



ARTIGO ORIGINAL

Maurício Reginaldo Alves dos Santos<sup>1\*</sup>  
Josilene Félix da Rocha<sup>1</sup>  
Maria das Graças Rodrigues Ferreira<sup>1</sup>  
Arêssa de Oliveira Correia<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Rondônia, BR 364, Km 5,5, Zona Rural,  
CP 127, 76815-800, Porto Velho, RO, Brasil  
<sup>2</sup>Universidade Federal do Espírito Santo – UFES,  
Centro de Ciências Agrárias, Alto Universitário,  
29500-000, Alegre, Espírito Santo, Brasil

**Autor Correspondente:**

\*E-mail: mauricio@cpafro.embrapa.br

**PALAVRAS-CHAVE**

Indução de calos  
Palmeira  
Palmito  
Propagação *in vitro*

**KEYWORDS**

Callus induction  
Palm tree  
Heart of palm  
*In vitro* propagation

## Estabelecimento *in vitro* e calogênese em explantes foliares de pupunheira

### *In vitro* establishment and callus induction in leaf explants of peach palm

**RESUMO:** A pupunheira é uma importante cultura amazônica em virtude da excelente qualidade do palmito, além de sua micropropagação ser de grande interesse para programas de melhoramento. O objetivo deste trabalho foi desenvolver protocolos para estabelecimento *in vitro* e indução de calos em explantes foliares de *B. gasipaes* submetidos a diferentes concentrações de reguladores de crescimento e nitrato de amônio, e níveis de pH. Nos testes de desinfestação, foi utilizada imersão em hipoclorito de sódio (1,0; 1,5 e 2,5%) ou hipoclorito de cálcio (1,0; 1,5 e 3,0%) durante 10, 20 ou 30 min. No primeiro teste de indução, o meio MS foi acrescido de 2,4-D (0,0; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0 mg L<sup>-1</sup>) em combinação fatorial com BAP (0,0; 3,0 e 6,0 mg L<sup>-1</sup>). No segundo teste, foram utilizadas concentrações de nitrato de amônio (0,00; 0,83; 1,65; 3,30 e 6,60 g L<sup>-1</sup>) em combinação fatorial com 2,4-D (0,0; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0 mg L<sup>-1</sup>). No terceiro ensaio, foram avaliados níveis de pH (4,0; 5,0; 6,0 e 7,0) em combinação fatorial com 2,4-D (0,0; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0 mg L<sup>-1</sup>). A desinfestação com hipoclorito de cálcio a 3,0% durante 30 min resultou em 80% dos explantes viáveis. A indução de calos em 70% dos explantes foi obtida com 10,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D, na ausência de BAP. A combinação de 1,65 g L<sup>-1</sup> de nitrato de amônio com 10,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D resultou em 70% de indução. A mesma concentração de 2,4-D associada ao pH 6,0 atingiu 65% de indução de calos.

**ABSTRACT:** Peach palm is an important Amazonian crop due to the high quality of its heart of palm and its micropropagation is interesting to breeding programs. The objective of this research was to develop protocols for *in vitro* establishment and callus induction in leaf explants of *B. gasipaes* submitted to different concentrations of growth regulators and ammonium nitrate and pH levels. Immersion in sodium hypochlorite (1.0, 1.5, and 2.5%) or calcium hypochlorite (1.0, 1.5 and 3.0%) was used for 10, 20, or 30 minutes in disinfection tests. In the first callus induction test, the MS medium was supplemented with 2,4-D (0.0, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0 mg L<sup>-1</sup>) and BA (0.0, 3.0, 6.0 mg L<sup>-1</sup>) in factorial combination. In the second test, ammonium nitrate concentrations (0.0, 0.83, 1.65, 3.30, 6.60 g L<sup>-1</sup>) were used in factorial combination with 2,4-D (0.0, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0 mg L<sup>-1</sup>). Levels of pH (4.0, 5.0, 6.0, 7.0) in factorial combination with 2,4-D (0.0, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0 mg L<sup>-1</sup>) were evaluated in the third experiment. Disinfection with calcium hypochlorite at 3.0% for 30 minutes resulted in 80% viable explants. Callus induction was achieved with 10.0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D in 70% explants, in the absence of BA. Ammonium nitrate at 1.65 g L<sup>-1</sup> in combination with 10.0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D resulted in 70% callus induction. The same concentration of 2,4-D associated to pH 6.0 reached 65% callus induction.

Recebido: 31/05/2012  
Aceito: 28/08/2012

## 1 Introdução

A pupunheira (*Bactris gasipaes* H.B.K.) é uma espécie tropical, pertencente à família das Arecaceae, sendo também conhecida como palma doce, pejobaye, no Peru, e pupunha, no Brasil (BOVI, 1993). É uma palmeira perene, nativa das regiões tropicais da América Latina, como a região Amazônica, onde seus frutos são utilizados na alimentação e na fabricação de farinha (TONET; FERREIRA; OROBONI, 1999). Trata-se de uma espécie domesticada, podendo ser cultivada como cultura agrícola racional e rentável, da qual o palmito pode ser extraído anualmente (TOZETTI; CONTEL, 2003). Seu cultivo tem substituído a exploração predatória de espécies de palmeiras nativas, como *Euterpe edulis* Mart. e *Euterpe oleracea* Mart., no Brasil (CARVALHO; ISHIDA, 2002), cujos estoques naturais já estão bastante reduzidos (VILLACHICA et al., 1996).

O palmito é o produto econômico mais importante obtido da pupunheira, sendo comercializado na forma de toletes de palmito em conserva (palmito de primeira), pedaços e rodela (TONET; FERREIRA; OROBONI, 1999; CLEMENT, 2000). Em virtude da excelente qualidade do palmito, seu cultivo é cada vez mais frequente, com plantios em escalas consideráveis nos Estados Pará, Acre, Rondônia e Mato Grosso. Além disso, a cultura encontra-se em intenso processo de disseminação fora da Amazônia, principalmente no Sudeste, sendo plantada em praticamente todo o Estado de São Paulo (ALMEIDA; YARA; ALMEIDA, 2005).

O extremo norte do Brasil passou a ser alardeado como o principal e maior produtor e exportador de palmito do Brasil e do mundo (MOURÃO, 2010). Além de ser ecologicamente correto o cultivo da pupunheira, este ainda se tornou a principal fonte produtora de palmito, tanto para o mercado interno quanto para o mercado externo, por se tratar de uma espécie que apresenta enormes vantagens em razão de algumas características agrônomicas importantes em relação às demais, como: precocidade, rusticidade, adaptabilidade e capacidade de perfilhamento ao longo dos anos, fácil processamento, boa produtividade e qualidade (FERNANDES et al., 2003).

A propagação desta espécie pode ocorrer por sementes, que germinam entre 30 e 90 dias (VILLACHICA et al., 1996). A reprodução por semente é pouco eficiente, por causa da ocorrência de autoincompatibilidade, sendo a xenogamia a forma predominante de reprodução nesta espécie (MORA-URPI et al., 1984). Há outros fatores restritivos à reprodução por semente, como o longo período necessário para a produção de sementes híbridas, as limitações de polinização cruzada no início da floração, com a conseqüente diminuição da produção de frutos por cacho, e a formação de frutos partenocárpicos.

A propagação ocorre também por perfilhamento, sendo comum encontrar cinco perfilhos por planta. Em termos de melhoramento genético, independentemente do produto almejado (palmito ou fruto), esta forma convencional de propagação é extremamente lenta, podendo comprometer a eficiência dos programas de melhoramento. O número limitado de perfilhos inviabiliza a obtenção de grandes populações genotipicamente idênticas às plantas selecionadas (ALMEIDA; ALMEIDA, 2006).

O cultivo da pupunheira tem se expandido em virtude de suas boas qualidades agrônomicas e ecológicas (TONET; FERREIRA; OROBONI, 1999; ANEFALOS; TUCCI; MODOLO, 2007). Contudo, a carência de campos de produção de matrizes com superioridade agrônômica no Brasil e o sistema genético autoincompatível levam a plantios heterogêneos, com baixa produção e qualidade do palmito (SANTOS et al., 2010b).

Neste sentido, a técnica de micropropagação pode ser considerada uma excelente ferramenta para a produção maciça desta espécie, uma vez que, além da clonagem de plantas selecionadas, há uma produção contínua de mudas, independentemente da disponibilidade de sementes no mercado (BATAGIN, 2008); permite-se, dessa forma, identificar genótipos adaptados a cada região, em larga escala e curto espaço de tempo, clonando plantas selecionadas em diferentes regiões do País (ALMEIDA; ALMEIDA, 2006).

Um eficiente sistema de regeneração de plantas a partir de cultura de tecidos e células é reconhecidamente um pré-requisito para a aplicação das técnicas de biotecnologia no melhoramento vegetal (LITZ; GRAY, 1992). Neste contexto, os métodos de propagação de plantas *in vitro* podem subsidiar programas de melhoramento, pois a micropropagação envolve a propagação vegetativa em larga escala, uniformemente e com alta qualidade fitossanitária. Desta forma, pode-se clonar uma determinada planta que reúna características de interesse no melhoramento, sem as dificuldades apresentadas pela propagação convencional (RÊGO et al., 2009; SOARES et al., 2009).

A propagação por meio de cultura de tecidos pode ser feita por via direta ou indireta; nesta última via, há formação de calos com retorno ao nível meristemático das células diferenciadas e, em seguida, a transformação em novos brotos e plantas, sendo então considerada uma forma potencial de propagação em massa (LANDA et al. 2000).

Condições para a formação de calos e de crescimento devem ser estudadas. O cultivo de calos pode resultar na produção de embriões somáticos, sendo necessário o suplemento exógeno de reguladores de crescimento. O balanço hormonal entre auxinas e citocininas é o aspecto mais importante para a cultura de calos (NOGUEIRA et al., 2007), com destaque para 2,4-D e, mais recentemente, TDZ (Thidiazuron) (AKRAM; AFTAB, 2008).

A indução de calos pode ser a primeira etapa para a propagação em larga escala desta espécie via cultura de tecidos vegetais, o que seria de grande interesse para subsidiar programas de melhoramento.

O objetivo foi desenvolver protocolos para estabelecimento *in vitro* e indução de calos em explantes foliares de *B. gasipaes* submetidos a diferentes concentrações de reguladores de crescimento e nitrato de amônio, e níveis de pH.

## 2 Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Rondônia, em Porto Velho. Foram coletadas folhas recém-expandidas enverdecidas, oriundas de perfilhos de pupunheiras situadas no campo

experimental da mesma empresa. As folhas foram lavadas em água bidestilada com auxílio de esponja e detergente e, em seguida, segmentadas em porções menores. Em câmara de fluxo laminar, os segmentos foliares foram imersos em etanol a 70% (v/v) por 1 min e em soluções de hipoclorito de sódio nas concentrações de 1,0, 1,5 e 2,5% (p/v) ou hipoclorito de cálcio nas concentrações de 1,0, 1,5 e 3,0% (p/v) por 10, 20 e 30 min, sendo, em seguida, enxaguados três vezes em água destilada estéril. Depois disso, os explantes foram segmentados em fragmentos de 1 cm<sup>2</sup>, os quais foram inoculados individualmente em tubos de ensaio contendo meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 8 g L<sup>-1</sup> de ágar, pH 5,8, sem reguladores. Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por dez tubos de ensaio. Dez dias após a inoculação, foram avaliadas as percentagens de contaminação e necrose dos explantes.

Para indução de calos, foram utilizados os mesmos procedimentos descritos para o experimento de desinfestação, com imersão em hipoclorito de cálcio a 3,0% por 30 min. No primeiro teste de indução de calos, o meio foi acrescido de combinações fatoriais dos reguladores de crescimento 2,4-D (0,0; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0 mg L<sup>-1</sup>) e BAP (0,0; 3,0 e 6,0 mg L<sup>-1</sup>) em combinações fatoriais. No segundo teste de indução, foram utilizados meios MS modificados, com cinco concentrações de nitrato de amônio (0,00; 0,83; 1,65; 3,30 e 6,60 g L<sup>-1</sup>) em combinações fatoriais com 2,4-D (0,0; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0 mg L<sup>-1</sup>). No terceiro teste de indução, quatro níveis de pH do meio foram avaliados (4,0; 5,0; 6,0 e 7,0), em combinações fatoriais com 2,4-D (0,0; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0 mg L<sup>-1</sup>). Nestes experimentos, foi utilizado delineamento inteiramente casualizado, com três repetições por tratamento, cada repetição composta por dez tubos de ensaio. Os cultivos foram mantidos no escuro, em sala de crescimento, a 24 ± 2 °C. Ao final de 30 dias, foi avaliado o percentual de explantes com calos.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (p < 0,05).

### 3 Resultados e Discussão

Quanto à desinfestação, em nenhum dos tratamentos com hipoclorito de cálcio ocorreu necrose nos explantes. Dentre estes, a desinfestação foi mais efetiva com a concentração de 3,0% (p/v) por 30 min, que resultou em 80% de explantes sem contaminação. A contaminação foi maior nos demais tratamentos, atingindo 100% no tratamento que combinou o período de 10 min com a concentração de 1,0% (p/v) de hipoclorito de cálcio (Tabela 1).

Nos tratamentos com hipoclorito de sódio, a concentração de 2,5% (p/v) por 30 min se mostrou eficiente, em virtude da maior desinfestação, mas resultou em altos níveis de necrose. Os demais tratamentos obtiveram maior percentual de contaminação, alcançando 100% de explantes contaminados no tratamento a 1,0% por 10 min (Tabela 1). Para Grattapaglia e Machado (1998), a maior dificuldade na etapa de desinfestação reside em se obter tecido descontaminado sem conduzi-lo à morte quando isolado.

Considerando-se as variáveis avaliadas, é possível afirmar que o hipoclorito de cálcio é mais eficaz para a descontaminação sem agressão dos explantes foliares de *B. gasipaes* do que o hipoclorito de sódio. Um processo de desinfestação eficaz é aquele que combina uma baixa taxa de contaminação e de oxidação com a menor exposição possível ao agente descontaminante (TORRES; CALDAS; BUSO, 1998). A desinfestação de segmentos de brotos, folhas e botões florais pode ser feita com sucesso utilizando-se etanol nas concentrações de 50 a 70%, por períodos de 1 a 3 min, seguido de um tratamento com hipoclorito de sódio ou cálcio de 0,5 a 2% (p/v) por 5 a 20 min (TEIXEIRA, 2001). As concentrações mais comuns vão de 0,5 a 2,0% de cloro ativo e o tratamento dura até 40 min, no caso de tecido lignificado. O cloro é o princípio ativo mais utilizado, em geral na forma de hipoclorito de sódio, sendo facilmente encontrado em formulações comerciais de água sanitária (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Além disso, o hipoclorito de cálcio encontrado em pó, em lojas de material para piscinas, precisa ser dissolvido e filtrado. Note-se que ele apresenta vantagem por ser menos tóxico para os tecidos do que o sódio (SWEET; BOLTON, 1979).

Quanto à indução de calos, nos explantes foliares de *B. gasipaes* inoculados na ausência de reguladores de crescimento, não foi observada calogênese (Figura 1). O processo de indução começou com o intumescimento dos explantes, aos dez dias de cultivo. A calogênese teve início aos 30 dias de cultivo após a inoculação. Na Figura 1, está representada a indução de calos em relação às diferentes

**Tabela 1.** Porcentagens de contaminação e necrose de explantes foliares de *B. gasipaes* submetidos a diferentes tempos de submersão e concentrações de hipoclorito de cálcio e hipoclorito de sódio antes da inoculação em meio de cultivo, após 10 dias.

Desinfestante	Tempo (min)	Contaminações* (%)	Necroses* (%)
1,0% Ca(ClO) <sub>2</sub>	10	100 (a)	0 (c)
1,5% Ca(ClO) <sub>2</sub>	10	80 (cd)	0 (c)
3,0% Ca(ClO) <sub>2</sub>	10	60 (g)	0 (c)
1,0% Ca(ClO) <sub>2</sub>	20	70 (ef)	0 (c)
1,5% Ca(ClO) <sub>2</sub>	20	50 (h)	0 (c)
3,0% Ca(ClO) <sub>2</sub>	20	40 (ij)	0 (c)
1,0% Ca(ClO) <sub>2</sub>	30	60 (g)	0 (c)
1,5% Ca(ClO) <sub>2</sub>	30	30 (k)	0 (c)
3,0% Ca(ClO) <sub>2</sub>	30	20 (l)	0 (c)
1,0% NaOCl	10	100 (a)	0 (c)
1,5% NaOCl	10	85 (bc)	0 (c)
2,5% NaOCl	10	65 (fg)	0 (c)
1,0% NaOCl	20	90 (b)	0 (c)
1,5% NaOCl	20	75 (de)	0 (c)
2,5% NaOCl	20	45 (hi)	7 (b)
1,0% NaOCl	30	70 (ef)	0 (c)
1,5% NaOCl	30	35 (jk)	5 (b)
2,5% NaOCl	30	20 (l)	16 (a)

\*Médias seguidas pela mesma letra, em cada coluna, não diferem pelo teste de Tukey (p < 0,05).

combinações hormonais. Nota-se que, na ausência de 2,4-D, não ocorreu nenhuma indução de calos e que esta aumentou concomitantemente com o aumento nas concentrações deste regulador de crescimento até a concentração de 10,0 mg L<sup>-1</sup>, decrescendo a partir de então. O pico da indução de calos ocorreu com a utilização de 10,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D sem a adição de BAP, atingindo 70% de indução de calos. Pode-se observar que esta concentração ótima de 2,4-D teve efeito bastante inferior (15%) quando em combinação com 3,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e não teve efeito quando em combinação com 6,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, na medida em que foram obtidos calos friáveis. O efeito das concentrações de BAP não foi significativo. Na ausência deste regulador, a calogênese atingiu 30%, com apenas 5,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D.

Resultados semelhantes foram obtidos trabalhando com segmentos de ápices caulinares de *B. gasipaes*, com o efeito positivo da auxina 2,4-D, obtendo, como melhor combinação, a concentração de 10,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D com 3,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, atingindo 60% de indução de calos (SANTOS et al. 2010a).

O 2,4-D teve um efeito estimulador na formação de calos em pupunheira (ARIAS; HUETE, 1983).

Quanto à indução de calos nos explantes foliares de *B. gasipaes* submetidos a combinações fatoriais de 2,4-D e nitrato de amônio, a calogênese ocorreu nos tratamentos que combinaram 5,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D com 1,65 g L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (25% de indução de calos); 5,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D com 3,30 g L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (35% de indução de calos); 10,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D com 0,83 g L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (45% de indução de calos); 10,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D com 1,65 g L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (70% de indução de calos); 10,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D com 3,30 g L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (55% de indução de calos); 20,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D com 0,83 g L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (35% de indução de calos), e 20,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D com 1,65 g L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (50% de indução de calos) (Figura 2). Os tratamentos que combinaram 20,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D com 3,30 g L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 20,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D com 6,60 g L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> e os demais que continham 40,0 mg L<sup>-1</sup>

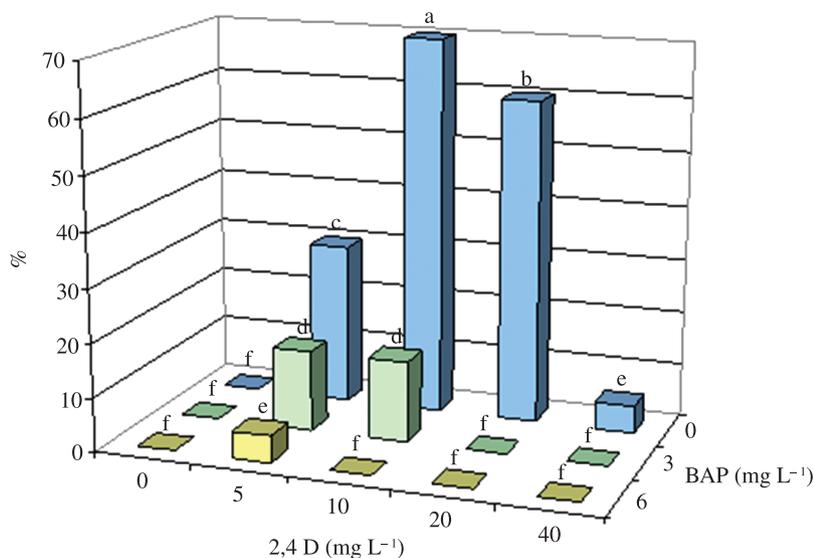
de 2,4-D resultaram em necrose total dos explantes. Os reguladores geralmente possuem um estreito espectro de ação, podendo se tornar tóxicos para os tecidos vegetais em concentrações excessivas.

O nitrogênio difere dos demais macronutrientes pelo fato de apresentar-se na forma de cátion (amônio) e ânion (nitrito e nitrato). O efeito destas diferentes formas inorgânicas sobre o crescimento e o desenvolvimento de culturas de tecidos é marcante: o nitrato, como única fonte de nitrogênio, sustenta uma boa taxa de crescimento em muitas espécies, sendo, também, a melhor forma de nitrogênio para algumas culturas (CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 1998).

A maior média correspondeu à combinação de 10,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D com 1,65 g L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, atingindo 70% de indução de calos (Figura 2). Para a preparação de soluções estoques do meio de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), a concentração do NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> deve ser de 1,65 g L<sup>-1</sup>. A utilização de 10,0 mg L<sup>-1</sup> da auxina 2,4-D sem a citocinina BAP mostrou o melhor percentual de indução de calos (70%) no experimento anterior (Figura 1). Pode-se observar que esta concentração ótima de 2,4-D teve efeito bastante inferior quando em combinação com 0,83 g L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, resultando em apenas 45% de indução de calos e 55%, com 3,30 g L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>. Estes dados confirmam que, para a calogênese em explantes foliares de *B. gasipaes*, a concentração de 1,65 g L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, utilizada no meio MS, é eficiente quando combinada com 10,0 mg L<sup>-1</sup> da auxina 2,4-D.

A utilização do nitrato pelas células depende da atividade da enzima redutase do nitrato, que reduz nitrato a nitrito e, em seguida, a amônia, por meio da atividade de redutase de nitrito. A redutase de nitrato mostra atividade *in vitro*. Altas concentrações de nitrato e a presença de amônio aumentam a atividade da redutase de nitrato e, em consequência, o crescimento das células (CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 1998).

Ao testar a influência de fontes de nitrogênio para a calogênese do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.),

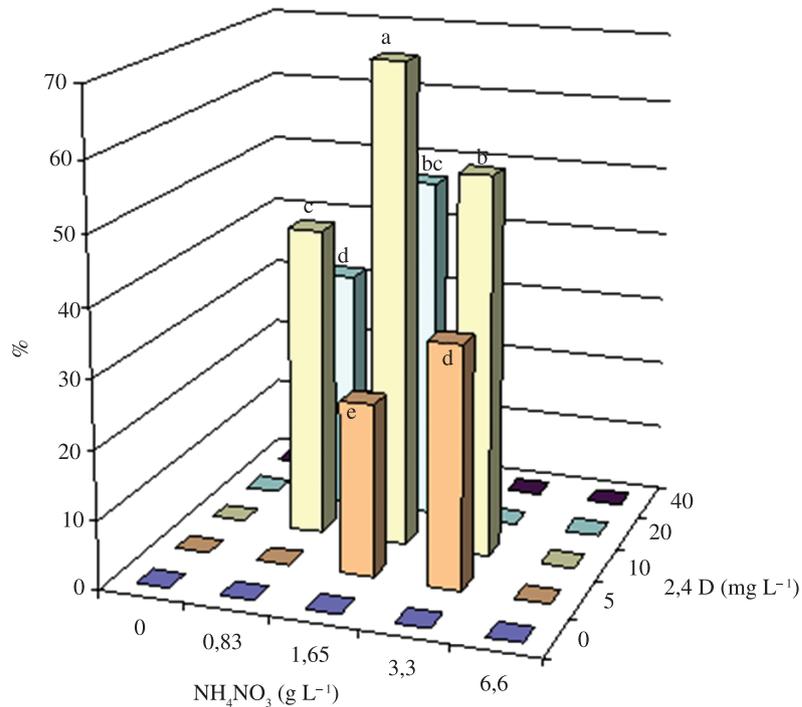


**Figura 1.** Indução de calos em explantes foliares de *Bactris gasipaes* submetidos a combinações fatoriais de 2,4-D e BAP em meio de cultivo, após 30 dias.

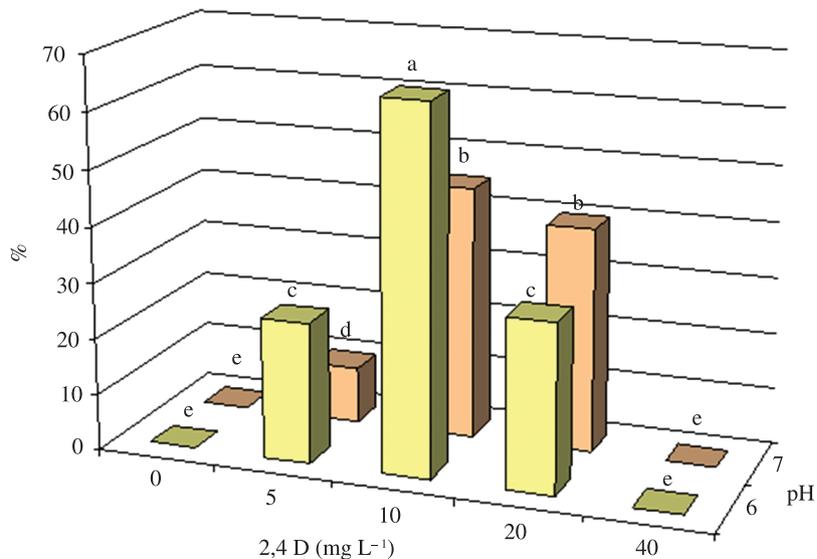
verificou-se que baixos níveis de  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$  não foram eficientes para indução de calos, sendo que a concentração de  $2,40 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  foi a mais eficaz na promoção da divisão celular indicada pela massa seca dos calos (WERNER et al., 2010).

Quanto à indução de calos nos explantes foliares de *B. gasipaes* submetidos a combinações fatoriais de 2,4-D e pH do meio de cultivo, os tratamentos com pH 4 e 5 não adquiriram a consistência adequada. Não houve indução de

calos nos tratamentos sem 2,4-D. A calogênese ocorreu nos tratamentos que combinaram  $5,0 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-D com pH 6 (25% de indução de calos);  $5,0 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-D com pH 7 (10% de indução de calos);  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-D com pH 6 (65% de indução de calos);  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-D com pH 7 (45% de indução de calos);  $20,0 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-D com pH 6 (40% de indução de calos), e  $20,0 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-D com pH 7 (30% de indução de calos) (Figura 3). Os tratamentos que



**Figura 2.** Indução de calos em explantes foliares de *Bactris gasipaes* submetidos a combinações fatoriais de 2,4-D e nitrato de amônio em meio de cultivo, após 30 dias.



**Figura 3.** Indução de calos em explantes foliares de *Bactris gasipaes* submetidos a combinações fatoriais de 2,4-D e pH do meio de cultivo, após 30 dias.

continham 40,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D resultaram em necrose total dos explantes.

Na Figura 3, nota-se que o melhor resultado correspondeu à combinação de 10,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D em pH 6, atingindo 65% de indução de calos. Pode-se observar que a mesma concentração de 2,4-D teve efeito bastante inferior quando em combinação com pH 7, resultando em apenas 45% de indução de calos.

O pH dos meios nutritivos em cultura de células vegetais é normalmente ajustado, depois de se adicionarem todos os componentes, para um valor ligeiramente ácido, entre 5 e 6. Estudos com tecidos tumorosos de *Tagetes* em meios com valores de pH variando de 4 a 7,5 mostraram que o pH ótimo para crescimento era 6,1 (CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 1998).

Os efeitos do pH podem ser diretos ou indiretos. Por exemplo: o pH influi na utilização do amônio como fonte de nitrogênio em células vegetais (STREET; SHEAT, 1958; MARTIN; ROSE, 1976), sendo que valores de pH mais baixos (meios mais ácidos) dificultam a utilização do amônio, enquanto valores mais altos de pH diminuem a utilização do nitrato. Durante o crescimento das células, o pH do meio se altera à medida que diferentes íons são absorvidos pelas células e os produtos metabólicos são excretados para o meio (CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 1998).

## 4 Conclusões

A desinfestação de explantes foliares de *Bactris gasipaes* foi mais efetiva com 30 min de imersão em hipoclorito de cálcio a 3,0% (p/v), que resultou em 80% dos explantes sem contaminação e sem necrose.

Quanto aos explantes foliares de *Bactris gasipaes* submetidos a combinações fatoriais de 2,4-D e BAP em meio de cultivo, a maior porcentagem de calogênese foi de 70%, com 10,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D sem a adição de BAP.

A concentração de 1,65 g L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> combinada com 10,0 mg L<sup>-1</sup> da auxina 2,4-D resultou em 70% de indução de calos.

A combinação de 10,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D com pH do meio de cultivo 6 atingiu 65% de indução de calos.

## Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo financiamento da pesquisa.

## Referências

AKRAM, M.; AFTAB, F. High frequency multiple shoot formation from nodal explants of teak (*Tectona grandis* L.) induced by thidiazuron. *Propagation of ornamental plants*, Sofia, v. 8, n. 2, p. 72-75, 2008.

ALMEIDA, C. V.; YARA, R.; ALMEIDA, M. Fungos endofíticos isolados de ápices caulinares de pupunheira cultivada *in vivo* e *in vitro*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 40, n. 5, p. 467-470, maio 2005. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2005000500007>

ALMEIDA, M.; ALMEIDA, C. V. Somatic embryogenesis and *in vitro* plant regeneration from pejobaye adult plant leaf primordium. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 41, n. 9, p. 1449-1452, 2006. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2006000900015>

ANEFALOS, L. C.; TUCCI, M. L. S. A.; MODOLO, V. A. Uma visão sobre a pupunheira no contexto do mercado do palmito. *Análises e Indicadores do Agronegócio*, v. 2, n. 7, 2007.

ARIAS, O.; HUETE, F. Propagación vegetativa *in vitro* del pejobaye (*Bactris gasipaes* H.B.K.). *Turrialba*, Costa Rica, v. 33, n. 2, p. 103-108, ago. 1983.

BATAGIN, K. D. *Análises anátomo-fisiológicas de folhas de pupunheiras cultivadas in vitro, ex vitro e in vivo visando otimizar o protocolo de aclimatização*. 2008. 110 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

BOVI, M. L. A. Cultivo racional de palmito. *Comunicação da Pesquisa Agropecuária*, São Paulo, v. 11, p.16-18, maio 1993.

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

CARVALHO, C. J. R.; ISHIDA, F. Y. Respostas de pupunheiras (*Bactris gasipaes* Kunth) jovens ao alagamento. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 37, n. 9, p. 1231-1237, 2002.

CLEMENT, C. R. *Pupunha (Bactris gasipaes Kunth, Palmae)*. Jaboticabal: Funep, 2000.

FERNANDES, A. R.; CARVALHO, J. G.; CURI, N.; GUIMARÃES, P. T. G.; PINTO, J. E. B. P. Crescimento de mudas de pupunheira (*Bactris gasipaes* H.B.K.) sob diferentes níveis de salinidade. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 27, n. 2, p. 278-284, mar./abr. 2003. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542003000200005>

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

LANDA, F. S. L.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O.; BUENO FILHO, J. S. S. Indução *in vitro* de calos em explantes foliares de pequi ( *Caryocar brasiliense* Camb.). *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 24, p. 56-63, dez. 2000. Edição especial.

LITZ, R. E.; GRAY, D. J. Organogenesis and somatic embryogenesis. In: HAMMERSCHLAG, F. A.; LITZ, R. E. (Eds.) *Biotechnology of perennial fruit crops*. Cambridge: Cambridge University Press, 1992. cap.14, p. 3-34.

MARTIN, S. M.; ROSE, D. Growth of plant cell (*Ipomea*) suspension cultures at controlled pH levels. *Canadian Journal of Botany*, v. 54, p. 1264-1270, 1976. <http://dx.doi.org/10.1139/b76-137>

MORA-URPI, J.; VARGAS, E.; LOPEZ, C. A.; VILLAPLANA, M.; ALLON, G.; BLANCO, C. *The Pejobaye Palm (Bactris gasipaes H.B.K.)*. San José: Food and agriculture Organization of the United Nations, 1984. 16 p.

MOURÃO, L. História e Natureza: do açaí ao palmito. *Revista Territórios e Fronteiras*, v. 3, n. 2, p. 74-96, jul./dez. 2010.

- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; OLIVEIRA, L. M.; SOARES, G. A.; SOARES, F. P.; CASTRO, A. H. F.; PAIVA, P. D. O. Indução de calos em explantes foliares de murici-pequeno. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 31, n. 2, p. 366-370, 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542007000200015>
- RÊGO, M. M.; ARAÚJO, E. R.; RÊGO, E. R.; CASTRO, J. P. *In vitro* seed germination of mandacaru (*Cereus jamacaru* DC.). *Revista Caatinga*, Mossoró, v. 22, n. 4, p. 34-38, 2009.
- SANTOS, M. R. A.; FERREIRA, M. G. R.; CORREIA, A. O.; ROCHA, J. F. *In vitro* establishment and callogenesis in shoot tips of peach palm. *Revista Caatinga*, Mossoró, v. 23, n. 1, p. 40-44, jan./mar. 2010a. PMCid:2975123.
- SANTOS, T. L.; ALMEIDA, C. V.; BRONDANI, G. E.; ALMEIDA, M. Nitrato de amônio e nitrato de potássio no desenvolvimento *in vitro* de embriões somáticos de pupunheiras. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 40, n. 7, p. 1655-1659, jul. 2010b.
- SOARES, S. A. G.; MARIANO, R. L. R.; CAVALCANTE, U. M. T.; MAIA, L. C. Efeito de bactérias na germinação de fungos micorrízicos arbusculares e co-inoculação em mudas de abacaxizeiro. *Revista Caatinga*, Mossoró, v. 22, n. 2, p. 31-38, 2009. PMCid:2760283.
- STREET, H. E.; SHEAT, D. E. G. The absorption and availability of nitrate and ammonia. In: RUHLAND, W. (Ed.). *Encyclopedia of plant physiology*. Berlin: Springer, 1958. v. 8, p. 150-165.
- SWEET, H. C.; BOLTON, W. E. The surface decontamination of seeds to produce axenic seedlings. *American Journal of Botany*, v. 66, p. 692-698, 1979. <http://dx.doi.org/10.2307/2442414>
- TEIXEIRA, J. B. *Limitações ao processo de cultivo in vitro de espécies lenhosas*. Brasília: Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. Disponível em: <<http://www.redbio.org>>. Acesso em: 26 nov. 2009.
- TONET, R. M.; FERREIRA, L. G. S.; OROBONI, J. L. M. *A cultura da pupunha (Bactris gasipaes)*. Campinas: CATI, 1999. 44 p. (Boletim técnico, n. 237).
- TORRES, C. A.; CALDAS, S. C.; BUSO, A. B. Meios nutritivos. In: CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Brasília: EMBRAPA-CNPQ/EMBRAPA-SPI, 1998. p. 102-106.
- TOZETTI, A. D.; CONTEL, E. P. B. Padronização da isoenzima 6-fosfogluconato desidrogenase em pupunha (*Bractris gasipaes* H.B.K.). *Revista Científica Eletrônica Agronomia*, São Paulo, v. 2, n. 4, 2003.
- VILLACHICA, H.; CARVALHO, J. E. U.; MÜLLER, C. H.; CAMILO DIAZ, J.; ALMANZA, M. Pijuayo *Bactris gasipaes* H.B.K. In: VILLACHICA, H.; CARVALHO, J. E. U.; MÜLLER, C. H.; CAMILO DIAZ, J.; ALMANZA, M. *Frutales y Hortalizas Promissórias de la Amazônia*. Lima: ICA, 1996. cap. 31, p. 215-226.
- WERNER, E. T.; MILANEZ, C. R. D.; MENGARDA, L. H. G.; VENDRAME, W. A.; CUZZUOL, G. R. F. Meios de cultura, reguladores de crescimento e fontes de nitrogênio na regulação da calogênese do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.). *Acta Botânica Brasileira*, v. 24, n. 4, p. 1046-1051, 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-33062010000400019>