utilizado, as fontes e as concentrações de reguladores de crescimento, estágio de desenvolvimento do ovário, condições ambientais de cultivo, assim como o período que essas células ficaram expostas à concentração exógena de auxina. Sendo assim, sugere-se que sejam testadas outras fontes de auxinas, durante diferentes períodos, e em seguida, sejam transferidas para meio de conversão com diferentes fontes e concentrações de citocinina.

Quando foi avaliado o índice de formação de calos entre a cv. Sexy Scarlet e a cv. Sexy Pink não foi observada a presença de células embriogênicas em nenhuma das cultivares. Embora a cv. Sexy Pink tenha apresentado um índice de formação de calos superior à cv. Sexy Scarlet, esses não apresentaram estruturas embriogênicas. Apesar de pertencerem à mesma espécie, não foi observado comportamento similar. Portanto, esse fato pode estar relacionado ao genótipo (recalcitrante) ou a falta de afinidade do tecido com os componentes do meio nutritivo, especialmente os reguladores de crescimento. A falha na competência de um tecido pode estar associada a falta de receptores que interagem com os reguladores de crescimento induzindo o processo organogênico nas células.

Já no experimento com embrião zigótico de *H. bihai* (L.) L. cv. Lobster Claw Two, a obtenção de embriões somáticos só foi possível quando utilizados embriões zigóticos provenientes de frutos maduros, cultivados em meio MS sem reguladores de crescimento, sugerindo que o processo de divisão celular pode ser induzido em células maduras, antes de sua total desdiferenciação, indicando a existência de níveis endógenos de substâncias que proporcionem o desenvolvimento de embriões somáticos nos explantes inoculados.

Diante dos resultados desses dois experimentos, evidenciou-se que respostas fisiológicas variaram entre espécies, até mesmo entre cultivares, tipos de explantes, entre outros, em decorrência do genótipo.

Com a finalidade de obtenção de plantas a partir do cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de *H. bihai* (L.) L. cv. Lobster Claw Two observou-se que os embriões zigóticos provenientes de frutos maduros apresentaram uma maior percentagem de conversão em plantas, quando comparados com os zigóticos provenientes de frutos imaturos. Esse fato pode estar relacionado com a estrutura interna dos embriões provenientes de frutos imaturos, na qual foi observada a ausência de alguns tecidos, além da presença do endosperma, que pode conter substâncias inibidoras que interferiram

de forma negativa no processo de conversão do embrião em planta. Sendo assim, para micropropagar a cv. Lobster Claw Two a partir de embriões zigóticos, é necessário utilizar o embrião zigótico proveniente de frutos maduros, pois esses embriões apresentaram melhor desenvolvimento em meio com metade da concentração dos sais MS, utilizando como fonte de carboidrato a sacarose, demonstrando uma tendência combinatória entre o tipo de carboidrato e o explante utilizado. As plantas obtidas a partir dos embriões zigóticos provenientes de frutos maduros apresentaram maior número de gemas quando cultivadas em meio MS com a concentração dos sais reduzida à metade, acrescido de $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP durante 45 dias. Esse resultado pode ser útil na redução dos custos de produção comercial de mudas micropropagadas de *H. bihai* (L.) L. cv. Lobster Claw Two.

Para assegurar de forma prática e econômica, a identidade genética das plantas provenientes de embrião zigótico, realizou-se a análise isoenzimática, na qual observaram-se alterações nos padrões isoenzimáticos, no que se refere à intensidade de coloração. Esse comportamento pode estar atrelado à diferença de idade entre as plantas provenientes do cultivo *in vitro* em relação à planta mãe. Também foi observado diferença na migração de bandas em apenas um dos seis sistemas testados, o sistema Malato Desidrogenase (MDH). Esse resultado pode estar associado a alguma variação no fenótipo eletroforético das plantas obtidas *in vitro* a partir de embrião zigótico. Portanto, diante desses resultados, faz-se necessária uma análise baseada em polimorfismos de DNA, para que se possa recomendar com maior segurança a utilização do embrião zigótico como fonte de explante no processo de micropropagação.

Anexo 1 – Composição dos sais inorgânicos do meio de cultura Murashige & Skoog (1962).

COMPONENTES	CONCENTRAÇÕES	
	(mg L ⁻¹)	(mM)
MACRONUTRIENTES		
NH ₄ NO ₃	1.650	20,6
KNO ₃	1.900	18,8
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	2,99
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	1,5
KH ₂ PO ₄	170	1,25
MICRONUTRIENTES		
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3	0,100
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6	0,0299
H ₃ BO ₃	6.2	0,100
KI	0.83	0,005
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	0,001
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0,0001
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0,0001
Fe EDTA		
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37.3	0,100
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8	0,100

Anexo 2 – Composição das soluções tampões utilizadas na análise isoenzimática.

Tampão Borato de lítio	Tampão Tris-citrato	Tampão C	Tampão D
(pH 8,3 0,2 M)	(pH 8,3 0,2 M)	Fosfato monobásico (pH 4,3 0,2 M)	Fosfato dibásico (pH 9,2 0,2 M)
1,2 g de hidróxido de lítio	6,2 g de tris	27,8 g Na ₂ HPO ₄ (anidro)	28,3 g Na ₂ PO ₄ (dibásico)
11,8 g de ácido bórico	1,6 g de ácido cítrico	1000 ml de água destilada	1000 ml de água destilada

Anexo 3 – Protocolos de revelação para cada sistema isoenzimático utilizado.

Peroxidase (PO) (Scandalios, 1969 modificado)		Esterase (EST) (Scandalios, 1969 modificado)	
3 amino 9 etil carbazole	0,065 g	Água destilada	40 ml
Dimetilformamida	5 ml	Alfa-naftilacetato	3 ml
CaCl ₂ (1M)	2 ml	Beta-naftil acetato	3 ml
H ₂ O ₂ (30%)	4 gotas	Fast blue RR salt	0,04 g
Tampão acetato de sódio (0,2 M pH 5,0)	85 ml	Tampão C	50 ml
		Tampão D	10 ml
Fosfatase ácida (ACP) (Scandalios, 1969 modificado)		Glutamato oxaloacetato transaminase (GOT) (Scandalios, 1969 modificado)	
α-naftil fosfato ácido de sódio	0,10 g	Ácido L-aspártico	0,20 g
Fast garnet GBC salt	0,10 g	Ácido α-cetoglutárico	0,10 g
MgCl ₂ (1%).	1 ml	Fast blue RR salt	0,15 g
Tampão acetato de sódio 0,2 M pH 5,0	100 ml	Tampão Tris 0,2 M pH 8,5	100 ml

Malato desidrogenase (MDH) (Scandalios, 1969 modificado)		Álcool desidrogenase (ADH) (Scandalios, 1969 modificado)	
Ácido málico 0,5M, pH 8,0	4mL		
DL-ácido málico	10 g	Etanol (95%)	20mL
Água destilada	80mL		
NAD ⁺	2mL	NAD ⁺ , Na ₂	2mL (20mg) Sigma N7004
MTT	2mL	MTT	2mL (20mg) Sigma M2128
PMS	2mL	PMS	2mL (2mg ou 0,002g) Sigma P9625
Tris-HCl 0,1M, pH 8,5	100mL	Tris-HCl 0,2M, pH 8,0	100mL

Centro de Genética
IBRUFPE