**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Avaliação histocitológica, histoquímica e morfofisiológica da habituação e
senescência em pupunheiras mantidas *in vitro***

Erika Mendes Graner

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica
de Plantas

**Piracicaba
2013**

Erika Mendes Graner
Licenciado em Ciências Biológicas

Avaliação histocitológica, histoquímica e morfofisiológica da habituação e senescência em pupunheiras mantidas *in vitro*

Orientador:
Prof. Dr. **MARCÍLIO DE ALMEIDA**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas

Piracicaba
2013

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Graner, Erika Mendes

Avaliação histocitológica, histoquímica e morfofisiológica da habituação e senescência em pupunheiras mantidas in vitro / Erika Mendes Graner. - - Piracicaba, 2013.
197 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.

1. Cultura de tecidos 2. Bactris gasipaes 3. Habituação 4. Senescência 5. Morte Celular Programada (MCP) I. Título

CDD 634.6
G756a

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

*Ao meu querido filho Matheus,
Ofereço.*

*Aos meus pais Elisabete e Murilo
e
aos meus irmãos Karen e Edgard,
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

Ao orientador Prof. Dr. Marcílio de Almeida, pela confiança em mim depositada neste trabalho; pela amizade; pela paciência e serenidade em meus deslizes; pela grandiosa contribuição à minha formação acadêmica e por representar um modelo inspirador às minhas condutas profissional e pessoal.

À Dra. Cristina Vieira de Almeida, pela grande amizade, pelo intenso positivismo e sabedoria transmitidos nos momentos mais difíceis que encontrei em minha jornada, pelos lotes de sementes de pupunha disponibilizados para o desenvolvimento de minhas análises e por todo o auxílio prestado em minha tese.

Ao meu filho, Matheus Mendes Graner Guerrini, grande amigo e companheiro, a quem devo parte das glórias obtidas com este trabalho e minha eterna gratidão por ser esta criança tão doce e compreensiva nos momentos em que não pude compartilhar os jogos de vídeo-game, passear ou simplesmente jogar conversa fora.

À minha mãe, Elisabete Teixeira Mendes, pela força, pelo auxílio aos cuidados com meu filho, pela paciência em meus momentos mais amargos e por ter escutado, sem se queixar, a respeito de todos os passos que dei ao longo deste trabalho de doutorado.

Ao meu pai, Murilo Graner, grande exemplo de professor e pesquisador, honesto e assíduo com seus compromissos, companheiro e compreensivo quando estive ausente.

Aos meus irmãos Edgard Graner e Karen Mendes Graner e aos cunhados Renata de Oliveira Mattos Graner e Gustavo Sáttolo Rolim pela força e companheirismo.

À grande “Família Morfogênese” do Laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas, do Departamento de Ciências Biológicas, que sempre estiveram dispostos a me auxiliar e com a qual compartilhei momentos inesquecíveis – Eveline, Fabiane, Gabriela, Germana, Gilvano, Katherine, Livia, Leandro, Marília, Natália, Priscila, Rafaella e às recém-chegadas à equipe, Isabela e Raquel.

Aos amigos Dra. Monita Fiori de Abreu-Tarazi, Dr. Roberto Tarazi e Doutorando em Recursos Florestais, Gustavo Pedro Javier Oberschelp pelo grande auxílio prestado às análises estatísticas.

À Empresa INACERES, Uruçuca/BA, pelo fornecimento de sementes de *Bactris gasipaes* Kunth.

Ao Prof. Dr. Edgard Graner, Prof. Dr Ricardo Della Coletta e Dra. Michelle Agostini da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP/UNICAMP), Piracicaba, São Paulo, pelo auxílio ao desenvolvimento da reação TUNEL.

Ao Dr. Elliot Watanabe Kitajima, Francisco André Ossamu Tanaka e Renato Barbosa Salaroli, do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada a Agricultura (NAP/MEPA/ESALQ/USP), Piracicaba, São Paulo, pelo auxílio no desenvolvimento das análises ultraestruturais.

À secretária do Programa de Fisiologia e Bioquímica de Plantas da ESALQ/USP, Maria Solizete Granziol Silva, pela amizade e apoio prestado durante o curso de doutorado.

Aos funcionários da Biblioteca Central da ESALQ/USP, pela simpatia e eficiência.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), ao Programa de Fisiologia de Plantas e ao Departamento de Ciências Biológicas, pela plena assistência durante o Curso de Doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa, utilizada durante os sete primeiros meses do curso de Doutorado.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa de doutorado concedida e financiamento do projeto (Processo FAPESP 2010/05941-0).

“Mesmo que, através de nossa inventividade, tenhamos aprendido tanto sobre o mundo, nossa descrição de realidade será sempre uma obra inacabada. Querer aprender sempre mais reflete a nossa curiosidade. Acreditar poder saber tudo reflete apenas uma ilusão.”

*Marcelo Gleiser em
“Criação Imperfeita -
Cosmo, Vida e o Código
Oculto da Natureza”*

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez.”

George Bernard Shaw

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
LISTA DE ABREVIATURAS.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Objetivos.....	19
1.1.1 Objetivo geral	19
1.1.2 Objetivos específicos.....	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 Micropropagação de <i>Bactris Gasipaes</i> Kunth.....	21
2.2 Morfogênese e vias morfogênicas	23
2.3 Reguladores de crescimento vs morfogênese.....	28
2.3.1 Auxinas.....	28
2.3.2 Citocininas	30
2.3.3 O balanço auxinas/citocininas	31
2.4 Fatores limitantes em cultura de tecidos vegetais	33
2.4.1 Tempo de manutenção <i>in vitro</i>	33
2.4.1.1 Habituação	35
2.4.1.2 Senescência.....	39
2.4.1.2.1 Caracterização do processo de morte celular programada	43
2.4.1.2.2 Morte celular programada vs necrose.....	50
2.4.1.2.3 Organelas vs vias de sinalização da morte celular programada	53
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	57
3.1 Local de realização dos experimentos	57
3.2 Material vegetal	57
3.3 Condições de cultivo	57
3.4 Análise morfofisiológica	64
3.5 Análise histológica	64
3.6 Análise histoquímica	64
3.6.1 Substâncias ergásticas – Senescência	64
3.6.2 Substâncias ergásticas – Habituação	65
3.6.3 Fragmentação do DNA – Reação tunel	65
3.7 Análise ultraestrutural	67

3.8 Forma de análise dos resultados.....	67
4 RESULTADOS.....	69
4.1 Detecção do processo de senescência (microplantas do grupo A vs plântulas do grupo BI) ..	69
4.1.1 Análise histológica.....	69
4.1.1.1 Folhas	69
4.1.1.2 Raízes	71
4.1.1.3 Bases caulinares	73
4.1.2 Análise histoquímica- fragmentação do DNA	77
4.1.2.1 Folhas	77
4.1.2.2 Raízes	79
4.1.2.3 Bases caulinares	82
4.1.3 Análise histoquímica – substâncias ergásticas.....	84
4.1.3.1. Folhas	84
4.1.3.2 Raízes	89
4.1.3.3 Bases caulinares	98
4.1.3.4 Substâncias ergásticas – análise estatística	106
4.1.4 Análise ultraestrutural	107
4.1.4.1 Folhas	107
4.1.4.2 Raízes	110
4.1.4.3 Bases caulinares	112
4.2 Detecção do processo de habituação (microplantas do grupo A vs plântulas do grupo BII)	116
4.2.1 Análise morfofisiológica.....	116
4.2.2 Análise histológica.....	119
4.2.2.1 Folhas	119
4.2.2.2 Raízes	123
4.2.2.3 Bases caulinares	126
4.2.3. Análise histoquímica.....	130
4.2.3.1 Bases caulinares	130
5 DISCUSSÃO	135
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	159
7 CONCLUSÕES	161
REFERÊNCIAS.....	163
ANEXOS	195

RESUMO

Avaliação histocitológica, histoquímica e morfofisiológica da habituação e senescência em pupunheiras mantidas *in vitro*

A técnica de cultura de tecidos permite a propagação rápida e maciça de propágulos geneticamente semelhantes, isentos de doenças, sendo amplamente empregada para a obtenção de gemas adventícias e embriões somáticos visando principalmente, a multiplicação clonal sob ação de reguladores de crescimento. Resultados satisfatórios foram obtidos com a espécie *Bactris gasipaes* Kunth. por meio da regeneração direta de gemas adventícias e de embriões somáticos, no entanto, as consequências decorrentes da prolongada manutenção *in vitro* de espécies perenes como a pupunheira, não estão elucidadas, sendo que as pesquisas mais expressivas ocorrem com espécies anuais e restritas a órgãos específicos. Considerando que o tempo de cultivo pode promover a senescência e a habituação de determinados tecidos aos reguladores de crescimento, afetando consideravelmente o potencial morfogênico, o objetivo principal do presente trabalho foi investigar a ocorrência destes processos em folhas, raízes e bases caulinares de plântulas e microplantas com um e oito anos de cultivo, respectivamente. Para tanto, o processo de senescência foi monitorado por meio de análises histológicas, ultraestruturais e histoquímicas à detecção de substâncias ergásticas e à fragmentação do DNA, ao passo que o processo de habituação, foi monitorado por meio de análises morfofisiológicas, histológicas e histoquímicas. Os resultados pertinentes ao processo de senescência evidenciaram a ocorrência de intenso processo de morte celular programada nas células de diversos tecidos nas estruturas analisadas das microplantas, sendo que estes eventos foram escassos e limitados às bases caulinares nas plântulas. Além disso, foi observada a presença elevada de plastoglôbulos no interior dos cloroplastos e de compostos fenólicos nas estruturas foliares e radiculares das microplantas. Já, em relação aos resultados obtidos à detecção do processo de habituação nestas microplantas, quando comparados às plântulas, foram detectados problemas relacionados ao alongamento da parte aérea e do sistema radicular, bem como alterações morfológicas nas raízes e uma pronunciada redução no potencial morfogênico das células pré-procambiais em relação às plântulas. Estes resultados evidenciam que a manutenção *in vitro* de pupunheiras por longos períodos promoveu o envelhecimento dos propágulos em decorrência à senescência generalizada, bem como provavelmente os conduziu ao processo de habituação aos reguladores de crescimento ANA e/ou BAP, inviabilizando a propagação em grande escala desta espécie.

Palavras-chave: Cultura de tecidos; *Bactris gasipaes*; Habituação; Senescência; Morte Celular Programada (MCP)

ABSTRACT

Histocytological, histochemistry and morphophysiological evaluations of habituation and senescence on peach palm maintained *in vitro*

The tissue culture technique allows rapid and massive spread of propagules genetically similar, free from diseases, being the technique widely employed to obtain adventitious buds and somatic embryos mainly targeting the clonal multiplication under the action of growth regulators. Satisfactory results have been obtained with the specie *Bactris gasipaes* Kunth. through direct regeneration of adventitious buds and somatic embryos, however, the consequences from prolonged *in vitro* maintenance of perennial species such as peach palm are not clear, and the most significant research occur with annual species and restricted to specific organs. Whereas the cultivation time can promote senescence and habituation of certain tissues to the growth regulators, affecting considerably the morphogenic potential, the main objective of this study was to investigate the occurrence of these processes in leaves, roots and stem bases of seedlings and microplants with one and eight years of cultivation, respectively. Thus, the senescence process was monitored by histological, ultrastructural and histochemical detection of ergastic substances and DNA fragmentation, whereas the habituation process was monitored by analyses histologic, histochemic and morpho-physiological. The relevant results from the senescence process showed the occurrence of an intensive process of programmed cell death in cells of various tissues of the analised microplants structures, and these events were rare and limited to the stem bases in the seedlings. Furthermore, it was observed the high presence of plastoglobules inside chloroplast and phenolic compounds in the leaf and root structure of microplants. Already, the results obtained in relation to the detection of the habituation process in these microplants, when compared to the seedlings, were detected problems related to the elongation of shoots and roots, as well as morphological changes in roots and a pronounced reduction in the morphogenic potential of pre procambial cells compared to seedlings. These results demonstrate that *the in vitro* maintenance of peach palm for long periods promoted the aging of seedlings due to senescence widespread and probably led to the habituation process, to the growth regulators NAA and/or BAP, diffculting the propagation on a large scale of this species.

Keywords: Tissue culture; *Bactris gasipaes*; Habituation; Senescence; Programmed Cell Death

LISTA DE ABREVIATURAS

AIA - Ácido indolacético

ANA – Ácido naftalenoacético

BAP - 6-Benzilaminopurina

CPP – Células Pré-Procambiais

DZ - Dihidrozeatina

MCP – Morte Celular Programada

MS - Murashige e Skoog

PAS – Ácido Periódico de Schiff

TDZ - Thidiazuron

Z – Zeatina

2,4-D - Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

2-iP - 2-isopenteniladenina

μM - Micromolar

1 INTRODUÇÃO

As técnicas de propagação *in vitro* são amplamente utilizadas em horticultura e agricultura comercial para a propagação em massa de espécies vegetais (AKIN-IDOWU et al., 2009) e de genótipos superiores, isentos de doenças (GILES; MORGAN, 2004), bem como para o estabelecimento e manutenção de bancos de germoplasma (REED et al., 2000; SANTOS, 2000; GEORGIEVA et al., 2010; PENCE, 2010; LYNCH et al., 2011).

A micropropagação possibilita a obtenção de plantas e seus distintos órgãos (PHILLIPS, 2004) pelo desenvolvimento e diferenciação de órgãos e tecidos de um organismo multicelular (ZHURAVLEV; OMELKO, 2008), processo este, conhecido como morfogênese (TAYLOR, 1997), cujos eventos são controlados principalmente pela rede de transcrição de sinais e pelos fitormônios (De SMET et al., 2009). No entanto, sob o ponto de vista referente à obtenção em massa de linhagens geneticamente semelhantes à planta mãe, o padrão indireto para a organogênese adventícia e embriogênese somática é inviável, uma vez que a variação somaclonal ocorre, principalmente, a partir da propagação pela indução de calos (LARKIN; SCOWCROFT, 1981; MÜLLER et al., 1990; SKIRVIN; NORTON; MCPHEETERS, 1993; BORDALLO et al., 2004). A instabilidade genética também tem sido reportada como uma possível consequência do cultivo *in vitro* por longos períodos de estruturas calogênicas (MURASHIGE; NAKANO, 1965; TORREY, 1967; KAEPLER; KAEPLER; RHEE, 2000).

Em palmeiras, a técnica da micropropagação é utilizada em diversas espécies como *Phoenix dactylifera* L. (ZAID; TISSERAT, 1984; TISSERAT; DeMASON, 1980, 1985; TISSERAT, 1987; BEKHEET; SAKER, 1998; MATER, 1990; SANÉ et al., 2006; SENA COSTA; ALOUFA, 2006; ASEMOTA et al., 2007), *Areca catechu* L (KARUN et al., 2004), *Euterpe oleracea* Mart. (LEDO et al., 2002) e *Elaies guineensis* Jack (BESSE et al., 1992; KONAN et al., 2010). Da mesma forma, a regeneração *in vitro* para *Bactris gasipaes* tem sido amplamente pesquisada (ARIAS, 1985; VALVERDE et al., 1987; VALVERDE, 1992; ALMEIDA; KERBAUY, 1996; ALMEIDA; ALMEIDA, 2006; STEINMACHER; CLEMENT; GUERRA, 2007; STEINMACHER et al., 2007, 2011; GRANER, 2009; ALMEIDA et al., 2012; GRANER et al., 2013), entretanto, poucas promoveram a regeneração via organogênese adventícia e (ou) embriogênese somática pela via morfogênica direta (ALMEIDA; KERBAUY, 1996; ALMEIDA; ALMEIDA, 2006; GRANER, 2009; ALMEIDA et al., 2012; GRANER et al., 2013) e mesmo com a ocorrência simultânea de ambos os eventos morfogênicos (GRANER, 2009; ALMEIDA et al., 2012). Nesta espécie, as células pré-procambiais (PPCs) respondem à aplicação exógena da associação dos

reguladores de crescimento ANA (ácido naftalenoacético) e 6-BAP (6- benzilaminopurina), atuando como nicho de células-tronco multipotentes, pluripotentes, e totipotentes ao desenvolvimento do sistema vascular, à organogênese adventícia e à embriogênese somática, respectivamente (ALMEIDA et al., 2012). No entanto, as consequências da manutenção *in vitro* por períodos prolongados sobre o potencial morfogênico são pouco compreendidas.

A manutenção *in vitro* prolongada de espécies obtidas por meio do padrão indireto já foi reportada como indutora de alterações no potencial morfogênico (CHATURVEDI; MITRA, 1975; MURASHIGE; NAKANO, 1965; VAN, 1981; KONAN et al., 2010), como responsável pela redução no desenvolvimento do sistema radicular (SHARMA; MODGIL; THAKUR, 2007) e na taxa de sobrevivência à aclimatização (KONAN et al., 2010) em decorrência, muito provavelmente, da senescência dos clones (HÄSLER et al., 2003; KONAN et al., 2010), envelhecimento das culturas (VALLEDOR et al., 2007) e ao processo de habituação de determinados tecidos aos reguladores de crescimento (WHITE, 1951; GAUTHERET, 1955; MEINS, 1989; AKIN-IDOWU et al., 2009). Enquanto o processo de senescência foliar em espécies anuais já foi bem caracterizado (GAN, 2003; WINGLER et al., 2006; LIM et al., 2007), pouco se sabe a respeito deste evento em espécies perenes (WATSON; RIHA, 2011) como a pupunheira, tanto nos sistemas *in vivo* (MUNNÉ-BOSH, 2007; WATSON; RIHA, 2011), como nos sistemas *in vitro* (KONAN et al., 2010).

Neste contexto, o objetivo principal do presente trabalho foi investigar a ocorrência dos processos de senescência e habituação de determinados tecidos aos reguladores de crescimento em folhas, raízes e bases caulinares contendo o meristema apical de microplantas de pupunheiras estabelecidas e mantidas *in vitro* por oito anos em subcultivos periódicos na presença e ausência de ANA e BAP no meio de cultura MS, comparando-se os resultados com aqueles obtidos em plântulas mantidas *in vitro* por apenas um ano, nas mesmas condições de cultivo.

Este estudo se fundamentou nas seguintes hipóteses:

a) Considerando-se que os processos bioquímicos independem da idade da planta, mas sim da sinalização genética, análises histocitológicas, histoquímicas e morfofisiológicas são eficientes à detecção de alterações no metabolismo primário e secundário; no potencial e vias morfogênicas em pupunheiras mantidas *in vitro* por longos períodos?

b) Microplantas mantidas por longos períodos *in vitro* apresentam alterações ultraestruturais e/ou danos no DNA em consequência do processo de morte celular, quando comparadas àquelas mantidas por curtos períodos?

c) O cultivo *in vitro* por longos períodos realmente afeta o potencial morfogênico em microplantas?

d) Estará o evento do item anterior relacionado ao processo de senescência e/ou habituação de plantas?

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Monitorar a ocorrência do processo de senescência e sinais de morte celular programada de microplantas e plântulas de pupunheiras mantidas *in vitro* por oito anos e um ano, respectivamente, por meio de avaliações histocitológicas, histoquímicas e morfofisiológicas.

1.1.2 Objetivos específicos

a) Evidenciar, por meio de análises histológicas, histoquímicas e morfofisiológicas, alterações no grau de autonomia (habituação) de determinados tecidos aos reguladores de crescimento ANA e BAP;

b) Identificar, por meio de análises histocitológicas, células em vias do processo de MCP;

c) Detectar, por meio de análises histoquímicas, a fragmentação do DNA e alterações na presença de compostos fenólicos, amido, lipídeos e proteínas totais nas células em microplantas submetidas a longos períodos de cultivo em relação às plântulas recém inoculadas;

d) Evidenciar, por meio de análises histológicas, morfofisiológicas e histoquímicas, modificações no potencial e vias morfogênicos em microplantas submetidas a longos períodos de cultivo comparando-as com plântulas em início de cultivo;

e) Caracterizar, por meio de análises estruturais e ultraestruturais, o processo de MCP em microplantas estabelecidas e cultivadas *in vitro* por oito anos com reguladores de crescimento ANA e BAP;

f) Monitorar, por meio de análises ultraestruturais, as organelas presentes em células de plantas mantidas um ano e oito anos de cultivo *in vitro*;

g) Detectar, por meio de análises ultraestruturais, alterações nas células em microplantas mantidas por longos períodos de cultivo, caracterizando o processo de morte celular, corroborando as análises histológicas;

h) Estabelecer se o cultivo *in vitro* por longos períodos realmente afeta o potencial e vias morfogênicas, e se esse fato está relacionado ao processo de senescência e/ou habituação de espécies vegetais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Micropropagação de *Bactris gasipaes* Kunth.

O processo extrativista irracional das matas nativas acarreta a extinção das palmeiras *Euterpe edulis* Mart. e *E. oleracea* Mart., espécies produtoras dos palmitos juçara e açai, respectivamente (YUYAMA, 1997). Desta forma, o cultivo da pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth–Arecaceae) para a obtenção do palmito promoveu a expansão no mercado brasileiro e mundial (MORA-URPÍ, 1997), principalmente em decorrência ao seu elevado potencial econômico (CLEMENT, 1987) e ao grau de aceitação organoléptica deste produto (FERREIRA et al., 1982).

A obtenção de propágulos por meio do estabelecimento e manutenção *in vitro* é uma alternativa viável para diversas espécies que possuem sementes recalcitrantes ou não produzem sementes viáveis, devido à intensa heterozigosidade, resultando na expressão de caracteres indesejáveis na população, bem como para espécies arbóreas de grande porte que demoram muitos anos para passar do estágio juvenil para o estágio adulto reprodutivo (SANTOS, 2000).

Diversas sementes de espécies de palmeiras com importância econômica apresentam recalcitrância, como o dendê (*Elaeis oleifera* [Kunth.] Cortes), côco da Bahia (*Cocos nucifera* L.) (SANTOS, 2000) e a pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth) (FERREIRA; SANTOS, 1992; BOVI, 1993; BOVI; MARTINS; SPIERING, 2004). Sob condições naturais, a reprodução assexuada de *B. gasipaes* ocorre pela formação de brotos na base do estipe (FERREIRA et al., 1995), no entanto, o êxito desse processo é reduzido a 25% de sobrevivência inicial (GARCIA, 1988), seguida de morte gradual de aproximadamente 90%, produzindo, além disso, plantas que não perfilham, ou perfilham pouco, e raramente florescem. Além disso, a propagação sexuada desta espécie apresenta outros entraves, devido à ocorrência de auto-incompatibilidade genética (MORA-URPÍ, 1984), à ocorrência de frutos partenocárpicos (HUERTE; ARIAS, 1981; ALMEIDA, 1994) e à polinização deficiente, colaborando para a formação de cachos com poucos frutos e sementes viáveis (ALMEIDA, 1994), justificando, assim, o emprego das técnicas de propagação *in vitro*, amplamente utilizada em horticultura e agricultura comercial para a propagação em massa de espécies vegetais (AKIN-IDOWU et al., 2009), bem como a obtenção de genótipos superiores estáveis e isentos de doenças (GILES; MORGAN, 2004).

A técnica da micropropagação é amplamente utilizada em palmeiras, como *Phoenix dactylifera* L. (ZAID; TISSERAT, 1983; TISSERAT; DeMASON, 1980, 1985; TISSERAT, 1987; BEKHEET; SAKER, 1998; MATER, 1990; SANÉ et al., 2006; SENA COSTA;

ALOUFA, 2006; ASEMOTA; EKE; ODEWALE, 2007), *Syagrus oleracea* (Mart.) Becc. (MELO et al., 2001), *Areca catechu* L (KARUN et al., 2004), *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Martius (MOURA, 2007), *Euterpe oleracea* Mart. (LEDO et al., 2001), *Euterpe edulis* Mart (SALDANHA, 2007), *Cocos nucifera* L. (SILVA, 2002; LEDO et al., 2007) e *Elaies guineensis* Jack (BESSE et al., 1992; KONAN et al.; 2010).

Da mesma forma, a regeneração *in vitro* é uma prática amplamente utilizada para *B. gasipaes* (ARIAS, 1985; VALVERDE et al., 1987; VALVERDE; ARIAS; THORPE, 1992; ALMEIDA, 1994; ALMEIDA; KERBAUY, 1996; ALMEIDA; ALMEIDA, 2006; STEINMACHER; CLEMENT; GUERRA, 2007; STEINMACHER et al., 2007, 2011; GRANER, 2009; ALMEIDA et al., 2012; GRANER et al., 2013), no entanto, somente as pesquisas realizadas por Almeida (1994), Almeida e Kerbauy (1996), Almeida e Almeida (2006), Graner (2009), Almeida et al. (2012) e Graner et al. (2013) promoveram a regeneração via organogênese adventícia e (ou) embriogênese somática pelo padrão direto e com resultados satisfatórios. A ocorrência simultânea de ambos os eventos morfogênicos também já foi reportada para *B. gasipaes* (GRANER, 2009; ALMEIDA et al., 2012; GRANER et al., 2013), com destaque às pesquisas desenvolvidas por Almeida et al. (2012), que detectaram a obtenção simultânea e direta de embriões somáticos com origem multicelular, a partir da bipolarização de células pré procambiais (CPPs), de embriões somáticos com origem unicelular a partir da desdiferenciação e transdiferenciação das células subepidérmicas de gemas adventícias, bem como a obtenção de gemas adventícias originadas da unipolarização das CPPs.

Sob o ponto de vista da micropropagação visando à obtenção em massa de linhagens geneticamente semelhantes à da planta mãe (“clones”), o padrão indireto para a organogênese adventícia e embriogênese somática é inviável, pois, segundo Grattapaglia e Machado (1990) e Guerra e Nodari (2006), a variabilidade genética (poliploidização e aneuploidização) resulta da passagem pela fase de calo, estado no qual as células estariam mais sujeitas a sofrerem alterações genotípicas. A instabilidade genética também tem sido reportada como uma possível consequência do cultivo *in vitro* por longos períodos de estruturas calogênicas (MURASHIGE; NAKANO, 1965; TORREY, 1967; KAEPLER; KAEPLER; RHEE, 2000). No entanto, tem sido constatado que a manutenção *in vitro* por períodos prolongados promove alterações nas vias morfogênicas (CHATURVEDI; MITRA, 1975), declínio no potencial morfogênico (MURASHIGE; NAKANO, 1965; VAN, 1981; KONAN et al., 2010), uma sensível redução no desenvolvimento do sistema radicular (SHARMA; MODGIL; THAKUR, 2007) e na taxa de sobrevivência à aclimatização (KONAN et al., 2010) em decorrência,

muito provavelmente, da senescência dos clones (HÄSLER et al., 2003, KONAN et al., 2010) em consequência ao envelhecimento das culturas (VALLEDOR et al., 2007) e ao processo de habituação (WHITE, 1951; GAUTHERET, 1955; KERBAUY, 1981; MEINS, 1989; AKIN-IDOWU et al., 2009).

Neste contexto, esta espécie torna-se uma importante ferramenta para a compreensão da alteração do potencial morfogênico mediante a manutenção prolongada *in vitro*, a qual pode estar relacionada ao envelhecimento e/ou habituação de determinados tecidos aos reguladores de crescimento destas culturas. Além disso, por tratar-se de uma espécie monocotiledônea e, portanto, não apresentar atividade cambial (DEMASON, 1983), as atividades mitóticas e morfogênicas podem ser mais facilmente monitoradas nos traços de cordões de células do procâmbio e/ou traços de cordões de células pré-procambiais, tecidos meristemáticos diretamente relacionados à regeneração de propágulos em *B. gasipaes* (ALMEIDA, 1994; GRANER, 2009; ALMEIDA et al., 2012).

2.2 Morfogênese e vias morfogênicas

Dentre os principais métodos de cultura de tecidos que fazem uso de diversas partes das plantas encontram-se: a cultura meristemática, a cultura de embriões, a suspensão celular (cultura de células), a cultura de anteras e micrósporos, cujas principais aplicações para este fim são: a conservação de germoplasma, produção de plantas transgênicas, produção de haplóides, obtenção *in vitro* de mutantes, a produção de metabólitos secundários à farmacologia ou outros compostos químicos (ILLG, 1991; GAMBORG, 2002) e a rápida e maciça propagação de espécies geneticamente superiores (MURASHIGE, 1974; WAWROSCHE; MALIA; KOPP, 2001; ERIG; SCHUCH, 2005; ILLG, 1991, GILES; MORGAN, 2004) isentas de doenças (GILES; MORGAN, 2004).

A propagação de plantas *in vitro*, também conhecida como micropropagação é amplamente utilizada na horticultura e agricultura comercial (AKIN-IDOWU et al., 2009) e baseia-se na totipotencialidade das células dos explantes (ZIMMERMAN, 1993; CHRISTIANSON; WARNICK, 1988).

O conhecimento morfogênico é imprescindível à técnica de micropropagação, pois possibilita a obtenção de plantas e seus distintos órgãos (PHILLIPS, 2004) pelo desenvolvimento e diferenciação de órgãos e tecidos de um organismo multicelular (ZHURAVLEV; OMELKO, 2008), processo este, conhecido como morfogênese (TAYLOR, 1997). Estes eventos são controlados principalmente pela rede de transcrição de sinais e pelos fitormônios (De SMET et al., 2009), os quais permitem otimizar as duas principais vias

morfogenéticas na biologia *in vitro*, a embriogênese somática e a organogênese adventícia (raízes e gemas adventícias) (PHILLIPS, 2004).

A multiplicação *in vitro* por meio da indução de gemas adventícias ou embriões somáticos via organogênese ou embriogênese somática, respectivamente, pode ocorrer direta ou indiretamente de acordo com o explante e sua subsequente manipulação. Entretanto, sob o ponto de vista da micropropagação visando a obtenção em larga escala de linhagens geneticamente semelhantes a da planta mãe, o padrão indireto para a organogênese e embriogênese somática é inviável, pois a variabilidade genética (variação somaclonal) resulta da passagem pela fase de calo (LARKIN; SCOWCROFT, 1981; MÜLLER et al., 1990; SKIRVIN; NORTON; McPHEETERS, 1993; BORDALLO et al., 2004). Cabe salientar que, devido às alterações epigenéticas decorrentes da utilização de reguladores de crescimento serem hereditáveis (MEINS, 1989) e estarem, muito provavelmente, relacionadas à memória celular residual ou epigenética descritas recentemente às células com origem animal (KIM et al., 2010, ZORZETTO, 2011), muita cautela é necessária para o emprego do termo ‘clone’, no que tange a obtenção de indivíduos com genótipos 100% idênticos às matrizes selecionadas à multiplicação *in vitro*.

Nos organismos vegetais, a diferenciação está na dependência do estabelecimento da polaridade na célula, de sua divisão assimétrica e de seu posicionamento no corpo vegetal, mediante a influência dos níveis endógenos hormonais, particularmente das auxinas (De SMET; BEECKMAN, 2011), considerando-se que as citocininas sejam imprescindíveis no processo de divisão celular (De VEYLDER; BEECKMAN; INZÉ, 2007).

A polarização de uma célula parece estar na dependência da influência de fatores extrínsecos provenientes das células adjacentes, a exemplo do que ocorre na célula-ovo após a fertilização (zigoto), que ocorre mediante sinais específicos ainda não elucidados provenientes das células do tecido materno ou da polarização da célula da hipófise do embrião em desenvolvimento, que ocorre após o fluxo basípeto de auxinas ou sinais induzidos por este hormônio (HOVE; HEIDSTRA, 2008) e da polarização da célula do periciclo, que ocorre após esta receber, muito provavelmente, fatores de transcrição (De SMET; BEECKMAN, 2011) provenientes das células adjacentes aos pólos de protoxilema mediante a presença da auxina (De SMET et al., 2007). Desta forma, fatores extrínsecos induzem a polarização de outros fatores intracelulares (fatores intrínsecos), como os mRNAs para WOX 2 e WOX 8 em embriões zigóticos de *Arabidopsis*, o que permite a expressão distinta destes após a divisão celular (HAECKER et al., 2004), além de proteínas e repressores da transcrição gênica, originando, assim, heranças distintas da fita de DNA (GÖNCZY, 2008).

Ainda para embriões zigóticos de *Arabidopsis*, observa-se uma evidente assimetria após a fertilização, em decorrência da localização polar do vacúolo e do núcleo (MANSFIELD; BRIARTY, 1991) e, embora se desconheça os reguladores moleculares que promovem a polarização do núcleo, tem sido reportado que os microtúbulos estão envolvidos neste processo, e não os filamentos de actina (DE SMET; BEECKMAN, 2011). Portanto, uma vez estabelecida a divisão assimétrica, além dos distintos fatores intrínsecos presentes em cada célula-filha, a exemplo dos fatores de transcrição e da expressão diferenciada dos genes, ambos se encontram também sob a atuação de fatores extrínsecos, como a auxina ou outros fatores de transcrição (HOVE; HEIDSTRA, 2008).

De acordo com o posicionamento das células-filhas, uma rede transcricional e os fitormônios regulam a comunicação célula-a-célula, promovendo a determinação e diferenciação destas células (De SMET et al., 2009), conforme demonstrado por Almeida et al. (2012) ao transferirem ápices caulinares de *B.gasipaes* Kunth. cultivados em meio MS isento de reguladores de crescimento para o meio de cultivo acrescido dos reguladores de crescimento ANA (ácido naftaleno acético) e BAP (6-benzilaminopurina) associados e, posteriormente, transferindo ao meio de cultivo acrescido dos reguladores de crescimento ANA e TDZ (tiadizuron). Os autores evidenciaram que, dependendo do posicionamento das células competentes e de sua interação com as células vizinhas, sob a influência da aplicação exógena da combinação destes reguladores de crescimento (ANA/BAP e ANA/TDZ), as células pré-procambiais (CPPs) localizadas entre as células meristemáticas do ápice caulinar e a região de diferenciação das células procambiais atuam como nichos de células-alvo à multipotência (diferenciação do sistema vascular), à pluripotência (organogênese adventícia) e à totipotência (embriogênese somática). Além disso, sabe-se que nos meristemas apicais há uma elevada atividade das CDKs (Cyclin-dependent kinases) e está diretamente relacionada à entrada ou não da célula em processo mitótico (De VEYLDER; BEECKMAN; INZÉ, 2007). Ainda, segundo os autores, à medida que as células se afastam dos meristemas, o nível da atividade da CDK cai consideravelmente, junto com os fatores mitogênicos, como fitormônios e carboidratos, induzindo as células ao processo de diferenciação. No entanto, ainda não está claro, como a atividade CDK e a diferenciação celular estão interconectadas.

Mecanismos epigenéticos que estão implicados na regulação da atividade gênica diferencial em elevado número de processos incluem modificações das histonas (como acetilação, metilação, fosforilação, ubiquitinação e ADP-ribosilação) e metilação do DNA em dinucleotídeos (CpG) (JENUWEIN; ALLIS, 2001; GAN et al., 2007). Como resultado, estas alterações epigenéticas regulam o silenciamento ou expressão dos genes (reprogramação

celular) em nível transcricional, mediada pelo nível de empacotamento do DNA em cromatina (MITALIPOV; WOLF, 2009). Segundo Verdeil et al. (2007), as células totipotentes possuem um núcleo volumoso, centralizado, com um único nucléolo, com formato irregular, invaginações do envelope nuclear e elevada relação núcleo-citoplasma. A presença de eucromatina é predominante em relação às esparsas heterocromatinas adjacentes ao envelope nuclear. O citoplasma é denso, contendo elevada quantidade de amiloplastos e pequenos vacúolos fragmentados. Raramente são observados plasmodesmos na parede celular modificada pela deposição de calose, conferindo, dessa forma, o isolamento de suas células vizinhas imediatas. Este isolamento físico favorece a reprogramação de suas funções genômica e celular, fundamentais para a aquisição da totipotencialidade e da competência às rotas morfogênicas.

Por sua vez, as células-tronco pluripotentes estão localizadas junto às células derivadas na região de diferenciação dos meristemas caulinares e radiculares, possuindo elevada relação núcleo-citoplasma, apresentando núcleo geralmente esférico, isodiamétrico, contendo um ou mais nucléolos, com poucas regiões com eucromatina, conseqüentemente com maior evidência de heterocromatina uniformemente distribuída (VERDEIL et al., 2007). O autor ressaltou que o citoplasma das células-tronco pluripotentes é denso, com muitos fragmentos de pequenos vacúolos e sem a presença de amiloplastos. Além disso, apresentam muitos plasmodesmos, devido à forte dependência e interação com células vizinhas, gerando um nicho que mantém sua identidade celular.

Embora não haja relatos na literatura vigente, muito provavelmente as células multipotentes seguem o mesmo padrão anatômico das células pluripotentes, com provável exceção em relação à reduzida quantidade de eucromatina, entretanto, mais estudos serão necessários para que se comprove essa hipótese.

A regulação da morfogênese é decorrente do posicionamento das células-filhas, da dinâmica transcricional e da atuação dos fitormônios (De SMET et al., 2009; DETTMER; ELO; HELARIUTTA, 2009), no entanto, a interação entre a indução da expressão morfogênica à organogênese adventícia (gemas adventícias) e embriogênese somática (embriões somáticos) por mecanismos epigenéticos, ainda é pouco compreendida.

Uma vez submetidos aos efeitos estimulatórios do meio de cultura, uma célula ou um grupo de células em estado diferenciado no explante podem tornar-se competentes a estes estímulos (CEDZICH et al., 2008; THOMPSON, 2008), desdiferenciar-se (ZHAO et al., 2001) e tornarem-se determinadas e limitadas a outras vias morfogênicas específicas (CHRISTIANSON; WARNICK, 1983; TUCKER; WARREN WILSON; GRESSHOFF,

1986). Portanto, a aquisição de competência corresponde à capacidade que uma determinada célula-alvo possui em responder de forma definida a um sinal hormonal específico (CEDZICH et al., 2008; THOMPSON, 2008), e caracteriza-se por ser um pré-requisito à determinação celular (CHURCH; GALSTON, 1988). Uma vez competentes aos estímulos hormonais, as células também podem se desdiferenciar, sendo este, o maior processo que antecede a totipotência, regeneração e formação de novas linhagens de células-tronco em organismos multicelulares (ZHAO et al., 2001). De acordo com os autores, a transição do estado diferenciado para o estado indiferenciado requer uma abrupta mudança na célula, como alterações na estrutura da cromatina, por meio de alterações nas porções que estão acessíveis à transcrição (eucromatina) versus a porção que está reprimida (heterocromatina). Os autores relataram, ainda, que a desdiferenciação celular ocorre por duas distintas fases da descondensação da cromatina: a primeira é uma fase de transição que confere competência para a mudança do destino da célula, que é seguido, em condições adequadas, por uma segunda fase proteossoma-dependente, que representa um compromisso para o ciclo mitótico. Portanto, o retorno da célula ao estado pluripotente ou totipotente por meio da biotecnologia implica a utilização de recursos que promovam a demetilação do DNA e a deacetilação de histonas.

Em células de origem animal, um grupo de fatores de transcrição (Oct4, Sox2, Klf4 e c-Myc) pode converter uma célula diferenciada à pluripotência (LISTER et al., 2011; PAPP; PLATH, 2011), reprogramando-as em células-tronco pluripotentes induzidas (iPS), pelo fato de atuarem como potencializadores da expressão gênica ou à sua repressão (silenciamento) (PAPP; PLATH, 2011). Os autores ressaltaram ainda que a natureza estocástica do processo de reprogramação sugere que o emprego destes fatores de transcrição encontra obstáculos epigenéticos que podem ser vistos como barreiras na conversão à pluripotência. De acordo com Kim et al. (2010), o emprego dos fatores de transcrição como moduladores epigenéticos encontra outro entrave relacionado ao sucesso do retorno ao estado pluripotente, pois não são capazes de eliminar a metilação residual dos tecidos somáticos de origem (assinatura da metilação residual ou memória residual), o que limita a obtenção de novas linhagens celulares. Os autores ressaltaram que, uma incompleta reprogramação celular ocorre com a utilização de células envelhecidas, bem como há diferenças entre o nível da metilação do DNA entre células-tronco pluripotentes e células-tronco embriogênicas, as quais somente são perceptíveis após a diferenciação, quando locus específicos que retém marcas residuais epigenéticas são expressos.

O processo de demetilação é bem compreendido para as células de origem animal, visando o retorno ao estado pluripotente (SANTOS et al., 2002; KIM et al., 2010; POLO et al., 2010; MARTINEZ-FERNANDEZ; NELSON; TERZIC, 2011), mas muito pouco compreendido para as plantas (OTTO; WALBOT, 1990; JOST, 1993; WEISS et al., 1996), embora já se tenha identificada a atuação de uma enzima demetilase em *Arabidopsis* (GEHRING et al., 2006).

Considerando que os fitormônios estão envolvidos no controle direto da atividade gênica em nível de transcrição e tradução, pela ativação seletiva e diferencial de genes (reprogramação celular) por meio do controle da metilação do DNA (LAMBÉ et al., 1997), o retorno da célula ao estado pluripotente ou totipotente (desdiferenciação) muito provavelmente está relacionado à atuação dos reguladores de crescimento na atividade de enzima(s) demetilase(s). De acordo com Cedar e Razin (1990), uma reorganização geral da atividade celular é necessária durante o estabelecimento *in vitro*, a qual se manifesta primeiramente por uma ativação geral dos genes (demetilação).

Embora o processo de divisão da célula pareça fazer parte do processo de desdiferenciação da célula, para então originar novos tipos celulares (SHIAVONE; RACUSEN, 1990), o processo de conversão de uma célula específica em outro tipo distinto, conhecido por transdiferenciação (Mc MANUS et al., 1998; THOMAS et al., 2003; PANG et al., 2008), pode ocorrer sem a necessidade do processo de divisão celular e geralmente é induzido por fatores endógenos hormonais (Mc MANUS et al., 1998; PANG et al., 2008), os quais também podem conferir informação posicional (Mc MANUS et al., 1998).

Posteriormente ao processo de desdiferenciação, ocorre a restrição ou ‘canalização’ do potencial das células à diferenciação ao longo das vias de desenvolvimento, resultando em um compromisso mais estável para uma via única, processo este designado por ‘determinação’ (CHRISTIANSON; WARNICK, 1983; TUCKER; WARREN WILSON; GRESSHOFF, 1986) e também controlado pelo nível de metilação do DNA (FRAGA; CAÑAL; RODRIGUEZ, 2002a; VALLEDOR et al., 2010).

2.3 Reguladores de crescimento vs morfogênese

2.3.1 Auxinas

As auxinas naturais são geralmente sintetizadas no meristema apical caulinar, em folhas jovens, frutos em desenvolvimento e sementes (PERES et al., 1997; COHEN; BANDURSKI, 1982) e desempenham elevada importância no ciclo de vida do vegetal, por

estarem relacionadas a diversos processos biológicos, particularmente ao processo de divisão celular (MARQUES, 1996).

A auxina possui, capacidade de promover a diferenciação vascular (FUKUDA, 1992; NELSON; DENGLER, 1997), cujo sinergismo com as citocininas, está intimamente relacionada com a divisão celular e com o crescimento do meristema, sendo, portanto, essencial ao desenvolvimento de explantes no cultivo *in vitro* (MARQUES, 1996) por exercer controle da morfogênese, particularmente em relação ao emprego de seu balanço com as citocininas nos meios de cultura (SKOOG; MILLER, 1957). De forma similar às citocininas, as auxinas atuam na diferenciação e podem interferir na regeneração, independente do balanço AIA/citocininas, pois são necessárias para a expansão e divisão celular (PINO-NUNES, 2005).

O ácido indolacético (AIA), a primeira auxina isolada em plantas, pode ser produzido por diversas vias e está estrutural e quimicamente relacionado ao aminoácido triptofano, favorecendo o crescimento das células (COHEN; BANDURSKI, 1982; MARCHIORO, 2005). Embora a síntese do AIA possa ocorrer através de vias dependentes ou independentes do triptofano (NORMANLY et al., 1995; LJUNG et al., 2002; WOODWARD; BARTEL, 2006), as reações completas destas rotas ainda não estão completamente elucidadas (WOODWARD; BARTEL, 2006; POLLMAN; DÜCHING; WEILER, 2009), presumindo-se basicamente, a existência de dois precursores da síntese do AIA: o triptofano ou um precursor deste composto, ou seja, o indol ou o indol-3-glicerol fosfato (POLLMAN; DÜCHING; WEILER, 2009). De acordo com os autores, tanto os precursores intermediários, como as enzimas envolvidas são desconhecidos na via de triptofano independente, ao passo que para a via de triptofano dependente da síntese do AIA foram isoladas enzimas capazes de produzir os precursores intermediários, tais como o indol-3-piruvato, ácido indole-3-acetaldoxima, indole-3-acetaldeído (IAALD), indole-3-acetonitrilo (IAN), indol-3-acetamida (IAM) ou triptamina (TAM), respectivamente. Os autores salientam, ainda que, nenhuma das vias de biossíntese propostas para a síntese de AIA foi completamente elucidada dentro de uma espécie, uma vez que a maior parte das vias de biossíntese sugeridas são propostas com base nos resultados combinados obtidos a partir de diferentes espécies de plantas.

Outros compostos endógenos também apresentam atividade auxínica, dentre os quais se destacam o ácido fenilacético (AFA) (MARCHIORO, 2005) e o ácido indolbutírico (AIB) (LUDWIG-MÜLLER, 2000; LI et al., 2009).

Dentre os compostos auxínicos sintéticos que também favorecem o crescimento das células, destacam-se o ácido indenoacético, o ácido 2-benzofuranacético, o ácido 3-

benzofuranacético, o ácido naftalenacético, o ácido 3-indolpirúvico, o ácido indolbutírico, derivados do naftaleno como o ácido naftil-1-acético, o ácido naftoxi-2-acético e alguns ácidos fenoxiacéticos com atividade auxínica, que levou ao descobrimento do 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), que apresenta uma grande atividade auxínica (MARCHIORO, 2005).

Em cultura de tecidos, o ANA (ácido naftalenoacético) é um dos compostos auxínicos mais amplamente utilizado, cujo emprego isolado tem sido reportado por estimular a indução de raízes (WIGHTMAN et al., 1980; ABDULLAH; GRACE; YEOMAN, 1989; RAHMAN et al., 1992; CENTELLAS et al., 1999; PICOLI; OTONI, 2001; PRAXEDES et al., 2001; SANÉ et al., 2006). Todavia, o ANA torna-se potencialmente inibitório na fase de alongamento (CENTELLAS et al., 1999; MELO et al., 2001; PICOLI; OTONI, 2001), podendo, ainda, promover o desenvolvimento de raízes grossas (CENTELLAS et al., 1999; GUIDOLIN, 2003; GRANER, 2009). Este regulador de crescimento comporta-se também como indutor ao desenvolvimento de embriões somáticos diretamente do explante (GRANER, 2009) e favorável à multiplicação de brotos, ao alongamento da parte aérea e ao desenvolvimento de elevado número de folhas quando utilizado em baixas concentrações (PRAXEDES et al., 2001; RUBIN et al., 2007).

2.3.2 Citocininas

As citocininas são compostos predominantemente produzidos nas raízes (PERES et al., 1997) e estão intimamente relacionados com os processos de divisão (SKOOG; MILLER, 1957; FRANCIS, SORRELL, 2001; PINO-NUNES, 2005), expansão (PINO-NUNES, 2005) e diferenciação celular (SKOOG; MILLER, 1957), bem como, ao desenvolvimento de gemas adventícias (SKOOG; MILLER, 1957; GRANER, 2009; GRANER et al., 2013), no processo de senescência foliar (MOK; MOK, 2001), e essenciais no desenvolvimento de explantes em cultura de tecidos (MARQUES, 1996).

Até 2001, o modelo corrente para a biossíntese de citocininas previa a adição de isopentenilpirofosfato (Δ^2 -iPP) à posição N6 de AMP pela enzima isopentenil transferase (IPT) produzindo a citocinina ribotídeo N6 Δ^2 -isopenteniladenosina monofosfato [9R-5'P]iP. Os primeiros genes codificando a enzima IPT foram isolados em bactéria e não em plantas. A enzima isopentenil transferase (IPT) também é codificada pelo gene *IPT* em *Arabidopsis thaliana*. O gene *IPT* ou *TMR* presente no T-DNA de *Agrobacterium tumefaciens* produz [9R-5'P]iP. Outra alternativa para biossíntese de citocininas em plantas seria o tRNA. A terminação 3' do anticódon do tRNA possui citocininas, o que conduz, inclusive, à hipótese

de que essas citocininas estão envolvidas no controle da biossíntese de proteínas. No entanto, a maior parte das citocininas biologicamente ativas não ocorrem no tRNA. No tRNA predomina cis-Z e não trans-Z. A liberação de cis-Z a partir de tRNA, e posterior conversão para trans-Z por uma cis-trans isomerase (MOK; MOK, 2001), pode ser uma via indireta de produção de citocininas, mas não a principal, pois tecidos auxotróficos para citocininas obviamente possuem tRNA (LETHAM; PALNI, 1983).

A atividade das citocininas é regulada em diferentes níveis, incluindo sua biossíntese, captação a partir de fontes extracelulares, interconversões metabólicas, inativação e degradação, bem como pela transdução do sinal e pelo transporte (MOK; MOK, 2001). Experimentos com a substância lovastatin, que inibe a via isoprenóide, indica que a biossíntese de citocininas está relacionada ao seu acúmulo (LAUREYS et al., 1998; DOBREV et al., 2002), ao passo que a remoção irreversível da cadeia lateral de citocininas isoprenóides ocorre pela catálise promovida pela enzima citocinina oxidase, que é amplamente distribuída nas plantas (HARE; van STANDEN, 1994).

Em cultura de tecidos, dentre as citocininas sintéticas mais amplamente utilizadas, destaca-se o BAP (6-Benzilaminopurina), cujo acréscimo isolado no meio de cultura tem favorecido a multiplicação de brotos (PEREIRA et al., 2000; ZAFFARI et al., 2000; BORGES-JÚNIOR; SOBORSA; MARTINS-CODER, 2004; DZAZIO; BIASI; ZANETTE, 2002; BERTONI et al., 2006; FURTADO et al., 2007), a indução de embriogênese somática direta (ALMEIDA, 1994; ALMEIDA; AYUB; GEBIELUCA, 2003; ALMEIDA, 2006), o desenvolvimento de elevado número de folhas (PEREIRA et al., 2000) e como inibidor da rizogênese (PEREIRA et al., 2000; SILVA JÚNIOR, 2007).

2.3.3 O balanço auxinas/citocininas

Os hormônios vegetais são metabólitos secundários que ocorrem naturalmente e desempenham papéis importantes no ciclo de vida das plantas, podendo ser transportados e exercer ação específica a certa distância ou atuar nas próprias células em que são sintetizados (GASPAR et al., 2003), sendo que as auxinas e citocininas correspondem aos mais importantes grupos de reguladores de crescimento e da morfogênese de tecidos e órgãos vegetais (MARQUES, 1996).

As auxinas naturais são sintetizadas geralmente, no meristema apical caulinar, em folhas jovens, frutos em desenvolvimento e em sementes, ao passo que as citocininas são predominantemente produzidas nas raízes (PERES et al., 1997). Desta forma, um intenso crescimento do sistema radicular implicaria numa elevada produção/transporte de citocininas,

estimulando a indução de gemas caulinares, as quais, por sua vez, garantiriam o suprimento de auxina necessária à indução de novas raízes (PERES et al., 1997; GRANER, 2009).

Tanto as auxinas como as citocininas estão intimamente relacionadas com a divisão celular e com o crescimento do meristema, sendo essenciais ao desenvolvimento de explantes em cultura de tecidos (MARQUES, 1996), pois exercem controle da morfogênese, particularmente em relação ao emprego de seu balanço nos meios de cultura (SKOOG; MILLER, 1957). Além disso, as auxinas e citocininas atuam na diferenciação e podem interferir na regeneração, independente do balanço AIA/citocininas utilizado, já que são necessárias para a expansão e divisão celular (PINO-NUNES, 2005), pois exercem tanto interações antagonistas no controle de gemas laterais e raízes adventícias (GASPAR et al., 2003), como interações antagonistas na regulação do controle do ciclo celular por meio da regulação da expressão da proteína quinase cdc2 (JOHN et al., 1993). Neste contexto, os níveis endógenos hormonais podem ser fortemente alterados pela aplicação exógena de reguladores de crescimento e exercer efeitos significativos nas respostas morfogênicas (MOK et al., 1987; HUTCHINSON; KRISHNARAJ; SAXENA, 1996; ZAFFARI et al., 2000; MONCALEÁN et al., 2005).

De acordo com o balanço auxina/citocinina empregado no meio de cultura, pode-se obter o desenvolvimento de embriões somáticos (LEDO et al., 2002; HUTCHINSON; KRISHNARAJ; SAXENA, 1996; GRANER, 2009; ALMEIDA et al., 2012), emissão de gemas adventícias (ALMEIDA, 1994; PERES; KERBAUY, 1999; PERES, 2002; SILVA JÚNIOR, 2007; GRANER, 2009; ALMEIDA et al., 2012), rizogênese (SKOOG; MILLER, 1957; LEDO et al., 2001; MERCIER et al., 2003; LEDO et al., 2007; SILVA JÚNIOR, 2007; ALMEIDA et al., 2012), o desenvolvimento da parte aérea (ALMEIDA, 1994; LEDO et al., 2001, 2007; GRANER, 2009), a reversão de gemas vegetativas em gemas florais (TISSERAT; DEMASON, 1985) ou a reversão de gemas florais em gemas vegetativas (ALMEIDA; KERBAUY, 1996).

A atuação dos hormônios, sobretudo o efeito do balanço AIA/citocininas no desenvolvimento, depende do estabelecimento de gradientes espaciais e temporais, cujos principais responsáveis pelo estabelecimento desses seriam as peculiaridades de síntese e transporte, além das enzimas de inativação de citocininas (PINO-NUNES, 2005). O autor ressalta que, devido à falta de conhecimento quanto à capacidade de absorção, transporte e inativação do tecido no qual o hormônio foi aplicado, bem como às alterações que o hormônio exógeno pode provocar no nível hormonal endógeno, há algumas limitações quanto a correta interpretação desses estudos. Além disso, ao invés de conceber o sistema de fitormônios como

uma matriz de vias paralelas ao processamento de sinais, este sistema é mais adequadamente descrito como uma rede de interações, onde mudanças em um determinado segmento promovem ajustes em outras áreas (MÜLLER; DÜCHTING; WEILER, 2002).

Gaspar et al. (2003) ressaltaram que os hormônios vegetais, bem como outros reguladores (incluindo as toxinas, eliciadores, luz, etc.) mediam seus efeitos através da transdução e vias de amplificação, utilizando proteínas-G, assim como ocorre nos organismos dos animais. Há indícios de que um determinado hormônio vegetal pode desempenhar diversos papéis, e não necessariamente da mesma maneira em uma sequência de eventos para um processo específico.

2.4 Fatores limitantes em cultura de tecidos vegetais

2.4.1 Tempo de manutenção *in vitro*

As consequências do cultivo *in vitro* por longos períodos ainda não estão completamente elucidadas, entretanto, já foram constatadas anormalidades na constituição cromossômica (poliploidia e aneuploidia) (TORREY, 1967; KAEPLER; KAEPLER; RHEE, 2000), alterações nas vias morfogênicas (CHATURVEDI; MITRA, 1975) e declínio no potencial morfogênico (MURASHIGE; NAKANO, 1965; VAN, 1981; KONAN et al., 2010) em estruturas calogênicas.

Torrey (1967) observou que a viabilidade à rizogênese de calos de *Pisum sativum* L. derivados de ápices radiculares mantidos por oito anos em meio de cultura com auxina (2,4-D ácido diclorofenoxiacético) não foi alterada após terem sido submetidos ao cultivo sob agitação em meio Bonner modificado, sem adição de reguladores de crescimento ou acrescido de AIA (ácido indolacético) ou ainda, contendo água de côco, entretanto, foram identificadas anormalidades na constituição cromossômica (poliploidia e aneuploidia) em todas as amostras analisadas. Já Chaturvedi e Mitra (1974) verificaram, ainda, que a presença contínua de reguladores de crescimento em estruturas calogênicas de *Citrus grandis* (L.) por períodos prolongados alterou a via morfogênica à obtenção de gemas adventícias para a indução de embriões somáticos.

Calos mantidos *in vitro* por períodos prolongados comumente sofrem declínio considerável no potencial morfogênico (VAN, 1981; MURASHIGE; NAKANO, 1965; KONAN et al., 2010), podendo ser irreversível, estar relacionado ao fenômeno de senescência e supostamente baseado em alterações genéticas (acúmulo de mutações somáticas) (MURASHIGE; NAKANO, 1965). Estes últimos autores verificaram que a manutenção de calos *Nicotiana tabacum* 'Wisconsin 38' entre 1 1/2-3 anos reduziu a taxa de

desenvolvimento de brotos e que o decréscimo no potencial morfogênico foi irreversível e característico da linhagem das células totipotentes analisadas. Jiménez et al. (2001), no entanto, verificaram que o envelhecimento de culturas de calos embriogênicos nucelares de *Citrus sinensis* Osb. iniciadas há mais de seis anos e posteriormente habituados ao glicerol, além de estimular a embriogênese somática, foi caracterizado pela redução nos níveis endógenos de ABA (ácido abscísico) e de citocininas.

Konan et al. (2010) avaliaram a manutenção *in vitro* por um período de vinte anos, vinte linhagens de dendezeiros obtidos a partir de embriões somáticos originados em culturas calogênicas e induzidos pelo acréscimo de 452,41 μM de 2,4-D, 4,44 μM de BAP, 81,45 μM de sulfato de adenina, 4,5 g.L^{-1} de carvão ativado e 20 g.L^{-1} de glucose ao meio MS. Para a fase de multiplicação, os autores utilizaram apenas o meio MS acrescido de 30 g.L^{-1} de sacarose, cujo enraizamento dos embriões ocorreu com o aumento da concentração de sacarose (45 g.L^{-1}) e na presença do ANA (5,37 μM). A manutenção destes embriões somáticos ocorreu na ausência de reguladores de crescimento, durante um período de vinte anos, com concomitante indução de novos embriões somáticos, entretanto, os autores observaram que a partir do nono ano de cultivo *in vitro*, 60% das linhagens testadas evidenciaram decréscimo na qualidade, com redução no potencial multiplicativo e 15% destes apresentaram gradativa redução na qualidade tecidual, como pronunciada deficiência de clorofilas nos haustórios. As demais linhagens não foram afetadas. Os autores observaram ainda, efeitos negativos relacionados ao prolongado período de cultivo *in vitro* no processo de aclimatização dos clones, bem como o desenvolvimento de anormalidades florais nas plantas adultas em condições de campo, sugerindo a senescência dos clones, desordens relacionadas à habituação aos reguladores de crescimento e biossíntese de poliaminas, as quais podem ter causado a degradação de tecidos, proliferação anormal de células e disrupturas epigenéticas.

Calos aclorofilados e habituados de *Beta vulgaris* L. cultivados em meio de cultura isento de reguladores de crescimento, também por um período de vinte anos, evidenciaram perda no potencial morfogênico, invaginações do núcleo, polinucleolação, vacuolação do nucléolo e paredes celulares incompletas (HÄSLER et al., 2003). Os autores observaram, ainda, que calos não habituados e também mantidos por vinte anos *in vitro*, mas na presença da associação dos reguladores de crescimento 2,4-D (0,45 μM) e BAP (0,44 μM), também começaram a evidenciar as mesmas características descritas para as células habituadas, sugerindo que, em longo prazo, a ausência de habituação aos reguladores de crescimento não impediu a progressão neoplásica para estas células.

Rubluo et al. (2002), no entanto, verificaram que brotos obtidos de explantes desenvolvidos em plântulas de *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada cultivados por sete anos em meio basal MS isento de reguladores de crescimento, quando transferidos para o mesmo meio acrescido de distintas fontes auxínicas, não perderam o potencial morfogênico à organogênese adventícia (gemas adventícias), embora esta tenha ocorrido pelo padrão indireto (calos), da mesma forma como não evidenciaram perda da estabilidade nuclear, conforme demonstrou seu grupo de pesquisas (PALOMINO et al., 1999). De acordo com Rubluo et al. (2002), a ausência de auxinas ao longo dos sete anos de manutenção *in vitro* no meio basal MS também ativou meristemas axilares pré-existent nesta cactácea.

Para células de origem animal, também há relatos de variações somaclonais em decorrência da manutenção prolongada *in vitro*, conforme descrito por Izadpanah et al. (2008). Os autores observaram que células-tronco mesenquimáticas derivadas de células-tronco da medula óssea e de células-tronco de tecido adiposo de humanos e de macacos rhesus, quando mantidas *in vitro* por períodos prolongados, possivelmente apresentam mudanças na cinética do ciclo celular, evidenciado pela alteração do número cromossômico e tornando-se potencialmente tumorais após transplantado *in vivo*.

Cabe salientar que uma peça chave da diferenciação e do desenvolvimento vegetal é o nível de metilação de DNA, que varia entre os tipos de células e tecidos (IKEGAMI et al., 2009) e é hereditável, sendo considerada como uma forma de ‘memória celular’ para o seu tecido de origem (OHGANE; YAGI; SHIOTA, 2008; KIM et al., 2010). Este processo pode ser um entrave ao sucesso do retorno ao estado pluripotente, limitando a obtenção de novas linhagens celulares, particularmente no que diz respeito à utilização de células envelhecidas, devido à ocorrência de incompleta reprogramação celular (KIM et al., 2010). Valledor et al. (2007) ressaltaram que o potencial embriogênico em culturas cultivadas por períodos prolongados pode ser decorrente da metilação do DNA, causando alterações epigenéticas.

Até o presente momento, não foram encontradas descrições relacionadas ao potencial morfogênico pela via organogênica e/ou embriogênica somática diretamente dos explantes em função da prolongada manutenção *in vitro*.

2.4.1.1 Habituação

Os reguladores de crescimento são amplamente requeridos no processo de indução da organogênese adventícia e da embriogênese somática (PHILLIPS, 2004), no entanto, pouco se sabe a respeito da manutenção de explantes por períodos prolongados de cultivo após prévia ou periódica exposição a esses compostos.

Até o presente momento, observa-se em cultivos *in vitro* por longos períodos, variável grau de autonomia (habituação) de determinados tecidos aos reguladores de crescimento. A habituação causada por prolongados períodos de contínuos subcultivos é a maior limitação aos sistemas de produção comercial, resultando em um progressivo declínio de vigor (AKIN-IDOWU et al., 2009). De fato, calos de fumo habituados para citocininas evidenciaram que, quanto maior o nível endógeno destas substâncias, menor a capacidade de desenvolvimento de gemas adventícias, parecendo haver uma correlação inversa para ambos os processos (KERBAUY, 1981).

Dentre as distintas classes de reguladores de crescimento relacionados à autonomia dos explantes mantidos *in vitro* por períodos prolongados, destacam-se as auxinas, as quais foram relacionadas ao fenômeno de “accostumance à l’auxine” ou habituação às auxinas (WHITE, 1951; GAUTHERET, 1955) e, da mesma forma, porém, com maior frequência, às citocininas (GAUTHERET, 1955; AKIN-IDOWU et al., 2009). Meins e Seldran (1994) verificaram a presença de reversibilidade entre células habituadas à citocinina (C^+) e células ‘citocinina exigentes’ (C^-) em folhas e na medula de tabaco cultivadas *in vitro* sob condições de longos períodos de cultivo (650 a 1260 dias).

A habituação foi definida como uma perda estável e hereditária ao requerimento dos fatores de crescimento pelas células de plantas cultivadas (MEINS, 1989). De acordo com o autor, a habituação às auxinas e citocininas resulta de modificações reversíveis na hereditariedade celular, conhecida como mudanças epigenéticas. Ao contrário das mutações, as alterações epigenéticas são reversíveis e direcionadas, ou seja, ocorrem em resposta a um indutor específico (DEMARLY, 1976; MEINS; SELDRAN, 1994) e implicam uma modificação no DNA, influenciando a expressão gênica (KIM et al., 2010). Sendo assim, pondera-se que as mutações são processos raros e promovem mudanças espontâneas e irreversíveis na constituição genética, ao passo que as variações fenotípicas geradas por mudanças epigenéticas são limitadas pela potencialidade genética do organismo e não transmissíveis por meiose (MEINS, 1989).

O estágio de desenvolvimento das células exerce forte influência em relação à tendência à habituação, visto que já foi evidenciado um gradiente de habituação à citocinina ao longo do caule de plantas de tabaco em explantes medulares (elevada próximo ao ápice e baixa próximo à base) (MEINS; LUTZ, 1979; TURGEON, 1982), bem como distintos tecidos também diferem quanto à competência para a habituação à citocinina (MEINS; LUTZ, 1979). Meins e Wenzler (1986) observaram ainda, que alterações hereditárias nas células ao requerimento às citocininas ocorrem durante o desenvolvimento normal da planta e a

mudança de um fenótipo ‘citocina exigente’ (C^-) para um fenótipo ‘citocinina autotrófico’ ou habituado (C^+) é a chave para um evento de transformação neoplástico.

Embora haja evidências de que a habituação resulta do acúmulo pelas células aos hormônios para os quais estão habituados, não se sabe verdadeiramente se este acúmulo ocorre pelo incremento na síntese, decréscimo na degradação ou pela combinação de ambos os fatores, por outro lado, parece haver um mecanismo de síntese/degradação de metabólitos caracterizando um processo de feedback (MEINS, 1989). Não obstante, Pischke et al. (2006) relataram que a habituação não implica um aumento na produção de citocininas, mas promovem um aumento à sensibilidade a estas por meio do incremento na síntese dos receptores citocínicos CRE1. Verificou-se, ainda, que elevados níveis de citocininas induzem células de *Arabidopsis* em suspensão ao processo de MCP, em decorrência a superexpressão do gene CRE1/AHK4 (VESCOVI et al., 2012). De fato, o aumento na produção de auxinas e citocininas em células habituadas não foi confirmado (KEVERS et al., 1999; GASPAR, 1999). Segundo Kevers et al. (1996), alterações na composição das membranas em decorrência à habituação também podem ser acompanhadas por modificações nas propriedades de muitos receptores, incluindo aqueles para hormônios de crescimento.

Gaspar et al. (2000, 2003) relataram que a habituação não causa apenas sensibilidade das células aos hormônios endógenos, mas também o acúmulo de metabólitos que poderiam substituir o controle das citocininas na divisão celular, alterações no metabolismo do etileno e poliaminas, um incremento no conteúdo de diacilglicerol, bem como um aumento nos níveis e conversão de inositol fosfatos. Segundo os autores, a independência das células às citocininas e auxinas, bem como à síntese de poliaminas durante o processo de habituação está integrada com as vias bioquímicas primárias, e implica tanto a ativação da via das pentose-fosfato em decorrência ao desvio do metabolismo do carbono e incremento da hidrólise de sacarose, como ao desvio de α -cetoglutarato do ciclo de Krebs para a via glutamato-prolina-poliaminas por meio de uma rota anapleurótica, e elevada atividade da via alternativa respiratória. De acordo com Le Dily et al. (1999), a autonomia das células às auxinas provém da via do ácido chiquímico em decorrência da ativação da glicólise na via das pentose-fosfato, ao passo que a autonomia das células às citocininas é decorrente da ribose difosfato, também originada da ativação da via das pentoses-fosfato.

As poliaminas são muito mais abundantes em plantas que os hormônios como giberelinas e citocininas, com ampla distribuição, sendo que quantidades milimolares são requeridas para induzir uma resposta biológica, como o controle da frequência de divisões celulares, a síntese de DNA, RNA e proteínas, com consequente controle no crescimento e no

desenvolvimento das plantas (GASPAR et al., 2003). Os autores destacam que, sem a habilidade para a síntese de poliaminas, seria impossível a sobrevivência das células. Não obstante, como a biossíntese de poliaminas e do etileno possuem como precursor comum o S-adenosil metionina (SAM), é possível que o estresse decorrente de sucessivas transferências de clones ao longo de anos de cultivo *in vitro* induza a uma substancial emissão de etileno e consequente indução à síntese e acúmulo de poliaminas, causando a degradação de tecidos, proliferação anormal de células e disrupturas epigenéticas (KONAN et al., 2010).

A presença de células aclorofiladas também já foi observada em calos habituados de *Beta vulgaris* L., em decorrência ao desvio do α -cetoglutarato para síntese de poliaminas, em detrimento à via metabólica Beale para a síntese de clorofilas (GASPAR et al., 1998, 1999). Calos aclorofilados e habituados desta mesma espécie, porém, cultivados em meio de cultura isento de reguladores de crescimento por um período de vinte anos, também evidenciaram perda no potencial morfogênico, invaginações do núcleo, polinucleolação, vacuolação do nucléolo e paredes celulares incompletas (HÄSLER et al., 2003).

Cabe salientar que, tanto os reguladores de crescimento naturais como os sintéticos, exercem controle na metilação no DNA no núcleo das células das plantas (VLASOVA et al., 1995), cujas alterações já foram reportadas como reversíveis durante o processo de habituação (HOLLIDAY, 1987). De fato, Amasino e John (1989) e Durante et al. (1989), evidenciaram uma variação estável ao requerimento de citocininas em decorrência ao processo de metilação do DNA. Portanto, o aumento na sensibilidade das células às citocininas pode ser decorrente da super-expressão de genes para os receptores CRE1 (LOIDL, 2003), implicando uma hipometilação do DNA para a expressão destes (PISCHKE et al., 2006). Já, a hipermetilação do DNA correspondente às regiões de heterocromatina e, portanto, silenciadas (LAMBÉ et al., 1997; FINNEGAN; KOVAK, 2000; VALLEDOR et al., 2007), promovem considerável queda no potencial organogênico (FRAGA; CAÑAL; RODRIGUEZ, 2002b) e embriogênico somático (SALAJOVA; SALAJ; KORMUTAK, 1999). De acordo com Ikegami et al. (2009), o nível de metilação de DNA varia entre os tipos de células e tecidos, e é uma peça chave na diferenciação e no desenvolvimento vegetal.

A metilação do DNA pode ser um entrave ao sucesso do retorno ao estado pluripotente, limitando a obtenção de novas linhagens celulares (KIM et al., 2010), particularmente naquelas habituadas pelo processo de metilação do DNA mediante aplicação exógena de fitormônios (HOLLIDAY, 1987; AMASINO; JOHN, 1989; DURANTE et al., 1989). Cabe salientar que a metilação do DNA é um processo hereditário e considerado como

uma forma de ‘memória celular’ para o seu tecido de origem (OHGANE; YAGI; SHIOTA, 2008; KIM et al., 2010).

Alterações na metilação do DNA podem ocorrer quando as plantas são expostas às condições de cultura de tecidos (PHILLIPS; KAEPLER; OLHOFT, 1994), particularmente quando ocorre o envelhecimento celular, caracterizando a irreversibilidade do processo de metilação e consequente comprometimento ao processo de retorno ao estágio pluripotente ou totipotente (desdiferenciação) e aquisição de novas competências morfogênicas (KIM et al., 2010).

Até o presente momento, não foram encontradas descrições relacionadas à habituação aos reguladores de crescimento para as vias organogênica e/ou embriogênica somática diretamente dos explantes.

2.4.1.2 Senescência

O processo de senescência compreende uma interação de reações geneticamente controladas e eventos estocásticos no curso do envelhecimento de um indivíduo (PENNEL; LAMB, 1997; BECK; SCHEIBE, 2003), e corresponde à fase final do ciclo de vida vegetativo e reprodutivo das plantas (PENNEL; LAMB, 1997; REAPE; MOLONY; McCABE, 2008). Portanto, a senescência é parte do processo de envelhecimento, mais especificamente, os eventos compreendidos nos estágios finais do desenvolvimento, ocorrendo também ao longo do tempo de vida das plantas perenes em nível tecidual ou de órgãos, beneficiando as plantas a exemplo do processo de remobilização de nutrientes durante a senescência foliar (MUNNÉ-BOSCH, 2007). Já, o envelhecimento em nível celular refere-se às alterações que ocorrem ao longo do tempo e que, normalmente, levam as células à perda das funções bioquímicas e fisiológicas, ao passo que a senescência é definida como uma forma de morte celular programada (MCP) e de ocorrência simultânea à senescência dos tecidos ou órgãos (DOORN; WOLTERING, 2004). Sendo assim, em plantas, a senescência poderia ser considerada como um processo fisiológico altamente regulado que permite a remobilização de nutrientes e culmina com a morte da célula, tecido/órgão e da planta em senescência, ao passo que o envelhecimento poderia ser considerado um acúmulo de alterações no desenvolvimento da célula, tecido e/ou órgão ou da planta, e responsável pelas lentas, progressivas e sequenciais alterações que as acompanham e que não necessariamente culminam com a morte da célula, tecido/órgão e da planta em processo de envelhecimento (MUNNÉ-BOSCH, 2007). O autor salientou, ainda, que o envelhecimento ou senescência de

uma célula, tecido ou órgão não implica o consequente envelhecimento e senescência da planta inteira.

O processo de senescência em espécies anuais já foi bem caracterizado, no entanto, restringindo-se às estruturas foliares (GAN, 2003; LIM et al., 2007). Além disso, pouco se sabe a respeito deste evento em espécies perenes (WATSON; RIHA, 2011) como a pupunheira, tanto nos sistemas *in vivo* (WATSON; RIHA, 2011; MUNNÉ-BOSH, 2007), como *in vitro* (KONAN et al., 2010). De acordo com Munné-Bosch (2007), em plantas perenes lenhosas, o tempo de vida é determinado pela amplitude de persistência dos meristemas e manutenção de sua capacidade de divisão e diferenciação em novos brotos e ramos ao longo dos anos, os quais estão diretamente relacionados às complexas interações de fatores externos e internos, que podem causar efeitos mutagênicos na mitose.

Em cultura de tecidos, o processo de senescência já foi relacionado aos estados de depreciação morfogênicos (MURASHIGE; NAKANO, 1965; KONAN et al., 2010), o qual pode ser irreversível e supostamente baseado em alterações genéticas (acúmulo de mutações somáticas) (MURASHIGE; NAKANO, 1965).

Os sintomas característicos da senescência são o declínio da taxa fotossintética e o incremento na taxa respiratória, a degradação de clorofilas e proteínas, o acúmulo de plastoglóbulos, a peroxidação de lipídeos (DHINDSA; MATAWE, 1981), o aumento no número de peroxissomos (PASTORI; Del RIO, 1997) e a síntese de poliaminas, as quais estão diretamente correlacionadas ao processo de senescência e ao estresse em plantas (KUMAR et al., 1997).

Cabe salientar que a peroxidação de lipídeos e aumento de radicais livres são considerados como os maiores contribuintes do processo de senescência (DHINDSA; MATAWE, 1981) por causarem severos danos celulares (CHANG; KAO, 1998). Além disso, em células animais, há relatos que nichos de células quiescentes hematopoiéticas são mantidos neste estado, dentre diversos fatores, por inibidores de proteínas quinases dependentes de ciclina (CDKs) e na presença de espécies reativas de oxigênio (EROS) (ARAI et al., 2004). Em *Arabidopsis thaliana*, este estado ocorre pela associação de proteínas retinoblastoma (RBR1) com proteínas do grupo polycomb, formando um multicomplexo de proteínas essenciais à formação de heterocromatina e silenciamento de genes, dentre os quais incluem aqueles relacionados ao ciclo celular (KÖHLER et al., 2003; MOSQUINA et al., 2004).

As células podem parar o processo de maturação em algum ponto do ciclo celular, tornando-se quiescentes, retornar à proliferação mediante estímulos adequados (POLLACK et

al., 1994) ou entrar em processo de morte celular mediante da atividade das redes de genes que controlam este processo, independente de encontrar-se ou não em estado de quiescência (SPINELLI et al., 2006).

Da mesma forma que a peroxidação de lipídeos é um processo inerente à senescência, particularmente daqueles constituintes das membranas plasmáticas, a proteólise é um importante mecanismo à remobilização de nitrogênio, sendo a principal ocorrência em proteínas constituintes dos cloroplastos (HÖERTENSTEINER; FELLER, 2002). De acordo com os autores, proteases cloroplastídicas são responsáveis pela remobilização de 75% do nitrogênio presente nas folhas, cuja maior quantidade desta substância provém da enzima RUBISCO e de outras enzimas fotossintéticas do estroma. A degradação de proteínas com conseqüente liberação de aminoácidos solúveis talvez seja o mais significativo processo metabólico que ocorre nas células durante o envelhecimento foliar (BUCHANAN-WOLLASTON, 1997; LECHINOSKI et al., 2007).

Em cultura de tecidos, a presença de numerosos idioblastos no citoplasma de células adjacentes a complexos celulares pró-embriogênicos (GRANER, 2009) e o acúmulo de reservas (amido e proteínas) tem sido frequentemente relacionado à aquisição de competência embriogênica (SANÉ et al., 2006), sendo que do amido provém importante recurso energético ao desenvolvimento de embriões somáticos (KANCHANAPOOM; DOMYOAS, 1999). No entanto, assim como observado para as proteínas, os ácidos nucleicos e as clorofilas, o amido foliar também é degradado durante o processo de senescência (ZAVALETA-MANCERA et al., 1999). Os autores ressaltaram que os proplastídeos, os amiloplastos e os cloroplastos, durante o processo de senescência foliar, desenvolvem-se em cromoplastos ou gerontoplastos, os quais são facilmente reconhecidos ultraestruturalmente tanto pelo reduzido sistema de tilacóides e pela presença de proeminentes plastoglóbulos, como pela retenção à capacidade de divisão e biossíntese. A presença de plastogóbulos associado aos tilacóides dos cloroplastos já foi reportada como um possível mecanismo antioxidativo, devido à sua participação da síntese e armazenamento de tocoferol (AUSTIN et al., 2006; VIDI et al., 2006).

O processo de MCP é evidenciado durante a senescência dos vegetais, e durante os processos de desenvolvimento (CAO et al., 2003; DOORN; WOLTERING, 2004; MUNNÉ-BOSCH, 2007; REAPE; MOLONY; McCABE, 2008). Jones (2001) propôs que o processo de senescência corresponde à integração dos eventos observados no processo de morte celular que envolve a hidrólise da parede celular (aerênquima radicular, p.e), a autólise (xilogênese, p.e) e o colapso do citoplasma. De acordo com o autor, o etileno, os patógenos, bem como as

auxinas e citocininas, representam os principais fatores que influenciam na decisão das células à morte celular e como este evento irá ocorrer. Salienta-se que, durante o processo de senescência, uma rigidificação da parede celular pode ser observada pela deposição de lignina, cujo evento também é mediado pelo AIA e pelo etileno e está diretamente relacionado à geração de radicais livres, a exemplo de radicais de peróxidos em resposta a diversos estímulos físicos e químicos (GASPAR et al., 2003).

Já foi reportado que a presença do etileno estimula a expressão de uma série de genes associados à senescência (PENNEL; LAMB, 1997), bem como já foram identificados diversos genes com sequências similares às proteases cisteína (caspases), as quais são induzidas precocemente no processo de senescência (LOHMAN et al., 1994), a exemplo da enzima com atividade caspase 1, presentes nos vacúolos líticos (HARA-NISHIMURA; HATSUGAI, 2011) e dos receptores quinases e fatores de transcrição nas vias de sinalização durante este processo fisiológico (ROBATZEK; SOMSSICH, 2002; YANG et al., 2001).

Sucessivas transferências de clones ao longo de anos de cultivo *in vitro* são fatores estressantes os quais, muito provavelmente, induzem substancial emissão de etileno e de poliaminas, visto que ambas as substâncias possuem como precursor comum o S-adenosil metionina (SAM) (KONAN et al., 2010). De acordo com os autores, o acúmulo de poliaminas causa a degradação de tecidos, proliferação anormal de células e disrupturas epigenéticas. A utilização de células envelhecidas em cultura de tecidos pode limitar a obtenção de novas linhagens celulares devido à ocorrência de incompleta reprogramação celular causada pela ‘memória celular residual’ (KIM et al., 2010), que consiste no processo hereditável do nível de metilação do DNA para o seu tecido de origem (OHGANE; YAGI; SHIOTA, 2008; KIM et al., 2010). Cabe salientar que um gradativo incremento na metilação do DNA já foi reportado durante o envelhecimento para espécies florestais *in vivo*, como *Castanea sativa*, cujas brotações de árvores maduras apresentaram maiores níveis de metilação em relação àqueles observados para brotações de árvores juvenis (HÁSBUN et al., 2005). Os autores observaram ainda que, independente da idade da árvore, as gemas dormentes evidenciaram os maiores níveis de metilação. De forma similar, em cultura de tecidos, o envelhecimento tem sido caracterizado pela incapacidade de responder aos estímulos externos em decorrência à hipermetilação do DNA (VALLEDOR et al., 2007), evento este também observado em células em vias de morte celular (LIPPMAN; MARTIENSSEN, 2004).

Cabe salientar que, em células animais, o fracasso da reprogramação celular em induzidas células-tronco pluripotentes (iPS) tem como consequência a senescência e a morte celular (PAPP; PLATH, 2011). Células animais submetidas ao cultivo *in vitro* também podem

ter a senescência deflagrada pelo excessivo número de divisões celulares, causando encurtamento dos telômeros e gerando quebra da fita dupla do DNA (WRIGHT; SHAY, 1992). Shippen e Knight (1998) relataram que, ao contrário das células animais, a formação da enzima telomerase, responsável pela manutenção dos telômeros, parece ser um evento mais comum nas células das plantas. De acordo com os autores, a citocinese previne o envelhecimento, em contrapartida, o inverso também é verdadeiro, onde o envelhecimento inibe a divisão celular. No entanto, em células de *Arabidopsis* constatou-se que disfunções nos telômeros resultaram em defeitos na morfogênese, bem como na função dos meristemas apicais com deficiência da enzima telomerase em determinadas linhagens desta espécie (RIHA et al., 2001). Munné-Bosch (2007) salientou que a elucidação do processo responsável pela manutenção dos telômeros em espécies perenes com ciclos de vida longos é uma tarefa desafiadora.

2.4.1.2.1 Caracterização do processo de morte celular programada

O conceito de morte celular programada ou MCP, do termo correspondente em inglês Programmed Cell Death (PCD), provém das plantas, e compreende um importante mecanismo à remoção de células à reciclagem de carbono, nitrogênio e fósforo (JONES, 2001). Tanto o processo de divisão celular como a MCP são fatores determinantes na morfogênese em plantas (PALAVAN-UNSAL; BUYUKTUNCER; TUFEKCI, 2005), sendo que este último ocorre na maioria das células e tecidos vegetais, envolvendo numerosos processos, incluindo a xilogênese, a formação do megásporo, o desenvolvimento embrionário, a degeneração de tecidos no fruto e na semente, o desenvolvimento do tecido e do órgão por meio da senescência e as respostas aos sinais ambientais (BEERS, 1997; KOUKALOVÁ et al., 1997) a exemplo do desenvolvimento de aerênquima em plantas submetidas ao estresse de oxigênio (BEERS, 1997; SCHUSSLER; LONGSTRETH, 2000; JONES, 2001) e à presença de patógenos (PENNELL; LAMB, 1997; GOVRIN; LEVINE, 2000; JONES, 2001).

De acordo com Reape, Molony e McCabe (2008), o processo de MCP ocorre durante os programas de desenvolvimento das plantas e varia desde o início do ciclo de vida das plantas, como a xilogênese, até o fim do ciclo (senescência). Munné-Bosh (2007) ressaltou, ainda, que a morte da célula, tecido e/ou órgão e da planta ocorre como consequência da senescência, um processo fisiológico altamente regulado que permite a remobilização de nutrientes.

Embora diferentes formas de MCP já tenham sido identificadas em plantas (SMETANA et al., 2012), não há ainda uma distinção absoluta entre seus tipos, tanto para as

células animais, como para as células vegetais (LIU; BASSHAM, 2012), bem como determinadas características deste evento fisiológico ainda não estão completamente correlacionadas quando comparadas entre ambos os grupos.

Doorn (2011) sugere a existência de duas classes de morte celular em plantas, uma ‘autolítica’, caracterizado pelo rápido desaparecimento do citoplasma e com ocorrência durante determinados processos de desenvolvimento e estresse abióticos, bem como em processos de senescência, e outra classe ‘não-autolítica’, cujo desaparecimento do citoplasma é um processo mais lento e em respostas hipersensíveis nas interações planta-patógenos. O autor sugere ainda que, a primeira classe (autolítica), poderia ser comparada com o processo de autofagia que ocorre em células de animais, em decorrência ao aparecimento e fusão de pequenos vacúolos no citoplasma em um grande e único vacúolo que sofre ruptura e pelo desaparecimento de número considerável de organelas, particularmente de plastídeos, ribossomos, membranas, retículo endoplasmático e de peroxisomos. Já, a segunda classe (não-autolítica), teria como processo correspondente a necrose em células animais, com ou sem ruptura do tonoplasto.

A autofagia corresponde à degradação de macromoléculas, via de reciclagem de materiais indesejados ou de células danificadas em situações de estresse ou durante processos específicos de desenvolvimento (LIU; BASSHAM, 2012), podendo ser considerada uma das maiores (se não a maior) via para a morte celular em plantas. Entretanto, no caso de autofagia ou de outro tipo de MCP que possa existir, é necessária uma profunda avaliação na terminologia atualmente utilizada (SCOTT; LOGAN, 2008). De acordo com Liu e Bassham (2012), este mecanismo tem sido bem conservado em plantas e evidenciado em várias respostas ao estresse, defesa aos patógenos e durante o processo de senescência, cujos principais eventos observados na morte celular por autofagia são a degeneração de organelas dentro do vacúolo, por meio da macrofagia, cujo material é transportado para o interior desta organela por meio de vesículas constituídas por duas membranas (autofagossomo), as quais, após fusão da membrana externa com o tonoplasto, são internalizadas (agora com uma única membrana), hidrolizadas pelas enzimas do vacúolo, que aumenta seu volume e eventualmente sofre processo de lise. Os autores ressaltaram ainda que, estas características são similares àquelas observadas durante o processo de morte celular autofágica em células animais, bem como a condensação da cromatina e a fragmentação do núcleo e quebra do DNA. De acordo com Beers (1997) tanto a autofagia como a autólise parecem governar a eliminação de células durante o suicídio celular em plantas e que, em alguns casos, a MCP parece depender da comunicação entre as células vizinhas, tais como a morte do tubo polínico por

incompatibilidade ao pólen, durante a degeneração do suspensor e na morte celular das sinérgides em algumas espécies. O autor descreveu, quatro possíveis destinos para as células de plantas em crescimento e desenvolvimento, durante o processo de MCP: 1- Completo desaparecimento das células, inclusive das paredes celulares (p.e, durante a formação do aerênquima e desenvolvimento de folhas fenestradas); 2- Esmagamento, retalhamento ou incremento no número de células mortas pela expansão de suas células vizinhas, como é o caso do desenvolvimento de megásporos; 3- Persistência das paredes celulares com ou sem degradação dos componentes do protoplasto morto (p.e., maturação dos elementos traqueais); e 4- Senescência posterior à abscisão de órgãos ou tecidos constituídos por células mortas. Cabe salientar que, como o processo da apoptose implica na formação de ‘corpos apoptóticos’ (FINK; COOKSON, 2005; DOORN, 2011) e este importante passo não ocorre em plantas, tem sido altamente ilógico o uso deste termo para descrever este processo em vegetais (SCOTT; LOGAN, 2008), justificando o emprego da terminologia ‘morte celular programada (MCP)’ neste trabalho, em substituição ao termo ‘apoptose’.

Conforme supracitado, tanto as células animais como as células vegetais em vias de morte celular, apresentam característica fragmentação do DNA (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972; WYLLIE; KERR; CURRIE, 1980; PENNELL; LAMB, 1997; HOEBERICHTS; WOLTERING, 2002; DOMÍNGUEZ; MORENO; CEJUDO, 2004; PARK et al., 2007; VUOSKU et al., 2010; LIU; BASSHAM, 2012). No cultivo *in vivo* de espécies vegetais, a fragmentação do DNA foi detectada em raízes sob atuação do herbicida isopropyl carbanilate (IPC) (SHUN-BIN; LING; YUN-CHUN, 2000), em resposta a estresses ambientais (BEERS, 1997), durante a senescência de folhas de *Eucommia ulmoides* (CAO et al., 2003) em respostas de hipersensibilidade a patógenos em *Hevea brasiliensis* (KOOP et al., 2009), em plantas de *Arabidopsis* sob a ação de UV e H₂O₂ (GALLOIS, et al., 2007), durante a embriogênese (BEERS, 1997; BOZHKO, 2005; PALAVAN-UNSAL; BUYUKTUNCER; TUFEKCI, 2005) e eliminação de embriões zigóticos em *Pinus sylvestris* (FILONOVA et al., 2002), durante a microsporogênese em uma *Brachiaria* (FUZINATTO; PAGLIARINI; VALLE, 2007), na diferenciação terminal de células em anteras e xilema, suspensor e senescência de folhas e pétalas (BEERS, 1997) dentre outros. Já, em relação ao cultivo *in vitro*, a caracterização do processo de MCP em nível de organismo como um todo de culturas de espécies estabelecidas *in vitro* por longos períodos ainda não foi estabelecida, restringindo-se a eventos morfogênicos específicos.

A fragmentação do DNA no processo de MCP foi observada na camada de aleurona de sementes de *Zea mays* (DOMÍNGUEZ; MORENO; CEJUDO, 2004) e no endosperma de

sementes de *Euphorbia lagascae* durante o processo germinativo (EKLUND; EDQVIST, 2003), para células de meristemóides originados em calos de explantes hipocotiledonares de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* cultivados em meio de cultura para indução organogênica (FERNANDO, 2005), durante a degradação de massas pró-embriogênicas no processo de desenvolvimento de embriões somáticos, bem como na degeneração de seus suspensores (FILONOVA et al., 2000) e em suspensões celulares de linhagem BY-2 de tabaco submetidas a baixas temperaturas (KOUKALOVÁ et al., 1997).

Também são eventos comumente observados nas células vegetais em processo de MCP: retração da membrana plasmática (DOMÍNGUEZ; MORENO; CEJUDO, 2004; SCOTT; LOGAN, 2008; ALMEIDA et al., 2012), ruptura e degradação da membrana plasmática (FILONOVA et al., 2000, 2002), condensação do núcleo (cromatina) (McCABE; LEAVER, 2000; ALMEIDA et al., 2012), ruptura e desintegração nuclear (OBARA; KURIYAMA; FUKUDA, 2001; FILONOVA et al., 2002; DOMÍNGUEZ; MORENO; CEJUDO, 2004).

Sabe-se que, o processo de MCP em plantas, a exemplo da xilogênese, implica na deposição de substâncias altamente complexas como lignina e suberina, seguida pelo processo de lise do protoplasto por meio de enzimas hidrolíticas liberadas pela ruptura do tonoplasto (JONES, 2001). A autólise com implicação da atividade enzimática do vacúolo tem sido bem observada em tecidos reprodutivos como em suspensor de embriões zigóticos de certas espécies (NAGL, 1976; GÄRTNER; NAGL, 1980), em ovários não polinizados de *Pisum sativum* L. (CARRASCO; CARBONELL, 1988), no tapete de *Lilium* (REZNICKOVA; DICKINSON, 1982) e na eliminação de embriões zigóticos em *Pinus sylvestris* durante o evento de poliembrionia (FILONOVA et al., 2002).

Neste contexto, é muito provável que, paralelo às modificações no protoplasto, alterações na deposição de parede secundária (suberização e/ou lignificação) e de ácidos fenólicos durante a senescência de plantas cultivadas tanto *in vivo* como *in vitro*, sejam processos característicos, senão os mais evidentes em análises histológicas e/ou ultraestruturais, conforme relataram Lima et al. (2001) e Alves de Brito et al. (2003). A formação de lignina em caules e folhas mais velhos de *Brachiaria brizantha* e *B. humidicola* pode ser identificada pela condensação de ácidos fenólicos, unidades precursoras deste composto (ALVES DE BRITO et al., 2003). De acordo com Gaspar et al. (2003) a rigidificação da parede celular pela deposição de lignina é mediada pelo AIA e pelo etileno, cujo evento está diretamente relacionado à geração de radicais livres, a exemplo de radicais de peróxidos em resposta a diversos estímulos físicos e químicos. O acúmulo de substâncias

tóxicas, como compostos fenólicos, fitoalexinas e deposição de calose também pode ser observado em certas condições de morte celular em vegetais, a exemplo da infecção por patógenos (FELLBRICH et al., 2002).

Embora os ácidos fenólicos sejam precursores da lignina (ALVES DE BRITO et al., 2003), muita cautela deve ser utilizada para a detecção e correlação destes compostos com o processo de senescência, visto que intenso processo oxidativo epidérmico já foi observado para *B. gasipaes* em primórdios foliares (ALMEIDA, ALMEIDA, 2006) e na região proximal da base caulinar de explantes desta espécie (GRANER, 2009), cujos tecidos parenquimáticos subepidérmicos manifestaram intensa competência à embriogênese somática direta.

Estudos relacionados ao papel dos compostos fenólicos exógenos evidenciaram que estes estão relacionados não apenas ao processo de dediferenciação celular (ALEMANNO et al., 2003) mas aos primeiros estádios de diferenciação dos embriões somáticos (REIS et al., 2008). Almeida et al. (2012) verificaram que a presença de polifenóis esteve diretamente relacionada à indução de embriões somáticos de origem unicelular e multicelular em gemas aventícias e ápices caulinares de pupunheiras, respectivamente. Muito provavelmente, os polifenóis promovem um incremento nos níveis endógenos auxínicos devido a sua atuação como inibidor do AIA oxidase (WILSON; STADEN, 1990; HAUSMAN, 1993), bem como devido à modulação dos níveis endógenos do ácido indolacético (AIA) (SCHNABLOVÁ et al., 2006; REIS et al., 2008).

A retração da membrana plasmática, conforme já mencionado, é um evento comumente observado durante o processo de MCP em plantas (PENNEL; LAMB, 1997; FILONOVA et al., 2000; DOMÍNGUEZ; MORENO; CEJUDO, 2004; SHISHKOVA; DUBROVSKY, 2005; SCOTT; LOGAN, 2008; ALMEIDA et al., 2012), a exemplo do observado durante a degradação de massas pró-embriogênicas no processo de desenvolvimento de embriões somáticos, bem como na degeneração de seus suspensores (PENNEL; LAMB, 1997; FILONOVA et al., 2000) e na camada de aleurona de sementes de *Triticum aestivum* (DOMÍNGUEZ; MORENO; CEJUDO, 2004), particularmente com a utilização de análises ultraestruturais (FILONOVA et al., 2000; DOMÍNGUEZ; MORENO; CEJUDO, 2004; SCOTT; LOGAN, 2008).

Após a retração da membrana plasmática, pode ser observado o colapso do vacúolo e a ruptura do tonoplasto, seguido pela degradação da cromatina (JONES, 2001). Posteriormente, a membrana plasmática se rompe e é degradada num evento posterior à autólise, após a digestão da maioria dos componentes celulares, inclusive do núcleo (FILONOVA et al., 2000). Cabe salientar que estes últimos autores observaram um

entumescimento do vacúolo em vez de seu colapso, cuja expansão promoveu o confinamento do citoplasma adjacente à parede celular. Mais recentemente, Hara-Nishimura e Hatsugai (2011) descreveram que as plantas podem apresentar tanto o colapso, como a ausência deste durante o processo de MCP, no entanto, o colapso do vacúolo lítico ocorre em condições de morte celular desencadeada pelo desenvolvimento vegetal, incluindo a senescência, ao passo que a ausência do colapso desta organela é característica de morte celular desencadeada por respostas hipersensíveis a agentes patogênicos. Liu e Bassham (2012) ressaltaram, ainda que, eventualmente, o processo de lise desta organela ocorre após o incremento em seu volume e hidrólise de autofagossomos contendo organelas citoplasmáticas em várias respostas ao estresse, defesa aos patógenos e durante o processo de senescência.

Um decréscimo no número de cloroplastos também já foi observado durante o processo de MCP induzida por patógenos (ARDUIN; KRAUS, 2001) e no desenvolvimento de folhas fenestradas (WRIGHT; DOORN; GUNAWARDENA, 2009). Além disso, os autores evidenciaram que a disposição destas organelas durante o processo de MCP ocorre na periferia do núcleo, sugerindo a ocorrência de competição por alguma substância proveniente do núcleo, retardando sua degradação. A degradação dos cloroplastos parece ocorrer bem antes do colapso do vacúolo (JONES, 2001), que se dispõe em posição central na célula (FILONOVA et al., 2000). Entretanto, Obara, Kuriyama e Fukuda (2001) verificaram que, durante a xilogênese, a degradação completa dos cloroplastos e mitocôndrias ocorre posteriormente à ruptura do tonoplasto e degradação dos nucleóides destas organelas (DNA cloroplastídico e mitocondrial).

Embora Konan et al. (2010) não tenham realizado análises histológicas ou ultraestruturais nos embriões somáticos de diversas linhagens de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) originados em culturas calogênicas e submetidos a longos períodos de manutenção *in vitro*, observaram hipertrofia do tecido haustorial e aparente deficiência de clorofila. De acordo com os autores, estas características correspondem às típicas descrições para vitrificação decorrentes de estresses não traumáticos como excesso de água, citocininas, determinados íons, etc., bem como em consequência de desordens de certas vias metabólicas (açúcar, nitrogênio e etileno).

Tanto nas células animais como nas células vegetais durante o processo de MCP, tem sido evidenciado que o núcleo sofre ruptura e desintegração (WYLLIE; KERR; CURRIE, 1980; WYLLIE, 1985; ARENDS; MORRIS; WYLLIE, 1990; FILONOVA et al., 2001; DOMÍNGUEZ; MORENO; CEJUDO, 2004; ZIEGLER; GROSCURTH, 2004), embora Staunton e Gaffney (1998) e Campos et al. (2004) tenham relatado que células animais não

sofrem ruptura nuclear durante o processo apoptótico. Em células vegetais, tem sido observado ainda que, a degradação do núcleo ocorre paralelamente à degradação dos demais componentes celulares (FILONOVA et al., 2000, 2002), salientando que este mesmo apresenta forma esférica após a ruptura do tonoplasto, devido a ausência de pressão promovida por esta organela contra a membrana plasmática (OBARA; KURIYAMA; FUKUDA, 2001), embora haja relatos que o núcleo das células em MCP adquire aspecto caracteristicamente lobado (FILONOVA et al., 2000).

Durante o processo de MCP em plantas, também pode ser observada a degeneração da parede celular, a exemplo do desenvolvimento de aerênquimas radiculares em situação de hipóxia (BEERS, 1997; GUNAWARDENA et al., 2001; VUOSKU, 2010) ou ainda permanecer intacta, como no processo de xilogênese (GUNAWARDENA et al., 2001; PALAVAN-UNSAL; BUYUKTUNCER; TUFEKCI, 2005). Em cultura de tecidos, Häsler et al. (2003) verificaram que calos aclorofilados de *Beta vulgaris* L habituados ou não aos reguladores de crescimento e cultivados por um período de vinte anos em meio de cultura isento de desses compostos ou na presença associada de 2,4-D (0,45 μ M) e BAP (0,44 μ M), respectivamente, evidenciaram, além da presença de paredes celulares incompletas, a perda da capacidade morfogênética, invaginações do núcleo, polinucleolação e vacuolação do nucléolo (HÄSLER et al., 2003).

Observa-se, portanto, que a caracterização do processo de MCP é altamente complexa e diversificada. Além disso, Danon et al. (2000) relataram que pouco se sabe a respeito da ‘apoptose’ em plantas, inclusive a respeito das mudanças morfológicas. Os autores, fundamentados em ampla revisão de literatura, relataram haver muitas evidências para as similaridades deste evento fisiológico, tanto em plantas, como em animais, a exemplo da condensação e desintegração da cromatina em respostas endógenas ou ambientais, entretanto, ressaltaram que tanto a retração citoplasmática, como a formação de corpos apoptóticos não têm sido universalmente identificados.

A clivagem do DNA genômico durante a apoptose pode produzir fragmentos de DNA com baixo peso molecular DNA (mono e oligonucleosomos), os quais podem ser identificados por meio da marcação da extremidade livre 3'-OH com nucleotídeos modificados em uma reação enzimática (GORCZYCA; GONG; DARZYNKIEWICZ, 1993; SGONC et al., 1994). Neste contexto, a reação TUNEL (Terminal deoxynucleotidyltransferase dUTP nick end labeling) é amplamente utilizada para detectar a fragmentação do DNA durante o processo de MCP (CAO et al., 2003; PALAVAN-UNSAL; BUYUKTUNCER; TUFEKCI, 2005; VUOSKU, 2010) e revela-se como um forte marcador

para identificação deste processo, permitindo a distinção com o processo de morte celular por necrose (JONES, 2001).

No entanto, como a fragmentação no DNA pode ocorrer em estádios mais avançados na necrose e conseqüente indução de resultados falso-positivos (COLLINS et al., 1992; GOLD, 1994), toda alteração morfológica das células deve ser cuidadosamente examinada durante este evento fisiológico (REAPE; MOLONY; McCABE, 2008), considerando, principalmente, que durante o processo de morte celular por necrose não ocorre a condensação do núcleo (McCABE; LEAVER, 2000).

2.4.1.2.2 Morte celular programada vs necrose

A necrose em células animais é um processo comumente pesquisado (ANAZETTI; MELO, 2007; RODRIGUES, 2008; SEABRA, 2008; FRANCO, 2009) e caracteriza-se pela perda da integridade da membrana plasmática, floculação da cromatina (condensação grosseira), inchaço seguido de lise celular com extravasamento do conteúdo citoplasmático e desintegração de organelas (ANAZETTI; MELO, 2007). Em plantas, no entanto, a abordagem para este evento fisiológico tem sido menos expressiva (McCABE; LEAVER, 2000; REAPE; MOLONY; McCABE, 2008), sendo que a desintegração da membrana plasmática tem sido observada tanto durante a MCP (FILONOVA et al., 2000), como durante o processo necrótico em células vegetais (VUOSKU, 2010). De acordo com Doorn (2011), em plantas, o processo de morte celular cujo desaparecimento do citoplasma é lento e ocorre em respostas hipersensíveis nas interações planta-patógenos (classe de morte celular não-autolítica), teria como correspondente o processo de necrose em células animais, com ou sem ruptura do tonoplasto. Já, a classe de morte celular 'autolítica', poderia ser comparada com o processo de autofagia que ocorre em células de animais, em decorrência do aparecimento e fusão de pequenos vacúolos no citoplasma em um grande e único vacúolo que sofre ruptura e pelo desaparecimento de considerável número de organelas, particularmente de plastídeos, ribossomos, membranas, retículo endoplasmático e peroxisomos; caracterizado pelo rápido desaparecimento do citoplasma e com ocorrência durante determinados processos de desenvolvimento e estresse abióticos, bem como em processos de senescência.

A necrose tem sido descrita como uma forma incontrolável de morte celular e frequentemente em decorrência ao estresse celular, principalmente em resposta a altas temperaturas, na qual a célula vegetal é incapaz de ativar vias de morte celular, devido a danos imediatos no DNA e no potencial de membrana mitocondrial (REAPE; MOLONY; McCABE, 2008). De acordo com os autores, a condensação do protoplasma e a retração

citoplasmática são eventos característicos das células vegetais em vias de morte celular por necrose.

De acordo com Pennel e Lamb (1997), enquanto o processo de MCP ocorre durante o desenvolvimento e é regulada por um mecanismo complexo, a necrose normalmente não está associada ao desenvolvimento, não requer a atividade de proteases e nucleases relacionadas ao controle de desmontagem da célula, não opera através de vias de transdução de sinal gene-dependentes e não requer Ca^{2+} ou alterações na fosforilação de proteínas. De fato, a indução de estresses, como elevadas temperaturas, podem evocar danos mais imediatos ao DNA, do que pela ativação de nucleases para evocar MCP, portanto, o nível de estresse determina o tipo de morte celular que ocorrerá (REAPE; MOLONY; McCABE, 2008). Para Breusegem e Dat (2006) a morte celular por necrose é um processo passivo, e ocorre em respostas aos níveis excessivos de ROS, matando a célula por danos imediatos como modificações destrutivas em proteínas, oxidação de purinas e quebra mutagênica na cadeia de DNA. Em relação à MCP, os autores ressaltaram que trata-se de um processo ativo e também ocorre em resposta a presença de ROS, porém, somente quando o acúmulo destas é insuficiente para matar imediatamente a célula, evidenciando o importante papel do balanço redox nas células.

Dentre os dois processos (MCP e necrose), somente a MCP está sob controle genético (OSBORNE; SCHWARTZ, 1994; PENNEL; LAMB, 1997; BECK; SCHEIBE, 2003). Breusegem e Dat (2006) propuseram, então, que o termo ‘necrose’ fosse empregado para descrever morte celular acidental causada por fatores extrínsecos, com um acúmulo fitotóxico de moléculas específicas após um evento traumático estressante, sendo um evento passivo, indiscriminado e frequentemente seguido por injúria irreversível. Não obstante, os autores ressaltaram que, embora ambos os eventos de morte celular sejam bem definidos em animais, tem sido observada para as plantas uma sobreposição de características fenotípicas e moleculares da necrose e da MCP, o que dificulta sobremaneira a discriminação entre estes dois eventos, a exemplo do processo de MCP que ocorre durante o desenvolvimento e em condições de estresse abiótico. Isto corrobora os relatos de Reape, Molony e McCabe (2008), em que a morte celular por necrose em células vegetais não necessariamente é induzida por injúrias ou estresse, como observado em células animais (ANAZETTI; MELO, 2007), visto que este evento fisiológico já foi evidenciado durante a ontogenia de embriões de *Pinus sylvestris* L., tanto na degeneração do suspensor, como nas células da região circundante dos embriões em estágio inicial de desenvolvimento no megagametófito (VUOSKU, 2010).

De acordo com Pennell e Lamb (1997), além da separação da membrana plasmática da parede celular e do encolhimento e condensação do protoplasto, a observação de pequenos

fragmentos de DNA implica que estas células morreram por MCP e não por necrose, pois este último é um processo que envolve intumescimento (inchaço) celular (COHEN, 1993) e da mitocôndria, designada por morfologia de transição mitocondrial (SCOTT; LOGAN, 2008; PETRUSSA et al., 2009). Scott e Logan (2008) relataram que o inchaço da mitocôndria é um prévio e necessário componente do processo de MCP em plantas, embora Bok, Ishida e Griffiths (2003) tenham evidenciado pronunciado inchaço desta organela durante o processo de necrose em células de *Neurospora*, em decorrência da inserção do plasmídeo kalilo no DNA mitocondrial.

Embora Jones (2001) tenha salientado que o colapso do vacúolo é um evento exclusivo do processo de MCP (JONES, 2001), Doorn (2011) sugere que a classe de morte celular não-autolítica, cujo desaparecimento do citoplasma é um processo mais lento, que ocorre em respostas hipersensíveis nas interações planta-patógenos e que teria como processo correspondente a necrose em células animais, pode ou não apresentar a ruptura do tonoplasto.

O colapso do vacúolo pode ser observado no processo de MCP durante o desenvolvimento do vegetal, incluindo a senescência (HARA-NISHIMURA; HATSUGAI, 2011) e, segundo Jones (2001), este evento é controlado pela célula, que atua como uma grande suicida em decorrência ao influxo de cálcio e ao efluxo deste elemento na organela, seguido pela degradação da cromatina.

A condensação do núcleo (cromatina) também é característica de células em vias de MCP, ao passo que este evento não pode ser observado na morte celular por necrose (McCABE; LEAVER, 2000). No entanto, da mesma forma que observado para o processo de morte celular programada, a necrose também implica a quebra do DNA, porém, este evento é proporcionalmente inferior em relação ao primeiro processo, sem a formação de fragmentos (PENNELL; LAMB, 1997), ocorrendo apenas em estádios mais avançados da necrose (COLLINS et al., 1992; GOLD, 1994), de forma difusa e ao acaso (PALAVAN-UNSAL; BUYUKTUNCER; TUFEKCI, 2005).

A degradação da cromatina revelada pela reação TUNEL (Terminal deoxynucleotidyltransferase dUTP nick end labeling) durante o processo de MCP permite a distinção do processo de necrose (JONES, 2001), no entanto, conforme já mencionado, a fragmentação no DNA pode ocorrer em estádios mais avançados na necrose e conseqüente indução de resultados falso-positivos (COLLINS et al., 1992; GOLD, 1994), evidenciando a necessidade de um exame cuidadoso para toda alteração morfológica das células durante este evento fisiológico (REAPE; MOLONY; McCABE, 2008).

Cabe salientar que, em células animais, estudos demonstraram que a morte celular apoptótica pode sofrer uma transição para a necrótica durante uma situação de estresse oxidativo (apoptose tardia) (LABAT-MOLEUR et al., 1998; ANAZETTI; MELO, 2007). Segundo os autores, durante este processo de morte celular, a energia é afetada, a célula incha e sofre “necrose secundária”.

A necrose secundária ocorre quando há redução dos níveis de glutathione GSH (Glutathione) (um dos componentes do sistema antioxidante das células), tanto no citoplasma, como nas mitocôndrias, ao passo que a redução desta substância apenas no citoplasma, caracteriza o processo de MCP por apoptose em animais (SLATER et al., 1995).

Devido à similaridade e sobreposição dos diversos eventos durante a MCP e a morte celular por necrose em células vegetais, parece que os principais caracteres distintos entre ambos os eventos sejam a intensa condensação nuclear, a fragmentação precoce e em grande extensão do DNA, além da ausência de intumescimento da célula observada durante o processo de MCP, uma vez que, no processo necrótico não é evidenciada condensação do núcleo, ocorrendo apenas discreta fragmentação do DNA e em estádios mais avançados, neste processo, verifica-se o intumescimento (inchaço) celular.

2.4.1.2.3 Organelas vs vias de sinalização da morte celular programada

Embora haja uma extensa literatura a respeito do papel central da mitocôndria atuando tanto como um sensor e iniciador de processos bioquímicos no controle da destruição celular (WOLTERING et al., 2002; SCOTT; LOGAN, 2008), pouco se sabe sobre este processo em plantas, cujas alterações morfológicas nestas organelas caracteriza-se, conforme supracitado, pela sua aparência inchada (morfologia de transição mitocondrial), sendo um prévio e necessário componente do processo de morte celular em plantas (SCOTT; LOGAN, 2008). Além disso, os cloroplastos exercem importante função na regulação da MCP (ZAPATA et al., 2005; ASADA, 2006), principalmente por serem organelas geradoras de EROS (Espécies Reativas de Oxigênio) (ZAPATA et al., 2005; ASADA, 2006; BREUSEGEM; DAT, 2006; SCOTT; LOGAN, 2008), da mesma forma que o observado para as mitocôndrias (VIROLAINEN; BLOKHINA; FAGERSTEDT, 2002; BREUSEGEM; DAT, 2006). De acordo com Gadjev, Stone e Gechev (2008), as EROS não apenas são produtos tóxicos do metabolismo aeróbico e rigorosamente controladas em nível celular, mas também atuam como agentes sinalizadores em muitos processos celulares, como a modulação do processo de morte celular em plantas.

Doyle e McCabe (2007) observaram que culturas de suspensões celulares de *Arabidopsis thaliana* submetidas ao calor induziram mais MCP durante o crescimento no escuro, que no crescimento das culturas na presença de luz. Os autores também verificaram que o tratamento com antioxidantes durante o crescimento na presença de luz eleva a indução da MCP em comparação ao observado nas culturas crescidas no escuro, sugerindo o envolvimento do cloroplasto na produção de espécies reativas de oxigênio na regulação da MCP. Konan et al. (2010), observaram hipertrofia do tecido haustorial e aparente deficiência de clorofila em embriões somáticos de diversas linhagens de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) originados em culturas calogênicas e submetidos a longos períodos de manutenção *in vitro*. De acordo com os autores, estas características correspondem às típicas descrições para vitrificação decorrentes de estresses não traumáticos como excesso de água, citocininas, etc., bem como em consequência a desordens de certas vias metabólicas (açúcar, nitrogênio e etileno).

As células animais apresentam dois mecanismos de defesa importantes em situações de estresse oxidativo: um tampão redutor tiol e um sistema enzimático (MATÉS, 2000; CURTIN; DONOVAN; COTTER, 2002). De acordo com os autores, a glutathiona (GSH) e a tiorredoxina (TRX) correspondem ao tampão redutor tiol, contendo pequenos peptídeos com moléculas sulfidríla redox-ativas, ao passo que as enzimas dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPX) correspondem ao sistema enzimático. Dentre estes compostos, destaca-se a glutathiona (GSH), que é observada em abundância, tanto em células animais, como em células vegetais (MEISTER; ANDERSON, 1984; SIES, 1999) e está relacionada ao processo de morte celular por apoptose, em decorrência do desbalanço no sistema redox causado por sua redução em nível citoplasmático e à sua intolerância na capacidade redox tamponante para os agentes oxidantes (SLATER et al., 1995), bem como ao peróxido de hidrogênio e aos ânions superóxidos (espécies reativas de oxigênio) (TORRES, 2010). Breusegem e Dat (2006) ressaltaram a importância do balanço redox nas células, visto que discretos incrementos nos níveis fitotóxicos de EROS, quando insuficientes para matar imediatamente a célula (necrose), iniciam uma cascata de transdução de sinais envolvendo interferências com outros fitormônios, ácido salicílico, jasmonatos, etileno e óxido nítrico, os quais podem amplificar ou reduzir a subsequente resposta ou canalizar as cascatas através de sensores e alvos transdutores mais específicos para a EROS-dependente e MCP relacionada à expressão gênica. Além disso, os autores ressaltaram que cascatas de fosforilação coordenadas por MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases), outras modificações

regulatórias pós-transducionais, como uma oxidação de proteínas e nitrosilação podem estar envolvidas na via de morte celular EROS-dependente.

Além da formação de espécies reativas de oxigênio (EROS), sob condições de estresse, as mitocôndrias percebem mudanças metabólicas a exemplo do pH, do status energético e de Ca^{2+} citoplasmático, promovendo a abertura da permeabilidade transitória do poro mitocondrial (PTP), reportado como uma resposta a danos celulares (VIROLAINEN; BLOKHINA; FAGERSTEDT, 2002). Os autores verificaram que raízes de trigo (*Triticum aestivum* L.) sob condições de anoxia sozinha ou associada à falta de Ca^{2+} , ocorre a liberação do citocromo c das mitocôndrias, porém, quando testado o efeito de altas concentrações de Ca^{2+} isoladamente, observaram pronunciado inchaço desta organela, o qual foi confirmado por meio de análises em microscopia eletrônica de transmissão.

O Ca^{2+} é um cofator de várias enzimas envolvidas no processo de morte celular, a exemplo das nucleases, caspases, calmodulinas, dentre outras (BLUMWALD; AHARON; LAM, 1998), cujo nível intracelular aumenta durante o estresse oxidativo (LECOURIEUX et al., 2000) e de acordo com Krishnamurthy et al. (2000), da mesma forma como observado em células animais, o incremento no nível citosólico de cálcio nas células das plantas em vias de morte, tem sido reportado como um importante evento sinalizador, muito provavelmente devido à ativação de endonucleases. Petrusa et al. (2009) observaram uma correlação entre a atividade mitocondrial e a manifestação da MCP durante o desenvolvimento de embriões somáticos, sugerindo que a atividade de canais K^+ ATP poderia induzir a entrada de K^+ na matriz, seguido por um aumento no volume desta organela e a liberação do citocromo c durante a proliferação de massas embriogênicas, ao passo que a via oxidase alternativa, atuando como fatores anti-apoptóticos, poderia neutralizar parcialmente os eventos de MCP durante a maturação dos embriões somáticos de *Abies alba*.

O processo de MCP em plantas é ativado por proteases com atividade de caspases, entretanto, não foi encontrado nenhum gene homólogo às caspases evidenciadas em células animais (WOLTERING et al., 2002; GREENBERG; YAO, 2004; GALLOIS et al., 2007; BONNEAU et al., 2008), as quais estão envolvidas no processo de apoptose (TSCHOPP et al., 1998). Pelo menos seis proteínas com atividade de caspases em vegetais já foram identificadas (WOLTERING et al., 2002; GREENBERG; YAO, 2004; GALLOIS et al., 2007; PALAVAN-UNSAL; ARISAN, 2011), as quais provavelmente mediam eventos envolvidos na morte celular geneticamente programada (WOLTERING; BENT; HOEBERICHTS, 2002). De acordo com Hara-Nishimura e Hatsugai (2011), enzimas com atividade caspase 1 estão presentes nos vacúolos líticos, que sofrem colapso durante o

processo de MCP desencadeada pelo desenvolvimento vegetal e pelo processo de senescência, ao passo que enzimas com atividade caspase 3 estão envolvidas na MCP desencadeada por respostas hipersensíveis a agentes patogênicos e sem o colapso desta organela, mas mediante a fusão da membrana plasmática com a do tonoplasto. Além das caspases responsáveis pelo início da MCP, há outras enzimas envolvidas neste processo, como fitaspases, as quais provavelmente clivam efetores secretados no apoplasto por patógenos, e as enzimas saspases, envolvidas na proteólise da enzima rubisco (VARTAPETIAN et al., 2011). De acordo com os autores, as fitaspases e saspases são sintetizadas como pró-enzimas e autocataliticamente processadas para originar uma enzima madura, sendo que, diferentemente das caspases, parecem ser processadas e secretadas por células saudáveis no interior dos espaços intercelulares, muito provavelmente para evitar a fragmentação de proteínas na ausência da MCP.

Cabe salientar que a peroxidação de lipídeos e o aumento de radicais livres são considerados como os maiores contribuintes do processo de senescência (DHINDSA; MATAWE, 1981) por causarem severos danos celulares (CHANG; KAO, 1998). Gaspar et al. (2003) relataram que diversos estímulos físicos e químicos promovem a geração de radicais livres, a exemplo de radicais de peróxidos, causando rigidificação da parede celular pela deposição de lignina. De acordo com os autores, este processo é mediado pelo AIA e pelo etileno. A resposta ao estresse e o metabolismo de lipídeos envolve a expressão de lipoxigenases, que catalisam a conversão de ácidos poliinsaturados em seus correspondentes derivados hidroperóxidos (ROSAHL, 1996; PORTA; ROCHA-SONA, 2002) e consequente entrada das células na MCP (NYATHI; BAKER, 2006). Já Pennel e Lamb (1997) ressaltaram que a geração de peróxido de hidrogênio e ânions superóxidos, bem como outras moléculas que desencadeiam a MCP parece ser controlada em nível supracelular e acumulam-se somente em células destinadas à morte. Ainda de acordo com os autores, o controle da expressão de genes para catalases e peroxidases à degradação do peróxido de hidrogênio e de ânions superóxidos também parece estar regulado em nível supracelular.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de realização dos experimentos

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas, no Departamento de Ciências Biológicas, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), Piracicaba/SP.

3.2 Material vegetal

Foram utilizadas microplantas e plântulas de pupunheiras inermes (*Bactris gasipaes* Kunth.-Arecaceae) estabelecidas e cultivadas *in vitro*.

Neste trabalho foram designados “grupo A”, microplantas cultivadas *in vitro* por oito anos, obtidas a partir da germinação de embriões excisados de sementes procedentes de Yurimáguas, Amazônia Peruana, provenientes do campo experimental do Departamento de Produção Vegetal na ESALQ/USP/Piracicaba/SP.

Os grupos BI e BII deste trabalho referem-se às plântulas desenvolvidas *in vitro* a partir de embriões excisados de sementes procedentes de Uruçuca, BA (Empresa Inaceres).

3.3 Condições de cultivo

As condições de cultivo das pupunheiras mantidas *in vitro* estão descritas na figura 1. As pupunheiras foram cultivadas em meio de cultura básico constituído por sais de Murashige e Skoog (1962), acrescido de sacarose (30 g L⁻¹), mioinositol (100 mg L⁻¹) e tiamina (5 mg L⁻¹) com pH ajustado a 5.8.

As microplantas do grupo A (Figura 2) foram introduzidas *in vitro* em fevereiro de 2002 e submetidas a quatro subcultivos anuais, com duração de três meses cada, intercalando-se entre meio de cultura básico e meio de cultura básico suplementado com 12.9 µM de ácido naftalenoacético (ANA) e 3.55 µM de 6-benzilaminopurina (BAP) (Figura 1). As plântulas germinadas e desenvolvidas *in vitro* (grupo B, Figura 3) foram mantidas nas mesmas condições de cultivo que as microplantas, porém foram divididas em dois subgrupos: BI: sem reguladores de crescimento, ou seja, apenas em meio de cultura básico e BII com adição de ANA (3.55 µM) e BAP (3.55 µM) (Figura 1).

Todas as culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura e luminosidade controladas [25 ± 2° C; irradiância de 42 µmol.s.m⁻².s⁻¹ de radiação fotossinteticamente ativa (PAR), respectivamente] em fotoperíodo de 16 horas, com renovação dos meios de cultura a cada 30 dias.

Figura 1 - Representação esquemática das condições do cultivo *in vitro* das microplantas e plântulas de *B. gasipaes*

Figura 2- A-D. Microplantas de *B. gasipaes* estabelecidas e cultivadas *in vitro* por oito anos (grupo A) e submetidas a quatro subcultivos anuais, com duração de três meses cada, intercalando-se entre meio de cultura básico e meio de cultura básico suplementado com ANA e BAP. Barras = 0,5 cm

Figura 3 - Plântulas de *B. gasipaes* com um ano de estabelecimento e cultivo *in vitro*. A. Plântulas pertencentes ao grupo BI cultivadas em meio de cultura básico. B. Plântulas pertencentes ao grupo BII e submetidas a quatro subcultivos com duração de três meses cada, intercalando-se entre meio de cultura básico e meio de cultura básico suplementado com ANA e BAP. Figuras A e B: Barras = 0,5 cm

Todas as amostras teciduais avaliadas neste trabalho compreenderam a região do terço mediano de folhas e raízes (Figura 4), bem como a base caulinar contendo o meristema apical (Figura 5).

A utilização de uma única plântula ou microplanta para três análises distintas baseou-se no princípio de que apenas as amostras teciduais com evidências de células em vias de MCP foram destinadas à reação Tunel (fragmentação de DNA) e às análises ultraestruturais. Para tanto, as bases caulinares das plântulas e microplantas contendo meristema apical caulinar, foram subdivididas longitudinalmente em quatro amostras, conforme demonstrado nas figuras 5 B-E.

Figura 4 - Folha e raízes de *B. gasipaes* evidenciando as regiões utilizadas para a coleta de amostras teciduais destinadas às avaliações histocitológicas e histoquímicas em plântulas e microplantas. A. Detalhe de uma folha expandida evidenciando o terço mediano de uma pina, região compreendida entre as linhas tracejadas, utilizada como amostra tecidual. B. Detalhe do sistema radicular evidenciando o terço mediano, região compreendida entre as linhas tracejadas, utilizada como amostra tecidual. Figuras A e B: Barras = 0,5 cm

Figura 5 - Metodologia utilizada para obtenção de amostras teciduais de bases caulinares contendo o meristema apical caulinar de plântulas e microplantas de *B. gasipaes* destinadas às avaliações histocitológicas e histoquímicas. **A.** Região entre as linhas tracejadas, utilizada para obtenção de amostras de bases caulinares contendo o meristema apical caulinar. **B.** Detalhe de base caulinar excisada, íntegra e utilizada em análises histológicas (potencial morfogênico/habituação) e histoquímicas (substâncias ergásticas - senescência e potencial morfogênico). **C-E.** Cortes longitudinais nas bases caulinares efetuado com o auxílio de lâminas de aço (setas vermelhas) visando à obtenção de quatro amostras destinadas às análises histológicas (processo de MCP), à reação TUNEL (fragmentação do DNA/MCP) e à microscopia eletrônica de transmissão (MET) (alterações ultraestruturais/MCP). Uma repetição foi destinada a eventuais imprevistos nos procedimentos metodológicos ou novas análises que se pretendam realizar. Setas pretas = meristemas apicais caulinares; asteriscos pretos = extremidade proximal da base caulinar. Figuras A-E: Barras = 0,5 cm

O fluxograma representado na figura 6 elucida as análises realizadas nas microplantas (grupo A) e as plântulas do grupo BII que foram submetidas a tratamento com MS acrescido de ANA e BAP. As análises realizadas por meio de microscopia de luz permitiram observar as vias morfogênicas afetadas por possível habituação. Avaliações morfofisiológicas complementaram os estudos referentes à habituação, como descrita no item 3.4 e as análises histológicas seguiram a metodologia descrita no item 3.5. O monitoramento das vias morfogênicas por meio de análises histoquímicas constam no item 3.6.2.

Figura 6 - Representação esquemática das metodologias aplicadas para identificação do processo de habituação nas plantas dos grupos A, microplantas com oito anos de cultivo e BII, plântulas com um ano de cultivo *in vitro*, ambas com adição de reguladores de crescimento ao meio MS

A figura 7 representa sucintamente as análises realizadas nas plantas dos grupos A e BI onde foram avaliadas a ocorrência dos processos de senescência e MCP. As avaliações foram efetuadas de acordo com as metodologias descritas nos itens 3.5; 3.6.1, 3.6.3 e 3.7.

Figura 7 - Representação esquemática das metodologias aplicadas para identificação do processo de senescência e morte celular programada (MCP) nas plantas nas plantas dos grupos A, microplantas com oito anos de cultivo em meio MS acrescido de reguladores de crescimento e grupo BI, plântulas com um ano de cultivo *in vitro* em meio MS isento de reguladores de crescimento

3.4 Análise morfofisiológica

Foram avaliados o número, o comprimento e tipos morfológicos radiculares (raízes grossas ou finas), bem como o número de folhas, comprimento da parte aérea e número de propágulos de oito microplantas do grupo A e de oito plântulas do grupo BII (Figura 6).

3.5 Análise histológica

Amostras teciduais de oito plântulas dos grupos BI e BII, bem como de dezesseis microplantas do grupo A (item 3.2, Figuras 4, 5) foram fixadas em solução Karnovsky (1965) e posteriormente desidratadas em série alcoólica-etílica em concentrações crescentes (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 80, 90 e 100% v/v). Em seguida as amostras teciduais foram incluídas em resina de hidroxietil metacrilato (Historesin, Leica[®], Heidelberg, Germany) de acordo com as recomendações do fabricante. Os blocos contendo as amostras teciduais das microplantas do grupo A foram seccionados longitudinalmente (bases caulinares) e transversalmente (raízes e folhas) a 5 µm de espessura empregando navalhas de aço do tipo C acopladas a micrótomo rotativo manual.

Para as análises histológicas destinadas à detecção de indícios do processo de senescência e habituação de determinado(s) tecido(s) aos reguladores de crescimento ANA e/ou BAP, os cortes obtidos foram corados com azul de toluidina (0,05%) em tampão fosfato e ácido cítrico (SAKAI, 1973) e montados em lâminas histológicas com resina sintética (Entellan[®]). As lâminas histológicas foram analisadas e fotomicrografadas em microscópio de luz (ZEISS-JENEMED2[®]) e em estereomicroscópio Micronal, sendo as imagens capturadas na mesma escala com câmera SAMSUNG[®] (SDC-313) e com câmera fotográfica digital SONY Cyber-shot com lente Carl Zeiss[®].

3.6 Análise histoquímica

3.6.1 Substâncias ergásticas – Senescência

Cortes transversais a fresco de amostras teciduais de oito microplantas (grupo A) e oito plântulas do grupo BI foram realizados para testes histoquímicos específicos de coloração segundo o componente celular a ser identificado.

Para a identificação de lipídeos, empregou-se Sudan black B (PEARSE, 1968); para amido, reagente de Lugol (BERLYN; MIKSCHE, 1976); para compostos fenólicos, solução aquosa de Cloreto férrico (JOHANSEN, 1940) e para proteínas, Aniline blue black (FISHER, 1968). Após a coloração, os materiais foram montados em lâminas semi permanentes;

analisadas e fotomicrografadas em microscópio de luz (ZEISS-JENEMED2[®]) e em estereomicroscópio Micronal, sendo as imagens capturadas na mesma escala com câmera SAMSUNG[®] (SDC-313) e com câmera fotográfica digital SONY Cyber-shot com lente Carl Zeiss[®]. De acordo com a intensidade das respostas aos testes aplicados, atribuiu-se os valores qualitativos na escala (-), (+), (++) e (+++) aos resultados negativos, à presença reduzida, moderada ou elevada, respectivamente, destas substâncias ergásticas.

3.6.2 Substâncias ergásticas – Habituação

Cortes longitudinais foram realizados nas amostras teciduais das bases caulinares emblocadas em historesina das oito microplantas (grupo A) e oito plântulas (grupo BII) utilizadas nas análises histológicas, conforme descrito no item 3.5. Posteriormente, as seções histológicas obtidas foram submetidas à coloração dupla com o reagente ácido periódico de Schiff e Naphtol blue black (FISHER, 1968) e montados em lâminas histológicas com resina sintética (Entellan[®]). Como resultado, os polissacarídeos presentes nas paredes celulares, no citoplasma e os amiloplastos foram corados em cor-de-rosa e os compostos fenólicos corados em laranja para o reagente ácido periódico de Schiff, ao passo que e as proteínas foram coradas em azul para o naphtol blue black. As lâminas histológicas foram analisadas e fotomicrografadas em microscópio de luz (ZEISS-JENEMED2[®]) e em estereomicroscópio Micronal, sendo as imagens capturadas na mesma escala com câmera SAMSUNG[®] (SDC-313).

Salienta-se que somente foram analisadas por meio deste teste histoquímico as amostras teciduais que evidenciaram o desenvolvimento de gemas adventícias (organogênese) e/ou embriões somáticos (embriogênese somática) nas análises histológicas (item 3.5).

3.6.3 Fragmentação do DNA – Reação Tunel

Para as análises histológicas visando a detecção de fragmentação do DNA (MCP) pela reação TUNEL (Terminal deoxynucleotidyltransferase dUTP nick end labeling), as amostras teciduais das microplantas do grupo A e das plântulas do grupo BI obtidas conforme descrito no item 3.2 e nas figuras 4 e 5 foram fixadas em paraformaldeído (4%) em tampão PBS (pH 7,4), de acordo com o manual do fabricante do kit para detecção de morte celular *in situ* Cell Death Detection kit AP da Roche, Germany. A seguir, procedeu-se a desidratação destas amostras em série alcoólica-etílica em concentrações crescentes (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 80, 90 e 100% v/v) e inclusão em resina de hidroxietil metacrilato (Historesin, Leica, Heidelberg,

Germany). Os blocos contendo as amostras teciduais das microplantas do grupo A foram seccionados longitudinalmente (bases caulinares) e transversalmente (raízes e folhas) a 5 µm de espessura empregando navalhas de aço do tipo C acopladas a micrótomo rotativo manual. Os cortes obtidos foram montados em lâminas de vidro revestidas com poli-L-lisina e submetidas à reação TUNEL (Terminal deoxynucleotidyltransferase dUTP nick end labeling) com a finalidade de identificar células em processo MCP via marcação de fragmentos terminais de DNA (porção 3' – OH) com o kit para detecção de morte celular *in situ* Cell Death Detection kit AP (Roche, Germany).

As secções histológicas foram reidratadas em solução tampão PBS por um período de 10 minutos e permeabilizadas com solução tampão Proteinase K (Roche, Germany) (20 µg/ml em 10 mM Tris/HCl, pH 7.5) por 30 minutos a 37° C.

Para o controle negativo foi utilizada somente a solução de marcação (nucleotídeo em solução tampão) sobre as secções histológicas, sem o acréscimo da solução enzimática (Terminal deoxynucleotidyl transferase em solução tampão), fornecidas pelo kit.

Para o controle positivo, as secções foram previamente incubadas em câmara úmida por um período de 10 minutos com DNase I recombinante (Roche, Germany) (3000 U/ml– 3 U/ml em 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl₂ 1 mg/ml BSA) por 10 minutos a 15–25°C para induzir a fragmentação do DNA, antes do procedimento da reação com a mistura da solução de marcação (nucleotídeo em solução tampão) e a solução enzimática (Terminal deoxynucleotidyl transferase em solução tampão).

A reação TUNEL foi realizada sobre secções histológicas utilizando-se a mistura da solução de marcação (nucleotídeo em solução tampão) com a solução enzimática (Terminal deoxynucleotidyl transferase em solução tampão) fornecidas no kit.

Tanto as lâminas contendo as secções histológicas imersas nas respectivas soluções para o controle negativo e positivo, como aquelas contendo a reação TUNEL propriamente dita, foram incubadas em câmara úmida por 60 minutos a 37° C.

Posteriormente, adicionou-se uma gota de solução tampão PBS e lamínulas de vidro sobre todas as amostras, as quais foram analisadas e fotomicrografadas em microscópio Leica® DMLD equipado com epifluorescência e câmera DMR (Leica Microsystems, Alemanha). Para tanto, utilizou-se comprimento de onda de excitação na faixa de 450-500 nm e detecção na faixa de 515-565 nm (verde).

Salienta-se que as lâminas contendo as secções histológicas foram lavadas três vezes por um período de dois minutos em solução tampão PBS entre cada procedimento de aplicação das soluções.

As análises referentes à Reação Tunel foram realizadas no Laboratório de Biologia Celular, da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP/UNICAMP).

3.7 Análise ultraestrutural

Amostras teciduais de bases caulinares, folhas e raízes de microplantas do grupo A e de plântulas do grupo BI em evidente processo de senescência segundo os achados histológicos e histoquímicos foram submetidas às análises ultraestruturais em microscopia eletrônica de transmissão (item 3.2, Figuras 4, 5). Para tanto, foram fixadas em solução glutaraldeído (2,5%) e paraformaldeído (2,5%) em tampão cacodilato, pH 7, 0,05 M + CaCl_2 0,001 M por uma hora à temperatura ambiente e armazenadas em refrigerador a 4° C. As amostras previamente fixadas e armazenadas em refrigerador a 4° C foram lavadas em tampão cacodilato 0,05 M três vezes por 10 minutos e pós-fixadas em OsO_4 1% em tampão cacodilato 0,05 M por 1 hora. Realizou-se nova lavagem com água destilada e as amostras fixadas com acetato de uranila 0,5% onde permaneceram por aproximadamente 12 horas sob refrigeração a 4° C.

Posteriormente, as amostras foram submetidas à desidratação em acetona sob concentrações crescentes [30%, 50%, 70% e 90% e 100% (v/v)], sendo infiltradas com mistura 1:1 de acetona: Spurr por 3-4 horas, seguido por infiltração em resina pura durante uma noite. As amostras foram inclusas em resina pura e polimerizadas em estufa a 60°C durante 48 horas. Os blocos obtidos foram desbastados com auxílio do aparelho “Leica EM Trimer” e preparadas navalhas de vidro com auxílio do aparelho “Knife maker” para a semi e ultramicrotomia.

Para visualização das amostras no microscópio eletrônico (Carl Zeiss EM 900, Germany), foram utilizadas telas de cobre constituídas por malhas hexagonais de 300 mesh, as quais, posteriormente a coleta do material, foram imersas em acetato de uranila por 12 minutos, lavadas em água destilada (três vezes), imersas em citrato de chumbo por 12 minutos e novamente lavadas em água destilada (três vezes).

As avaliações ultraestruturais foram realizadas no Núcleo De Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Agricultura (NAP/MEPA/ESALQ/USP), Piracicaba/SP.

3.8 Forma de análise dos resultados

A aplicação de métodos estatísticos rotineiros não foram pertinentes às análises morfofisiológicas, histológicas, para detecção de fragmentação do DNA, ultraestruturais e

histoquímicas com a coloração dupla PAS e Naphtol blue black, a exemplo das pesquisas desenvolvidas por Cao et al. (2003), Domínguez, Moreno e Cejudo (2004), Park et al. (2007), Vuosku et al. (2010) e Almeida et al. (2012), uma vez que foi enfatizado o monitoramento da presença ou ausência de MCP e/ou alterações no potencial morfogênico em microplantas do grupo A em relação às plântulas dos grupos BI e BII.

Com relação às análises morfofisiológicas os valores obtidos das microplantas do grupo A e das plântulas do grupo BII foram apresentados em médias reais para os parâmetros Número de Folhas (NF), Comprimento da Parte Aérea (CPA), Número de propágulos (NP), Número de Raízes (NR), Comprimento das raízes (CR) e calculados o desvio padrão. Os dados observados foram expressos em $\text{folhas.microplanta}^{-1}$, $\text{cm.microplanta}^{-1}$, $\text{propágulos.microplanta}^{-1}$, $\text{cm.microplanta}^{-1}$, $\text{raízes.microplanta}^{-1}$ e $\text{cm.microplanta}^{-1}$, respectivamente.

Cabe salientar que, devido à elevada heterogeneidade dos comprimentos radiculares observados por plântula e microplanta, determinou-se as médias reais para cada uma delas, por meio das quais foi obtida uma média geral representativa para estes grupos (ANEXOS D e E).

Para os parâmetros qualitativos radiculares Tipo Morfológico (TM) e Ramificação atribuíram-se G ou F (Grossas ou Finas) e + ou – (presente ou ausente), respectivamente, cujos dados foram discriminados.

Para as análises realizadas nas amostras teciduais de folhas, raízes e bases caulinares das microplantas do grupo A e das plântulas do grupo BI à detecção de substâncias ergásticas, as intensidades das respostas obtidas por meio da atribuição dos valores (-), (+), (++) e (+++) (ausente, reduzido, moderado e elevado, respectivamente) foram alterados a uma escala qualitativa ordinal, respectivamente 1, 2, 3 e 4 e aplicada a análise não paramétrica de Wilcoxon-Mann-Whitney (SIEGEL, 1957; SIEGEL; CASTELLAN, 1988; DISTEL; HUDSON, 2001; SVENSSON, 2001) para a determinação do nível de significância observado entre os grupos analisados, bem como a obtenção das medianas para as análises comparativas entre os grupos A e BI. Para tanto, os dados qualitativos ordinais foram analisados no programa estatístico SAS[®] (Statistical Analysis System) (SAS INSTITUTE, 1993).

4 RESULTADOS

4.1 Detecção do processo de senescência (microplantas do grupo A vs plântulas do grupo BI)

4.1.1 Análise histológica

4.1.1.1 Folhas

As análises histológicas efetuadas nas secções transversais dos terços medianos foliares (Figura 8) evidenciaram que todas as microplantas (grupo A) apresentaram mesofilo homogêneo contendo células em vias de MCP e consequente ampliação dos espaços intercelulares, resultantes do processo de lise total ou parcial das paredes celulares destas células, caracterizando um parênquima lacunoso (Figuras 8 A-C), enquanto que as plântulas do grupo BI não evidenciaram o processo de MCP, portanto, o mesofilo homogêneo não foi caracterizado como lacunoso (Figuras 8 D-F).

Todas as células das epidermes e hipodermes adaxial e abaxial, do parênquima clorofiliano e da bainha dos feixes vasculares colaterais das microplantas (grupo A) apresentaram uma ou mais das seguintes características relacionadas ao processo de MCP: condensação do núcleo e/ou citoplasmática, retração ou autólise da membrana plasmática com ou sem degradação da parede celular, caracterizando a ocorrência de senescência em todas as folhas das microplantas analisadas (Figuras 8 A-C). Além disso, por vezes, foram observadas sinuosidades marcantes nas paredes celulares das células clorofilianas (Figura 8 B), no entanto, a ocorrência de cloroplastos em processo degenerativo foi detectada com frequência (Figura 8 C). Estes eventos não foram observados nas células de todos os tecidos foliares das plântulas do grupo BI, as quais apresentaram paredes celulares íntegras, núcleos não condensados e sem a retração e/ou autólise da membrana plasmática (Figuras 8 D-F).

As paredes periclinais das células epidérmicas em ambas as superfícies adaxial e abaxial nas microplantas (grupo A) apresentaram-se mais espessas em relação ao observado nas plântulas (grupo BI), sendo a maior espessura observada nas células epidérmicas adaxiais (Figuras 8 A, B, D, E, F).

Figura 8 – Fotomicrografias de secções transversais do terço mediano de folhas de microplantas do grupo A (A-C) e de plântulas do grupo BI (D-F) de *B. gasipaes*. **A e B.** Células em vias do processo de MCP em microplantas do grupo A. **C.** Detalhe do mesofilo contendo células em processo de MCP, com destaque à lise total das paredes celulares, o desenvolvimento de lacunas e a degeneração dos cloroplastos. **D-F.** Ausência do processo de MCP nas células de todos os tecidos nas secções foliares efetuadas em plântulas do grupo BI, destacando a presença de cloroplastos íntegros. Ed = Epiderme adaxial; Eb = Epiderme abaxial; Me = Mesofilo; BE = Bainha Esclerenquimática; Ba = Bainha do feixe; Xi = Xilema; Fl = Floema; Fi = Fibras; setas laranjas = condensação do núcleo; setas cor-de-rosa = retração da membrana plasmática; setas verdes = processo de lise das paredes celulares; setas pretas = sinuosidade da parede celular; setas brancas = cloroplastos; asteriscos pretos = condensação do citoplasma; asteriscos vermelhos = desenvolvimento de amplos espaços intercelulares. Figuras A, B, D e E: Barras = 50 µm; Figuras C e F: Barras = 10 µm

4.1.1.2 Raízes

As análises histológicas efetuadas nos terços medianos radiculares seccionados transversalmente (Figura 9) evidenciaram que todas as microplantas do grupo A apresentaram intenso processo oxidativo do tecido epidérmico e do tecido adjacente, frequentemente constituído por uma camada de células parenquimáticas, e da exoderme pluriestratificada, ocasionando a ruptura das células destes tecidos (Figuras 9 A, B). As células parenquimáticas corticais mais externas apresentaram-se histologicamente sem anomalias (Figuras 9 A, B), no entanto, observou-se o desenvolvimento de espaços intercelulares no córtex mais interno, adjacente ao cilindro vascular, em decorrência do intenso processo de MCP, que foi acompanhado pela degeneração das paredes celulares (Figuras 9 A, C). Estas células apresentaram uma ou várias das seguintes características relacionadas ao processo de MCP: condensação do núcleo e/ou citoplasmática, retração da membrana plasmática com ou sem lise da parede celular, indicando a ocorrência de senescência em todas as raízes das microplantas analisadas (Figuras 9 A-C). Estes eventos não foram observados no cilindro vascular. As análises histológicas efetuadas nestas estruturas em plântulas do grupo BI não evidenciaram o processo oxidativo das células dos tecidos epidérmicos, da camada adjacente constituída de células parenquimáticas, bem como da exoderme pluriestratificada (Figuras 9 D, E). Além disso, todos os tecidos radiculares não apresentaram células em vias do processo de MCP, com paredes celulares íntegras, núcleos não condensados e sem a retração e/ou autólise da membrana plasmática (Figuras 9 D-F).

Figura 9 - Fotomicrografias de secções transversais do terço mediano de raízes de microplantas do grupo A (A-C) e de plântulas do grupo BI (D-F) de *B. gasipaes*. A e B. Oxidação e ruptura das células do tecido epidérmico, de células parenquimáticas e da exoderme, bem como a elevada incidência de células parenquimáticas corticais internas em processo de MCP. C. Detalhe das células parenquimáticas corticais internas em vias do processo de MCP. D-F. Células normais em todos os tecidos radiculares de plântulas do grupo BI, sem evidências de MCP. Ep = Epiderme; CE = Córtex Externo; CI = Córtex Interno; ME = Medula Esclerenquimática; setas vermelhas = células em vias de MCP; setas azuis = processo oxidativo; seta vermelha = ausência de processo oxidativo; seta branca = raiz lateral; setas laranja = condensação do núcleo; asteriscos pretos = condensação do citoplasma; setas cor-de-rosa = retração da membrana plasmática; setas verdes = processo de lise das paredes celulares; seta preta = nucléolo; asteriscos vermelhos = estrato de células parenquimáticas; asteriscos azuis = exoderme; asterisco laranja = desenvolvimento de amplos espaços intercelulares. Figuras A e D: Barras = 100 µm; Figura B, E e F: Barras = 50 µm; Figura C: Barra = 10 µm

4.1.1.3 Bases caulinares

As análises histológicas longitudinais efetuadas nas bases caulinares contendo o meristema apical caulinar (Figura 10) evidenciaram que na extremidade distal em todas as microplantas do grupo A analisadas, as células iniciais meristemáticas do ápice caulinar não apresentaram células em via de MCP, com paredes celulares íntegras e sem a retração e/ou autólise da membrana plasmática. No entanto, ainda na região distal, este evento pôde ser observado nas células parenquimáticas adjacentes às CPPs (células pré procambiais) e localizados abaixo das células meristemáticas apicais caulinares (Figuras 10 A-C). Estas células apresentaram núcleos mais evidentes que o normal e densos à coloração com o azul de toluidina, sugerindo a ocorrência de condensação da cromatina, bem como algumas células apresentaram a retração da membrana plasmática e uma elevada densidade citoplasmática (Figura 10 C).

As análises histológicas efetuadas na região distal das plântulas do grupo BI também evidenciaram paredes celulares íntegras e a ausência de retração e/ou autólise da membrana plasmática nas células iniciais meristemáticas dos ápices caulinares, nas células parenquimáticas, nos traços de cordões de CPPs, bem como nos centros meristemáticos originados a partir de divisões periclinais das CPPs (Figuras 10 D-F). No entanto, nas células da camada externa destes centros meristemáticos, bem como nas células parenquimáticas adjacentes detectou-se a ocorrência de núcleos proeminentes, condensados e morfológicamente alongados, sugerindo a ocorrência do processo de MCP (Figura 10 F).

Figura 10 - Fotomicrografias de secções longitudinais da região distal de bases caulinares das microplantas do grupo A (A-C) e de plântulas do grupo BI (D-F) de *B. gasipaes*. A. Vista geral da região distal das bases caulinares das microplantas do grupo A. B. Células iniciais meristemáticas apicais do ápice caulinar sem evidência do processo de MCP. C. Detalhe de células parenquimáticas em vias do processo de MCP. D. Vista geral da região distal das bases caulinares das plântulas do grupo BI. E. Detalhe das células iniciais meristemáticas do ápice caulinar sem evidências do processo de MCP. F. Indícios do processo de MCP em células parenquimáticas e em células da camada externa de centros meristemáticos localizados nesta região, destacando-se a presença de núcleos proeminentes, condensados e morfologicamente alongados. RPBI = Região Proximal da Bainha foliar Interna; RPBE = Região Proximal da Bainha Foliar Externa; Mac = Meristema apical caulinar; setas verdes = traços de cordões de CPPs; setas vermelhas = feixes vasculares; setas pretas = divisões celulares; setas cor-de-rosa = retração da membrana plasmática; asteriscos vermelhos = células da camada externa dos centros meristemáticos; asteriscos pretos = condensação do citoplasma. Figura A: Barra = 0,5 mm; Figuras B e E: Barras = 10 µm; Figura C e F: Barra = 50 µm; Figura D: Barra = 100 µm

Na região proximal das bases caulinares (Figura 11), as secções longitudinais efetuadas em microplantas do grupo A evidenciaram a ocorrência mais acentuada do processo

de MCP nas células parenquimáticas (Figuras 11 A, B) em relação ao observado na região distal destas estruturas, evento não observado nas análises histológicas efetuadas nesta mesma região em plântulas do grupo BI (Figuras 11 D, E).

Na região proximal das bainhas foliares mais externas das microplantas do grupo A, além do processo de MCP, também foi observado intenso processo oxidativo nas paredes celulares das células parenquimáticas, as quais apresentaram sinuosidades pronunciadas (Figura 11 C). Já nas estruturas correspondentes das plântulas do grupo BI, este evento não foi observado (Figura 11 F).

Figura 11 - Fotomicrografias de secções longitudinais da região proximal de bases caulinares das microplantas do grupo A (A-C) e de plântulas do grupo BI (D-F) de *B. gasipaes*. A. Vista geral da região proximal em microplantas do grupo A com elevada incidência do processo de MCP nas células parenquimáticas. B. Detalhe de uma célula parenquimática em estágio final do processo de MCP, destacando-se a lise completada parede celular. C. Células parenquimáticas localizadas na região proximal das bainhas foliares mais externas das microplantas em processo de MCP e com intensa oxidação das paredes celulares. D. Vista geral da região proximal em plântulas do grupo BI. E. Detalhe da região proximal com destaque à integridade das células parenquimáticas. F. Células parenquimáticas íntegras em evidência, localizadas na região proximal das bainhas foliares mais externas das plântulas. TP = Traços procambiais; setas vermelhas = células em vias do processo de MCP; setas laranjas = condensação do núcleo; setas cor-de-rosa = retração da membrana plasmática; setas pretas = sinuosidade da parede celular; setas azuis = oxidação das paredes celulares; seta branca = metaxilema; asterisco preto = condensação do citoplasma; asterisco vermelho = células parenquimática. Figura A: Barra = 50 μ m; Figuras B e C: Barras = 10 μ m; Figuras D e F: Barras = 10 μ m

4.1.2 Análise histoquímica- fragmentação do DNA

4.1.2.1 Folhas

A reação TUNEL efetuada nas secções histológicas transversais dos terços medianos foliares das microplantas (grupo A) e plântulas (grupo BI) (Figuras 12, 13) evidenciaram que ambas as epidermes e hipodermes (adaxial e abaxial), o mesofilo, as bainhas dos feixes vasculares, o xilema e o floema das microplantas (grupo A) apresentaram elevada incidência de células que reagiram positivamente, identificando a ocorrência de fragmentação do DNA e, portanto, em vias do processo de MCP (Figuras 12 C; 13 C), enquanto que este evento não foi observado nas células de todos os tecidos foliares das plântulas do grupo BI, os quais reagiram negativamente à reação (Figuras 12 F; 13 F). Além disso, ambas as paredes celulares anticlinais e periclinais das células do mesofilo, bem como das células epidérmicas adaxial e abaxial, das bainhas esclerenquimáticas dos feixes vasculares, das células xilemáticas das microplantas (grupo A) evidenciaram intensa auto-fluorescência com a reação TUNEL (Figuras 12 A, C; 13 A-C). Este evento foi mais discreto para estas estruturas nas plântulas (grupo BI) analisadas, no entanto, as células parenquimáticas do mesofilo apresentaram cloroplastos com emissão mais intensa de auto-fluorescência em relação ao observado nestas organelas nas microplantas do grupo A, que foi consideravelmente reduzida (Figuras 12 e 13).

Figura 12 - Fotomicrografias de secções transversais do terço mediano de folhas de microplantas do grupo A (A-C) e de plântulas do grupo BI (D-F) de *B. gasipaes* submetidas à reação TUNEL para a detecção de células com fragmentação do DNA (MCP). A. Secção histológica de microplanta do grupo A utilizada como controle negativo (-). B. Secção histológica de microplanta utilizada como controle positivo (+). C. Reação TUNEL aplicada sobre secção histológica de microplanta do grupo A, evidenciando a fragmentação do DNA nas células de todos os tecidos e a intensa fluorescência nos núcleos. Observar em A e C a intensa auto-fluorescência nas paredes celulares das células do mesofilo, das células epidérmicas adaxial e abaxial, bem como das células das bainhas esclerenquimáticas e xilemáticas, e a reduzida fluorescência nos cloroplastos em A, B e C. D. Secção histológica de plântula do grupo BI utilizada como controle negativo (-). E. Secção histológica de plântula do grupo BI utilizada como controle positivo (+). F. Reação TUNEL aplicada sobre as secções histológicas de plântulas do grupo BI, evidenciando a ausência da fragmentação do DNA nas células em todos os tecidos analisados. Observar em A e C a discreta auto-fluorescência nas paredes celulares epidérmicas adaxial e abaxial, bem como nas paredes celulares das bainhas esclerenquimáticas e a intensa fluorescência proveniente dos cloroplastos em D, E e F. Ed = Epiderme adaxial; Eb = Epiderme abaxial; Hd = Hipoderme adaxial; Hb = Hipoderme abaxial; Me = Mesofilo; BE = Bainha Esclerenquimática; Fl = floema; Xi = Xilema; setas brancas = cloroplastos. Figuras A-F: Barras = 100 μ m

Figura 13 - Fotomicrografias de secções transversais do terço mediano de folhas de microplantas do grupo A (A-C) e de plântulas do grupo BI (D-F) de *B. gasipaes* submetidas à reação TUNEL para a detecção de células com fragmentação do DNA (MCP). A. Secção histológica de microplanta do grupo A utilizada como controle negativo (-). B. Secção histológica de microplanta do grupo A utilizada como controle positivo (+). C. Reação TUNEL aplicada sobre secção histológica em microplanta do grupo A, evidenciando a fragmentação do DNA nas células de todos os tecidos e a intensa fluorescência nos núcleos. Observar em A, B e C a intensa auto-fluorescência nas paredes celulares anticlinalis e periclinalis das células epidérmicas adaxial e abaxial, bem como a reduzida emissão de fluorescência nos cloroplastos. D. Secção histológica de plântula do grupo BI utilizada como controle negativo (-). E. Secção histológica de plântula do grupo BI utilizada como controle positivo (+). F. Reação TUNEL aplicada sobre secção histológica em plântula do grupo BI, evidenciando a ausência da fragmentação do DNA nas células em todos os tecidos analisados. Observar a discreta auto-fluorescência nas paredes celulares epidérmicas adaxial e abaxial, bem como nas paredes celulares das bainhas esclerenquimáticas e a intensa fluorescência proveniente dos cloroplastos em D, E e F. Ed = Epiderme adaxial; Eb = Epiderme abaxial; Hd = Hipoderme adaxial; Hb = Hipoderme abaxial; Me = Mesofilo; FV = Feixe Vascular; setas brancas = cloroplastos. Figuras A-F: Barras = 100 µm

4.1.2.2 Raízes

As secções histológicas transversais dos terços medianos radiculares das microplantas do grupo A e plântulas do grupo BI submetidas à reação TUNEL (Figura 14) evidenciaram que as células exodérmicas, as células parenquimáticas do córtex externo e interno, as células endodérmicas e pericíclicas, as células do protoxilema, do floema e da medula esclerenquimática das microplantas (grupo A) reagiram positivamente, com fragmentação do DNA e, portanto, em vias do processo de MCP (Figuras 14 C, F). Entretanto, este foi um evento escasso nas células de todos os tecidos radiculares das plântulas do grupo BI e observados nas células epidérmicas e células dos mesmos tecidos das raízes das microplantas positivas à reação (Figuras 14 I, L).

O tecido epidérmico e o tecido adjacente, constituído por células parenquimáticas, com frequência não foram evidenciados nas secções histológicas radiculares das microplantas

(grupo A), em decorrência ao intenso processo oxidativo relatado nas análises histológicas específicas à identificação do processo de MCP (Figuras 9 A, B).

A presença de células positivas à reação TUNEL com núcleos disformes também foi comumente observada nas análises histológicas radiculares das microplantas do grupo A (Figura 14 F) e, tanto a camada de células parenquimáticas adjacente à epiderme, bem como as células da exoderme e da endoderme evidenciaram a presença de auto-fluorescência das paredes celulares com a reação TUNEL (Figuras 14 A-D). Esta reação, quando aplicada nas secções histológicas radiculares das plântulas do grupo BI, não detectou a ocorrência de núcleos disformes, mas uma eventual localização periférica do DNA fragmentado e adjacente à carioteca (Figura 14 L). Nestas plântulas, as paredes celulares das células epidérmicas, das células parenquimáticas adjacente à epiderme, das células exodérmicas e endodérmicas apresentaram auto-fluorescência (Figuras 14 G-L), no entanto, a intensidade da emissão de fluorescência foi consideravelmente inferior nas células endodérmicas das plântulas (grupo BI) (Figuras 14 J-L) em relação às células do tecido correspondente das microplantas (grupo A) (Figuras 14 D, E).

Figura 14 - Fotomicrografias de seções transversais do terço mediano de raízes de microplantas do grupo A (A-F) e de plântulas do grupo BI (G-L) de *B. gasipaes* submetidas à reação TUNEL para a detecção de células com fragmentação do DNA (MCP). A. Seção histológica dos tecidos radiculares externos de microplantas do grupo A utilizada como controle negativo (-). B. Seção histológica dos tecidos radiculares externos de microplantas do grupo A utilizada como controle positivo (+). C. Reação TUNEL aplicada sobre seção histológica contendo o tecido radicular externo em microplanta do grupo A, evidenciando a fragmentação do DNA nas células esclerenquimáticas e parenquimáticas do córtex externo, bem como a intensa fluorescência nos núcleos. Observar a auto-fluorescência nas paredes celulares dos estratos de células esclerenquimáticas em A, B e C. D. Seção histológica dos tecidos radiculares internos de microplantas do grupo A utilizada como controle negativo (-). E. Seção histológica dos tecidos radiculares internos de microplantas do grupo A utilizada como controle positivo (+). F. Reação TUNEL aplicada sobre seção histológica contendo os tecidos radiculares internos em microplanta do grupo A evidenciando a fragmentação do DNA nas células de todos os tecidos. Destaque para a presença de um núcleo disforme (canto superior direito) e a auto-fluorescência nas paredes celulares das células endodérmicas em D e E. G. Seção histológica dos tecidos radiculares externos de plântulas do grupo BI utilizada como controle negativo (-). H. Seção histológica dos tecidos radiculares externos de plântulas do grupo BI utilizada como controle positivo (+). I. Reação TUNEL aplicada sobre seção histológica contendo o tecido radicular externo em plântula do grupo BI, evidenciando a presença escassa de células com fragmentação do DNA. J. Seção histológica dos tecidos radiculares internos de plântulas do grupo BI utilizada como controle negativo (-). K. Seção histológica dos tecidos radiculares internos de plântulas do grupo BI utilizada como controle positivo (+). L. Reação TUNEL aplicada sobre seção histológica contendo os tecidos radiculares internos em plântula do grupo BI evidenciando a presença reduzida de células com fragmentação do DNA. Destaque para um núcleo com localização periférica do DNA fragmentado e adjacente à carioteca (canto superior direito). Ep = Epiderme; Ex = Exoderme; CE = Córtex Externo; CI = Córtex Interno; En = Endoderme; Pe = Periciclo; Px = Protoxilema; Mx = Metaxilema; FI = Floema; ME = Medula Esclerenquimática; asteriscos = células parenquimáticas. Figuras A-F: Barras = 100 μ m; Ampliações das figuras F e L: Barra = 10 μ m

4.1.2.3 Bases caulinares

A reação TUNEL efetuada nas secções histológicas longitudinais das bases caulinares das microplantas (grupo A) e plântulas (grupo BI) (Figura 15) evidenciaram a elevada presença de células que reagiram positivamente nas microplantas (grupo A), tanto na região distal, que contém o meristema apical caulinar (Figura 15 C), como na região proximal destas estruturas (Figura 15 I), enquanto que nas plântulas do grupo BI a ocorrência de células marcadas positivamente foi escassa em ambas as regiões distal e proximal (Figuras 15 F, K).

Na região distal das bases caulinares das microplantas (grupo A) e plântulas (grupo BI), este evento foi observado nas células iniciais meristemáticas dos ápices caulinares e nas células dos traços de cordões de CPPs (Figuras 15 C, F), ao passo que na região proximal reagiram positivamente as células parenquimáticas e as células procambiais (Figuras 15 I, L), evidenciando a fragmentação do DNA das células destes tecidos e, portanto, em vias do processo de MCP. No entanto, nas células positivas à reação das plântulas (grupo BI) este evento ocorreu esporadicamente e com intensidade mais fraca (Figuras 15 C, F, I, L), em decorrência à reduzida fluorescência proveniente do núcleo (Figuras 15 F, L) em relação ao observado para as microplantas (grupo A) (Figuras 15 C, I).

A auto-fluorescência também foi observada nas paredes celulares dos traços de cordões de células pré-procambiais e procambiais nas bases caulinares das microplantas do grupo A e plântulas do grupo BI, sendo que este evento foi mais intenso nas paredes celulares destas estruturas nas plântulas analisadas (Figuras 15 A, D, G, J, L).

Figura 15 – Fotomicrografias de secções longitudinais nas regiões distal (RD) e proximal (RP) das bases caulinares de microplantas do grupo A (A-C e G-I) e de plântulas do grupo BI (D-F e J-L) de *B. gasipaes* submetidas à reação TUNEL para a detecção de células com fragmentação do DNA (MCP). A. Secção histológica da região distal de microplantas do grupo A utilizada como controle negativo (-). Observar a reduzida auto-fluorescência nas paredes celulares dos traços de cordões de CPPs. B. Secção histológica da região distal de microplantas do grupo A utilizada como controle positivo (+). C. Reação TUNEL aplicada sobre secção histológica contendo a região distal em microplanta do grupo A, evidenciando a elevada presença de células com fragmentação do DNA. D. Secção histológica da região distal de plântulas do grupo BI utilizada como controle negativo (-). Observar a auto-fluorescência nas paredes celulares dos traços de cordões de CPPs. E. Secção histológica da região distal do grupo BI utilizada como controle positivo (+). F. Reação TUNEL aplicada sobre secção histológica contendo a região distal em plântula do grupo BI evidenciando a presença escassa de células com fragmentação do DNA e a discreta fluorescência proveniente dos núcleos. G. Secção histológica da região proximal de microplantas do grupo A utilizada como controle negativo (-). Observar a reduzida auto-fluorescência nas paredes celulares dos traços de células procambiais. H. Secção histológica da região proximal de microplantas do grupo A utilizada como controle positivo (+). I. Reação TUNEL aplicada sobre a região proximal em microplanta do grupo A evidenciando a elevada presença de células com fragmentação do DNA. J. Secção histológica da região proximal de plântula do grupo BI utilizada como controle negativo (-). Observar a auto-fluorescência nas paredes celulares dos feixes vasculares e das células parenquimáticas. K. Secção histológica da região proximal de plântula do grupo BI utilizada como controle positivo (+). L. Reação TUNEL aplicada sobre secção histológica contendo a região proximal em plântula do grupo BI evidenciando a presença reduzida de células com fragmentação do DNA, a discreta fluorescência proveniente dos núcleos e a auto-fluorescência nas paredes celulares dos traços de células procambiais e das células parenquimáticas. RD = Região Distal; RP = Região proximal; TPP = Traços de cordões de células Pré-Procambiais; TP = Traços de células Procambiais; FV = Feixe Vascular; CP = Células Parenquimáticas; MAC = Meristema Apical Caulinar; PF = Primórdios Foliares. Figuras A-L: Barras = 100 µm

4.1.3 Análise histoquímica – substâncias ergásticas

4.1.3.1. Folhas

Os testes histoquímicos realizados em secções transversais do terço mediano das folhas evidenciaram que apenas uma das microplantas do grupo A (microplantas com oito anos em cultivo com reguladores de crescimento) analisadas reagiu positivamente ao reagente de Lugol à detecção de amido (Tabela 1 e Figuras 16 A, B). Quando o teste foi aplicado em plântulas do grupo BI (plântulas com um ano de cultivo em meio isento de reguladores de crescimento), todas as amostras reagiram positivamente, revelando uma coloração preta nas células parenquimáticas do mesofilo e nas células da bainha do feixe colateral da nervura central (Tabela 1 e Figuras 16 C, D).

Tabela 1 - Valores qualitativos atribuídos de acordo com a intensidade das respostas aos testes histoquímicos aplicados à detecção de amido, lipídeos, proteínas totais e compostos fenólicos em secções transversais realizadas no terço mediano de folhas de microplantas do grupo A e de plântulas do grupo BI de *B. gasipaes* (GA= grupo A e GBI= grupo BI)

Repetições	Substâncias ergásticas							
	amido		lipídeos totais		proteínas totais		compostos fenólicos	
	GA	GBI	GA	GBI	GA	GBI	GA	GBI
R1	-	+++	+++	++	-	-	+++	+
R2	-	+++	+++	++	-	-	+++	++
R3	+	+++	+++	++	-	-	+++	++
R4	-	+++	+++	++	-	-	+++	++
R5	-	+++	+++	++	-	-	+	+
R6	-	+++	+++	++	-	-	+++	+
R7	-	+++	+++	++	-	-	+	++
R8	-	+++	+++	++	-	-	+++	++

- (ausente), reduzido (+), moderado (++), elevado (+++).

Figura 16 - Fotomicrografias de secções transversais do terço mediano de folhas de microplantas do grupo A (A e B) e de plântulas do grupo BI (C e D) de *B. gasipaes* coradas com reagente de Lugol para detecção de amido. A e B. Ausência de amiloplastos nas folhas das microplantas. C e D. Detalhe das células da bainha do feixe vascular e das células parenquimáticas clorofilianas das plântulas do grupo BI, que reagiram fortemente ao Lugol. Ed = Epiderme adaxial; Eb = Epiderme abaxial; Hd = Hipoderme adaxial; Hb = Hipoderme abaxial; Me = Mesofilo; BE = Bainha Esclerenquimática; Ba = Bainha do feixe; Xi = Xilema; Fl = Floema; Fi = Fibras; setas vermelhas = compostos fenólicos. Figuras A-D: Barras = 50 µm

Todas as secções foliares das microplantas (grupo A) coradas com Sudan black B para a detecção de lipídeos totais evidenciaram elevado conteúdo desta substância no interior dos cloroplastos, caracterizado pela forte coloração preta observada (Tabela 1 e Figuras 17 A-C), ao passo que a reação efetuada em plântulas do grupo BI evidenciou a presença moderada desta substância ergástica no interior da organela (Tabela 1 e Figuras 17 D-F). Estas análises também evidenciaram similaridade em relação ao conteúdo lipídico presente na cutícula das células epidérmicas das superfícies adaxial e abaxial das microplantas do grupo A (Figuras 17 B, C), ao passo que para as plântulas do grupo BI foi observado maior conteúdo lipídico na cutícula das células epidérmicas da superfície adaxial em relação à superfície abaxial (Figuras 17 E, F).

Figura 17 - Fotomicrografias de secções transversais do terço mediano de folhas de microplantas do grupo A (A-C) e de plântulas do grupo BI (D-F) de *B. gasipaes* coradas com Sudan black B para detecção de lipídeos totais. A. Vista geral do feixe vascular colateral da nervura central em microplantas do grupo A, evidenciando a elevada presença de lipídeos no interior dos cloroplastos. B e C. Superfícies adaxial e abaxial em microplantas do grupo A, destacando a similaridade à presença de lipídeos na cutícula, bem como a elevada presença de lipídeos no interior dos cloroplastos. D. Vista geral da região do feixe vascular colateral da nervura central em plântulas do grupo BI evidenciando a presença moderada de lipídeos nos cloroplastos. E e F. Detalhes das superfícies adaxial e abaxial das folhas do grupo BI, com destaque ao maior conteúdo lipídico na cutícula das células epidérmicas abaxiais. Cut = Cutícula; Ed = Epiderme adaxial; Eb = Epiderme abaxial; Hd = Hipoderme adaxial; Hb = Hipoderme abaxial; Me = Mesófilo; BE = Bainha Esclerenquimática; Ba = Bainha do feixe; Xi = Xilema; Fi = Floema; Fi = Fibras; setas vermelhas = lipídeos. Figuras A e D: Barras = 50 µm; Figuras B, C, E e F: Barras = 10 µm

Os testes histoquímicos realizados para a detecção de proteínas totais com o reagente Aniline blue black foram negativos para ambas as secções foliares das microplantas do grupo A e das plântulas do grupo BI, visto que a reação positiva revelaria uma coloração azul claro a escuro ou ainda, uma coloração azul esverdeada, conforme evidenciado nas paredes secundárias das células das fibras dos feixes vasculares (bainhas esclerenquimáticas) adjacentes ao xilema (Figuras 18 A, C).

Figura 18 - Fotomicrografias de secções transversais do terço mediano de folhas de microplantas do grupo A (A e B) e de plântulas do grupo BI (C e D) de *B. gasipaes* coradas com Aniline blue black para detecção de proteínas totais. A. Região do feixe vascular colateral da nervura central em microplanta do grupo A evidenciando ausência de proteinoplastos e conteúdo proteico localizado nas bainhas esclerenquimáticas adjacentes ao xilema. B. Detalhe das células do mesofilo da microplanta isentas de proteinoplastos. C. Região do feixe vascular colateral da nervura central em plântula do grupo BI evidenciando ausência de proteinoplastos, mas com conteúdo proteico nas bainhas esclerenquimáticas adjacentes ao xilema. D. Células do mesofilo da plântula e isenta de proteinoplastos. Ed = Epiderme adaxial; Hb = Hipoderme abaxial; Ba = Bainha do feixe vascular; BE = Bainha Esclerenquimática; Me = Mesofilo; setas azuis = cloroplastos; setas cor-de-rosa = retração da membrana plasmática. Figuras A e C: Barras = 50 µm; Figura B e D: Barras = 10 µm

As secções foliares das microplantas do grupo A coradas com reagente Cloreto férrico para a detecção de compostos fenólicos evidenciaram elevado conteúdo desta substância ergástica nas células parenquimáticas do mesofilo em seis, das oito microplantas analisadas (Tabela 1 e Figuras 19 A, B) e depositados nas paredes celulares periclinais e anticlinais das

células em ambos os tecidos epidérmicos, nas células do mesofilo, nas células da bainha do feixe vascular e nas células do xilema e do floema (Figuras 19 A, B). Esta reação positiva foi detectada pela forte coloração preta proporcionada pela aplicação do reagente Cloreto férrico, o que não pode ser observado nos demais tecidos destas estruturas, exceto nas duas amostras foliares restantes, cujo conteúdo fenólico foi reduzido (Tabela 1) e evidenciado também nas paredes periclinais externas dos tecidos epidérmicos adaxial e abaxial, bem como esparsamente no interior das células do mesofilo e em suas paredes primárias. As secções foliares das plântulas do grupo BI submetidas a esta reação evidenciaram moderado conteúdo de compostos fenólicos nas células parenquimáticas do mesofilo em cinco, das oito plântulas analisadas (Tabela 1 e Figuras 19 C, D) e depositados nas paredes celulares das células do mesofilo, nas paredes celulares periclinais e anticlinais das células da bainha do feixe vascular, na camada mais externa de células da bainha esclerenquimática, bem como nas paredes celulares das células do xilema e do floema (Figuras 19 C, D).

As demais amostras foliares das plântulas apresentaram reduzido conteúdo fenólico (Tabela 1) e limitado às paredes celulares primárias das células clorênquimáticas e, por vezes, em seu interior.

Figura 19 - Fotomicrografias de secções transversais do terço mediano de folhas de microplantas do grupo A (A e B) e de plântulas do grupo BI (C e D) de *B. gasipaes* coradas com Cloreto férrico para a detecção de compostos fenólicos. A. Vista geral do terço mediano de folha de microplanta do grupo A, destacando a presença elevada de compostos fenólicos nas paredes celulares das células epidérmicas, das células do mesofilo e do feixe vascular colateral da nervura central. B. Detalhe da intensa deposição desta substância nas paredes celulares primárias das células parenquimáticas do mesofilo em microplanta do grupo A. C. Região do feixe vascular colateral da nervura central destacando a reduzida presença de compostos fenólicos em plântula do grupo BI. D. Detalhe da reduzida presença de compostos fenólicos nas paredes celulares do mesofilo em plântula do grupo BI. Ed = Epiderme adaxial; Eb = Epiderme abaxial; Hd = Hipoderme adaxial; Hb = Hipoderme abaxial; Me = Mesofilo; BE = Bainha Esclerenquimática; Ba = Bainha do feixe vascular; Xi = Xilema; FI = Floema; FVA = Feixe Vascular Anfivascular; setas vermelhas = compostos fenólicos; setas azuis = cloroplastos. Figura A: Barra = 100 µm; Figuras B e D: Barras = 50 µm; Figura C: Barra = 10 µm

4.1.3.2 Raízes

Os testes histoquímicos realizados nas secções transversais dos terços medianos radiculares das microplantas do grupo A para a detecção de amido com o reagente Lugol não detectaram esta substância em sete das oito microplantas analisadas (Tabela 2 e Figuras 20 A, B). A única reação positiva (uma microplanta) (Tabela 2) evidenciou a presença de amiloplastos somente nas células parenquimáticas corticais mais internas. Quando o teste foi aplicado nestas estruturas para as plântulas do grupo BI, observou-se a ausência desta substância ergástica em todas as amostras analisadas (Tabela 2 e Figura 20).

Nas secções radiculares com o desenvolvimento de ramificação (raízes laterais), o teste histoquímico com o reagente Lugol não identificou a presença de amiloplastos em ambos os grupos analisados (A e BI).

Tabela 2 - Valores qualitativos atribuídos de acordo com a intensidade das respostas aos testes histoquímicos aplicados à detecção de amido, lipídeos, proteínas totais e compostos fenólicos em secções transversais realizadas no terço mediano de raízes de microplantas do grupo A e de plântulas do grupo BI de *B. gasipaes* (GA= grupo A e GBI= grupo BI)

Repetições	Substâncias ergásticas							
	amido		lipídeos totais		proteínas totais		compostos fenólicos	
	GA	GBI	GA	GBI	GA	GBI	GA	GBI
R1	-	-	+	+	-	-	+++	-
R2	-	-	+++	+	-	-	+++	++
R3	-	-	+++	+	-	-	+++	++
R4	-	-	+++	-	++	-	+	++
R5	+++	-	+++	+	-	-	+	++
R6	-	-	+++	+	-	-	+++	++
R7	-	-	+++	+	+++	-	+++	++
R8	-	-	+++	+	-	-	+++	++

- (ausente), reduzido (+), moderado (++), elevado (+++).

Figura 20 - Fotomicrografias de secções transversais do terço mediano radicular de microplantas do grupo A (A e B) e de plântulas do grupo BI (C e D) de *B. gasipaes* coradas com reagente de Lugol para detecção de amido. A-B. Ausência de amiloplastos em microplantas do grupo A. C-D. Reação negativa para o amido em de plântula do grupo BI. Ep = Epiderme; Ex = Exoderme; CE = Córtex Externo; CI = Córtex Interno; CV = Cilindro Vascular; Pe = Periciclo; En = Endoderme; Mx = Metaxilema; Px = Protoxilema; Fl = Floema; ME = Medula Esclerenquimática; Ep = Epiderme; Ex = Exoderme; CE = Córtex Externo CI = Córtex Interno; CV = Cilindro Vascular; End = Endoderme; Mx = Metaxilema; setas azuis = processo oxidativo; asteriscos vermelhos = células parenquimáticas. Figuras A e C: Barras = 50 µm; Figura B: Barra = 100 µm; Figura D: Barra = 10 µm

O emprego do reagente Sudan black B revelou elevado conteúdo lipídico nas raízes em sete, das oito microplantas do grupo A analisadas (Tabela 2), caracterizado pela coloração preta localizada nas paredes celulares das células do estrato epidérmico em processo oxidativo, da camada de células parenquimáticas, dos primeiros estratos da exoderme, da endoderme e do periciclo (Figura 21 A, C, D). Além disso, abundantes elaioplastos foram observados no interior das células parenquimáticas, adjacentes à epiderme, no interior das células exodérmicas (Figura 21 A), no entanto, a maior incidência desta substância ergástica ocorreu no interior das células parenquimáticas corticais mais internas (Figuras 21 B, C) e a menor incidência foi observada nas células do periciclo, do xilema e do floema (Figuras 21 C, D). Apenas uma microplanta apresentou reduzido conteúdo lipídico no sistema radicular nos mesmos tecidos supracitados (Tabela 2).

A aplicação do teste em plântulas do grupo BI revelou reduzido conteúdo lipídico nas raízes em sete, das oito plântulas analisadas (Tabela 2 e Figuras 21 E-H) e detectados no interior das células epidérmicas, exodérmicas, parenquimáticas corticais internas e externas, endodérmicas, protoxilemáticas e esclerenquimáticas da medula (Figuras 21 E-H). A reação também foi positiva às paredes celulares das células da exoderme (Figura 21 E) e apenas uma única plântula não evidenciou conteúdo lipídico nos tecidos radiculares (Tabela 2). Cabe salientar que, nas secções radiculares das microplantas do grupo A que evidenciaram o desenvolvimento de ramificação (raízes laterais), constatou-se elevado conteúdo lipídico (elaioplastos) tanto no interior das células na região de conexão vascular, bem como no interior das células parenquimáticas corticais destas novas estruturas (Figura 22 A). O teste foi negativo à detecção desta substância ergástica nas raízes laterais em desenvolvimento nas secções histológicas efetuadas em plântulas do grupo BI (Figura 22 F).

Figura 21 - Fotomicrografias de secções transversais do terço mediano radicular de microplantas do grupo A (A-D) e de plântulas do grupo BI (E-H) de *B. gasipaes* coradas com Sudan black B para detecção de lipídeos totais. A. Vista geral da epiderme, da camada de células parenquimáticas e da exoderme em microplanta do grupo A. B. Detalhe do córtex interno, destacando o elevado conteúdo de elaioplastos. C. Região do córtex interno e do cilindro vascular em microplanta do grupo A. D. Detalhe das células do xilema e do floema em microplanta do grupo A com conteúdo lipídico. E. Vista geral da epiderme e da região cortical externa em plântula do grupo BI. F. Detalhe da deposição de lipídeos nas paredes celulares e no interior das células exodérmicas. G. Córtex interno com poucos elaioplastos intracelulares. H. Destacando a presença de esparsos elaioplastos nas células dos tecidos do cilindro vascular. Ep = Epiderme; Ex = Exoderme; CE = Córtex Externo CI = Córtex Interno; En = Endoderme; Pe = Periciclo; Px = Protoxilema; Mx = Metaxilema; MxI = Metaxilema Imaturo; Fl = Floema; ME = Medula Esclerenquimática; setas azuis = lipídeos em paredes celulares oxidadas; setas vermelhas = elaioplastos; setas verdes = deposição de lipídeos em paredes celulares; asteriscos vermelhos = células parenquimáticas. Figuras A, D, F, G e H: Barras = 10 µm; Figuras B, C e E: Barras = 50 µm

Figura 22 - Fotomicrografias de secções transversais do terço mediano radicular de microplantas do grupo A (A) e de plântulas do grupo BI (B) de *B. gasipaes* com desenvolvimento de ramificação (raízes laterais) e coradas com Sudan black B para detecção de lipídeos totais. A. Elevada presença de elaioplastos intracelulares na região de conexão vascular e no parênquima cortical das raízes laterais em microplantas do grupo A. B. Reação negativa para a presença de lipídeos em raiz de plântula do grupo BI em processo rizogênico. CV = Cilindro Vascular; RCV = Região de Conexão Vascular; RL = Raiz Lateral; setas vermelhas = elaioplastos. Figuras A, e B: Barras = 100 µm

Os testes histoquímicos efetuados para detecção de proteínas totais nas raízes com o reagente Aniline blue black foram negativos para seis microplantas do grupo A (Tabela 2), sendo que nas duas restantes, observou-se, respectivamente, moderado e elevado conteúdo protéico, evidenciado pela coloração azul-esverdeada com o uso deste reagente. (Tabela 2 e Figuras 22 A-D). Cabe salientar que, normalmente, as paredes secundárias espessadas (exoderme, xilema e medula esclerenquimática), bem como o núcleo das células meristemáticas reagiram positivamente ao Aniline blue black (Figuras 22 A, C, H). Neste contexto, considerou-se como resultado positivo para fins estatísticos apenas a presença de proteinoplastos ou outras estruturas protéicas (Figuras 22 B, D).

Nas raízes destas microplantas, os proteinoplastos foram identificados no núcleo das células da medula esclerenquimática adjacente ao xilema, ao floema e no interior das células floemáticas (Figura 23 C), sendo que também observou-se a presença de abundantes estruturas protéicas filamentosas aglomeradas nas células parenquimáticas corticais internas e nas células do metaxilema em três, das oito microplantas analisadas (Tabela 2 e Figuras 23 B, D). Quando o teste histoquímico foi efetuado em plântulas do grupo BI, observou-se a ausência de proteínas totais em todas as amostras analisadas (Tabela 2 e Figuras 23 E-H), evidenciado pela ausência da coloração azul-esverdeada com o uso do reagente.

Em ambos os grupos (A e BI), não foi detectada a presença de proteinoplastos nas secções radiculares com o desenvolvimento de ramificação (raízes laterais).

Figura 23 - Fotomicrografias de secções transversais do terço mediano radicular de microplantas do grupo A (A-D) e de plântulas do grupo BI (E-H) de *B. gasipaes* coradas com Aniline blue black para a detecção de proteínas totais. A. Vista geral do tecido epidérmico e do córtex mais externo em microplanta do grupo A. B. Detalhe das células parenquimáticas corticais internas em microplantas (grupo A) contendo estruturas protéicas filamentosas aglomeradas. C. Detalhe da medula esclerenquimática e das células do xilema e do floema em microplantas do grupo A. D. Medula esclerenquimática contendo estruturas protéicas filamentosas aglomeradas. E-H. Ausência de proteinoplastos intracelulares em todos os tecidos radiculares. Ep = Epiderme; asterisco vermelho = camada de células parenquimáticas; Ex = Exoderme; CE = Córtex Externo CI = Córtex Interno; En = Endoderme; CV = Cilindro vascular; Pe = Periciclo; Px = Protoxilema; Mx = Metaxilema; Fl = Floema; ME = Medula Esclerenquimática; RL = Raiz Lateral; setas vermelhas = estruturas protéicas filamentosas; setas verdes = conteúdo protéico nas paredes celulares; setas cor-de-rosa = conteúdo protéico no núcleo; setas azuis = proteinoplastos. Figuras A, B, E e G: Barras = 100 µm; Figuras C, D e H: Barras = 50 µm; Figura F: Barra = 10 µm

Em relação à detecção de compostos fenólicos com o emprego de Cloreto férrico, verificou-se que seis, das oito microplantas do grupo A analisadas apresentaram elevado conteúdo fenólico nas raízes seccionadas, evidenciado pela coloração marrom escura ou preta, particularmente nas células epidérmicas, que manifestaram intensa deposição de fenóis, característico de processo oxidativo (Tabela 2 e Figuras 24 A-C).

Novamente, as células parenquimáticas corticais internas reagiram positivamente à aplicação dos testes histoquímicos, evidenciando forte presença de compostos fenólicos nas paredes celulares, sendo que este evento também foi observado nas células da endoderme (Figuras 24 A-C), nos estratos celulares mais externos da medula esclerenquimática e nas paredes celulares secundárias do metaxilema, cuja deposição ocorreu de forma simétrica e intercalada com regiões sem a presença desta substância (Figura 24 C). Apenas duas microplantas apresentaram quantidade reduzida desta substância ergástica nestes tecidos (Tabela 2), sendo que a maior ocorrência foi observada nos estratos celulares mais externos da medula esclerenquimática e nas células epidérmicas. Quando o teste foi aplicado nas estruturas radiculares das plântulas do grupo BI, verificou-se que sete, das oito amostras analisadas, apresentaram moderado conteúdo fenólico nas raízes seccionadas, mas sem evidências de processo oxidativo nas células do tecido epidérmico, evidenciado pela discreta coloração marrom a preta detectada nas paredes celulares anticlinais externas das células epidérmicas e nas paredes celulares das células parenquimáticas corticais mais internas (Tabela 2 e Figuras 24 D-F). Eventualmente, esta reação foi positiva no interior das células (Figuras 24 E e F) e apenas uma plântula não evidenciou a presença de compostos fenólicos (Tabela 2).

Todas as raízes das microplantas (grupo A) que apresentaram o desenvolvimento de ramificação (raízes laterais) apresentaram moderado a elevado conteúdo fenólico nas células dos feixes vasculares das raízes laterais e em parte de suas células parenquimáticas corticais nestas novas estruturas (Figura 25 A). Com frequência, também foram observados cloroplastos no interior das células parenquimáticas corticais das raízes laterais (Figura 25 A) e nas células parenquimáticas corticais mais internas das raízes que as originaram. Todas as raízes das plântulas do grupo BI com desenvolvimento de ramificação (raízes laterais) evidenciaram elevado conteúdo fenólico nestas novas estruturas, os quais se restringiram às células dos feixes vasculares das raízes laterais e parcialmente nas células parenquimáticas corticais (Figura 24 B).

Figura 24 - Fotomicrografias de secções transversais do terço mediano radicular de microplantas do grupo A (A-C) e de plântulas do grupo BI (D-F) de *B. gasipaes* coradas com Cloreto férrico para a detecção de compostos fenólicos. A. Células do tecido epidérmico com intensa deposição de fenóis em microplantas do grupo A. B. Vista geral da raiz em microplanta (grupo A) com destaque à elevada presença de compostos fenólicos nas células parenquimáticas corticais internas e nos tecidos do cilindro vascular. C. Detalhe do tecido parenquimático cortical interno e do cilindro vascular contendo intensa deposição de fenóis nas paredes celulares. D. Células do tecido epidérmico de plântulas do grupo BI sem evidências da deposição de fenóis. E e F. Presença moderada de conteúdo fenólico nas paredes celulares e no interior das células exodérmicas, parenquimáticas corticais internas e endodérmicas em plântulas do grupo BI. Ep = Epiderme; Ex = Exoderme; CI = CórteX Interno; En = Endoderme; Pe = Periciclo; Px = Protoxilema; Mx = Metaxilema; Fl = Floema; ME = Medula Esclerenquimática; setas azuis = deposição de fenóis nas paredes celulares; setas vermelhas = conteúdo fenólico intracelular; asterisco vermelho = camada de células parenquimáticas. Figura A: Barra = 100 µm; Figuras B, D e E: Barras = 10 µm; Figuras C e F: Barras = 50 µm

Figura 25 - Fotomicrografias de secções transversais do terço mediano radicular de microplantas do grupo A (A) e de plântulas do grupo BI (B) de *B. gasipaes* com desenvolvimento de ramificação (raízes laterais) e coradas com Cloreto férrico para a detecção de compostos fenólicos. A. Presença moderada de conteúdo fenólico nas células dos feixes vasculares das raízes laterais e em parte de suas células parenquimáticas corticais em microplanta do grupo A. Destaque à presença de cloroplastos no interior destas novas estruturas. B. Presença de elevado conteúdo fenólico nas células dos feixes vasculares das raízes laterais e em parte das células parenquimáticas corticais em plântulas do grupo BI. ME = Medula esclerenquimática; Mx = Metaxilema; Fl = Floema; RCV = Região de Conexão Vascular; PP = Procâmbio Proliferado; Co = Córtex das raízes laterais; FV = feixe Vascular; RL = Raiz Lateral; setas vermelhas = compostos fenólicos; setas azuis = cloroplastos. Figuras A e B: Barras = 100 µm

4.1.3.3 Bases caulinares

As análises histoquímicas para a detecção de amido com o reagente Lugol efetuadas nas bases caulinares das microplantas do grupo A seccionadas longitudinalmente foram positivas em sete, das oito amostras analisadas (Tabela 3), evidenciando elevado conteúdo de amiloplastos nas células parenquimáticas da região distal onde se encontra o meristema apical caulinar (Figura 26 A), bem como na região proximal destas estruturas em sete, das oito microplantas analisadas (Figura 26 B). Os amiloplastos observados apresentaram-se comumente agrupados e com a coloração cinza clara ou escura (Figuras 26 A, B). Resultados semelhantes foram observados com as plântulas do grupo BI, as quais também apresentaram elevado conteúdo amiláceo em ambas as regiões distal e proximal das bases caulinares em todas as amostras analisadas (Tabela 3 e Figuras 26 C, D).

A reação para amido foi positiva em todas as bases caulinares das plântulas (grupo BI) seccionadas longitudinalmente (Tabela 3), evidenciando elevado conteúdo de amiloplastos nas células parenquimáticas da região distal (Figuras 26 A-D), bem como na região proximal destas estruturas em sete, das oito microplantas analisadas (Figuras 26 E, F). Os amiloplastos

observados apresentaram-se agrupados ou isolados e com a coloração cinza clara ou escura (Figuras 26 E, F).

Na extremidade proximal foliar (bainha), tanto interna, quanto externa, na região distal das amostras analisadas em ambos os grupos (A e BI) não foram detectados.

Tabela 3 - Valores qualitativos atribuídos de acordo com a intensidade das respostas aos testes histoquímicos aplicados à detecção de amido, lipídeos, proteínas totais e compostos fenólicos em secções transversais realizadas no terço mediano de raízes de microplantas do grupo A e de plântulas do grupo BI de *B. gasipaes* (GA= grupo A e GBI= grupo BI)

Repetições	Substâncias ergásticas							
	amido		lipídeos totais		proteínas totais		compostos fenólicos	
	GA	GBI	GA	GBI	GA	GBI	GA	GBI
R1	+++	+++	+++	++	-	+	+	+++
R2	+++	+++	+++	++	-	-	+	+++
R3	+++	+++	+++	++	-	-	+	+++
R4	+++	+++	+++	++	+++	-	+	+++
R5	+++	+++	+++	++	-	+	+	+++
R6	+++	+++	+++	++	+++	-	+	+++
R7	-	+++	+++	++	-	-	+	+++
R8	+++	+++	-	++	-	-	+	+++

Ausente (-), reduzido (+), moderado (++), elevado (+++).

Figura 26 - Fotomicrografias de secções longitudinais das bases caulinares de microplantas do grupo A (A e B) e de plântulas do grupo BI (C e D) de *B. gasipaes* coradas com reagente de Lugol para detecção de amido. A. Região distal em microplanta do grupo A, destacando o elevado conteúdo de amiloplastos agrupados nas células parenquimáticas. B. Detalhe da região proximal em microplanta do grupo A evidenciando elevado conteúdo de amiloplastos nas células parenquimáticas. C. Região distal em plântula do grupo BI, destacando o elevado conteúdo de amiloplastos isolados ou agrupados no interior das células parenquimáticas. D. Detalhe da região proximal em plântula do grupo BI evidenciando elevado conteúdo de amiloplastos agrupados ou isolados no interior das células parenquimáticas. Setas vermelhas = amiloplastos. Figuras A, B e D: Barras = 10 µm; Figura C: Barra = 50 µm

Os testes histoquímicos para detecção de lipídeos totais efetuados nestas estruturas com o emprego do reagente Sudan black B foi positivo para sete, das oito microplantas do grupo A analisadas (Tabela 3), onde observou-se elevado conteúdo de elaioplastos (coloração preta) com pequenas dimensões no interior das células parenquimáticas e pré-procambiais (CPPs) localizadas na região distal (Figura 27 A), exceto nas células iniciais meristemáticas do ápice caulinar, e a elevada presença de elaioplastos nas células parenquimáticas da região proximal das bases caulinares analisadas (Figura 27 B). Quando o teste foi aplicado em plântulas do grupo BI, os resultados foram similares àqueles obtidos nas microplantas do grupo A, com presença de lipídeos nas células dos traços procambiais em processo de diferenciação em elementos vasculares e localizados na região proximal destas bases caulinares, no entanto, o conteúdo de elaioplastos observados nas células parenquimáticas em ambas as regiões distal e proximal foi discretamente inferior para as plântulas (grupo BI), os

quais também apresentaram maiores dimensões (Tabela 3 e Figuras 27 C, D). De forma similar ao observado para as microplantas do grupo A, não foi detectada esta substância ergástica nas células iniciais meristemáticas do ápice caulinar e o teste foi negativo na extremidade proximal das bainhas foliares, tanto internas, quanto externas, na região distal das amostras dos grupos A e BI.

Figura 27 - Fotomicrografias de secções longitudinais das bases caulinares de microplantas do grupo A (A e B) e de plântulas do grupo BI (C e D) de *B. gasipaes* coradas com Sudan black B para detecção de lipídeos totais. A. Região distal em microplanta do grupo A, destacando o elevado conteúdo de elaioplastos nas células parenquimáticas e nos traços de cordões de CPPs. B. Detalhe da região proximal em microplanta do grupo A evidenciando elevado conteúdo de elaioplastos nas células parenquimáticas. C. Região distal em plântula do grupo BI, destacando a presença moderada de elaioplastos intracelulares no tecido parenquimático. D. Detalhe da região proximal em plântula do grupo BI evidenciando a presença moderada de elaioplastos intracelulares no tecido parenquimático e traços de procâmbio. TPP = Traços de cordões de células Pré-Procambiais; TP = Traços de células Procambiais; setas vermelhas = elaioplastos. Figuras A e D: Barras = 100 μ m; Figuras B e C: Barras = 50 μ m

As análises efetuadas para detecção de proteínas totais nas regiões distal e proximal das bases caulinares com o reagente Aniline blue black (Figuras 28 A-H) foi positivo apenas para duas microplantas do grupo A (Tabela 3) e localizadas nas bainhas foliares externas e internas da região distal das bases caulinares (Figura 28 A). Na região proximal destas bainhas mais externas, verificou-se elevado conteúdo de proteinoplastos, bem como estruturas protéicas filamentosas aglomeradas no interior das células parenquimáticas, no entanto, nas

células parenquimáticas localizadas da região proximal das bainhas mais internas, observou-se apenas a ocorrência destas estruturas protéicas filamentosas aglomeradas no interior das células parenquimáticas e procambiais (Figura 28 A). Cabe salientar que, como o núcleo e/ou citoplasma de todas as células iniciais meristemáticas reagiram positivamente ao Aniline blue black, bem como aquelas presentes no citoplasma e/ou paredes celulares das CPPs e das células procambiais (Figura 28), considerou-se como resultado positivo para fins estatísticos apenas a presença de proteinoplastos ou outras estruturas protéicas. A presença reduzida dos proteinoplastos intracelulares nos traços de células procambiais da região proximal da base caulinar em uma única microplanta do grupo A (Figura 28 D) também não foi considerada para fins estatísticos.

A aplicação do teste nas regiões distal e proximal das bases caulinares de plântulas do grupo BI foi positivo apenas para duas, das oito amostras analisadas (Tabela 3), as quais evidenciaram reduzido conteúdo protéico nas células epidérmicas e parenquimáticas localizadas na região proximal das bainhas foliares mais externas (Figura 28 E) e nas células meristemáticas apicais caulinares, nas células parenquimáticas e nos traços de cordões de CPPs, localizadas na região distal das bases caulinares. (Figuras 28 F-G). Não foram detectados proteinoplastos na região proximal das bases caulinares nas plântulas analisadas (Tabela 3 e Figura 28 H).

Figura 28 - Fotomicrografias de secções longitudinais das bases caulinares de microplantas do grupo A (A-D) e de plântulas do grupo BI (E-H) de *B. gasipaes* coradas com Aniline blue black para a detecção de proteínas totais. A. Elevada presença de estruturas protéicas filamentosas em células parenquimáticas na região proximal das bainhas foliares mais internas em microplanta do grupo A. B. Ausência de proteinoplastos nas células iniciais meristemáticas do ápice caulinar, na região distal em microplanta do grupo A. C. CPPs na região distal em microplanta reagindo negativamente à aplicação do corante Aniline blue black. D. Região proximal da base caulinar em microplanta (grupo A) com esparsos proteinoplastos. E. Região proximal das bainhas foliares mais externas e internas em plântula do grupo BI com destaque à presença de reduzida de proteinoplastos nas células epidérmicas e parenquimáticas das bainhas foliares mais externas. F. Região distal em plântula do grupo BI com reduzida presença de proteinoplastos nas células iniciais meristemáticas do ápice caulinar. G. Proteinoplastos localizados nas células parenquimáticas e procambiais na região distal em plântulas do grupo BI. H. Região proximal em plântula (grupo BI) isenta de proteinoplastos. Nu = Núcleo; MAC = Meristema Apical Caulinar; TPP = Traços de cordões de células Pré-Procambiais; TP = Traços de células Procambiais; Ep = Epiderme; RPBI = Região Proximal das Bainhas mais internas; RPBE = Região Proximal das Bainhas mais externas; setas azuis = proteinoplastos; setas vermelhas = conteúdo protéico no citoplasma e/ou núcleo; setas pretas = amiloplastos. Figuras A-E: Barras = 10 µm; Figuras F-H: Barras = 50 µm

Ambas as regiões distal e proximal em todas as bases caulinares das microplantas (grupo A) analisadas evidenciaram a presença reduzida de compostos fenólicos para o reagente Cloreto férrico, evidenciado pela tonalidade marrom clara a escura nas células positivas para esta substância (Tabela 3 e Figuras 29 A-C), enquanto que as plântulas do grupo BI apresentaram elevada presença em ambas as regiões e em todas as bases caulinares analisadas (Tabela 3 e Figuras 29 D-F).

Na região distal das microplantas (grupo A), os compostos fenólicos somente foram observados no interior das células dos traços de cordões de CPPs e localizados nas paredes secundárias (Figura 29 A), ao passo que na região proximal estas substâncias ergásticas foram frequentemente detectadas nas células parenquimáticas da periferia das bases caulinares e na base das bainhas foliares externas, evidenciando um intenso processo oxidativo nas células desta região (Figura 29 C). Nas regiões distal e proximal das bases caulinares das plântulas do grupo BI, os compostos fenólicos depositaram-se nas paredes celulares e no interior das células parenquimáticas, e nas paredes celulares dos traços de cordões de células procambiais (Figura 29 D), os quais também evidenciaram intensa deposição nas células do metaxilema (Figura 29 D). Tanto as células parenquimáticas localizadas na periferia das bases caulinares, bem como os tecidos das bainhas foliares externas das plântulas deste grupo evidenciaram um reduzido processo oxidativo, sendo os compostos fenólicos identificados, particularmente, nas paredes celulares (Figura 29 F).

Figura 29- Fotomicrografias de secções longitudinais das bases caulinares de microplantas do grupo A (A-C) e de plântulas do grupo BI (D-F) de *B. gasipaes* coradas com Cloreto férrico para a detecção de compostos fenólicos. A. Região distal em microplanta do grupo A, destacando a presença reduzida de fenóis nos traços de cordões de CPPs. B. Detalhe de células parenquimáticas na região proximal em microplanta (grupo A), negativa para o teste histoquímico aplicado. C. Elevado conteúdo fenólico em células parenquimáticas da bainha foliar externa na região proximal da microplanta (grupo A). D. Região distal em plântula do grupo BI com elevada presença de compostos fenólicos nos traços de cordões de células procambiais e nas paredes celulares das células parenquimáticas. E. Região proximal em plântula (grupo BI) evidenciando elevado conteúdo fenólico nas paredes celulares das células parenquimáticas e nos traços de cordões de células procambiais. F. Forte reatividade das células parenquimáticas localizadas na periferia da região proximal em plântula do grupo BI. TTP = Traços de cordões de células Pré-Procambiais; TP = Traços de cordões de células Procambiais; seta preta = compostos fenólicos em CPPs; setas azuis = conteúdo fenólico nas paredes celulares; setas vermelhas = compostos fenólicos intracelulares; setas verdes = conteúdo fenólico nas células em processo de diferenciação em metaxilema; setas cor-de-rosa = amiloplastos. Figuras A e B: Barras = 50 μ m; Figuras C e F: Barras = 10 μ m; Figuras D e E: Barras = 100 μ m

4.1.3.4 Substâncias ergásticas – análise estatística

As análises comparativas entre as microplantas do grupo A e as plântulas do grupo BI de *B. gasipaes* para os resultados obtidos com os testes histoquímicos aplicados à detecção de substâncias ergásticas nas folhas, nas raízes e nas bases caulinares contendo o meristema apical estão contidas na figura 30. Os ANEXOS A, B e C discriminam a obtenção dos valores das medianas para estas estruturas e originados da escala qualitativa ordinal atribuída à intensidade de resultados observados nas folhas, raízes e bases caulinares de ambos os grupos e classificados como 1= negativo (-), 2 = reduzido (+), 3 = moderado (++) e 4 = elevado (+++).

Para o amido, o teste de Wilcoxon-Mann-Whitney detectou diferenças significativas ($P \leq 0,001$) entre os grupos A e BI somente nas folhas, sendo não significativo nas raízes e bases caulinares (Figura 30). Em relação aos lipídios totais, as diferenças foram significativas em todas as estruturas avaliadas ($P \leq 0,001$) (Figura 30), ao passo que para as proteínas totais, não houve diferenças entre grupos (Figura 30). O teste também detectou diferenças significativas nas folhas ($P \leq 0,01$), nas raízes ($P \leq 0,05$) e nas bases caulinares ($P \leq 0,001$) para a presença de compostos fenólicos (Figura 30).

Detectou-se maior presença de amido nas folhas das plântulas do grupo BI em relação às microplantas do grupo A, no entanto, maior presença de lipídeos totais e de compostos fenólicos foi observada nestas estruturas em microplantas do grupo A quando comparados às plântulas do grupo BI (Figura 30). Quanto às proteínas totais, as análises não detectaram esta substância ergástica nas folhas, nas raízes e nas bases caulinares em ambos os grupos analisados, sendo que nas estruturas radiculares, o amido também esteve ausente para os grupos A e BI (Figura 30). Ainda em relação às estruturas radiculares, a presença de lipídeos totais e de compostos fenólicos foi maior para as microplantas do grupo A quando comparado com as plântulas do grupo BI (Figura 30).

Nas bases caulinares de ambos os grupos (A e BI) observou-se elevada presença de amido, enquanto que para os lipídeos totais, as microplantas do grupo A também evidenciaram elevada presença desta substância ergástica, mas discretamente superior em relação às plântulas do grupo BI, nas quais a presença de lipídeos totais foi moderada (Figura 30). Finalmente, para os compostos fenólicos, observou-se maior presença desta substância ergástica nas plântulas do grupo BI em relação ao observado para as microplantas do grupo A (Figura 30).

Figura 30 - Análises comparativas entre as microplantas do grupo A (A) e as plântulas do grupo BI (BI) de *B. gasipaes* para os resultados obtidos com os testes histoquímicos aplicados à detecção de amido (AM), lipídeos totais (LT), proteínas totais (PT) e compostos fenólicos (CF) nas folhas, nas raízes e nas bases caulinares contendo o meristema apical. Os valores das medianas foram obtidos da escala qualitativa ordinal atribuída à intensidade de resultados observados nas folhas, raízes e bases caulinares de ambos os grupos e classificados como 1= negativo (-), 2 = reduzido (+), 3 = moderado (++) e 4 = elevado (+++). ns = não significativo, * = $P \leq 0,05$ (significativo 5%), ** = $P \leq 0,01$ (significativo 1%) e *** = $P \leq 0,001$ (significativo 0,1%) para a prova não paramétrica de Wilcoxon-Mann-Whitney

4.1.4 Análise ultraestrutural

4.1.4.1 Folhas

As análises ultraestruturais das secções transversais realizadas no tecido parenquimático do mesofilo em microplantas de *B. gasipaes* com oito anos em cultivo *in vitro* (grupo A) evidenciaram a ocorrência do processo de MCP (Figuras 31 A-E) em todas as amostras analisadas. Com frequência observou-se nas células em estádios iniciais do processo de MCP a presença de plastoglóbulos osmiofílicos no interior dos cloroplastos, intensa desorganização estrutural destas organelas e a ausência de conteúdo amiláceo, tanto nos cloroplastos íntegros, como naqueles em processo degenerativo, a retração da membrana plasmática, a degeneração de peroxissomos e mitocôndrias, bem como a presença de núcleo com intensa condensação da cromatina, adjacente ou não à carioteca (Figuras 31 A, B, C). Em todas as amostras foliares destas microplantas (grupo A), a presença de peroxissomos foi consideravelmente inferior em relação às mitocôndrias, (Figura 31 C) e todos os núcleos apresentaram-se disformes e alongados, no entanto, em estádios mais avançados do processo de MCP, evidenciou-se o rompimento da carioteca, promovendo o extravasamento do material nuclear, a ruptura do tonoplasto, com subsequente liberação de enzimas responsáveis pela degeneração do conteúdo citoplasmático (Figuras 31 C, D, E) e a presença de paredes celulares em processo degenerativo, caracterizado pela presença discreta de fenóis,

particularmente na lamela média (Figuras 31 C, E). Estes eventos promoveram a ampliação dos espaços intercelulares no mesofilo em todas as amostras analisadas.

Salienta-se que, com frequência, foi observada a presença de vesículas grandes com vesículas menores internas no vacúolo destas células parenquimáticas das microplantas do grupo A (Figura 31 B).

Distintamente das análises ultraestruturais efetuadas nas microplantas do grupo A (Figuras 31 A-E), todas as células parenquimáticas do mesofilo das plântulas estabelecidas e mantidas *in vitro* por um ano (grupo BI) evidenciaram a presença de células íntegras, sem a ocorrência do processo de MCP (Figuras 31 F-J) e, de forma similar ao observado para as amostras analisadas em microplantas do grupo A, não detectou-se conteúdo amiláceo no interior dos cloroplastos ou no citoplasma destas células parenquimáticas (Figuras 31 A-E), no entanto, houve uma eventual ocorrência de plastoglóbulos no interior destas organelas (Figura 31 A). Não observou-se a deposição de fenóis nas paredes celulares das amostras das plântulas (grupo BI) analisadas (Figuras 31 A-E).

Figura 31 - Eletromicrografias de transmissão de secções transversais realizadas no tecido parenquimático do mesofilo em microplantas do grupo A (A-E) e plântulas do grupo BI (F-J) de *B. gasipaes*. A. Plastoglóbulo osmiofílico no interior do cloroplasto. B. Cloroplasto em processo degenerativo, retração da membrana plasmática e presença de vesículas grandes com vesículas menores internas no vacúolo. C. Célula em estágio inicial do processo de MCP, com degeneração do núcleo, das mitocôndrias e dos peroxissomos. Destaca-ser a retração da membrana plasmática, a condensação da cromatina adjacente à carioteca e a presença de fenóis nas paredes celulares e na lamela média. D. Degeneração do cloroplasto e do núcleo com rompimento da carioteca e extravasamento do material nuclear em estádios mais avançados do processo de MCP. E. Detalhe de célula em estágio avançado do processo de MCP, com a ruptura do tonoplasto, a degeneração das paredes celulares e a discreta deposição de fenóis nestas estruturas e na lamela média. F-J. Células parenquimáticas normais do mesofilo de plântulas do grupo BI, com ausência do processo de MCP. Destaque para a integridade da carioteca em J. Cl = Cloroplastos; Cili = Cloroplastos íntegros; PC = Parede Celular; Ci = Citoplasma; Ve = Vesículas; LM = Lamela Média; Pe = Peroxisomo; Mi = Mitocôndria; N = Núcleo; Nu = Nucléolo; V = Vacúolo; To = Tonoplasto; He = Heterocromatina; Eu = Eucromatina; Ca = Carioteca. setas amarelas = plastoglóbulo osmiofílico; setas azuis = retração da membrana plasmática; seta vermelha = membrana plasmática íntegra; setas brancas = substâncias fenólicas; setas verdes = rompimento da carioteca; seta laranja = ruptura do tonoplasto; seta preta = degeneração do citoplasma; asteriscos brancos = condensação da cromatina. Figuras A, E e F: Barras = 1 µm; Figuras B, C, D, G e I: Barras = 2 µm; Figuras H e J: Barra = 0,5 µm

4.1.4.2 Raízes

As análises ultraestruturais das secções transversais realizadas no tecido parenquimático cortical interno do terço mediano em raízes de microplantas de *B. gasipaes* com oito anos em cultivo *in vitro* (grupo A) evidenciaram a ocorrência do processo de MCP nas células deste tecido (Figuras 32 A-E) em todas as amostras analisadas, nas quais identificou-se o transporte de vesículas entre o citoplasma e o vacúolo partir da invaginação do tonoplasto (Figura 32 A), a ruptura do tonoplasto, a degeneração de amiloplastos e a intensa condensação da cromatina nuclear na periferia e adjacente à carioteca, antes mesmo da ruptura do tonoplasto, em estádios iniciais do processo de MCP (Figuras 32 B, C, D). No entanto, a presença de mitocôndrias em processo degenerativo, as quais apresentaram pronunciado desarranjo das cristas (Figuras 32 D, E) e a retração da membrana plasmática (Figura 32 E) foram eventos comumente detectados nestas células em estádios mais avançados do processo de MCP e após a ruptura do tonoplasto (Figura 32 B). Durante estes estádios finais, também observou-se a ocorrência de vesículas contendo vestígios citoplasmáticos em processo degenerativo (Figuras 32 D, E), algumas originadas a partir da extensa retração da membrana plasmática (Figura 32 E). Posteriormente, estas vesículas se romperam, liberando o seu conteúdo para o interior da célula (Figura 32 E), característico do processo de autólise. Além disso, de forma similar ao observado nas células do mesofilo das microplantas deste grupo (A) (Figura 31 C) a presença de peroxissomos foi inferior em relação às mitocôndrias, sendo que ambos foram observados em processo degenerativo (Figuras 32 D, E) e, com frequência, observou-se a deposição de substâncias fenólicas nas paredes celulares nas células em vias do processo de MCP (Figuras 32 A, B).

As análises ultraestruturais efetuadas no tecido parenquimático cortical interno do terço mediano em raízes das plântulas estabelecidas e mantidas *in vitro* por um ano (grupo BI) não evidenciaram células em vias do processo de MCP (Figuras 32 F-J), a presença de amiloplastos ou de fenóis nas paredes celulares, no entanto, a presença de cloroplastos foi comumente observada nestas células (Figuras 32 F, G).

Figura 32 - Eletromicrografias de transmissão de secções transversais realizadas no tecido parenquimático cortical interno das raízes de microplântulas do grupo A (A-E) e plântulas do grupo BI (F-J) de *B. gasipaes*. A. Transporte de vesículas entre o citoplasma e o vacúolo a partir da invaginação do tonoplasto. B. Células em microplântula do grupo A em processo de MCP, destacando o rompimento do tonoplasto e a degeneração de amiloplastos em estádios iniciais deste evento. C. Núcleo de uma célula em vias iniciais do processo de MCP com a cromatina condensada e adjacente a carioteca. D. Degeneração de amiloplastos e mitocôndrias em estádios mais avançados do processo de MCP. E. Estádios mais avançados do processo de MCP destacando a ocorrência de vesícula originária da extensa retração da membrana plasmática. F-J. Células parenquimáticas corticais internas das raízes de plântulas do grupo BI normais, sem a ocorrência do processo de MCP, com membrana plasmática e organelas íntegras e de núcleos sem condensação da cromatina. PC = Paredes Celulares; Ci = Citoplasma; To = Tonoplasto; Mi = Mitocôndrias; V = Vacúolo; Am = amiloplastos; Ve = Vesículas; LM = Lamela média; Ca = Carioteca; N = Núcleo; Nu = Nucléolo; He = Heterocromatina; Eu = Eucromatina; EI = Espaço Intercelular. Setas cor-de-rosa = degeneração de amiloplastos; setas azuis = retração da membrana plasmática; setas vermelhas = membrana plasmática íntegra; setas brancas = substâncias fenólicas; setas laranja = ruptura do tonoplasto; seta preta = vestígios citoplasmáticos; seta verde = ruptura da membrana plasmática; asterisco branco = cromatina condensada. Figuras A, C, G, H, I e J: Barras = 1 µm; Figuras B, D, E e F: Barras = 2 µm

4.1.4.3 Bases caulinares

As análises ultraestruturais das secções longitudinais realizadas no tecido parenquimático localizado na região distal das bases caulinares de microplantas de *B. gasipaes* do grupo A evidenciaram a ocorrência do processo de MCP nas células deste tecido (Figuras 33 A-E) em todas as amostras analisadas. Nesta região, a presença de peroxissomos foi inferior às mitocôndrias e evidenciados em processo degenerativo no citoplasma, antes mesmo da ruptura do tonoplasto (Figura 33 A), salientando-se que também foram detectadas células com núcleos em processo degenerativo antes mesmo desta membrana se romper. Após a ocorrência da ruptura do tonoplasto (Figuras 33 B, C e D), detectou-se a elevada presença de amiloplastos e de mitocôndrias em processo degenerativo (Figuras 33 B, D), a condensação da cromatina nuclear, as quais apresentaram disposição periférica e adjacente à carioteca (Figura 33 C), a deposição de fenóis durante o processo de degeneração da parede celular (Figura 33 D), a retração e degeneração da membrana plasmática (Figuras 33 C, D).

Numerosas vesículas foram observadas no citoplasma ou dispersas no conteúdo vacuolar nestas células durante este evento, com origem a partir da invaginação da membrana plasmática (Figuras 33 A, C), as quais, no final do processo de MCP apresentaram vestígios citoplasmáticos em seu conteúdo (Figura 33 E).

As análises ultraestruturais efetuadas no tecido parenquimático localizado na região distal das bases caulinares das plântulas estabelecidas e mantidas *in vitro* por um ano (grupo BI) não evidenciaram células em vias do processo de MCP (Figuras 33 F-J), no entanto observou-se a presença de numerosos amiloplastos em processo degenerativo no conteúdo vacuolar (Figuras 33 F, H), a elevada incidência de compostos fenólicos nas paredes celulares (Figuras 33 G-I) e o transporte de vesículas entre o conteúdo citoplasmático e o conteúdo vacuolar (Figuras 33 G, H), com origem a partir da invaginação do tonoplasto (Figura 33 G).

Figura 33 - Eletromicrografias de transmissão de seções transversais realizadas no tecido parenquimático localizado na região distal das bases caulinares em microplantas do grupo A (A-E) e plântulas do grupo BI (F-J) de *B. gasipaes*. A. Células em microplanta do grupo A em vias iniciais do processo de MCP com a presença de peroxissomos em processo degenerativo e o transporte de vesículas entre o citoplasma e o vacúolo. B. Degeneração de mitocôndrias e amiloplasto após a ruptura do tonoplasto. C. Núcleo com pronunciada condensação periférica da cromatina. Destaca-se a presença de numerosas vesículas oriundas da retração da membrana plasmática. D. Degeneração mitocondrial e da parede celular, com ruptura do tonoplasto. E. Grande vesícula em célula ao final do processo de MCP. F-J. Células normais em plântulas do grupo BI sem a ocorrência do processo de MCP, com membrana plasmática e organelas íntegras e de núcleos sem condensação da cromatina. Destaca-se a presença de numerosos amiloplastos em processo degenerativo, o transporte de vesículas a partir da invaginação do tonoplasto e a intensa deposição de fenóis nas paredes celulares. PC = Pared Celular; Ci = Citoplasma; To = Tonoplasto; Mi = Mitocôndrias; V = Vacúolo; Am = amiloplastos; Ve = Vesículas; LM = Lamela média; Ca = Carioteca; N = Núcleo; Nu = Nucléolo; He = Heterocromatina; Eu = Eucromatina; EI = Espaço Intercelular. Setas laranjas = ruptura do tonoplasto; setas azuis = retração da membrana plasmática; setas vermelhas = membrana plasmática íntegra; setas brancas = substâncias fenólicas; seta preta = vestígios citoplasmáticos; asterisco branco = cromatina condensada. Figuras A e D: Barras = 1 µm; Figuras B, C, F, G, H, I e J: Barras = 2 µm; Figura E: Barra = 0,5 µm

De forma similar ao observado na região distal das bases caulinares das microplantas do grupo A (Figuras 33 A-E), as análises ultraestruturais das secções longitudinais realizadas no tecido parenquimático localizado na região proximal das bases caulinares destas microplantas (grupo A) também evidenciaram a ocorrência do processo de MCP (Figuras 34 A-E). Durante todos os estádios deste evento observou-se a retração da membrana plasmática, a presença de fenóis nas paredes celulares, a degeneração do núcleo e das numerosas mitocôndrias observadas, os quais, muitas vezes, apresentaram-se estruturalmente alongados e disformes, sendo que a ocorrência de peroxissomos foi escassa. (Figuras 34 A-E). Independente do estádio do processo de MCP observou-se o transporte direto de vesículas entre a parede celular e o conteúdo vacuolar disperso no interior da célula após a ruptura do tonoplasto, os quais originaram-se da invaginação da membrana plasmática (Figuras 34 B-E), no entanto, em estádios mais avançados deste evento, detectou-se o processo degenerativo simultâneo da membrana plasmática e da parede celular (Figura 34 C).

Para as plântulas estabelecidas e mantidas *in vitro* por um ano (grupo BI), as análises ultraestruturais efetuadas nas células parenquimáticas desta região proximal não evidenciaram células em vias do processo de MCP (Figuras 34 F-J), no entanto, observou-se numerosos amiloplastos em processo degenerativo no conteúdo vacuolar (Figuras 34 F, G), a elevada incidência de compostos fenólicos nas paredes celulares (Figuras 34 F, G, I) e o transporte de vesículas entre o conteúdo citoplasmático e o conteúdo vacuolar com origem a partir da invaginação do tonoplasto (Figura 34 F).

Figura 34 – Eletromicrografias de transmissão de secções transversais realizadas no tecido parenquimático localizado na região proximal das bases caulinares em microplantas do grupo A (A-E) e de plântulas do grupo BI (F-J) de *B. gasipaes*. A e B. Células em vias iniciais do processo de MCP em microplantas do grupo A com destaque à degeneração das organelas, do núcleo, a deposição de fenóis nas paredes celulares e o transporte de vesículas originárias da invaginação da membrana plasmática. C e D. Células em estádios mais avançados do processo de MCP, com organelas em degeneração após a ruptura do tonoplasto. Destaque ao transporte de vesículas originárias da invaginação da membrana plasmática e a presença de fenóis. E. Degeneração de amiloplastos e presença de núcleo disforme após a ruptura do tonoplasto. F-J. Células normais em plântulas do grupo BI, sem a ocorrência do processo de MCP, com membrana plasmática e organelas íntegras e de núcleos sem condensação da cromatina. Destaca-se a presença de numerosos amiloplastos em processo degenerativo, o transporte de vesículas a partir da invaginação do tonoplasto e a deposição de fenóis nas paredes celulares. PC = Parede Celular; Ci = Citoplasma; To = Tonoplasto; Mi = Mitocôndrias; V = Vacúolo; Am = amiloplastos; Ve e setas pretas = Vesículas; LM = Lamela média; Ca = Carioteca; N = Núcleo; Nu = Nucléolo; He = Heterocromatina; Eu = Eucromatina; EI = Espaço Intercelular. Setas laranja = ruptura do tonoplasto; setas azul-escuras = retração da membrana plasmática; seta azul-clara = degeneração da parede celular e das membranas plasmática e vacuolar; setas verdes = invaginação da membrana plasmática; setas vermelhas = membrana plasmática íntegra; setas brancas = substâncias fenólicas; asterisco branco = cromatina condensada. Figuras A, B, F-J: Barras = 2 µm; Figuras C e D: Barras = 1 µm; Figura E: Barra = 0,5 µm

4.2 Detecção do processo de habituação (microplantas do grupo A vs plântulas do grupo BII)

4.2.1 Análise morfofisiológica

As análises morfofisiológicas efetuadas em microplantas do grupo A evidenciaram número médio de 3,75 folhas.microplanta⁻¹ (Tabela 2), sendo que três das oito microplantas analisadas apresentaram uma ou duas folhas com sintomas de senescência, caracterizada pela presença de áreas cloróticas de coloração parda nas lâminas foliares das pinas expandidas (Figuras 35 C, D). As demais microplantas analisadas evidenciaram folhas morfológicamente normais (Figuras 35 A, B, E).

O número médio de raízes observado por microplanta foi de 6,13 (Tabela 1), com comprimento médio.microplanta⁻¹ de 0,47 a 2,33 cm.microplanta⁻¹ (Tabela 4, ANEXO D), as quais apresentaram-se, em sua maioria, morfológicamente finas e ramificadas (cinco microplantas) ou grossas e não ramificadas (três microplantas) (Tabela 4). Em relação ao comprimento da parte aérea, obteve-se uma média de 10,1 cm.microplanta⁻¹ e o número médio de propágulos emitidos foi de 1,25 propágulos.microplanta⁻¹ (Tabela 4), sem a evidência de embriões somáticos. Todas as microplantas analisadas apresentaram oxidação da extremidade proximal da região basal caulinar, compreendendo a região de emergência radicular às bainhas foliares externas mais velhas (Figuras 35 A, B, C, E).

Tabela 4 - Médias reais do número de folhas (NF), comprimento da parte aérea (CPA) (cm), número de propágulos (NP), do número de raízes (NR), do comprimento radicular (CR) (cm) e caracterização do tipo morfológico radicular (TMR) com a presença ou ausência de ramificação para as microplantas de *B. gasipaes* com oito anos de cultivo *in vitro* (grupo A)

Repetições	NF	CPA	NP	NR	*CR	TMR	Ramificação
R1	5,00	15,00	2,00	6,00	0,47	F	Presente
R2	5,00	12,50	2,00	7,00	1,36	F	Presente
R3	4,00	6,50	1,00	3,00	2,33	G	Ausente
R4	6,00	9,00	1,00	4,00	0,93	G	Ausente
R5	2,00	8,50	1,00	3,00	1,17	G	Ausente
R6	3,00	9,00	1,00	9,00	1,35	F	Presente
R7	3,00	10,50	1,00	8,00	1,44	F	Presente
R8	2,00	9,50	1,00	9,00	1,00	F	Presente
*Média	3,75	10,06	1,25	6,13	**1,26	-	-
DP	± 1,48	± 2,62	± 0,46	± 2,53	± 0,53	-	-

*Médias.microplanta⁻¹; **Média geral observada

F = Finas; G = Grossas; DP = Desvio Padrão.

Figura 35 - A-D. Microplantas de *B. gasipaes* estabelecidas e cultivadas *in vitro* por oito anos (grupo A) e submetidas a dois subcultivos anuais em meio de cultura acrescido de ANA e BAP, evidenciando o desenvolvimento de estruturas foliares morfológicamente normais ou com sintomas de senescência (setas vermelhas) e o desenvolvimento de raízes morfológicamente finas e ramificadas (setas pretas) ou grossas e isentas de ramificação (seta verde). Observar a reduzida presença de propágulos (seta azul) e a característica oxidação da extremidade proximal da região basal caulinar, compreendendo a região de emergência radicular às bainhas foliares externas mais velhas (setas laranja). Figuras A-E: Barras = 0,5 cm

As análises morfofisiológicas efetuadas em plântulas do grupo BII evidenciaram número médio de 1,5 folhas.plântula⁻¹ (Tabela 5), as quais não evidenciaram anomalias (Figura 36) e com comprimento médio da parte aérea de 13,95 cm.plântula⁻¹. Em relação às raízes, o número médio de raízes observado foi de 3,88 raízes.plântula⁻¹, com comprimento médio variando de 1,18 a 5,54 cm.plântula⁻¹ (Tabela 5, ANEXO E) e apenas uma, das oito plântulas analisadas evidenciou-se morfológicamente grossa e isenta de ramificações (Tabela 5, Figura 36 C). As demais apresentaram-se finas e ramificadas (Tabela 5, Figuras 36 A, B, D).

Em relação ao número médio de propágulos observados, somente uma plântula evidenciou este evento fisiológico, com a emissão de apenas uma destas estruturas (média de 0,12 propágulos cm.plântula⁻¹) (Tabela 5, Figura 36 D), sem constatação de embriogênese somática.

A incidência de oxidação na extremidade proximal da região basal caulinar, compreendendo a região de emergência radicular às bainhas foliares externas mais velhas foi escassa entre as plântulas analisadas (Figura 36 C).

Tabela 5 -. Médias reais do número de folhas (NF), comprimento da parte aérea (CPA) (cm), número de propágulos (NP), do número de raízes (NR), do comprimento radicular (CR) (cm) e caracterização do tipo morfológico radicular (TMR) com a presença ou ausência de ramificação para as plântulas de *B. gasipaes* com um ano de cultivo *in vitro* (grupo BII)

Repetições	NF	CPA	NP	NR	*CR	TMR	Ramificação
R1	1,00	13,50	0,00	5,00	2,10	F	Presente
R2	1,00	16,00	0,00	3,00	2,17	F	Presente
R3	4,00	15,00	0,00	6,00	2,05	G	Ausente
R4	1,00	14,80	0,00	5,00	1,18	F	Presente
R5	1,00	12,00	0,00	3,00	1,87	F	Presente
R6	1,00	14,50	1,00	5,00	5,54	F	Presente
R7	2,00	10,00	0,00	3,00	2,33	F	Presente
R8	1,00	15,80	0,00	1,00	3,20	F	Presente
*Média	1,50	13,95	0,12	3,88	**2,55	-	-
DP	± 1,07	± 2,05	± 0,35	± 1,64	± 1,33	-	-

*Médias.plântula⁻¹; **Média geral observada

F = Finas; G = Grossas; DP = Desvio Padrão.

Figura 36 - Plântulas de *B. gasipaes* com um ano de cultivo *in vitro* (grupo BII) e submetidas a dois subcultivos em meio de cultura acrescido de ANA e BAP, evidenciando o desenvolvimento de estruturas foliares morfológicamente normais e o desenvolvimento de raízes morfológicamente finas e ramificadas (setas pretas). Apenas uma plântula evidenciou o desenvolvimento de raízes grossas e isentas de ramificação (seta verde). Um único propágulo foi evidenciado nestas análises (seta azul) e foi escassa a incidência de oxidação na extremidade proximal da região basal caulinar, compreendendo a região de emergência radicular às bainhas foliares externas mais velhas (seta laranja). Figuras A-C: Barras = 0,5 cm

4.2.2 Análise histológica

4.2.2.1 Folhas

Histologicamente, não houve diferença entre as epidermes adaxial e abaxial dos terços medianos foliares seccionados transversalmente nas oito microplantas (grupon A) analisadas, as quais evidenciaram-se isodiamétricas ou discretamente alongadas no sentido periclinal a ambas as superfícies e com moderado grau de cutinização (Figuras 37 A-D). Quando as análises foram efetuadas em plântulas do grupo BII, observou-se que embora as células epidérmicas de ambas as superfícies (adaxial e abaxial) tenham apresentado-se discretamente alongadas no sentido periclinal e pouco cutinizadas (Figuras 37 E, F, H), somente o tecido

epidérmico abaxial apresentou células com dimensões heterogêneas (Figuras 37 F, H). Adicionalmente, as epidermes adaxial e abaxial nas folhas das plântulas (grupo BII) apresentaram células discretamente maiores em relação ao observado para as células dos tecidos correspondentes das microplantas (grupo A) (Figuras 37 B, C, D, F, H).

Ambas as hipodermes adaxial e abaxial foliares das microplantas (grupo A) e das plântulas (grupo BII) apresentaram-se similares, contendo células parenquimáticas com grandes dimensões, paredes celulares primárias delgadas e alongadas periclinalmente (Figuras 37 A-D, E-H), exceto na superfície abaxial adjacente ao feixe vascular central de seis, das oito microplantas (grupo A) analisadas, as quais apresentaram características histológicas de células buliformes (Figura 37 A), fato não detectado em plântulas do grupo BII (Figuras 37 E-H).

O mesofilo das microplantas do grupo A caracterizou-se como homogêneo e constituído por quatro a cinco estratos de células, nos quais, com frequência, foram observados amplos espaços intercelulares resultantes do processo de lise total das células ou parcial, naquelas em vias do processo de MCP, constituindo um parênquima lacunoso (Figuras 37 B-D), fato também observado nas folhas das demais microplantas destinadas às análises histológicas para detectar exclusivamente este tipo de evento (Figuras 8 A-C). Todas as microplantas (grupo A) e plântulas (grupo BII) analisadas evidenciaram mesofilo contendo células clorofilianas com paredes celulares primárias delgadas, isodiamétricas ou discretamente alongadas no sentido periclinal, tornando-as histologicamente similares às células hipodérmicas de ambas as superfícies (Figuras 37 B-D, F-H), no entanto, a presença de cloroplastos íntegros e maiores nas células do mesofilo em plântulas do grupo BII possibilitou a sua distinção com as células hipodérmicas em ambas as superfícies analisadas (Figuras 37 E-H). A presença de cloroplastos íntegros nas plântulas (grupo BII) foi uma característica marcante e distintiva daqueles observados nas microplantas (grupo A), os quais, quando presentes, apresentaram-se disformes e alongados (Figuras 37 B-D, F-H). No mesofilo destas plântulas (grupo BI), também observou-se menor número de estratos celulares (três a quatro) quando comparado com as microplantas do grupo A (Figuras 37 B, F).

Os feixes vasculares colaterais da nervura central (de maior porte) das secções foliares das microplantas do grupo A e das plântulas do grupo BII comumente apresentaram estratos de células esclerenquimáticas (extensões das bainhas esclerenquimáticas) que se estendem, com frequência, até as epidermes adaxial e abaxial, os quais apresentaram sua maior proeminência voltada para a face adaxial (Figuras 37 A, E). Os feixes vasculares menores e anfivasais das microplantas (grupo A) evidenciaram-se centralizados no mesofilo e sem a

presença de extensões fibrosas em ambas as superfícies (Figuras 37 C, D), ao passo que em plântulas (grupo BII) estas estruturas raramente foram detectadas (Figuras 37 E-H). As bainhas dos feixes vasculares anfivasais (Figuras 37 C, D) e colaterais (Figura 37 A) das microplantas (grupo A) evidenciaram células contendo cloroplastos, e observou-se a presença de feixes de fibras avasculares com dimensões reduzidas, centralizados no mesofilo (Figura 37 B), de forma similar ao observado nas secções histológicas das plântulas do grupo BII (Figuras 37 F-H).

Figura 37 - Fotomicrografias de secções transversais do terço mediano de folhas de microplantas do grupo A (A-D) e de plântulas do grupo BII (E-H) de *B. gasipaes*. A. Feixe vascular colateral da nervura central em microplanta do grupo A evidenciando a presença de extensões das bainhas esclerenquimáticas até ambas as epidermes adaxial e abaxial. B, C e D. Mesofilo lacunoso e células epidérmicas e hipodérmicas de ambas as superfícies, discretamente alongadas no sentido periclinal. Destaque à moderada cutinização das células epidérmicas em ambas as superfícies e à presença de cloroplastos disformes e alongados. E. Feixe vascular colateral da nervura central em plântula do grupo BII evidenciando a presença de extensões das bainhas esclerenquimáticas até ambas as epidermes adaxial e abaxial. B, C e D. Detalhe de células epidérmicas e hipodérmicas de ambas as superfícies, discretamente alongadas no sentido periclinal, bem como a presença de cutícula delgada. Ed = Epiderme adaxial; Eb = Epiderme abaxial; Hd = Hipoderme adaxial; Hb = Hipoderme abaxial; Me = Mesofilo; FVC = Feixe Vascular Colateral; FVA = Feixe vascular Anfivascular; Ba = Bainha do feixe; BE = Bainha esclerenquimática; Fi = Fibras; setas verdes = cloroplastos; asteriscos cor-de-rosa = Células hipodérmicas abaxiais com característica de células buliformes; asteriscos vermelhos – lacunas; asteriscos pretos = xilema; asteriscos laranja = floema. Figuras A e E: Barras = 100 µm; Figuras B e F: Barras = 50 µm; Figuras C, D, G e H: Barras = 10 µm

4.2.2.2 Raízes

Nas secções transversais efetuadas no terço mediano radicular das microplantas do grupo A evidenciou-se intenso processo oxidativo e frequente ruptura da epiderme uniestratificada, da camada de células parenquimáticas e da exoderme constituída por dois a três estratos de células moderadamente esclerificadas (Figura 38 A), fato não observado nas secções efetuadas em plântulas do grupo BII (Figura 38 E), no entanto, de forma similar às microplantas (grupo A), observou-se a presença de epiderme uniestratificada e exoderme moderadamente esclerificada, com dois a três estratos de células, destacando-se a presença frequente de uma camada de células parenquimáticas entre a epiderme e a exoderme (Figura 38 E).

As células parenquimáticas do córtex e adjacentes ao esclerênquima (córtex externo) das microplantas do grupo A apresentaram-se histologicamente sem anomalias, com reduzidos espaços intercelulares (Figura 38 A), os quais tornaram-se amplos no córtex mais interno, adjacente ao cilindro vascular, em decorrência ao intenso processo MCP observado em todas as raízes analisadas (Figuras 38 B, C). Este evento também ocorreu nas outras oito microplantas destinadas às análises histológicas visando à detecção exclusiva do processo de MCP (Figura 9 C). A maioria das células parenquimáticas do córtex externo destas microplantas, exceto aquelas em vias do processo de MCP, constituiu-se por paredes celulares primárias delgadas e isodiamétricas, sendo que as localizadas no córtex mais externo evidenciaram dimensões menores em relação àquelas localizadas no córtex mais interno (Figuras 38 A-C). Entretanto, as análises realizadas nas células parenquimáticas corticais externas (córtex externo), adjacentes à exoderme, e nas células corticais internas (córtex interno) e adjacentes à endoderme em plântulas do grupo BII, evidenciaram a ausência de anomalias histológicas, com paredes celulares primárias delgadas e isodiamétricas, porém, com reduzidos espaços intercelulares no córtex externo, os quais tornaram-se amplos no córtex mais interno (Figuras 38 E, F).

Em ambas as microplantas (grupo A) e plântulas (grupo BII), as células da endoderme apresentaram espessamento tanto nas paredes anticliniais, como nas paredes pericliniais interna e externa, constituindo o designado espessamento em ‘O’ deste tecido (Figuras 38 C, G).

Em relação ao sistema de vascularização, o número de pólos de protoxilema observados nas microplantas (grupo A) variou em função do diâmetro radicular e a medula evidenciou-se constituída por células esclerenquimáticas (Figuras 38C, D), ao passo que a maioria das raízes das plântulas (grupo BII) analisadas evidenciaram diâmetro reduzido, particularmente em decorrência ao reduzido número de pólos de protoxilema e a medula

evidenciou-se constituída por poucas células esclerenquimáticas (Figura 38 G, H). No periciclo, estrato mais externo do cilindro vascular, as células apresentaram-se com paredes celulares primárias delgadas, isodiamétricas ou discretamente alongadas no sentido periclinal à superfície radicular, em ambos os grupos analisados (A e BII) (Figura 38 C, G, H).

Nas secções radiculares das microplantas (grupo A) e plântulas (grupo BII) com desenvolvimento de ramificação (raízes laterais) (Figuras 39 A-F), constatou-se que estas originaram-se a partir da atividade meristemática das células deste tecido, com predomínio de divisões periclinais (Figuras 39 B, F). Além disso, em microplantas do grupo A, este evento foi acompanhado de intensa presença de conteúdo amiláceo nas células do córtex interno da raiz primária (Figura 39 C) e no interior das células meristemáticas das raízes laterais em desenvolvimento, as quais apresentaram elevada relação nuclear-citoplasmática (Figura 39 D). No entanto, não detectou-se a presença de plastídeos no interior das células corticais externas e internas da raiz primária (adventícia), bem como no interior das células das raízes laterais em desenvolvimento das plântulas (grupo BII) (Figuras 39 E, F).

Figura 38 - Fotomicrografias de secções transversais do terço mediano de raízes de microplantas do grupo A (A-D) e de plântulas do grupo BII (E-H) de *B. gasipaes*. A. Intenso processo oxidativo na epiderme uniestratificada e nos primeiros estratos celulares do córtex interno em raízes do grupo A. Destaque às células parenquimáticas do córtex interno, que apresentaram-se maiores que aquelas do córtex externo. B. Células parenquimáticas do córtex interno em processo de MCP e ampliação dos espaços intercelulares. C. Endoderme com espessamento das paredes anticlinais e periclinais internas e externas (espessamento em “O”) e periciclo contendo células com paredes primárias delgadas, isodiamétricas ou discretamente alongadas paralelamente à superfície radicular. D. Detalhe da medula contendo células esclerenquimáticas. E. Vista geral de secção radicular em plântula do grupo BII, destacando a presença de células íntegras na epiderme e no córtex externo. F. Células corticais internas com a presença de espaços intercelulares. G. Endoderme com espessamento das paredes anticlinais e periclinais internas e externas (espessamento em “O”) e periciclo contendo células com paredes primárias delgadas, isodiamétricas ou discretamente alongadas paralelamente à superfície radicular. H. Detalhe do cilindro vascular, destacando a medula esclerenquimática constituída por poucas células. Ep = Epiderme; CV = Cilindro Vascular; CE = Córtex Externo; CI = Córtex Interno; EI = Espaço Interceular; Px = Protoxilema; Mx = Metaxilema; FI = Floema; ME = Medula Esclerenquimática; CI = Córtex Interno; retângulo amarelo = exoderme; setas azuis = oxidação; setas cor-de-rosa = retração da membrana plasmática; setas laranja = condensação do núcleo; seta preta = nucléolo; setas verdes = degeneração da parede celular; asterisco vermelho = estrato de células parenquimáticas; asterisco preto = condensação do citoplasma; asteriscos verdes = desenvolvimento de lacunas; asteriscos azuis = endoderme; asteriscos laranja = periciclo. Figuras A e E: Barras = 100 µm; Figuras B-D e F-H: Barras = 10 µm

Figura 39 - Fotomicrografias de secções transversais do terço mediano radicular de microplantas do grupo A (A-D) e de plântulas do grupo BII (E e F) de *B. gasipaes* com desenvolvimento de ramificação (raízes laterais). A. Raiz adventícia de microplanta do grupo A com desenvolvimento de uma raiz lateral. B. Origem da raiz lateral a partir da atividade meristemática das células do periciclo com predomínio de divisões periclinais. C. Amiloplastos intracelulares no córtex interno em raiz adventícia. D. Amiloplastos no interior das células meristemáticas da raiz lateral em desenvolvimento. E. Raiz adventícia de plântula do grupo BII com desenvolvimento de raiz lateral. F. Origem da raiz lateral a partir da atividade meristemática das células do periciclo com predomínio de divisões periclinais. CV = Cilindro Vascular da raiz adventícia; RL = Raiz lateral; Mx = Metaxilema; Px = Protoxilema; setas azuis = amiloplastos; setas laranja = núcleo; setas cor-de-rosa = divisões periclinais das células do periciclo; setas verdes = divisões oblíquas das células pericíclicas; asteriscos cor-de-rosa = córtex interno da raiz adventícia; asteriscos pretos = endoderme; asteriscos laranja = periciclo; asteriscos vermelhos = células meristemáticas. Figuras A e E: Barras = 100 µm; Figuras C, B e D: Barras = 50 µm; Figura F: Barra = 10 µm

4.2.2.3 Bases caulinares

As secções longitudinais efetuadas nas bases caulinares das microplantas estabelecidas e cultivadas *in vitro* por oito anos (grupo A) não evidenciaram a presença de centros meristemáticos na região distal onde se encontra o meristema apical caulinar (Figuras 40 A-C). No entanto, traços de cordões de CPPs foram comumente observados nesta região

(Figuras 40 A, B, D), e constituídos por células com paredes celulares delgadas, alongadas no sentido anticlinal à superfície do meristema apical caulinar (Figuras 40 A, B, D), com predomínio de divisões periclinais e originárias da atividade meristemática das CPPs iniciais localizadas entre a região meristemática apical (que contém as células iniciais) e o tecido meristemático procambial na região distal das bases caulinares seccionadas (Figuras 40 B, D). Da mesma forma que o observado para as células dos traços de cordões de CPPs, as células iniciais destas estruturas apresentaram paredes celulares delgadas, isodiamétricas e com elevada relação nuclear-citoplasmática (Figura 40 D) e originárias das divisões anticlinais das CPPs iniciais meristemáticas localizadas entre a região meristemática apical (que contém as células iniciais) e o tecido meristemático procambial na região distal (Figura 40 A). A atividade meristemática dos traços de cordões de CPPs resultou no desenvolvimento de traços de células procambiais, precursores do sistema de vascularização destas microplantas (Figura 40 A).

Não observou-se o desenvolvimento de centros meristemáticos unipolarizados ou bipolarizados a partir da atividade meristemática das CPPs nestas microplantas (grupo A), respectivamente, característico de processos organogênico e embriogênico somático, evidenciando que estes diferenciaram-se em células procambiais e, posteriormente, em feixes vasculares, os quais foram observados somente na região proximal destas estruturas, em todas as amostras analisadas (Figura 40 A).

Das oito microplantas (grupo A) analisadas, apenas uma apresentou o desenvolvimento de uma única gema adventícia, e localizada na periferia entre as regiões distal e proximal da base caulinar (Figuras 40 A, E). Embora não se tenha observado o processo organogênico inicial, muito provavelmente esta estrutura originou-se da atividade meristemática de traços de células procambiais (Figura 40 A) unipolarizados ou da unipolarização de centros meristemáticos originados a partir da desdiferenciação e transdiferenciação das células parenquimáticas localizadas nesta região. Esta última hipótese aparenta ser menos plausível, uma vez que nenhum centro meristemático foi observado nas secções histológicas efetuadas na região basal caulinar destas microplantas do grupo A.

De forma similar ao observado nas CPPs, as células iniciais meristemáticas do ápice caulinar das microplantas (grupo A) evidenciaram paredes celulares delgadas, isodiamétricas e com elevada relação nuclear-citoplasmática (Figura 40 C), no entanto, esta relação foi inferior em relação ao observado nas células deste tecido em plântulas do grupo BII, pois nestas últimas os núcleos ocuparam a maior parte do volume destas células (Figura 40 H). Em ambos os grupos analisados (grupos A e BII) observou-se que enquanto as CPPs apresentaram

predomínio de divisões anticlinais, as células iniciais meristemáticas do ápice caulinar não caracterizam um padrão típico de divisão celular (Figuras 40 C, H, I). As análises efetuadas na região distal das bases caulinares destas plântulas (grupo BII) (Figuras 40 F-M) também evidenciaram a presença de meristemóides originários de divisões celulares predominantemente periclinais de CPPs presentes em traços de cordões adjacentes ao meristema apical caulinar (Figuras 40 F, G, J). Estes meristemóides, que apresentaram-se circundados por um estrato de células maiores e com menor relação nuclear-citoplasmática circundando estas estruturas (Figura 40 J), foram observados em unipolarização (centros meristemáticos unipolarizados) ou bipolarização (centros meristemáticos bipolarizados) respectivamente característicos dos processos diretos (sem formação de calo) de organogênese adventícia e de embriogênese somática com origem multicelular (Figuras 40 G, I, J). Ainda nesta região, foi observada a presença de CPPs com predomínio de divisões celulares anticlinais, que também deram origem aos traços de procâmbio e subsequentes feixes vasculares ainda nesta região distal das bases caulinares seccionadas (Figuras 40 F, G).

Em ambos os grupos analisados (grupos A e BII) detectou-se o desenvolvimento de raízes adventícias, comumente localizadas na região proximal das bases caulinares e originárias da atividade meristemática das células procambiais, com predomínio de divisões periclinais (Figura 41).

Figura 40 - Fotomicrografias de secções longitudinais das regiões distal e proximal de bases caulinares em microplântulas do grupo A (A-E) e plântulas do grupo BII (F-M) de *B. gasipaes*. A. Vista geral da base caulinar em microplântula do grupo A, destacando a presença de traços de cordões de CPPs e de traços de células procambiais na região distal e de traços de células procambiais em diferenciação em feixes vasculares na região proximal. Destaque ao desenvolvimento de uma gema adventícia na periferia entre as regiões distal e proximal da base caulinar. B. Região meristemática apical caulinar na região distal da base caulinar. C. Detalhe das células iniciais meristemáticas do ápice caulinar em microplântula do grupo A apresentando moderada relação nuclear-citoplasmática. D. Destacando as células iniciais pré-procambiais e as CPPs na região distal destas bases caulinares. E. Detalhe da gema adventícia observada em A. F. Vista geral da base caulinar em plântula do grupo BII, destacando a presença de traços de células procambiais em diferenciação em feixes vasculares em ambas as regiões distal e proximal. G. Detalhe da região meristemática apical caulinar na região distal da base caulinar. H. Células iniciais meristemáticas do ápice caulinar das plântulas (grupo BII) apresentando elevada relação nuclear-citoplasmática. I. Organogênese adventícia originária da unipolarização de um meristemóide (centro meristemático unipolarizado), destacando o predomínio de divisões periclinais. J e K. Detalhes dos eventos morfogênicos evidenciados em F e G com destaque ao desenvolvimento de embriões somáticos no estágio globular por meio da bipolarização de meristemóides (centros meristemáticos bipolarizados). L e M. Região proximal da base caulinar em plântula do grupo BII com traços de células procambiais originando os elementos de vascularização. MAC = Meristema Apical Caulinar; GA = Gema Adventícia; RD = Região Distal; RP = Região Proximal; PF = Primórdios foliares; CPP, setas e linhas tracejadas pretas = Células Pré-Procambiais; CMU = Centro Meristemático Unipolarizado; CP = Células Parenquimáticas; FV = Feixe Vascular; Mx = Metaxilema; setas brancas = feixes vasculares; setas e linhas tracejadas verdes = células iniciais pré-procambiais; seta azul = divisão anticlinal; setas marrom = divisões periclinais; setas cor-de-rosa = meristemóides; setas vermelhas = bipolarização de meristemóides; setas amarelas = estabelecimento dos pólos caulinares e radiculares; asteriscos vermelhos = primórdios foliares mais internos; asteriscos azuis = primórdios foliares mais externos; asteriscos cor-de-rosa = estrato de células externas dos meristemóides. Figuras C, H e I: Barras = 10 µm; Figuras D, J, K e M: Barras = 50 µm; Figuras B, E, G e L: Barras = 100 µm; Figura F: Barra = 0,25 mm; Figura A: Barra = 2 mm

Figura 41 - Fotomicrografias de secções longitudinais da região proximal de bases caulinares em microplantas do grupo A (A e B) e plântulas do grupo BII (C e D) de *B. gasipaes* originando raízes adventícias. A. Raiz adventícia em microplanta do grupo A originária da atividade meristemática das células procambiais. B. Destacando o predomínio de divisões periclinais das células procambiais. C. Raiz adventícia em plântula do grupo BII originária da atividade meristemática das células procambiais. D. Células procambiais com o predomínio de divisões periclinais. RA = Raiz Adventícia; setas cor-de-rosa = traços de células procambiais; setas pretas = divisões periclinais; asterisco vermelho = tecido parenquimático da região proximal das bases caulinares. Figura A: Barra = 1 mm; Figura C: Barra = 100 µm; Figuras B e D: Barras = 50 µm

4.2.3. Análise histoquímica

4.2.3.1 Bases caulinares

O teste histoquímico efetuado nas secções longitudinais das microplantas do grupo A (Figuras 42 A-C, 43 A-F) e plântulas do grupo BII (Figuras 42 D-I, 43 G-L) utilizando a coloração dupla com ácido periódico reativo de Schiff (PAS) e Naphtol blue black evidenciou a presença de proteínas nas células iniciais meristemáticas do ápice caulinar localizadas na região distal destas estruturas, em ambas as microplantas e plântulas (grupos A e BII, respectivamente), no entanto, apenas aquelas presentes nas plântulas (grupo BII) apresentaram amido e polissacarídeos no citoplasma, embora distribuídos de forma consideravelmente discreta (Figuras 42 A, D). Ainda na região distal, as CPPs das microplantas (grupo A) evidenciaram elevado conteúdo protéico e sutilmente inferior ao observado nas CPPs das plântulas (grupo BII), sendo que não se identificou a presença de outras substâncias ergásticas nas células destas estruturas em ambos os grupos analisados (Figuras 42 B, E).

Durante o estabelecimento inicial dos meristemóides e centros meristemáticos em plântulas do grupo BII, os quais se originaram da atividade meristemática das CPPs, observou-se redução do conteúdo protéico e de amido, bem como a presença elevada de polissacarídeos, particularmente no interior das células e nas paredes celulares de células da camada mais externa dos meristemóides (Figuras 42 F-G). De forma similar, as células parenquimáticas adjacentes às CPPs também apresentaram elevada quantidade de polossacarídeos e reduzida de amido (Figuras 42 F-G).

Conforme descrito nas análises histológicas (item 4.2.2.3, Figuras 40 F-K), as CPPs da região distal das bases caulinares das plântulas (grupo BII) atuaram como nichos de células alvo em três distintas vias morfogênicas: como células multipotentes originando feixes vasculares; como pluripotentes originando gemas adventícias (organogênese adventícia) e finalmente como células totipotentes com o desenvolvimento de embriões com origem multicelular (embriogênese somática), caracterizado pela frequente presença de traços de cordões de CPPs bipolarizados (Figuras 42 F, H, I). Os testes histoquímicos evidenciaram que à medida que os meristemóides tornaram-se unipolarizados ou bipolarizados por meio de divisões periclinais das CPPs das plântulas (grupo BII), respectivamente, originando gemas adventícias (centros meristemáticos unipolarizados) e embriões somáticos (centros meristemáticos bipolarizados), ocorreu uma pronunciada redução no conteúdo de polissacarídeos e de amido no interior destas células, ao passo que o conteúdo protéico manteve-se inalterado (Figuras 42 H, I). Os testes histoquímicos evidenciaram ainda a presença elevada de proteínas e reduzida de polissacarídeos intracelulares nos feixes vasculares localizados na região distal das bases caulinares (grupo BII) e elevada presença de substâncias fenólicas nas células em processo de diferenciação de elementos de metaxilema (Figura 42 F).

As secções histológicas da região distal das bases caulinares submetidas ao teste histoquímico em microplantas (grupo A) não evidenciaram eventos morfogênicos relacionados à organogênese adventícia ou embriogênese somática (Figuras 40 A, B, D; 42 A-C). Contudo, detectou-se competência à diferenciação das CPPs em células procambiais, nas quais se observou a elevada presença de proteínas e esparsa deposição de polissacarídeos no interior destas células, que apresentaram-se consideravelmente mais alongadas que as CPPs (Figuras 42 A-C).

Figura 42 - Fotomicrografias de secções longitudinais das regiões distal de bases caulinares em microplantas do grupo A (A-C) e plântulas do grupo BII (D-I) de *B. gasipaes* submetidas ao teste histoquímico com ácido periódico de Schiff e Naphtol blue black para o monitoramento do potencial morfogênico. A. Células iniciais meristemáticas do ápice caulinar de microplantas do grupo A, evidenciando somente conteúdo protéico. B. Elevado conteúdo protéico no interior das CPPs e reduzido conteúdo protéico e de polissacarídeos no interior das células parenquimáticas destas microplantas. C. CPPs em processo de diferenciação em células procambiais com elevado conteúdo protéico e discreto conteúdo de polissacarídeos. D. Células iniciais meristemáticas do ápice caulinar em plântula do grupo BII com elevado conteúdo protéico, e reduzida presença de polissacarídeos e de amido. E. Elevado conteúdo protéico nas CPPs e reduzido conteúdo protéico e de polissacarídeos nas células parenquimáticas destas plântulas. F. Estádios iniciais das PPCs à diferenciação em centro meristemático, destacando a presença de células com elevado conteúdo protéico e polissacarídeos. Destaque ao feixe vascular adjacente, em secção longitudinal com elevado conteúdo protéico e presença reduzida de polissacarídeos e de fenóis. G. Meristemóide circundado por células com elevado conteúdo de polissacarídeos em seu interior e nas paredes celulares. H. Bipolarização de centros meristemáticos (embriogênese somática) durante as divisões periclinais das PPCs apresentando células com moderado conteúdo protéico e reduzida presença de polissacarídeos. I. Unipolarização de centros meristemáticos (organogênese adventícia) durante as divisões periclinais das PPCs apresentando células com moderado conteúdo protéico e esparsa presença de amido, destacando a presença de um feixe vascular em secção transversal com elevado conteúdo de fenóis nas células condutoras do xilema. CCPs = Células Pré-Procambiais; FV = Feixes Vasculares; CM = Centro Meristemático; setas vermelhas = proteínas; setas amarelas = amido; setas brancas = polissacarídeos; setas azuis = polifenóis; setas pretas = divisões periclinais; linha tracejada vermelha = centro meristemático bipolarizado; linha tracejada preta = centro meristemático unipolarizado; asteriscos pretos = células parenquimáticas; asteriscos vermelhos = células da camada externa de meristemóide. Figuras A-I: Barras = 50 µm

Na região proximal das bases caulinares das microplantas (grupo A) e plântulas (grupo BII), as células dos feixes vasculares em diferenciação, apresentaram elevado

conteúdo protéico, reduzida presença de polissacarídeos e a ausência de substâncias fenólicas (Figuras 43 A, G), ao passo que as células parenquimáticas desta região apresentaram moderado conteúdo protéico e elevada presença de polissacarídeos e de amido (Figuras 43 A, G).

As análises histoquímicas permitiram também identificar o desenvolvimento de pró-embriões originados de divisões assimétricas das células parenquimáticas subepidérmicas na região proximal das microplantas do grupo A, por meio do processo de desdiferenciação e transdiferenciação destas células e isolados pela presença de polissacarídeos (Figuras 43 B, C). No entanto, a ausência de substâncias ergásticas no citoplasma destas células, a presença de núcleos disformes (em processo degenerativo) e a retração da membrana plasmática nas células destas estruturas evidenciaram a ocorrência do processo de MCP e a inviabilidade dos pró-embriões (Figuras 43 B, C).

Nos tecidos das bainhas foliares localizados mais externamente nesta região proximal das bases caulinares (grupo A), o teste histoquímico também evidenciou a presença de MCP, com intenso processo oxidativo e degenerativo das paredes celulares, identificado pela presença de polifenóis e de polissacarídeos, bem como pela pronunciada retração da membrana plasmática (Figuras 43 D-F). Entretanto, nas bainhas foliares mais externas das plântulas (grupo BII), foram detectadas células parenquimáticas adjacentes à epiderme abaxial com competência embriogênica e pró-embriões viáveis originados diretamente de divisões assimétricas destas células (Figuras 43 H-L). Não se observou a presença de fenóis nestas estruturas, no entanto, constatou-se intensa presença de amido intracelular e de polissacarídeos nos espaços intercelulares durante este evento morfogênico, sendo que a ocorrência foi gradativamente maior no sentido da superfície adaxial à superfície abaxial, bem como o processo degenerativo do amido foi observado nos estratos de células mais próximos a este evento morfogênico (Figuras 43 H-L). Já nos estratos parenquimáticos subepidérmico adaxial e no centro desta estrutura, com frequência detectou-se a ocorrência do processo de MCP. (Figuras 43 H-K).

Figura 43 - Fotomicrografias de secções longitudinais das regiões distal de bases caulinares em microplantas do grupo A (A-F) e plântulas do grupo BII (G-L) de *B. gasipaes* submetidas ao teste histoquímico com ácido periódico de Schiff e Naphtol blue black, para o monitoramento do potencial morfogênico. A. Elevado conteúdo protéico e esparsos amiloplastos nas células dos feixes vasculares e células parenquimáticas com elevado conteúdo de proteínas, de amido e de polissacarídeos em microplanta do grupo A. B. Prováveis pró-embriões originados de divisões assimétricas das células parenquimáticas subepidérmicas nesta região e isolados pela presença de polissacarídeos. C. Detalhe de células e de um pró-embrião em processo de MCP, destacando a ausência de substâncias ergásticas intracelulares e a presença de núcleo disforme. D. Vista geral das bainhas foliares externas e internas em microplanta do grupo A. E e F. Detalhe das células epidérmicas e parenquimáticas da bainha foliar externa em processo de MCP e com intensa deposição de fenóis nas paredes celulares. G. Elevado conteúdo protéico e esparsa presença de amido nas células dos feixes vasculares e de células parenquimáticas com elevado conteúdo de proteínas, de amido e de polissacarídeos em plântula do grupo BII. H. Vista geral de bainha foliar externa em plântula (grupo BII). I. Células parenquimáticas adjacentes à epiderme adaxial da bainha foliar em processo de MCP e com reduzida presença de amido em seu interior. J. Células parenquimáticas mais internas desta bainha foliar em processo de MCP, com elevado conteúdo amiláceo em início de processo degenerativo. K e L. Células parenquimáticas com competência embriogênica e pró-embriões íntegros originados de divisões assimétricas destas células adjacentes à epiderme abaxial da bainha foliar. Destaque à intensa degeneração de amiloplastos no citoplasma, ao elevado conteúdo protéico, à integridade do núcleo e à deposição de polissacarídeos entre estas estruturas. FV = Feixe Vascular; BI = Bainha Interna; BE = Bainha externa; N = Núcleo; EI = Espaço Intercelular; Ed = Epiderme adaxial; Eb = epiderme abaxial; setas vermelhas = proteínas; setas amarelas = amido; setas verdes = degeneração do amido; setas brancas e asteriscos laranja = polissacarídeos; setas pretas = polifenóis; setas cor-de-rosa = retração da membrana plasmática; linha tracejada amarela = pró-embrião em vias do processo de MCP; linhas tracejadas pretas = pró-embrião viável; asteriscos pretos = células parenquimáticas. Figuras A, C, E, F, G, I, J, K e L: Barras = 50 µm; Figuras B e D: Barras = 100 µm; Figura C: Barras = 200 µm

5 DISCUSSÃO

O processo de senescência foliar em espécies anuais já foi bem caracterizado (GAN, 2003; WINGLER et al., 2006; LIM; KIM; NAM, 2007), no entanto, pouco se sabe a respeito deste evento em espécies perenes (WATSON; RIHA, 2011) como a pupunheira, tanto nos sistemas *in vivo* (WATSON; RIHA, 2011; MUNNÉ-BOSH, 2007), como *in vitro* (KONAN et al., 2010), bem como carecem análises para este evento fisiológico considerando-se o organismo como um todo, limitando sobremaneira a determinação da viabilidade das espécies mantidas *in vitro*.

Neste trabalho, microplantas de pupunheiras estabelecidas e cultivadas *in vitro* por oito anos (grupo A) apresentaram pronunciadas alterações estruturais nas folhas, raízes e bases caulinares demonstradas por meio das análises histológicas efetuadas, em relação às plântulas estabelecidas e cultivadas *in vitro* por um ano (grupo BI) em decorrência do processo de MCP (Figuras 8-11). Todas as amostras das estruturas foliares, radiculares e das bases caulinares destas microplantas (grupo A) apresentaram células em vias de processo de MCP, com uma ou mais das seguintes características relacionadas a este evento: condensação do núcleo e do citoplasma como descrito por McCabe e Leaver (2000) e Almeida et al. (2012), retração da membrana plasmática, observado por Domínguez, Moreno e Cejudo (2004) e Almeida et al. (2012) e com ou sem a ocorrência de degeneração da parede celular, como relatado por Jones (2001) (Figuras 8-11).

Os resultados obtidos nesse trabalho corroboram com os dados relatados por inúmeros autores, como por exemplo as análises em microscopia eletrônica de transmissão onde foi detectada a ruptura da carioteca (OBARA; KURIYAMA; FUKUDA, 2001; DOMÍNGUEZ; MORENO; CEJUDO, 2004), a ocorrência de processo degenerativo das mitocôndrias (OBARA; KURIYAMA; FUKUDA, 2001), a ruptura do tonoplasto (JONES, 2001; DOORN, 2011), a degeneração dos cloroplastos nas estruturas foliares (OBARA; KURIYAMA; FUKUDA, 2001; WRIGHT; DOORN; GUNAWARDENA, 2009) e a degeneração das paredes celulares (ausentes apenas nas células parenquimáticas localizadas na região distal das bases caulinares), durante o processo de MCP (Figuras 31 A-E; 32 A-E; 33 A-E; 34 A-E).

As análises histológicas evidenciaram, ainda, a ausência do processo de MCP nas células meristemáticas apicais caulinares das microplantas do grupo A (Figura 10 B) e das plântulas do grupo BI (Figura 10 E), bem como em todas as análises histológicas realizadas nas amostras foliares e radiculares das plântulas do grupo BI (Figuras 8 D-F; 9 D-F). No entanto, na região distal das bases caulinares destas plântulas mantidas *in vitro* por um ano (grupo BI) detectou-se a presença de núcleos proeminentes, condensados e morfologicamente

alongados nas células da camada externa destes centros meristemáticos, bem como nas células parenquimáticas adjacentes (Figura 10 F). A reação TUNEL efetuada na região distal destas plântulas (grupo BI) corrobora as análises histológicas, evidenciando o processo de MCP nas células parenquimáticas e nas células dos traços de cordões de CPPs (Figura 15 F). Embora esta reação tenha sido positiva nas raízes das plântulas (grupo BI) (Figuras 14 I, L), este evento foi escasso e, nas regiões distal e proximal das bases caulinares, a intensidade da fluorescência emitida do núcleo foi consideravelmente fraca nas células iniciais meristemáticas do ápice caulinar, nas células parenquimáticas e nas células dos traços pré-procambiais e procambiais (Figuras 15 F, L), evidenciando que a extensão da fragmentação do DNA destas células foi sensivelmente menor (CEITA et al., 2007) em relação ao observado nas células das microplantas do grupo A positivas à reação TUNEL (Figuras 15 C, I).

Um incremento na intensidade da fluorescência do núcleo em células em vias do processo de MCP foi relacionado aos estádios mais avançados de infecção pelo fungo *Moniliophthora perniciosa* em cacaueiro (*Theobroma cacao*) (CEITA et al., 2007). Neste trabalho, a extensa fragmentação do DNA observada no núcleo das células em todos os tecidos positivos a reação TUNEL, nas microplantas (grupo A), parece ser mais propriamente uma consequência da integração de agentes eliciadores do processo de MCP. Considerando que diversos estímulos físicos e químicos promovem a geração de radicais livres, a exemplo de radicais de peróxidos (GASPAR et al., 2003) e que o nível de estresse determina o tipo de morte celular a ser seguido pela célula (MCP ou necrose) (BREUSEGEM; DAT, 2006; REAPE; MOLONY; McCABE, 2008), muito provavelmente, as sucessivas transferências dos propágulos ao longo de oito anos em cultivo *in vitro*, foram fatores estressantes que induziram substancial emissão de etileno e de poliaminas, visto que, ambas as substâncias possuem como precursor comum o S-adenosil metionina (SAM) (KONAN et al., 2010). O excesso de etileno pode ter ativado genes relacionados ao processo de MCP (JONES, 2001; PENNEL; LAMB, 1997; BREUSEGEM; DAT, 2006), bem como promovido a síntese elevada de poliaminas, causando, assim, possíveis disrupturas epigenéticas e a degeneração de tecidos (KONAN et al., 2010). De forma similar ao etileno, o ANA e o BAP acrescidos ao meio de cultura, durante os subcultivos periódicos das microplantas (grupo A), podem ter ativado as enzimas proteases e caspases, e sinais extracelulares específicos promovendo o influxo de cálcio nas células (JONES, 2001), que aumenta consideravelmente durante o estresse oxidativo (LECOURIEUX; PUGIN; LEBRUN-GARCIA, 2000) e é um cofator de várias

enzimas envolvidas no processo de morte celular, a exemplo das nucleases, caspases, calmodulinas, dentre outras (BLUMWALD; AHARON; LAM, 1998).

Sendo um evento escasso, o processo de MCP não foi identificado nas análises ultraestruturais, realizadas nas células parenquimáticas radiculares e nas células parenquimáticas das regiões distal e proximal das bases caulinares das plântulas do grupo BI (Figuras 32 F-J; 34 F-J). No entanto, a ocorrência do processo de MCP detectado nas estruturas radiculares e nas bases caulinares das plântulas do grupo BI submetidas às análises histológicas e à reação TUNEL (Figura 10 F; 14 I, L; 15 F, L), parece estar mais propriamente relacionado aos eventos de MCP que ocorrem ao longo do tempo de vida das plantas perenes em nível tecidual ou de órgãos (MUNNÉ-BOSCH, 2007), e decorrentes dos processos inerentes ao desenvolvimento vegetal (CAO et al., 2003; DOORN; WOLTERING, 2004; MUNNÉ-BOSCH, 2007; REAPE; MOLONY; McCABE, 2008).

Como as amostras utilizadas para a reação TUNEL e as análises ultraestruturais foram procedentes das mesmas microplantas (grupo A) (item 3.2; Figura 5) e as células de todos os tecidos das estruturas analisadas apresentaram a degeneração e condensação do núcleo, já em estádios iniciais do processo de MCP (Figuras 31 C; 32 C; 34 A) e marcadas positivamente para a reação TUNEL (Figuras 12 C; 13 C; 14 C, F; 15 C, D), pode-se descartar a ocorrência do processo de morte celular por necrose, visto que neste tipo de morte celular, a fragmentação no DNA pode ocorrer somente em estádios mais avançados (COLLINS et al., 1992; GOLD, 1994), e é proporcionalmente inferior em relação ao primeiro processo, (PENNEL; LAMB, 1997) que ocorre de forma difusa e ao acaso (PALAVAN-UNSAI; BUYUKTUNCER; TUFEKCI, 2005), bem como, não envolve a condensação do núcleo (McCABE; LEAVER, 2000).

Neste contexto, destaca-se a importância do balanço redox nas células destas estruturas em processo de MCP, visto que, muito provavelmente, houve discretos incrementos nos níveis fitotóxicos de ROS e insuficientes para matar imediatamente a célula (necrose), iniciando, desta forma, uma cascata de transdução de sinais envolvendo interferências com outros fitormônios, ácido salicílico, jasmonatos, etileno e óxido nítrico, os quais possivelmente, amplificaram ou reduziram a subsequente resposta ou canalizaram as cascatas de transduções de sinais através de sensores e alvos transdutores mais específicos para a EROS-dependente e MCP relacionada à expressão gênica (BREUSEGEM; DAT, 2006).

Em estruturas foliares e radiculares das microplantas (grupo A) o processo de MCP foi histologicamente detectado em todos os tecidos, principalmente nas células parenquimáticas do mesofilo (Figuras 8 A-C) e do córtex interno das raízes (Figuras 9 A, C),

onde se observou a formação de amplos espaços intercelulares decorrentes da MCP (Figuras 8 A-C; 9 C). Nas bases caulinares destas microplantas (grupo A), as células parenquimáticas foram observadas em processo de MCP, em ambas as regiões, distal e proximal (Figuras 10 C; 11 A, B), particularmente as localizadas na região proximal das bainhas foliares mais externas (Figura 11 C).

Todos os resultados observados nas secções histológicas foliares, radiculares e nas bases caulinares das microplantas (grupo A) e das plântulas (grupo BI) confirmaram os resultados obtidos na reação TUNEL efetuada nestes tecidos (Figuras 12-15), onde se detectou a clivagem do DNA genômico, em fragmentos de DNA com baixo peso molecular DNA (mono e oligonucleossomos) (GORCZYCA; GONG; DARZYNKIEWICZ, 1993; SGONC et al., 1994) nas células em vias do processo de MCP. Esta reação, além de permitir detectar a fragmentação do DNA durante o processo de MCP (CAO et al., 2003; PALAVAN-UNSAI; BUYUKTUNCER; TUFEKCI, 2005; VUOSKU, 2010), identificou a ocorrência de maior intensidade de auto-fluorescência de determinadas estruturas das células dos tecidos nas estruturas foliares, radiculares e nas bases das microplantas mantidas *in vitro* por oito anos (grupo A) em relação ao observado para estas mesmas estruturas nas plântulas do grupo BI (Figuras 12-15).

Considerando que a auto-fluorescência em plantas é inata em determinadas estruturas, como paredes celulares, conteúdo vacuolar e nas clorofilas (HELD; BOULAFLOUS; BRANDIZZI, 2008), bem como, na presença de substâncias fenólicas (OVERMYER et al., 2005), foi possível observar que as paredes celulares anticlinais e periclinais das células do mesófilo e das epidermes adaxial e abaxial, além das células das bainhas esclerenquimáticas e xilemáticas das folhas das microplantas do grupo A, apresentaram fluorescência mais intensa (Figuras 12 A, C; 13 A-C) quando comparado com as plântulas do grupo BI (Figuras 12 D-F; 13 D-F), sugerindo um intenso processo de lignificação e/ou cutinização destas células nas microplantas (grupo A), reforçando as observações das análises histológicas efetuadas em ambos os grupos (Figuras 8 A, B, D, E, F).

Ainda não foi reportada a deposição de fenóis como consequência do processo de senescência em clones cultivados *in vitro*, no entanto, sabe-se que os ácidos fenólicos são precursores da lignina (ALVES DE BRITO et al., 2003), promovendo a rigidificação da parede celular durante o processo de senescência em um evento mediado pelo AIA (ácido indolacético) e pelo etileno, e que está diretamente relacionado à geração de radicais livres, a exemplo de radicais de peróxidos em resposta a diversos estímulos físicos e químicos (GASPAR et al., 2003). Entretanto, a emissão de fluorescência dos cloroplastos nas células

parenquimáticas do mesofilo das microplantas do grupo A', foi reduzida (Figuras 12 A-C; 13 A-C) quando comparada com a fluorescência emitida nos cloroplastos das plântulas do grupo BI (Figuras 12 D-F; 13 D-F), refletindo uma provável fotoinibição do aparato fotossintético nestas microplantas mantidas *in vitro* por oito anos (grupo A), ao passo que nas plântulas mantidas *in vitro* por um ano (grupo BI), a intensa fluorescência parece ser decorrente do mecanismo de dissipação do excesso de energia luminosa absorvida pelas moléculas de clorofila (MAXWELL; JOHNSON, 2000), sugerindo a integridade e elevada eficiência do aparato fotossintético destas plântulas. A reduzida emissão de fluorescência observada nos cloroplastos das microplantas, também pode ser uma consequência do processo degenerativo detectado nestas organelas durante o processo de MCP (ARDUIN; KRAUS, 2001; WRIGHT; DOORN; GUNAWARDENA, 2009), conforme observado nas análises histológicas (Figura 8 C) e ultraestruturais (Figuras 31 B, D), bem como à degeneração dos pigmentos durante o processo de senescência (DHINDSA; MATAWE, 1981).

O teste histoquímico à detecção de lipídeos totais, evidenciou uma maior deposição desta substância ergástica nas paredes periclinais das células epidérmicas em ambas as superfícies foliares nas microplantas (grupo A) em relação ao observado nas plântulas (grupo BI), onde a deposição de lipídeos foi maior nas células epidérmicas adaxiais (Figuras 17 A-F), o que está de acordo com as análises histológicas efetuadas nesta estrutura em ambos os grupos (Figuras 8 A, B, D, F). Estes resultados permitem inferir que o processo de deposição de lipídeos tem início na superfície adaxial em decorrência da maior exposição à luz, progredindo para abaxial acompanhando o processo de senescência do órgão sugerindo assim, que a luz provavelmente atue como um fator deletério às organelas.

Em cultura de tecidos, as plantas apresentam uma reduzida formação de cera cuticular e epicuticular nas epidermes foliares (WETZSTEIN; SOMMER, 1981; BARBOSA et al., 2006; BATAGIN et al., 2008, 2009) devido à elevada umidade no interior dos frascos (PREECE; SUTTER, 1991; CALVETE et al., 2002), conforme observado nas amostras foliares das plântulas mantidas *in vitro* por um ano (grupo BI) (Figuras 8 B, D, F; 17 D, E, F). Embora não haja relatos da ocorrência do espessamento cuticular, mediante o processo de senescência em plantas cultivadas *in vivo*, Alves de Brito e Deschamps (2001) observaram uma intensa cutinização no sentido apical-basal, das células em bainhas foliares durante a senescência do capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schumach.) cultivadas *in vivo*, e atribuíram a uma possível estratégia para evitar a exposição direta do colmo ao ambiente. O espessamento cuticular observado nas epidermes foliares das microplantas do grupo A parece ser uma importante estratégia de isolar as células dos distintos tecidos às elevadas condições

de umidade no interior dos frascos de cultivo (PREECE; SUTTER, 1991, CALVETE et al., 2002), visto que recentes ensaios *in vitro* demonstraram que elevadas condições de umidade, também são eliciadoras do processo de MCP (LI et al., 2012). Adicionalmente, o espessamento cuticular pode ser um mecanismo para dificultar possíveis perdas internas de água para o ar contido no interior dos frascos, o qual, mesmo contendo elevada umidade, muito provavelmente não evitaria o colapso das células do mesofilo, dotado de amplos espaços intercelulares em decorrência ao extenso processo de MCP (Figuras 8 A-C).

De forma similar ao observado nas estruturas foliares das microplantas (grupo A), um possível processo de lignificação ocorreu nas paredes celulares do estrato celular endodérmico radicular, identificado pela fluorescência mais intensa emitida por estas estruturas (Figura 14 D) em relação ao observado neste tecido nas plântulas (grupo BI) (Figuras 14 G, J, K, L). No entanto, as paredes celulares das CPPs e procambiais, bem como das células parenquimáticas nas bases caulinares das plântulas (Figuras 15 D, J, L) apresentaram maior intensidade de fluorescência em relação ao observado para estas estruturas nas microplantas (Figuras 15 A, G), muito provavelmente, devido a um maior processo de lignificação das paredes celulares dos elementos vasculares em diferenciação (multipotência), bem como pode ser um evento diretamente relacionado à totipotência ou pluripotência das CPPs nas plântulas, visto que, os compostos fenólicos estão diretamente relacionados ao processo de dediferenciação celular (ALEMANNO et al., 2003; ALMEIDA et al., 2012) e aos primeiros estádios de diferenciação dos embriões somáticos (REIS et al., 2008; ALMEIDA et al., 2012). De fato, os testes histoquímicos à detecção de substâncias fenólicas nas bases caulinares de ambos os grupos analisados (grupo A e BI) corroboram os resultados obtidos com a aplicação da reação TUNEL nestas estruturas, evidenciando a presença de maior conteúdo fenólico nas plântulas mantidas *in vitro* por um ano (grupo BI), particularmente no interior e nas paredes celulares das células parenquimáticas, bem como, nas paredes celulares dos traços de células procambiais (Tabela 3; Figuras 29 D; 30), em ambas as regiões analisadas. As análises ultraestruturais efetuadas nas células parenquimáticas das regiões distal e proximal das bases caulinares destas plântulas (grupo BI) também evidenciaram uma intensa deposição desta substância ergástica (Figuras 33 G-I; 34 F, G, I).

Embora os compostos fenólicos frequentemente sejam responsáveis pela mortalidade de explantes (MONACO et al., 1977), são capazes de promover um incremento nos níveis endógenos auxínicos devido a sua atuação como inibidor do AIA oxidase (WILSON; STADEN, 1990; HAUSMAN, 1993), e da mesma forma, modular os níveis endógenos do ácido indolacético (AIA) (SCHNABLOVÁ et al., 2006; REIS et al., 2008), acarretando um

aumento nos níveis endógenos deste hormônio e consequente indução de eventos morfogênicos, particularmente, a embriogênese somática, em acordo aos resultados obtidos por Almeida et al. (2012), que verificaram que a presença de polifenóis esteve diretamente relacionada à indução de embriões somáticos com origem multicelular em ápices caulinares de pupunheiras, bem como, de embriões somáticos com origem unicelular e multicelular em gemas aventícias desta espécie.

Os testes histoquímicos para detecção de substâncias fenólicas corroboram os resultados observados na reação TUNEL efetuada nas estruturas foliares, radiculares e nas bases caulinares das microplantas (grupo A) e plântulas (grupo BI), visto que maior conteúdo de compostos fenólicos foi detectado nas paredes celulares periclinais e anticlinais das células, ou limitados às paredes anticlinais em ambos os tecidos epidérmicos das folhas destas microplantas (grupo A), nas paredes celulares das células do mesofilo, da bainha do feixe vascular e das células do xilema (Tabela 1; Figuras 19 A, B; 30) em relação ao observado para as plântulas do grupo BI (Tabela 1; Figuras 19 C, D; 30). O mesmo evento pode ser observado nas células dos tecidos epidérmico, exodérmico e endodérmico das estruturas radiculares das microplantas do grupo A, nas quais detectou-se maior presença destas substâncias ergásticas em relação às estruturas radiculares das plântulas (grupo BI) analisadas (Tabela 2; Figuras 24 A-F; 30), sendo que a intensa deposição de fenóis nas células epidérmicas das raízes das microplantas caracterizou um intenso processo oxidativo (Figura 24 A). Embora a presença destas substâncias possa causar a mortalidade dos explantes, decorrente da formação de quinonas originadas do processo oxidativo dos compostos fenólicos quando estes entram em contato com o oxigênio (MONACO et al., 1977), a elevada incidência destas substâncias nas raízes (Tabela 2, Figuras 24 A-C), bem como, nas bases caulinares, não acarretaram a morte das microplantas (grupo A), visto que, este evento restringiu-se à extremidade da região proximal das bases caulinares, induzindo somente as células das bainhas mais externas a um intenso processo de MCP (Figuras 11 C; 29 C). No entanto, muito provavelmente, a deposição de substâncias fenólicas observadas nas análises ultraestruturais efetuadas nestas microplantas, e depositadas durante o processo de oxidação nas paredes celulares das células parenquimáticas do mesofilo, do córtex interno radicular, bem como, nas bases caulinares (Figuras 31 C, E; 32 A, B; 33 D; 34 A-E), foi um processo inerente ao evento da MCP, visto que, os compostos fenólicos já foram reportados como possíveis mediadores deste evento fisiológico (BUCKNER et al., 1998).

Neste contexto, enquanto os compostos fenólicos detectados nas plântulas (grupo BI) parecem estar relacionados a eventos morfogênicos, ou inerentes ao próprio processo de

desenvolvimento, conforme discorrido anteriormente, a presença destas substâncias ergásticas nas microplantas (grupo A) está diretamente relacionada ao processo de MCP, mas limitado à senescência de tecidos específicos, sem acarretar a morte do organismo como um todo. De fato, embora tenham sido constatadas pronunciadas alterações estruturais e ultraestruturais nas folhas, nas raízes e nas bases caulinares das microplantas, estes eventos não culminaram com a morte dos propágulos desta espécie ao longo dos oito anos de manutenção *in vitro*, mesmo com o acentuado processo de MCP detectado nas análises histológicas, na reação TUNEL e nas análises ultraestruturais, principalmente nas células parenquimáticas do mesofilo (Figuras 8 A-C; 12 A; 13 C; 31 A-E), nas células do tecido parenquimático cortical interno e dos tecidos do cilindro vascular das raízes (Figuras 9 A, C; 14 C, F; 32 A-E), nas células parenquimáticas e pré-procambiais localizadas na região distal das bases caulinares (Figuras 10 C; 15 C; 33 A-E) e nas células parenquimáticas e procambiais localizadas na região proximal destas estruturas (Figuras 11 A, B; 15 I; 34 A-E). Cabe salientar que a elevada presença de compostos fenólicos detectados nas raízes das microplantas (grupo A) e das plântulas (grupo BI) que apresentaram o desenvolvimento de ramificação (raízes laterais) (Figuras 25 A, B) muito provavelmente relaciona-se ao processo de desenvolvimento e maturação do metaxilema destas raízes laterais, visto que, os ácidos fenólicos são precursores da lignina (ALVES DE BRITO et al., 2003).

Os testes histoquímicos efetuados à detecção de proteínas totais nas estruturas foliares, radiculares e nas bases caulinares das microplantas (grupo A) e das plântulas (grupo BI) evidenciaram a presença de proteinoplastos apenas em uma microplanta (Tabela 3) os quais estão localizados dispersos no interior das células dos traços de cordões de células procambiais da região proximal das bases caulinares, bem como em duas plântulas (Tabela 3), onde as proteínas foram esporadicamente detectadas nas células epidérmicas e parenquimáticas da região proximal das bainhas foliares mais externas (Figuras 28 E), nas células meristemáticas apicais caulinares, nas células parenquimáticas e nos traços de cordões de CPPs (Figuras 28 F-G), na região distal das bases caulinares. A ausência destas substâncias ergásticas em todas as estruturas analisadas e em ambos os grupos (Tabelas 1, 2, 3; Figura 30) já era esperada, principalmente nas microplantas do grupo A, visto que, o processo de MCP representa um importante mecanismo à remoção de células, à reciclagem de carbono, nitrogênio e fósforo (JONES, 2001). No entanto, nas células parenquimáticas do córtex interno e nas células do metaxilema das raízes (Figuras 23 B, D), bem como, nas células parenquimáticas localizadas nas bainhas foliares externas (Figura 28 A) e internas da região distal das bases caulinares das microplantas (grupo A), o elevado conteúdo de estruturas

protéicas filamentosas detectados no interior destas células (Figuras 23 B, D; 28 A) não foram elucidados, sendo que, até o presente momento ainda não foram observados em células vegetais.

Os mecanismos de armazenamento de proteína e sua mobilização estão envolvidos em distintas funções fisiológicas e de desenvolvimento (HERMAN; LARKINS, 1999). De acordo com os autores, as proteínas armazenadas fornecem blocos de construção ao crescimento rápido durante a germinação de sementes e do grão de pólen e, em células de plantas no estágio vegetativo, fornecem os blocos de construção para produção de sementes e frutas no estágio reprodutivo, bem como, à rápida expansão das estruturas vegetativas após períodos de dormência. Isto sugere que as proteínas sintetizadas pelas plântulas do grupo BI, supriram apenas as necessidades ao desenvolvimento ao longo de um ano de manutenção *in vitro*, impossibilitando o seu armazenamento em plastídeos.

De forma similar ao observado para as proteínas, para os ácidos nucléicos e para as clorofilas, o amido foliar também é degradado durante o processo de senescência (ZAVALETA-MANCERA et al., 1999), reforçando as análises histoquímicas (Tabela 1; Figuras 19 A, B) e ultraestruturais efetuadas nas secções foliares das microplantas do grupo A, que não evidenciaram a presença de amiloplastos nas células e de amido no interior dos cloroplastos (Figuras 31 A-E), resultado este, previsto para estas análises, visto que, as células em vias do processo de MCP requerem uma elevada demanda energética (ELMORE, 2007). Todavia, as plântulas do grupo BI evidenciaram elevado conteúdo desta substância ergástica nas análises histoquímicas foliares (Tabela 1; Figuras 19 A, B), as quais foram identificadas por meio da marcação escura distribuída na periferia das células do mesofilo (Figuras 19 A, B). O amido é sintetizado durante o dia e armazenado nos cloroplastos para ser utilizado durante a noite para a síntese de sacarose (VANDEPUTTE; DELCOUR, 2004), no entanto, o cultivo *in vitro* sob altas concentrações de sacarose já foi reportado como indutor do acúmulo de amido nos cloroplastos (CAPELLADES; LEMEURE; DEBERGH, 1991), pois inibe o processo de fotossíntese e a síntese reduzida de açúcares, favorece o acúmulo desta substância (HDIDER; DESJARDINS, 1994). Embora a concentração de sacarose utilizada nos meios de cultura constituído por sais de Murashige e Skoog (1962) (MS) não sejam altas (30 g.L⁻¹), e bem estabelecidas ao cultivo *in vitro* desta espécie por Almeida (1994), o próprio fornecimento de açúcares pode ter favorecido o acúmulo de amido nas células do mesofilo das plântulas do grupo BI devido à redução do processo de fotossíntese, ou ainda, como consequência da baixa capacidade fotossintética das folhas desenvolvidas *in vitro* em meio provido de sacarose (autotrofismo) (GROUT, 1988).

Os testes histoquímicos não detectaram a presença de amido nas células das raízes das plântulas do Grupo BI (um ano sem reguladores de crescimento) nem na maioria das raízes das microplantas do grupo A (8 anos com reguladores de crescimento), como pode ser observado na Tabela 2 e nas Figuras 20 A-D. As amostras das microplantas analisadas em microscopia eletrônica de transmissão evidenciaram a presença de amiloplastos em processo degenerativo nas células em processo de MCP (Figuras 32 B, D), destacando-se que nas raízes das plântulas esta substância não foi observada (Figuras 32 F-J). Muito provavelmente, a degeneração de amido observada nas células parenquimáticas corticais internas das raízes destas microplantas, relaciona-se aos eventos do processo de MCP, pois requerem uma elevada demanda energética (ELMORE, 2007), no entanto, nas bases caulinares de ambos os grupos analisados (A e BI), detectou-se elevado conteúdo de amido nas regiões distal e proximal, nos testes histoquímicos (Tabela 3; Figuras 26 A-D, 30) e nas análises ultraestruturais, nos quais observou-se a presença discretamente superior desta substância ergástica para as plântulas (grupo BI) em relação à microplantas (grupo A), sendo que, todas evidenciaram processo degenerativo (Figuras 33 B, F, H).

A degradação do amido foliar, radicular e das bases caulinares das microplantas (grupo A) durante o processo de MCP, evidencia que esta substância ergástica, muito provavelmente está sendo consumida e/ou remobilizada para outras células. Estes resultados enfatizam os relatos de Munné-Bosh (2007) em que a morte da célula, tecido/órgão e da planta, além de ocorrer como consequência da senescência, é um processo fisiológico altamente regulado e que permite a remobilização de nutrientes. Entretanto, a incidência elevada de amiloplastos nas bases caulinares das plântulas (grupo BI) (Tabela 3; Figuras 26 C, D, 30; 33 F, H), pode estar relacionada a eventos morfogênicos, visto que, desta substância provém recurso energético ao processo de organogênese adventícia (gemas adventícias) (THORPE; JOY IV; LEUNG, 1986; FORTES; PAIS, 2000) e o fornecimento de agentes osmóticos na forma de açúcares solúveis (THORPE; JOY IV; LEUNG, 1986). Isto não implica a ausência de competência embriogênica destas plântulas, pois a presença do amido está comumente relacionada ao processo de embriogênese somática (WILLIAMS; MAHESWARAN, 1986; VERDEIL et al., 2007; ROCHA et al., 2011), embora não esteja sistematicamente relacionada com a aquisição de potencialidade embriogênica (GOH et al., 2001; STEINMACHER et al., 2011; ALMEIDA et al., 2012).

Uma elevada presença de lipídeos também foi detectada nos testes histoquímicos realizados nas estruturas foliares, radiculares e em ambas as regiões distal e proximal das bases caulinares das microplantas do grupo A, sendo que nas plântulas do grupo BI, esta

substância ergástica também foi evidenciada, porém, em quantidade inferior em relação ao observado nas microplantas, principalmente nas raízes (Tabelas 1, 2, 3; Figuras 17, 21, 22, 27, 30).

Em microplantas do grupo A foi detectada a maior presença de lipídeos no interior dos cloroplastos (Figuras 17 A-C) em relação ao observado nos cloroplastos das plântulas do grupo BI (Figuras 17 D-E), corroborando as análises ultraestruturais efetuadas nestas estruturas em ambos os grupos (A e BI), nas quais foram detectados plastoglóbulos osmiofílicos associados às tilacóides dos cloroplastos (ZAVALETA-MANCERA, 1999), sendo que, este evento foi esporádico nas amostras foliares das plântulas (grupo BI) (Figuras 31 A, B). Estas estruturas são tipicamente observadas durante o processo de senescência e já foram detectadas nos cloroplastos de plantas cultivadas *in vitro* durante o processo de senescência foliar, que também promoveu o declínio da taxa fotossintética, incremento na taxa respiratória, degradação de clorofilas e proteínas, bem como, a peroxidação de lipídeos (DHINDSA; MATAWE, 1981).

Como os plastoglóbulos são plastos de lipídeos associados com a família de proteínas/fibrilina, e a enzimas metabólicas, incluindo a tocoferol ciclase (VTE1), enzima-chave para a síntese do tocoferol (Vitamina E) (VIDI et al., 2006), sendo reportados como um possível mecanismo antioxidativo devido à sua participação na síntese e armazenamento de tocoferol (AUSTIN et al., 2006; VIDI et al., 2006), a elevada frequência dos plastoglóbulos nos cloroplastos nas folhas das microplantas (grupo A), já era esperada para as células em vias do processo de MCP. De fato, os cloroplastos parecem exercer importante função na regulação da MCP (ZAPATA et al., 2005; ASADA, 2006; WANG, BAYLES, 2012), principalmente por serem organelas geradoras de EROS (Espécies Reativas de Oxigênio) (ZAPATA et al., 2005; ASADA, 2006; BREUSEGEM; DAT, 2006; SCOTT; LOGAN, 2008), as quais também atuam como agentes sinalizadores em muitos processos celulares, como a modulação do processo de morte celular em plantas (GADJEV; STONE; GECHEV, 2008; WANG, BAYLES, 2012), particularmente pela ativação de proteases com atividade caspase por proteínas específicas liberadas após a ruptura desta organela (WANG, BAYLES, 2012). Salienta-se, ainda que, embora um aumento no número de peroxissomos esteja correlacionado ao processo de senescência e ao estresse em plantas (PASTORI; Del RIO, 1997), a ocorrência desta organela foi escassa ou esteve ausente nas estruturas analisadas, bem como, não se observou evidências de maior presença nas microplantas (grupo A) em relação às plântulas (grupo BI), sendo que nas microplantas os peroxissomos observados, apresentaram-se em intenso processo degenerativo (Figuras 31 C, I; 33 A).

A caracterização do processo de MCP em nível de organismo como um todo, em culturas de espécies estabelecidas *in vitro* por longos períodos, ainda não foi estabelecida, restringindo-se a eventos morfogênicos específicos e relacionados a processos de desenvolvimento, bem como, em respostas hipersensíveis nas interações planta-patógenos. Embora não haja ainda uma distinção absoluta entre os tipos de MCP desencadeada por um único ou diferentes eliciadores (LIU; BASSHAM, 2012), este trabalho identificou, por meio de análises ultraestruturais, que durante o processo de MCP, por senescência das células parenquimáticas das microplantas do grupo A, localizadas no mesofilo, tecido cortical interno das raízes e nas bases caulinares, que os eventos como a retração da membrana plasmática, a degeneração generalizada das organelas e das paredes celulares, a intensa condensação e degeneração do núcleo, foram comuns e simultâneos em todas estas estruturas (Figuras 31 B-E; 32 B-E; 33 A-E; 34 A, B, C, E), conforme também observado por Filonova et al. (2000, 2002), durante a MCP em poliembrões zigóticos e embriões somáticos em gimnospermas, onde a degradação do núcleo ocorreu paralelamente à degeneração dos demais componentes celulares. Todas as células destas estruturas também evidenciaram que, a degeneração das organelas e do núcleo, foi independente das enzimas liberadas do vacúolo após a ruptura do tonoplasto (Figuras 31 B-E; 32 C-E; 33 A-E; 34 A, B, E), sendo que, nas células parenquimáticas do mesofilo, a ruptura desta membrana ocorreu somente em estádios mais avançados do processo de MCP (Figura 31 E). Além disso, observou-se nas células parenquimáticas corticais internas das raízes, nas células parenquimáticas das regiões distal e proximal das bases caulinares que, durante um único evento de MCP, ocorreu o transporte de vesículas para o interior do vacúolo por meio da invaginação do tonoplasto e, após a ruptura desta membrana, o transporte de vesículas a partir da retração da membrana plasmática, que por vezes foi consideravelmente pronunciada, formando uma grande e única vesícula, contendo os vestígios citoplasmáticos em seu interior (Figuras 32 A, D, E; 33 A, C, E; 34 A-E). No entanto, nas células parenquimáticas do mesofilo destas microplantas (grupo A) não se detectou o transporte de vesículas, mas a presença de vesículas grandes com vesículas menores internas no interior do vacúolo (Figura 31 B), as quais são ultraestruturalmente similares àquelas observadas para esta mesma espécie, caracterizadas como microrganismos endossimbiontes estáveis (bacteriossomos) (ALMEIDA et al., 2009) e que parecem exercer importantes funções metabólicas dentro das células vegetais de microplantas “axênicas” micropropagadas (ALMEIDA et al., 2009; ABREU-TARAZI et al., 2010; ESPOSITO-POLESI, 2011). Salienta-se que estes microrganismos foram comumente evidenciados em todas as estruturas analisadas e em ambos os grupos analisados (A e BI).

Neste contexto, o intenso transporte de vesículas observado nas células parenquimáticas das raízes e nas regiões distal e proximal das bases caulinares das microplantas (grupo A), sugere a ocorrência tanto do processo de autofagia, que corresponde à degradação de macromoléculas, uma via de reciclagem de materiais de células danificadas ou indesejadas em situações de estresse ou durante processos específicos de desenvolvimento (LIU; BASSHAM, 2012), bem como, do processo de autólise, envolvendo a lise do protoplasto por meio de enzimas hidrolíticas liberadas pela ruptura do tonoplasto (NAGL, 1976; GÄRTNER; NAGL, 1980; REZNICKOVA; DICKINSON, 1982; CARRASCO; CARBONELL, 1988; JONES, 2001; FILONOVA et al., 2002; SCOTT; LOGAN, 2008).

Não se detectou a presença de vesículas no interior das células parenquimáticas do mesofilo e do córtex interno das raízes das plântulas do grupo BI (Figuras 31 F-I; 32 F-I), no entanto, nas células parenquimáticas das regiões distal e proximal das bases caulinares, observou-se o transporte de vesículas entre o conteúdo citoplasmático e o conteúdo vacuolar (Figuras 33 G, H; 34 F) com origem a partir da invaginação do tonoplasto (Figura 33 G), caracterizando um mecanismo fisiológico natural de transporte e reciclagem de nutrientes em células com elevada atividade metabólica e supostamente relacionada aos eventos mofogênicos devido à intensa degeneração de amiloplastos nestas regiões, conforme já mencionado (Figuras 33 F, H; 34 F, G).

Salienta-se que a degeneração das paredes celulares detectada nas células parenquimáticas, em ambas as regiões distal e proximal das bases caulinares em microplantas (grupo A) durante o processo de MCP (Figuras 33 D; 34 C), ainda não foi citada como um evento relacionado ao processo de senescência, mas sim a formação do aerênquima radicular em resposta ao estresse, durante o desenvolvimento de folhas fenestradas (BEERS, 1997) e ao processo de desenvolvimento das células xilemáticas (xilogênese) (JONES, 2001). Nos resultados aqui apresentados, o desenvolvimento de lacunas no mesofilo (Figuras 8 A-C) e de amplos espaços intercelulares nas células do tecido parenquimático do córtex interno das raízes das microplantas (grupo A) (Figura 9 C), foi decorrente do processo MCP durante a senescência destas estruturas, mediante o envelhecimento das microplantas pelo prolongado período de manutenção *in vitro*. Os resultados obtidos com as análises histológicas, histoquímicas (TUNEL e substâncias ergásticas) e ultraestruturais (Figuras 8-34; Tabelas 1-3) confirmam que o tempo prolongado de manutenção *in vitro* realmente promoveu o envelhecimento das microplantas (grupo A) em decorrência ao generalizado processo de senescência observado nas estruturas foliares e radiculares, bem como nas regiões distal e proximal das bases caulinares.

Embora as análises morfofisiológicas (Figuras 35, 36) tenham constatado uma reduzida emissão de propágulos, folhas e raízes nas plântulas do grupo BII (Tabela 5; Figura 36) em relação às microplantas do grupo A (Tabela 4; Figura 35), as análises histológicas (Figuras 37-40) evidenciaram que a detecção total de propágulos nestas plântulas (grupo BII) somente seria perceptível em períodos posteriores ao analisado (Figuras 40 F-K), fato que também exerceria forte influência na emissão total de folhas e de raízes, uma vez que, o estabelecimento do balanço nos níveis endógenos ótimos na relação auxina/citocininas a estes eventos fisiológicos, muito provavelmente, seria obtido em períodos e estádios de desenvolvimento superiores ao analisado. No entanto, as análises morfofisiológicas deixaram evidentes que a prolongada manutenção *in vitro* das microplantas, sob periódicos subcultivos na presença da associação dos reguladores de crescimento ANA e BAP, foi desfavorável ao alongamento da parte aérea e do sistema radicular, visto que, as raízes apresentaram-se com maior frequência, mais curtas, grossas e isentas de ramificação (Tabela 4; Figura 35 B) em relação às plântulas cultivadas *in vitro* por um ano e submetidas apenas a dois subcultivos na presença da associação de reguladores de crescimento (Tabela 5; Figura 36 A, B, D). Destaca-se a ocorrência de um possível desvio de energia para o desenvolvimento da parte aérea em detrimento ao desenvolvimento radicular, visto que, a única plântula (grupo BII) que apresentou raízes morfológicamente grossas e isentas de ramificações, evidenciou também maior indução de folhas em relação as demais plântulas analisadas (Tabela 5).

Embora sejam escassos os relatos na literatura vigente para os estudos comparativos realizados nestes experimentos, muito provavelmente, o engrossamento das raízes, bem como, a inibição de seu alongamento em microplantas do grupo A, sejam decorrentes da atuação de altos níveis endógenos das auxinas, visto que, embora atuem como estimuladoras à rizogênese (SANÉ et al., 2006), podem inibir o alongamento (MELO et al., 2001; GRANER, 2009) ou ainda, promover o engrossamento das raízes (CENTELLAS et al., 1999; GUIDOLIN, 2003; GRANER, 2009). Em gemas adventícias de pupunheiras provenientes da organogênese secundária direta, obtidas após a transferência destas estruturas do meio MS acrescido da associação dos reguladores de crescimento ANA e BAP, para o meio MS contendo ANA e TDZ (thidiazuron), quando submetidas ao cultivo em meio MS isento de reguladores de crescimento, observou-se a indução de raízes adventícias sem anomalias e originárias da desdiferenciação de células parenquimáticas, localizadas mais internamente na região basal destas estruturas (ALMEIDA et al., 2012). Diferentemente do observado pelos autores, as raízes adventícias de ambas as microplantas (grupo A) e plântulas (grupo BII) originaram-se da atividade meristemática de células procambiais localizadas na região proximal das bases

caulinares (Figuras 41 A-D). No entanto, a elevada incidência do engrossamento radicular observado nas microplantas do grupo A (Tabela 4; Figura 35 B), sugere um possível desbalanço nos níveis endógenos hormonais, particularmente dos auxínicos, em decorrência aos subcultivos periódicos na presença dos reguladores de crescimento ANA/BAP ao longo dos oito anos de cultivo *in vitro*, e atuado em nível do processo de divisão e diferenciação das células procambiais. As análises histológicas detectaram, além de um intenso processo oxidativo nas células do tecido epidérmico, na camada de células parenquimáticas adjacente à epiderme e na exoderme pluriestratificada das raízes das microplantas (Figuras 38 A), que o incremento no diâmetro destas estruturas foi proporcional ao número de pólos de protoxilema observados, quando comparados às secções radiculares efetuadas nas plântulas do grupo BII (Figuras 38 C-D; G-H). A possível detecção de um incremento nos níveis endógenos do AIA, evidenciaria que esta substância estimulou a indução de elementos xilemáticos, com consequente ampliação do diâmetro destas estruturas, bem como, a presença do processo de habituação (WHITE, 1951; GAUTHERET, 1955) ao regulador de crescimento ANA. Da mesma forma, a detecção de elevados níveis do AIA na região proximal das bases caulinares, poderia indicar a habituação de determinado(s) tecido(s) aos rregulares de crescimento, particularmente ao ANA, desbalanceando os níveis endógenos ótimo na relação auxina/citocininas requeridos ao pleno desenvolvimento do sistema radicular, promovendo, assim, o engrossamento, a inibição à ramificação nas raízes e o seu alongamento. Nas análises histológicas efetuadas nas raízes em processo de ramificação foi observado que em ambos os grupos (A e BII), as raízes laterais originaram-se da atividade meristemática das células pericíclicas, com predomínio de divisões periclinais, sugerindo a ausência de anomalias no desenvolvimento da ramificação destas microplantas (grupo A) (Figuras 39 A-F).

Os resultados descritos corroboram àqueles observados por Graner (2009), que também detectou o desenvolvimento de raízes grossas, sem ramificação, em explantes desta mesma espécie cultivados por 140 dias na presença contínua da associação ANA/BAP no meio de cultura MS e nas mesmas concentrações utilizadas no presente trabalho. No entanto, Torrey (1967) observou que a viabilidade à rizogênese de calos de *Pisum sativum* L. derivados de ápices radiculares, mantidos por oito anos em meio de cultura na presença da auxina (2,4-D ácido diclorofenoxiacético) não foi alterada após terem sido submetidos ao cultivo sob agitação em meio Bonner modificado, sem adição de reguladores de crescimento, acrescido de AIA (ácido indolacético) ou contendo água de côco, entretanto, foram identificadas anormalidades na constituição cromossômica (poliploidia e aneuploidia) em todas as amostras analisadas.

A manutenção *in vitro* por períodos prolongados também favoreceu a oxidação da extremidade proximal da região basal caulinar em microplantas (grupo A) (Figuras 35 A, B, C, E), quando comparado às plântulas cultivadas *in vitro* por um ano (grupo BII) (Figura 36 C), corroborando as análises histológicas e histoquímicas, que detectaram a intensa ocorrência do processo de MCP e oxidação das células parenquimáticas localizadas nas bainhas foliares externas (Figuras 11 C; 29 C), conforme discutido anteriormente e que não acarretaram a morte das microplantas (grupo A), no entanto, podem ter exercido influência negativa no alongamento das raízes (Tabela 4; Figura 35 B), em decorrência a um possível processo de habituação ao reguladores de crescimento ANA. O menor comprimento médio da parte aérea observado nestas microplantas cultivadas *in vitro* por oito anos (Tabela 4; Figura 35), em relação às plântulas cultivadas *in vitro* por um ano (Tabela 5; Figura 36), também parece estar relacionado ao processo oxidativo supracitado, bem como, pelo possível processo habituação de determinados tecidos às citocininas (GAUTHERET, 1955; AKIN-IDOWU et al., 2009).

Embora as citocininas sejam evidentemente necessárias à proliferação normal das células, a aplicação exógena também inibe o processo de alongamento de caules e de raízes (TAIZ; ZAIGER, 2006), conforme observado por Pereira et al. (2000), Rubin et al. (2007), Graner (2009) e Graner et al. (2013). Salienta-se que um possível processo de habituação à citocinina BAP, contribuiria sobremaneira à indução do processo de MCP, conforme observado nas análises histológicas (Figuras 8 A-C; 37 A-D) e nas análises morfofisiológicas, onde os limbos foliares de três, das oito microplantas analisadas, apresentaram áreas cloróticas (Figuras 35 C, D), visto que, as citocininas podem ativar enzimas proteases e caspases (JONES, 2001). As estruturas foliares das plântulas evidenciaram-se morfológica e histologicamente normais, com ausência de áreas cloróticas no limbo e isentas de lacunas no parênquima clorofiliano (Figuras 8 D-F; 36 A-D; 37 E-H).

As análises histológicas desenvolvidas para o monitoramento do potencial e vias morfogênicas nas bases caulinares contendo o meristema apical das microplantas (A) e plântulas (grupo BII) (Figuras 40 A-M) evidenciaram nas microplantas mantidas *in vitro* por 8 anos (grupo A), a ausência de embriões somáticos, o desenvolvimento de uma única gema adventícia e a competência exclusiva das CPPs à diferenciação em cordões procambiais e, posteriormente, em feixes vasculares na região proximal destas estruturas (Figuras 40 A- E). No entanto, para esta mesma espécie, já se observou que a associação dos reguladores de crescimento ANA/BAP acrescidos ao meio de cultura MS, induziu as CPPs de ápices caulinares estabelecidos e mantidos *in vitro* por 10 meses, a atuarem como nichos de células alvo em três distintas vias morfogênicas: como multipotentes, originando feixes vasculares;

como pluripotentes, originando gemas adventícias (organogênese) e finalmente como células totipotentes, com o desenvolvimento de embriões somáticos (embriogênese somática) (ALMEIDA et al., 2012). Estes resultados corroboram aos observados nas análises histológicas, desenvolvidas nas bases caulinares, contendo o meristema apical das plântulas cultivadas *in vitro*, por um período de um ano (grupo BII) (Figuras 40 F-M), visto que, a associação destes reguladores de crescimento, também induziram as CPPs às mesmas vias morfogênicas observadas pelos autores, como células multipotentes originando feixes vasculares (Figuras 40 A, B); como pluripotentes, originando gemas adventícias (organogênese) (Figura 40 I) e finalmente como células totipotentes, com o desenvolvimento de embriões (embriogênese somática), destacando-se a origem multicelular, caracterizada pela frequente presença de traços de CPPs bipolarizados (Figuras 40 G, J, K).

As análises histoquímicas efetuadas nas secções histológicas das bases caulinares das microplantas (grupo A) e das plântulas (grupo BII) (Figuras 42, 43) permitiram maior acuidade ao monitoramento das vias morfogênicas seguidas pelas CPPs das plântulas (grupo BII) em resposta a associação dos reguladores de crescimento ANA e BAP, bem como, comparar o status metabólico entre os grupos analisados (A e BII) nos diferentes tecidos destas estruturas. Estas análises evidenciaram a presença mais elevada de proteínas nas CPPs das plântulas do grupo BII (Figuras 42 B, E) em relação às microplantas do grupo A, indicando maior síntese de RNA e atividade metabólica nas plântulas (STEIN et al., 2010), fato que corrobora as observações de Almeida et al. (2012) para esta mesma espécie, os quais detectaram elevado conteúdo protéico no citoplasma destas estruturas. Os autores verificaram ainda, reduzida concentração de amido e de polissacarídeos, particularmente durante o estabelecimento de centros meristemáticos unipolarizados (organogênese adventícia) e bipolarizados (embriogênese somática), confirmando o observado para as CPPs e para as células parenquimáticas adjacentes, das plântulas mantidas *in vitro* por um ano, na presença de reguladores de crescimento (grupo BII) (Figuras 42 F, G, H).

A presença elevada de polissacarídeos e reduzida de amido somente foram detectadas nos estádios iniciais ao estabelecimento de centros meristemáticos, sugerindo que estas substâncias são intensamente consumidas e mobilizadas nos estádios iniciais destes eventos morfogênicos (PINTO et al., 2011; ALMEIDA et al., 2012), desta forma, o incremento de amido poderia somente ser detectado em estádios mais avançados de desenvolvimento, conforme observado durante a embriogênese somática em *Picea glauca* (JOY IV et al., 1991). Normalmente, a presença de amido está relacionada à organogênese e embriogênese somática, visto que, desta substância ergástica provém recurso energético ao processo de organogênese

adventícia (gemas adventícias) (THORPE et al., 1986; FORTES; PAIS, 2000) e o fornecimento de agentes osmóticos na forma de açúcares solúveis (THORPE et al., 1986). A presença de amido também tem sido reportada durante a aquisição de competência embriogênica (WILLIAMS; MAHESWARAN, 1986; VERDEIL et al., 2007; ROCHA et al., 2011), embora não esteja sistematicamente relacionada com este evento, neste estágio morfogênico (GOH et al., 2001; STEINMACHER et al., 2011; ALMEIDA et al., 2012).

As CPPs também potencializaram o desenvolvimento do sistema de vascularização das plântulas (grupo BII), visto que com frequência detectou-se feixes vasculares em desenvolvimento na região distal das bases caulinares (Figuras 40 F, G, 42 F). A competência das CPPs à embriogênese somática multicelular, organogênese (gemas adventícias) e ao desenvolvimento do sistema de vascularização já na região distal das bases caulinares destas plântulas (grupo BII), pode estar fortemente associada a uma possível ausência do processo de habituação destas células aos reguladores de crescimento ANA e BAP, particularmente ao ANA. Nos testes histoquímicos efetuados em plântulas (grupo BII), observou-se a presença de proteínas e de substâncias fenólicas nas células em processo de diferenciação em elementos condutores do xilema (Figuras 42 F-G; 43 F, I), semelhante ao observado por Almeida et al. (2012) com esta espécie. As mesmas observações foram detectadas nos feixes vasculares localizados na região proximal das bases caulinares das microplantas (grupo A) e das plântulas (grupo BII), e as células parenquimáticas desta região apresentaram moderado conteúdo protéico e elevada presença de polissacarídeos e de amido (Figuras 43 A, G). Muito provavelmente, os polissacarídeos e o amido detectados são recursos energéticos ao desenvolvimento do sistema vascular e radicular, bem como, à aquisição de competência embriogênica das células parenquimáticas nas microplantas (grupo A). As análises histoquímicas também permitiram identificar o desenvolvimento de pró-embriões originados de divisões assimétricas das células parenquimáticas subepidérmicas nesta região, por meio do processo de desdiferenciação e transdiferenciação destas células e isolados pela presença de polissacarídeos (Figuras 43 B, C). No entanto, a ausência de substâncias ergásticas no interior destas células, a presença de núcleos disformes (em processo degenerativo) e a retração da membrana plasmática nas células destas estruturas em microplantas do grupo A, evidenciaram a ocorrência do processo de MCP e a inviabilidade dos pró-embriões (Figuras 43 B, C). Almeida et al. (2012), em estudo com *B. gasipaes*, detectaram em células parenquimáticas subepidérmicas de gemas adventícias, a mesma via morfogênica mencionada neste trabalho, na presença dos reguladores de crescimento ANA e TDZ (Thidiazuron), otimizando assim, a regeneração *in vitro* de pupunheiras. No entanto, os autores também

identificaram por meio da utilização da dupla coloração com ácido periódico de Schiff e Naphthol blue-black, que alguns pró-embriões tiveram limitados o simultâneo e o pleno desenvolvimento em decorrência a fatores físicos e da competição por nutrientes entre estas estruturas. Para estas microplantas (grupo A), no entanto, este evento parece estar mais precisamente relacionado ao processo de senescência e a um possível processo de habituação aos reguladores de crescimento.

A presença de MCP também foi detectada nas células dos tecidos das bainhas foliares localizados mais externamente a região proximal das bases caulinares das microplantas (grupo A), com intenso processo oxidativo e degenerativo das paredes celulares, identificado pela presença de polifenóis e de polissacarídeos, bem como, pela pronunciada retração da membrana plasmática (Figuras 43 D-F). No entanto, nas bainhas foliares mais externas das plântulas (grupo BII), foram detectadas células parenquimáticas adjacentes à epiderme abaxial, com competência embriogênica e pró-embriões viáveis originados diretamente de divisões assimétricas das células adjacentes à epiderme abaxial desta estrutura (Figuras 43 H-L). Embora os fenóis estejam diretamente relacionados à indução de embriões somáticos (ALEMANNO et al., 2003; REIS et al., 2008; ALMEIDA et al., 2012), não se detectou a presença desta substância ergástica nas células das bainhas foliares mais externas das plântulas (Figuras 43 H-L). No entanto, destaca-se a intensa presença de amido intracelular e de polissacarídeos nos espaços intercelulares durante este evento morfogênico, sendo sua ocorrência gradativamente maior no sentido da superfície adaxial para a superfície abaxial, bem como, o processo degenerativo do amido foi observado nos estratos celulares mais próximos a este evento morfogênico (Figuras 43H-L). Fato que reforça as evidências de que o amido realmente está relacionado à aquisição de competência embriogênica, (WILLIAMS; MAHESWARAN, 1986; VERDEIL et al., 2007; ROCHA et al., 2011) e que é intensamente consumido e mobilizado nos estádios iniciais destes eventos morfogênicos (PINTO et al., 2011; ALMEIDA et al., 2012). Já nos estratos parenquimático subepidérmico adaxial e no centro desta estrutura foi detectada a ocorrência do processo de MCP, sugerindo que a intensa presença de polissacarídeos nas camadas adjacentes às células embriogênicas, sejam decorrentes da degeneração da parede celular durante este evento (Figuras 43H-K), os quais, junto com o amido, constituem um importante recurso energético à indução e desenvolvimento dos pró-embriões. A embriogênese somática direta e com origem multicelular a partir da bipolarização de centros meristemáticos provenientes de células parenquimáticas localizadas no mesofilo de primórdios foliares, também foi observada para

esta mesma espécie (ALMEIDA; ALMEIDA, 2006), evidenciando o elevado potencial morfogênico destas estruturas à aquisição de competência embriogênica.

Neste contexto, as análises histológicas e histoquímicas comparativas dos resultados obtidos com as microplantas (grupo A) e plântulas (grupo BII) contradizem aqueles obtidos com as análises morfofisiológicas, nas quais a detecção de propágulos em plântulas do grupo BII foi consideravelmente reduzida (Tabela 5; Figura 36) em relação às microplantas do grupo A (Tabela 4; Figura 35). Certamente houve o estabelecimento do balanço nos níveis endógenos ótimos na relação auxina/citocinina à indução dos eventos morfogênicos supracitados nas bases caulinares das plântulas estabelecidas e mantidas *in vitro* por um ano, os quais somente seriam perceptíveis nas análises morfofisiológicas em período posterior ao mensurado, superando os resultados observados para as microplantas (grupo A) e corroborando as evidências de que em cultura de tecidos, o processo de senescência está relacionado aos estádios de depreciação morfogênicos (MURASHIGE; NAKANO, 1965; KONAN et al., 2010).

Sabendo-se também que o nível de metilação de DNA varia consideravelmente em plantas expostas a um prolongado tempo de cultivo *in vitro* (WANG et al., 2012) e entre os tipos de células e tecidos, peça chave na diferenciação e no desenvolvimento vegetal (IKEGAMI et al., 2009), bem como trata-se de um processo hereditário (OHGANE; YAGI; SHIOTA, 2008; KIM et al., 2010), que pode ocorrer quando as plantas são expostas às condições de cultura de tecidos (PHILLIPS; KAEPLER; OLHOFT, 1994) durante o processo de habituação mediante aplicação exógena de reguladores de crescimento (HOLLIDAY, 1987; AMASINO; JOHN, 1989; DURANTE et al., 1989) e tornar-se irreversível, particularmente quando ocorre o envelhecimento celular (KIM et al., 2010), não pode ser descartada a ocorrência do processo irreversível de metilação do DNA, como consequência de um possível processo de habituação, da senescência das células e/ou tecidos das bases caulinares das microplantas estabelecidas e cultivadas *in vitro* por longos períodos (grupo A), inclusive das células iniciais meristemáticas do ápice caulinar.

Nas análises histológicas, as células meristemáticas apicais caulinares das microplantas (grupo A) apresentaram uma menor relação nuclear-citoplasmática em relação ao observado nas células deste mesmo tecido em plântulas do grupo BII, quando comparados os volumes citoplasmáticos (Figuras 40 C, H), indicando uma possível disfunção nestas células localizadas no meristema apical caulinar das microplantas. A reação TUNEL confirma esta suposição, pois a maior incidência da fragmentação do DNA (MCP) e emissão de fluorescência ocorreu nas células iniciais meristemáticas do ápice caulinar das microplantas

(grupo A) em relação ao mesmo tecido das plântulas (grupo BI) analisadas (Figuras 15 C, F), evidenciando que a extensão da fragmentação do DNA destas células foi sensivelmente maior (CEITA et al., 2007) que aquela observada nas plântulas do grupo BI. Além disso, os testes histoquímicos efetuados nas secções histológicas das bases caulinares das microplantas (grupo A) e das plântulas (grupo BII) por meio da coloração com ácido periódico de Schiff e Naphthol blue-black (Figuras 42, 43) permitiram evidenciar que as células iniciais meristemáticas do ápice caulinar das microplantas, apresentaram apenas conteúdo protéico, ao passo que as células deste tecido meristemático em plântulas, apresentaram além de elevado conteúdo protéico, a discreta presença de amido e de polissacarídeos no citoplasma (Figuras 42 A, D). Esses resultados sugerem alterações metabólicas relacionadas ao funcionamento e à manutenção de células meristemáticas nas microplantas mantidas *in vitro* por oito anos (grupo A), a partir das células adjacentes a este tecido, das quais provêm aminoácidos, fosfatos e ácidos orgânicos transportados via floema (VERDEIL et al., 2007), embora a elevada densidade citoplasmática, caracterizada pela presença de proteínas pelo Naphtol blue-black (Figura 42 D) indiquem a ocorrência de elevada síntese de RNA e uma elevada atividade metabólica (STEIN et al., 2010).

Em plantas perenes lenhosas, o tempo de vida é determinado pela amplitude de persistência dos meristemas e manutenção de sua capacidade de divisão e diferenciação em novos brotos e ramos ao longo dos anos, os quais estão diretamente relacionados às complexas interações de fatores externos e internos, que podem causar efeitos mutagênicos na mitose (MUNNÉ-BOSCH, 2007). Neste contexto, a queda no potencial morfogênico observada nas bases caulinares das microplantas do grupo A analisadas (Figuras 40 A-E, 42 A-C), particularmente das CPPs (Figuras 10 A, B, D), é um forte indício de que a manutenção do meristema apical caulinar, bem como, a capacidade de divisão e diferenciação celular foram comprometidos, conduzindo algumas células ao processo de MCP, conforme detectados nas células de ambas as regiões distal e proximal (Figuras 10 C; 11 A, B) e promovendo desordens na reprogramação celular mediante a exposição aos reguladores de crescimento ANA e/ou BAP.

As células podem parar o processo de maturação em algum ponto do ciclo celular, tornando-se quiescentes, retornar à proliferação mediante estímulos adequados (POLLACK et al., 1994), ou ainda, entrar em processo MCP mediante da atividade das redes de genes que controlam este processo, independente de encontrar-se ou não em estado de quiescência (SPINELLI et al., 2006), no entanto, os resultados obtidos evidenciam ainda, que o retorno à proliferação não foi possível nestas microplantas (grupo A), conforme já mencionado, mesmo

com os estímulos adequados à multiplicação nesta espécie, como a aplicação exógena da associação do ANA e do BAP ao meio de cultivo (GRANER, 2009; ALMEIDA; ALMEIDA, 2006; ALMEIDA et al., 2012), embora o TDZ exerça papel potencializador à organogênese adventícia (gemas adventícias), bem como à indução de embriões somáticos com origem unicelular (GRANER, 2009; ALMEIDA et al., 2012). Portanto, a ausência de respostas das microplantas à indução de gemas adventícias (organogênese) e embriões somáticos (embriogênese somática) pode ser decorrente do processo habituação aos reguladores de crescimento ANA e/ou BAP e agravado pelo processo de senescência de determinada(s) célula(s) e/ou tecido(s), particularmente das células iniciais meristemáticas do ápice caulinar e das CPPs, visto que, ambos os processos promovem a metilação do DNA nuclear (HOLLIDAY, 1987; VLASOVA et al., 1995; KIM et al., 2010). No entanto, ao contrário da reversibilidade do processo de habituação (HOLLIDAY, 1987), o processo de metilação decorrente do envelhecimento celular é irreversível, comprometendo assim, o retorno ao estágio pluripotente ou totipotente (desdiferenciação) e aquisição de novas competências morfogênicas (KIM et al., 2010).

Um possível processo de metilação do DNA ao longo da senescência e envelhecimento destas microplantas (grupo A), associado a um provável processo de habituação aos reguladores de crescimento ANA e/ou BAP induziram as CPPs localizadas entre as células meristemáticas apicais caulinares e a região de diferenciação das células procambiais, na região distal destas estruturas (Figuras 40 A, B, D) que deixassem de atuar como nichos de células-alvo à multipotência (diferenciação do sistema vascular) e totipotência (embriogênese somática) (ALMEIDA et al., 2012), quando comparadas às plântulas cultivadas *in vitro* por um ano (Figuras 40 F, G, I, J, K). Embora se tenha observado a competência ao desenvolvimento de gemas adventícias em apenas uma, das oito microplantas analisadas, a origem para este evento morfogênico, foi incerta, mediante o estágio avançado de desenvolvimento desta estrutura (Figuras 40 A, E). Isto implica a ocorrência de uma queda pronunciada também à pluripotência em decorrência ao prolongado período de manutenção *in vitro*, visto que, para esta mesma espécie, a incidência de gemas adventícias demonstrou ser elevada em ápices caulinares mantidos *in vitro* por oito meses na presença da associação dos reguladores de crescimento ANA e BAP, as quais originaram-se das CPPs mais internas dos ápices caulinares (ALMEIDA et al., 2012). Entretanto, a potencialização à organogênese adventícia (gemas adventícias) e à embriogênese somática observadas em plântulas do grupo BII (Figuras 40 G, J, K), muito provavelmente relaciona-se à ausência de disfunções nas células iniciais meristemáticas do ápice caulinar, em decorrência

ao reduzido período de manutenção *in vitro* e à ausência de um processo de metilação das células deste tecido e das CPPs.

Nas amostras foliares analisadas, verificou-se que em microplantas (grupo A) e plântulas (grupo BII) o mesofilo apresentou-se histologicamente similar às células hipodérmicas de ambas as superfícies (Figuras 37 B-D; F-H), no entanto, a presença de cloroplastos íntegros e maiores nas células do mesofilo em plântulas do grupo BII, possibilitou a sua distinção com as células hipodérmicas em ambas as superfícies analisadas (Figuras 37 E-H) e foi uma característica marcante e distintiva daqueles observados em microplantas (grupo A), os quais, quando presentes, apresentaram-se disformes e alongados (Figuras 37 B-D; F-H). Estas observações foram similares àquelas efetuadas nas análises histológicas, visando à identificação do processo de MCP nas amostras foliares de ambos os grupos (Figuras 8 C, F) e a reduzida intensidade da auto-fluorescência observada nos cloroplastos das microplantas do grupo A, além de ser uma possível consequência do processo degenerativo detectados nestas organelas durante o processo de MCP (Figuras 12 A-C; 13 A-C; 31 B, C) (ARDUIN; KRAUS, 2001; WRIGHT; DOORN; GUNAWARDENA, 2009), e à degeneração dos pigmentos durante o processo de senescência (DHINDSA; MATAWE, 1981), conforme já discutido, pode estar associada às desordens relacionadas à síntese de clorofilas durante um possível processo de habituação aos reguladores de crescimento ANA e/ou BAP. A independência das células às citocininas e auxinas, bem como à síntese de poliaminas durante o processo de habituação, está integrada com as vias bioquímicas primárias, e implica tanto a ativação da via das pentose-fosfato, em decorrência ao desvio do metabolismo do carbono e incremento da hidrólise de sacarose, como ao desvio de α -cetoglutarato do ciclo de Krebs, para a via glutamato-prolina-poliaminas por meio de uma rota anapleurótica (GASPAR et al., 2000, 2003), em detrimento à via metabólica Beale para a síntese de clorofilas (GASPAR et al., 1998, 1999).

Considerando que a habituação não causa apenas sensibilidade das células aos hormônios endógenos, mas também alterações no metabolismo do etileno e poliaminas (GASPAR et al., 2000, 2003), é possível que o estresse decorrente de sucessivas transferências de propágulos das microplantas do grupo A ao longo dos oito anos de manutenção *in vitro*, tenha induzido substancial emissão de etileno e consequente indução à síntese e acúmulo de poliaminas, causando disrupturas epigenéticas, conforme pressuposto por Konan et al. (2010) ao avaliarem vinte linhagens de dendezeiros (*Elaeis guineensis* Jacq.) cultivadas *in vitro* por um período de vinte anos.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os tecidos passam por constantes processos de renovação celular, em decorrência do equilíbrio entre a proliferação e a morte das células, caracterizada por um processo ativo de alterações morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e morte celular programada, sendo que, esta última atua também como um mecanismo de defesa, ativado sempre que ocorre uma injúria, um estresse, seja biótico (ataque de patógenos) ou abióticos (pH, temperatura, nutrição, exposição a reguladores de crescimento, entre outros), ou ainda quando o DNA apresenta-se danificado.

Baseado nos resultados obtidos, pressupõe-se que o tempo prolongado de manutenção *in vitro* de *B. Gasipaes*, teve como fator estressante os sucessivos subcultivos ao longo dos oito anos de manutenção *in vitro*, o que provavelmente favoreceu a síntese de etileno, ativando genes para a MCP, principalmente nas células parenquimáticas do mesofilo, nas células do tecido parenquimático cortical interno das raízes, bem como, nas células pré-procambiais, procambiais e parenquimáticas das bases caulinares. Adicionalmente, o processo de envelhecimento dos propágulos, particularmente das células iniciais meristemáticas do ápice caulinar, associado a um possível processo de habituação aos reguladores de crescimento ANA e/ou BAP destas microplantas (grupo A), podem ter promovido intenso processo de metilação do DNA, comprometendo assim, a reprogramação celular ao estado indiferenciado e a aquisição de competência à multipotência, pluripotência e totipotência, particularmente das CPPs localizadas na região distal das bases caulinares. Não se pode descartar a ocorrência de um acúmulo excessivo de poliaminas nestas microplantas (grupo A), as quais podem ter promovido disrupturas epigenéticas.

Estes eventos culminaram com a senescência das células dos tecidos supracitados, induzindo-as ao processo de MCP, no entanto, sem acarretar a morte dos órgãos e das microplantas como um todo, mas comprometendo severamente o processo de multiplicação em grande escala desta espécie. Isto evidencia a necessidade de efetuar ressalvas ao princípio da totipotencialidade creditado por Haberlandt (1902), que enunciou que cada célula vegetal possui o potencial genético para reproduzir um organismo inteiro.

Os resultados obtidos neste trabalho, também evidenciam a necessidade de que novas pesquisas sejam efetuadas no processo de regeneração *in vitro*, particularmente avaliando-se cada espécie como um caso específico, considerando-se o ciclo de vida e as alterações observadas ao longo de sua manutenção *in vitro*. Também faz-se necessário o desenvolvimento de análises à mensuração dos níveis endógenos de auxinas e citocininas, da emissão de etileno, dos níveis de poliaminas, de cálcio citoplasmático e de metilação do

DNA, particularmente nas células presentes nos meristemas apicais caulinares, e avaliações no processo de aclimatização dos propágulos. Cabe ainda ressaltar que, o envelhecimento promove o encurtamento dos telômeros e que disfunções nestas estruturas localizadas nos cromossomos, acarretam defeitos morfogênicos, bem como, na função dos meristemas apicais com deficiência da enzima telomerase.

A compreensão dos mecanismos e possíveis alterações das vias morfogênicas e sua correlação com a ocorrência da habituação, senescência e morte celular programada, são extremamente importantes para o desenvolvimento de métodos de cultivo *in vitro* que previnam as perdas de indivíduos micropropagados.

7 CONCLUSÕES

- 1) Microplantas mantidas por longos períodos *in vitro* apresentam alterações ultraestruturais e danos no DNA, em consequência do processo de morte celular.
- 2) O cultivo *in vitro* de microplantas por longos períodos realmente afeta o potencial morfogênico.
- 3) Considerando-se que os processos bioquímicos independem da idade da planta, mas sim da sinalização genética, análises histocitológicas, histoquímicas e morfofisiológicas são fundamentais para a detecção de alterações no metabolismo primário e secundário, bem como, no potencial e vias morfogênicas em plantas mantidas *in vitro* por longos períodos.
- 4) A queda no potencial morfogênico das microplantas mantidas por longos períodos *in vitro* está relacionada ao processo de senescência em decorrência ao envelhecimento das microplantas, bem como a um possível processo de habituação aos reguladores de crescimento ANA e/ou BAP.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, A.A.; GRACE; YEOMAN. Rooting and establishment of calabrian pine plantlets propagated *in vitro*: influence of growth substances, rooting medium and origin of explant. **New Phytologist**, Oxford, v. 113, n. 2, p. 193-202, 1989.
- ABREU, I.N.; PINTO, J.E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V.; MORAIS, A.R.; GEROMEL, C.; LADEIRA, A.; LAMEIRA, O.A. Propagação *in vivo* e *in vitro* de *Cissus sicyoides*, uma planta medicinal. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 33, n. 1, p. 1-7, 2003.
- ABREU-TARAZI, M.F.; NAVARRETE, A.A.; ANDREOTE, F.D.; ALMEIDA, C.V.; TSAI, S.M.; ALMEIDA, M. Endophytic bacteria in long-term *in vitro* cultivated “axenic” pineapple microplants revealed by PCR–DGGE. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 26, n. 3, p. 555-560, 2010.
- AKIN-IDOWU, P.E.; IBITOYE, D.O.; ADEMOYEGUN, O.T. Tissue culture as a plant production technique for horticultural crops. **African Journal of Biotechnology**, Naibori, v. 8, n. 16, p. 3782-3788, 2009.
- ALEMANN, L.; RAMOS, T.; GARGADENEC, A.; ANDARY, C.; FERRIERE, N. Localization and identification of phenolic compounds in *Theobroma cacao* L. somatic embryogenesis. **Annals of Botany**, Oxford, v. 92, n. 4, p. 613-623, 2003.
- ALMEIDA, C.V.; ANDREOTE, F.D.; YARA, R.; TANAKA, F.; AZEVEDO, J.L.; ALMEIDA, M. Bacteriosomes in axenic plants: endophytes as stable endosymbionts. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 25, n. 10, p. 1757-17642, 2009.
- ALMEIDA, M. **Emprego da Cultura “in vitro” para multiplicação vegetativa em pupunha (*Bactris gasipaes* H.B.K.) Palmae**. 1994. 121 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1994.
- ALMEIDA, M.; ALMEIDA, C.V. Somatic embryogenesis and *in vitro* plant regeneration from pejiabaye adult plant leaf primordial. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 9, p. 1449-1452, 2006.
- ALMEIDA, M.; KERBAUY, G.B. Micropropagation of *Bactris gasipaes* H.B.K. (Palmae) through flowers bud culture. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Lavras, v. 8, n. 3, p. 215-217, 1996.
- ALMEIDA, M.; ALMEIDA, C.V.; GRANER, E.M.; BRONDANI, G.E.; ABREU-TARAZI, M.F. Pre-procambial cells are niches for pluripotent and totipotent stem-like cells for organogenesis and somatic embryogenesis in the peach palm: a histological study. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 31, n. 8, p. 1495-1515, 2012.
- ALVES DE BRITO, C.J.F.; RODELLA, R.A.; DESCHAMPS, F.C. Perfil químico da parede celular e suas implicações na digestibilidade de *Brachiaria brizantha* e *Brachiaria humidicola*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 32, n. 6, supl. 2, p. 1835-1844, 2003.

AMASINO, R.M.; JOHN, MC. Extensive changes in DNA methylation patterns accompany activation of a silent T-DNA ipt gene in *Agrobacterium tumefaciens*-transformed plant cells. **Molecular and Cell Biology**, Washington, v. 9, n. 10, p. 4298-4303, 1989.

ANAZETTI, M.C.; MELO, P.S. Morte celular por apoptose: uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp Pesquisa**, Campinas, v. 1, n. 1, p. 37-58, 2007.

ARAI, F.; HIRAO, A.; OHMURA, M.; SATO, H.; MATSUOKA, S.; TAKUBO, K.; ITO, K.; KOH, G.Y.; SUDA, T. Tie2/Angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. **Cell**, Cambridge, v. 118, p. 149–161, 2004.

ARDUIN, M.; KRAUS, J.E. Anatomia de galhas de ambrosia em folhas de *Baccharis concinna* e *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 63-72, 2001.

ARENDS, M.J.; MORRIS, R.G.; WYLLIE, A.H. Apoptosis: the role of the endonuclease. **American Journal of Pathology**, Bethesda, n. 136, p. 593-608, 1990.

ARIAS, O. Propagación vegetative por cultivos de tejidos del pejobaye (*Bactris gasipaes* H.B.K.) **Revista de la Asociación Bananera Nacional**, San Jose, v.9, p.24-27, 1985.

ASADA, K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. **Plant Physiology**, Rockville, v. 141, n. 2, p. 391–396, 2006.

ASEMOTA, O.; EKE, C.R.; ODEWALE, J.O. Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) *in vitro* morphogenesis in response to growth regulators, sucrose and nitrogen. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 6, n. 20, p. 2353-2357, 2007.

AUSTIN, J.R.; FROST, E.; VIDI, P.A.; KESSLER, F.; STAEHELIN, L.A. Plastoglobules are lipoprotein subcompartments of the chloroplast that are permanently coupled to thylakoid membranes and contain biosynthetic enzymes. **Plant Cell**, Waterbury, v. 18, n. 7, p. 1693–1703, 2006.

AYUB, R.A.; GEBIELUCA, A.N. Embriogênese somática em genótipos de café (*Coffea arabica*) é citocinina dependente. **Exact Soil Science, Agricultural Science Engineering**, Ponta Grossa, v. 9, n. 2, p. 25-30, 2003.

BABU, K.N.; SAJINA, A.; MINOO, D.; JOHN, C.Z.; MINI, P.M.; TUSHAR, K.V.; REMA, J.; RAVINDRAN, P.N. Micropropagation of camphor tree (*Cinnamomum camphora*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 74, n. 2, p. 179–183, 2003.

BARBOSA, S.B.S.C.; GRACIANO-RIBEIRO, D.; TEIXEIRA, J.B.; PORTES, T.A.; SOUZA, L.A.C. Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. **Pesquisa Pecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 2, p. 185-194, 2006.

BATAGIN, K.D. **Análise anátomo-fisiológicas de folhas de pupunheiras cultivadas *in vitro*, *ex vitro* e *in vivo* visando otimizar o protocolo de aclimatização**. 2008. 107 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

BATAGIN, K.D.; ALMEIDA, C.V.; TANAKA, F.A.O.; ALMEIDA, AM. Alterações morfológicas foliares em abacaxizeiros cv. IAC “Gomo-de-mel” micropropagados e aclimatizados em diferentes condições de luminosidade. **Acta Botânica Brasílica**, Porto Alegre, v. 23, n. 1, p. 85-92, 2009.

BECK, E.; SCHEIBE, R. Senescence and ageing in plants and cyanobacteria. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 119, n. 1, p. 1-4, 2003.

BEKHEET, S.A.; SAKER, M.M. *In vitro* propagation of Egyptian date palm: II-Direct and indirect shoot proliferation from shoot-tip explants of *Phoenix dactylifera* L. c.v. Zaghlool. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON DATE PALM, 1., 1998, Al Ain. **Proceedings...** Al Ain: United Arab Emirates University, Faculty of Agriculture Science, 1998. p. 150-157.

BEERS, E.P. Programmed cell death during plant growth and development. **Cell Death and Differentiation**, Cambridge, v. 4, n. 8, p. 649-661, 1997.

BERLYN, G.P.; MIKSCHE, J.P.P. **Botanical microtechnique and citochemistry**. Ames: Iowa State University Press, 1976. 326 p.

BERTONI, B.W.; DAMIÃO FILHO, C.F.; MORO, J.R.; FRANÇA, S.C.; PEREIRA, A.M.S. Micropropagação de *Calendula officinalis* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 2, p. 48-54, 2006.

BESSE, I.; VERDEIL, J.L.; DUVAL, Y.; SOTA, B.; MALDNEY, R. ; MIGIRIAC, E. Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) clonal fidelity: endogenous cytokinins and indolacetic acid in embryogenic callus cultures. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 43, n. 7, p. 983-989, 1992.

BLUMWALD, E.; AHARON, G.S.; LAM, B.C.H. Early signal transduction pathways in plant-pathogen interactions. **Trends in Plant Science**, London, v. 3, n. 9, p. 342-346, 1998.

BOK, J.W.; ISHIDA, K.I.; GRIFFITHS, A.J.F. Ultrastructural changes in *Neurospora* cells undergoing senescence induced by kalilo plasmids. **Mycologia**, Lawrence, v. 95, n. 3, p. 500-505, 2003.

BONNEAU, L.; GE, Y.; DRURY, G.E.; GALLOIS, P. What happened to plant caspases? **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, n. 3, p. 491-499, 2008.

BORDALLO, P.N.; SILVA, D.H.; MARIA, J.; CRUZ, C.D.; FONTES, E.P. Somaclonal variation on *in vitro* callus culture potato cultivars. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 2, p. 300-304, 2004.

BORGES JÚNIOR, N.; SOBORSA, R.C.; MARTINS-CODER, M.P. *In vitro* multiplication of black wattle (*Acacia mearnsii* De Wild.) axillary buds. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 28, n. 4, p. 493-498, 2004.

BOVI, M.L.A. Palmito pupunha-informações básicas para o cultivo. In: ENCONTRO SOBRE PRODUÇÃO DE PALMITO, 1993, Piracicaba. Piracicaba: Departamento de Agricultura; CALQ, 1993. p. 12-23.

- BOVI, M.L.A.; MARTINS, C.C.; SPIERING, S.H. Desidratação de sementes de quatro lotes de pupunheira: efeito sobre a germinação e vigor. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 1, p. 109-112, 2004.
- BOZHKO, P. Regulation of programmed cell death in plant embryogenesis. **BMC Plant Biology**, London, v. 5, suppl. 1, p. S6, 2005.
- BREUSEGEM, F. van; DAT, J.F. Reactive oxygen species in plant cell death. **Plant Physiology**, Rockville, v. 141, n. 2, p. 384-390, 2006.
- BUCHANAN-WOLLASTON, V. The molecular biology of leaf senescence. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 48, n. 307, p. 181-199, 1997.
- BUCKNER, B.; JANICK-BUCKNER, D.; GRAY, J.; JOHAL, G.S. Cell-death mechanisms in maize. **Trends in Plant Science**, London, v. 3, n. 6, p. 218-223, 1998.
- CALVETE; E.O.; AZEVEDO, M.; BORDIGNON, M.H.; SUZIN, M. Anatomic analyses and biomass of strawberry plants cultivated *in vitro* and *ex vitro*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 4, p. 649-653, 2002.
- CAMPOS, P.P.; VASCONCELOS, A.C.; MELO, M.M. Apoptose no placentomo de cabras gestantes intoxicadas experimentalmente com cipó preto – *Tetrapteryx multiglandulosa*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 56, n. 1, p. 19-24, 2004.
- CAO, J.; JIANG, F.; SODMERGEN; CUI, K. Time-course of programmed cell death during leaf senescence in *Eucommia ulmoides*. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 116, n. 1, p. 7-12, 2003.
- CAPELLADES, M.; LEMEUR, L.; DEBERGH, P. Effects of sucrose on starch accumulation and rate of photosynthesis in *Rosa* cultured *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 25, n. 1, p. 21-26, 1991.
- CARRASCO, P.; CARBONELL, J. Involvement of a neutral proteolytic activity in the senescence of unpollinated ovaries of *Pisum sativum* L. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 72, n. 3, p. 610-616, 1988.
- CEDAR, H.; RAZIN, A. DNA methylation and development. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1049, n. 1, p. 1-8, 1990.
- CEDZICH, A.; STRANSKY, H.; SCHULZ, B.; FROMMER, W.B. Characterization of cytokinin and adenine transport in *Arabidopsis* cell cultures. **Plant Physiology**, Rockville, v. 148, p. 1857-1867, 2008.
- CEITA, G.O.; MACÊDO, J.N.A.; SANTOS, T.B.; ALEMANN, L.; GESTEIRA, A.S.; MICHELI, F.; MARIANO, A.C.; GRAMACHO, K.P.; SILVA, D.C.; MEINHARDT, J.; MAZZAFERA, P.; PEREIRA, G.A.G.; CASCARDO, J.C.M. Involvement of calcium oxalate degradation during programmed cell death in *Theobroma cacao* tissues triggered by the hemibiotrophic fungus *Crinipellis perniciosus*. **Plant Science**, Atlanta, v. 173, n. 2, p. 106-117, 2007.

CENTELLAS, A.Q.; FORTES, G.R.L.; MÜLLER, N.T.G.; ZANOL, G.C.; FLORES, R.; GOTTINARI, R.A. Efeito das auxinas sintéticas no enraizamento *in vitro* da macieira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 2, p. 181-186, 1999.

CHANG, C.J.; KAO, C.H. H₂O₂ metabolism during senescence of rice leaves: changes in enzyme activities in light and darkness. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 25, n. 1, p. 11-15, 1998.

CHATURVEDI, H.C.; MITRA, G.C. A shift in morphogenic pattern in citrus callus tissue during prolonged culture. **Annals of Botany**, Oxford, v. 39, n. 4, p. 683-687, 1975.

CHRISTIANSON, M.L.; WARNICK, D.A. Competence and determination in the process of *in vitro* shoot organogenesis. **Developmental Biology**, New York, v. 95, n. 2, p. 288-293, 1983.

_____. Organogenesis *in vitro* as developmental process. **HortScience**, Alexandria, v. 23, n. 3, p. 515-519, 1988.

CHURCH, D.L.; GALSTON, A.W. Kinetics of determination in the differentiation of isolated mesophyll cells of *Zinnia elegans* to tracheary elements. **Plant Physiology**, Rockville, v. 88, n. 1, p. 92-96, 1988.

CLEMENT, C.R. Pupunha uma árvore domesticada. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, n. 5, p. 42-49, 1987.

COHEN, J.J. Apoptosis. **Immunology Today**, Barking, v. 14, n. 3, p. 126-130, 1993.

COHEN, J.D.; BANDURSKI, R.S. Chemistry and physiology of the bound auxins. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 33, n. 1, p. 403-430, 1982.

COLLINS, R.J.; HARMON, B.V.; GOBÉ, G.C.; KERR, J.F.R. Internucleosomal DNA cleavage should not be the sole criterion for identifying apoptosis. **International Journal of Radiation Biology**, London, v. 61, n. 4, p. 451-453, 1992.

CURTIN, J.F.; DONOVAN, M.; COTTER, T.G. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 265, n. 1/2, p. 49-72, 2002.

DANON, A.; DELORME, V.G.; MAILHAC, N.; GALLOIS, P. Plant programmed cell death: a common way to die. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 38, n. 9, p. 647-655, 2000.

DEEPAK, P.; KADAMBARI, G.; GAUTAM, S.; AGNIHOTRI, A. Activated charcoal induced high frequency microspore embryogenesis and efficient doubled haploid production in *Brassica juncea*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 93, n. 3, p. 269-282, 2008.

DEMARLY, Y. La notion de programme genetique chez les vegetaux superieurs. **Annual of Amelior Plantes**, Paris, v. 26, n. 2, p. 117-138, 1976.

DEMASON, D.A. The primary thickening meristem: definition and function in monocotyledons. **American Journal of Botany**, Palo Alto, v. 70, n. 6, p. 1195-1204, 1983.

De SMET, I.; BEECKMAN, T. Asymmetric cell division in land plants and algae: the driving force for differentiation. **Nature Reviews - Molecular Cell Biology**, London, v. 12, n. 3, p. 177-188, 2011.

De SMET, I.; VOSS, U.; JÜRGENS, G.; BEECKMAN, T. Receptor-like kinases shape the plant. **Nature Cell Biology**, London, v. 11, n. 10, p. 1166-1173, 2009.

De SMET, I.; TETSUMURA, T.; De RYBEL, B.; FREY, N.F.; LAPLAZE, L.; CASIMIRO, I.; SWARUP, R.; NAUDTS, M.; VANNESTE, S.; AUDENAERT, D.; INZÉ, D.; BENNET, M.J.; BEECKMAN, T. Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of *Arabidopsis*. **Development**, Cambridge, v. 134, n. 4, p. 681-690, 2007.

DETTMER, J.; ELO, A.; HELARIUTTA, Y. Hormone interactions during vascular development. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 69, n. 4, p. 347-360, 2009.

De VEYLDER, L.; BEECKMAN, T.; INZÉ, T. The ins and outs of the plant cell cycle. **Nature Reviews - Molecular Cell Biology**, London, v. 8, n. 8, p. 655-665, 2007.

DHINDSA, R.S.; MATAWE, W. Drought tolerance in two mosses - correlated with difference against lipid peroxidation. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 32, n. 1, p. 19-21, 1981.

DISTEL, H.; HUDSON, R. Judgement of odor intensity is influenced by subject's knowledge of the odor source. **Chemical Senses**, Oxford, v. 26, n. 3, p. 247-251, 2001.

DOBREV, P.; MOTYKA, V.; GAUDINOVÁ, A.; MALBECK, J.; TRÁVNÍCKOVÁ, A.; KAMÍNEK, M.; VANKOVÁ, R. Transient accumulation of *cis*- and *trans*-zeatin type cytokinins and its relation to cytokinin oxidase activity during cell cycle of synchronized tobacco BY-2 cells. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 40, n. 4, p. 333-337, 2002.

DOMÍNGUEZ, F.; MORENO, J.; CEJUDO, F.J. A gibberellin-induced nuclease is localized in the nucleus of wheat aleurone cells undergoing programmed cell death. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 279, n. 12, p. 11530-11536, 2004.

DOORN, W.G. van. Classes of programmed cell death in plants, compared to those in animals. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 14, p. 4749-4761, 2011.

DOORN, W.G. van; WOLTERING, E.J. Senescence and programmed cell death: substance or semantics? **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 406, p. 2147-2153, 2004.

DOYLE, S.; McCABE. Can chloroplasts regulate plant programmed cell death? **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, Glasgow, v. 146, p. s.202-203, 2007. Abstracts.

- DURANTE, M.; CECCHINI, E.; NATALI, L.; CITTI, L.; GERI, C.; PARENTI, R.; RONCHI, V.N. 5-azacytidine induced tumorous transformation and DNA hypomethylation in *Nicotiana* tissue cultures. **Developmental Genetics**, New York, v. 10, n. 4, p. 298-303, 1989.
- DZAZIO, P.M.; BIASI, L.A.; ZANETTE, F. Micropropagação do porta-enxerto de videira '420-A'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 3, p. 759-764, 2002.
- EKLUND, D.M.; EDQVIST, J. Localization of nonspecific lipid transfer proteins correlate with programmed cell death responses during endosperm degradation in *Euphorbia lagascae* seedlings. **Plant Physiology**, Rockville, v. 132, n. 3, p. 1249-1259, 2003.
- ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Photoautotrophic micropropagation and use of the natural light. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 4, p. 961-965, 2005.
- ESPOSITO-POLESI, N.P. Microrganismos endofíticos e a cultura de tecidos vegetais: quebrando paradigmas. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 9, n. 4, p. 533-541, 2011.
- FELLBRICH, G.; ROMANSKI, A.; VARET, A.; BLUME, B.; BRUNNER, F.; ENGELHARDT, S.; FELIX, G.; KEMMERLING, B.; KRZYMOWSKA, M.; NÜRNBERGER, T. NPP1, a Phytophthora- associated trigger of plant defense in parsley and *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 32, n. 3, p. 375-390, 2002.
- FERNANDO, J.A. **Estudos anatômicos e ultra-estruturais da organogênese *in vitro* de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.** 2005. 106 p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.
- FERREIRA, S.A.N.; SANTOS, L.A. Viabilidade de sementes de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth). **Acta Amazônica**, Manaus, v. 22, n. 3, p. 303-307, 1992.
- FERREIRA, S.A.N.; CLEMENTE, C.R.; RANZANI, G.; COSTA, S.S. Contribuição ao conhecimento do sistema radicular da pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth, Palmae). II. Solo Latossolo Amarelo, textura argilosa. **Acta Botânica**, Manaus, v. 25, n. 3/4, p. 161-170, 1995.
- FERREIRA, V.L.P.; GRANER, M.; BOVI, M.L.A.; DRAETTA, I.S.; PASCHOALINO, J.E.; SHIROSE, I. Comparação entre os palmitos de *Guilielma gasipaes* Bailey (pupunha) e *Euterpe edulis* Mart. (juçara). I. Avaliações físicas, organolépticas e bioquímicas. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 12, n. 1, p. 255-272, 1982.
- FILONOVA, L.H.; ARNOLD, S. von; DANIEL, G.; BOZHKO, P.V. Programmed cell death eliminates all but one embryo in a polyembryonic plant seed. **Cell Death and Differentiation**, Cambridge, v. 9, n. 10, p. 1057-1062, 2002.
- FILONOVA, L.H.; BOZHKO, P.V.; BRUKHIN, V.B.; DANIEL, G.; ZHIVOTOVSKY, B.; ARNOLD, S. von. Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, Norway spruce. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 113, pt. 24, p. 4399-4411, 2000.
- FINNEGAN, E.J.; KOVAK, K.A. Plant DNA methyltransferases. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 43, n. 2/3, p. 189-201, 2000.

FINK, S.L.; COOKSON, B.T. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. **Infection and Immunity**, Washington, v. 73, n. 4, p. 1907-1916, 2005.

FISHER, D.B. Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. **Histochemistry and Cell Biology**, Berlin, v. 16, n. 1, p. 92-96, 1968.

FORTES, A.M.; PAIS, M.S. Organogenesis from internode-derived nodules of *Humulus lupulus* var. Nugget (Cannabaceae): histological studies and changes in the starch content. **American Journal of Botany**, Palo Alto, v. 87, n. 7, p. 971-979, 2000.

FRAGA, M.; CAÑAL, M.; RODRIGUEZ, R. Phase-change related epigenetic and physiological changes in *Pinus radiata* D. Don. **Planta**, Berlin, v. 215, n. 4, p. 672-678, 2002a.

_____. Genomic DNA methylation-demethylation during aging and reinvigoration of *Pinus radiata*. **Tree Physiology**, Victoria, v. 22, n. 11, p. 813-816, 2002b.

FRANCIS, D.; SORRELL, D.A. The interface between the cell cycle and plant growth regulators. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 33, n. 1, p. 1-12, 2001.

FRANCO, L.L. **Apoptose em placenta de mulheres com e sem infecção por *Streptococcus agalactiae***. 2009. 62 p. Dissertação (Mestre em Patologia Geral) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

FUKUDA, H. Tracheary element formation as a model system of cell differentiation. **International Review of Cytology**, New York, v. 136, p. 289-332, 1992.

FURTADO, C.M.; CARVALHO, J.M.F.C.; CASTRO, J.P.; SILVA, H. Comparação da frequência de regeneração *in vitro* do amendoim (*Arachis hypogaea*), utilizando diferentes citocininas. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, João Pessoa, v. 7, n. 1, p. 51-58, 2007.

FUZINATTO, V.A.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. Evidence of programmed cell death during microsporogenesis in an interspecific *Brachiaria* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 6, n. 2, p. 308-315, 2007.

GADJEV, I.; STONE, J.M.; GECHEV, T.S. Programmed cell death in plants: new insights into redox regulation and the role of hydrogen peroxide. **International Review of Cell and Molecular Biology**, Knoxville, v. 270, p. 87-143, 2008.

GALLOIS, P.; ROTARI, V.; HE, R.; GE, H. Identification of caspase-like proteases regulating programmed cell death in *Arabidopsis*. In: ANNUAL MAIN MEETING OF THE SOCIETY FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY, 2007, San Diego. **Proceedings...** San Diego: Elsevier, 2007. p. S199-204.

GAMBORG, O.L. Plant tissue culture. Biotechnology. Milestones. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, New York, v. 38, n. 2, p. 84-92, 2002.

GAN, Q.; YOSHIDA, T.; McDONALD, O.D.; OWENS, G.K. Concise review: epigenetic mechanisms contribute to pluripotency and cell lineage determination of embryonic stem cells. **Stem Cells**, Hoboken, v. 25, n. 1, p. 2–9, 2007.

GAN, S: Mitotic and postmitotic senescence in plants. **Science of Aging Knowledge Environment**, Washington, v. 2003, n. 38, p. re7, 2003.

GARCIA, T.B. **Efeito de ácido indol 3-butírico no enraizamento de diferentes tamanhos de perfis de pupunheira (*Bactris gasipaes* H.B.K.)**. 1988. 36 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1988.

GÄRTNER, P.J.; NAGL, W. Acid phosphatase activity in plastids (plastolysomes) of senescing embryo-suspensor cells. **Planta**, Berlin, v. 249, n. 4, p. 341-349, 1980.

GASPAR, T.H.; KEVERS, C.; BISBIS, B.; FRANCK, T.; CRÈVECOEUR, M.; GREPPIN, H.; DOMMES, J. Loss of plant organogenic totipotency in the course of *in vitro* neoplastic progression. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, New York, v. 36, n. 3, p. 171–181, 2000.

GASPAR, T.H.; KEVERS, C.; FAIVRE-RAMPANT, O.; CRÈVECOEUR, M.; PENNEL, C.L.; GREPPIN, H.; DOMMES, J. Changing concepts in plant hormone action. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, New York, v. 39, n. 2, p. 85-106, 2003.

GASPAR, T.H.; KEVERS, C.; BISBIS, B.; PENEL, C.; GREPPIN, H.; GARNIER, F.; RIDEAU, M.; HUAULT, C.; BILLARD, J.P.; FOIDART, J.M. Shemin pathway and peroxidase deficiency in a fully habituated and fully heterotrophic nonorganogenic sugarbeet callus: an adaptative strategy or the consequence of modified hormonal balances and sensitivities in these cancerous cells? A review and reassessment. **Cell Proliferation**, Oxford, v. 32, n. 5, p. 249–270, 1999.

GASPAR, T.H.; BISBIS, B.; KEVERS, C.; PENEL, C.; GREPPIN, H.; LE DILY, F.; BILLARD, J.P.; HUAULT, C.; GARNIER, F.; RIDEAU, M.; FOIDART, J.M. Atypical metabolisms and biochemical cycles imposing the cancerous state on plant cells. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 24, n. 2, p. 135-144, 1998.

GAUTHERET, R.J. Sur la variabilité des propriétés physiologiques des cultures de tissus végétaux. **Revue Générale de Botanique**, Paris v. 62, p. 5-112, 1955.

GEHRING, M.; HUH, J.H.; HSIEH, T.F.; PENTERMAN, J.; CHOI, Y.; HARADA, J.J.; GOLDBERG, R.B.; FISCHER, R.L. DEMETER DNA glycosylase establishes MEDEA polycomb gene self-imprinting by allele-specific demethylation. **Cell**, Cambridge, v. 124, n. 3, p. 495–506, 2006.

GEORGIEVA, L.; ATANASSOV, A.; DAVIDKOVA, L.; KONDAKOVA, V. Long-term *in vitro* storage and multiplication of *Leucojum aestivum* L. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, Sofia, v. 24, n. 3, p. 1950-1954, 2010.

GILES, K.L.; MORGAN, W.M. Industrial scale plant micropropagation. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 5, n. 2, p. 35-39, 1987.

GOH, D.K.S.; BON, M.C.; ALIOTTI, F.; ESCOUTE, J.; FERRIERE, N.; MONTEUUIS, O. *In vitro* somatic embryogenesis in two major rattan species: *Calamus merrillii* and *Calamus subinermis*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, New York, v. 37, n. 3, p. 375–381, 2001.

GOLD, R.; SCHMIED, M.; GIEGERICH, G.; BREITSCHOPF, H.; HARTUNG, H.P.; TOKYKA, K.V.; LASSMANN, H. Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by combined use of *in situ* tailing and nick translation techniques. **Laboratory Investigation**, Baltimore, v. 71, n. 2, p. 219–225, 1994.

GÖNCZY, P. Mechanisms of asymmetric cell division: flies and worms pave the way. **Nature Reviews – Molecular Cell Biology**, London, v. 9, p. 355–366, 2008.

GORCZYCA, W.; GONG, J.; DARZYNKIEWICZ, Z. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the *in situ* terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. **Cancer Research**, Baltimore, v. 53, n. 8, p. 1945–1951, 1993.

GOVRIN, E.M.; LEVINE, A. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic *Botrytis cinerea*. **Current Biology**, v.10, n.13, p.751–757, 2000.

GRANER, E.M. **Avaliações morfofisiológicas do desenvolvimento de microplantas de pupunheiras submetidas a tratamentos com biorreguladores**. 2009. 242 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

GRANER, E.M.; OBERSCHELP, G.P.J.; BRONDANI, G.E.; BATAGIN-PIOTTO, K.D.; ALMEIDA, C.V.; ALMEIDA, M. TDZ pulsing evaluation on the *in vitro* morphogenesis of peach palm. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, Lucknow, v. 19, n. 2, p. 283–288, 2013.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCT; EMBRAPA, CNPH, 1990. p. 99–169.

GREENBERG, J.T.; YAO, N. The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. **Cellular Microbiology**, Berkeley, v. 6, n. 3, p. 201–211, 2004.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A.B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 53, n. 3, p. 335–343, 2007.

GROUT, B.W.W. Photosynthesis of regenerated plantlets *in vitro*, and stress of transplanting. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 230, p. 129–135, 1988.

GUERRA, M.; KENTON, A. Distribution of telomere DNA in mitotic and polytene nuclei of the anther tapetum of a tetraploid hybrid bean, *Phaseolus vulgaris* x *P. acutifolius*. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 19, n. 2, p. 313–318, 1996.

GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. **Apostila de biotecnologia: introdução ao conceito de biotecnologia**. São Carlos: UFSCar, CCA, 2006. 41 p. (Material de Apoio). Disponível em: <<http://www.cca.ufsc.br/lfdgv/Apostila%20Biotecnologia.pdf>>. Acesso em: 30 set. 2007.

GUIDOLIN, A.F. **Regeneração de plantas de *Phaseolus vulgaris* L. a partir de calos e transformação genética via *Agrobacterium***. 2003. 100 p. Tese (Doutorado em Energia Nuclear na Agricultura)– Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

GUNAWARDENA, A.; PEARCE, D.M.; JACKSON, M.B.; HAWES, C.R.; EVANS, D.E. Rapid changes in cell wall pectic polysaccharides are closely associated with early stages of aerenchyma formation, a spatially localized form of programmed cell death in roots of maize promoted by ethylene. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 24, n. 12, p. 1369–1375, 2001.

HABERLANDT, G. Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. **S.B.Weisen Wien Mathnaturw**, Wien, v.111, p.69-92, 1902.

HAECKER, A; GROSS-HARDT, R; GEIGES, B; SARKAR, A; BREUNINGER, H; HERRMANN, M; LAUX, T: Expression dynamics of WOX genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. **Development**, Cambridge, v. 131, n. 3, p. 657-668, 2004.

HARA-NISHIMURA, I.; HATSUGAI, N. The role of vacuole in plant cell death. **Cell Death and Differentiation**, Cambridge, v. 18, n. 8, p. 1298–1304, 2011.

HARE, P.D.; STADEN, J. van. Cytokinin oxidase: biochemical features and physiological significance. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 91, n. 1, p. 128–136, 1994.

HASBÚN, R.; VALLEDOR, L.; BERDASCO, M.; SANTAMARÍA, E.; CAÑAL, M.J.; RODRÍGUEZ, R.; RIOS, D.; SÁNCHEZ, M. *In vitro* proliferation and genome DNA methylation in adult chestnuts. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 693, n. 1, p. 333–339, 2005.

HÄSLER, J.; WÜEST, J.; GASPAR, T.; CRÈVECOEUR, M. Long term *in vitro*-cultured plant cells show typical neoplastic features at the cytological level. **Biology of the Cell**, Paris, v. 95, n. 6, p. 357–364, 2003.

HAUSMAN, J.F. Changes in peroxidase activity, auxin level and level and ethylene production during root formation by poplar shoots raised *in vitro*. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 13, n. 3, p. 263-268, 1993

HDIDER, C.; DESJARDINS, Y. Effects of sucrose on photosynthesis and phosphoenolpyruvate carboxylase activity of *in vitro* cultured strawberry plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 1, n. 36, p. 27-33, 1994.

HELD, M.A.; BOULAFLOUS, A.; BRANDIZZI, F. Advances in fluorescent protein-based imaging for the analysis of plant endomembranes. **Plant Physiology**, Palo Alto, v. 147, n. 4, p. 1469-1481, 2008.

HERMAN, E.M.; LARKINS, B.A. Protein storage bodies and vacuoles. **Plant Cell**, Waterbury, v. 11, n. 4, p. 601–613, 1999.

HOEBERICHTS, F.A.; WOLTERING, E.J. Multiple mediators of plant programmed cell death: interplay of conserved cell death mechanisms. **Bioessays**, Cambridge, v. 25, n. 1, p. 47-57, 2002.

HÖERTENSTEINER, S.; FELLER, U. Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 370, p. 927-937, 2002.

HOLLIDAY, R. The inheritance of epigenetic defects. **Science**, Washington, v. 238, n. 4824, p. 163-170, 1987.

HOVE, C.A. ten; HEIDSTRA, R. Who begets whom? Plant cell fate determination by asymmetric cell division. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 11, n. 1, p. 34-41, 2008.

HUERTE, V.F.; ARIAS, M.O. Propagación vegetativa del pejibaye. **Asbana**, San José, v. 5, n. 14, p. 10-13, 1981.

HUTCHINSON, M.J.; KRISHNARAJ, S.; SAXENA, P.K. Morphological and physiological changes during thidiazuron-induced somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium x hortorum* Bailey) hypocotyl cultures. **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v. 157, n. 4, p. 440-446, 1996.

IGASE, M.; OKURA, T.; KITAMI, Y.; HIWADA, K. Apoptosis and Bcl-xs in the intimal thickening of ballon-injured carotid arteries. **Clinical Science**, London, v. 96, n. 6, p. 605-612, 1999.

IKEGAMI, K.; OHGANE, J.; TANAKA, S.; YAGI, S.; SHIOTA, K. Interplay between DNA methylation, histone modification and chromatin remodeling in stem cells and during development. **International Journal of Developmental Biology**, Vizcaya, v. 53, n. 2/3, p. 203-214, 2009.

ILLG, R.D. Plant tissue culture techniques. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 86, suppl. 2, p. 21-24, 1991.

JENUWEIN, T.; ALLIS, C.D. Translating the histone code. **Science**, Washington, v. 293, n. 5532, p. 1074-1080, 2001.

JIMÉNEZ, V.M.; GUEVARA, E.; HERRERA, J.; BANGERTH, F. Endogenous hormone levels in habituated nucellar *Citrus* callus during the initial stages of regeneration. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 20, n. 1, p. 92-100, 2001.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: Mc Graw Hill Book, 1940. 523 p.

JOHN, P.C.L.; ZHANG, K.; DONG, C.; DIEDERICH, L.; WIGHTMAN, F. p34cdc2 related proteins in control of cell cycle progression, the switch between division and differentiation in tissue development, and stimulation of division by auxin and cytokinin. **Australian Journal of Plant Physiology**, Sidney, v. 20, n. 5, p. 503-526, 1993.

JONES, A.M. Programmed cell death in development and defense. **Plant Physiology**, Rockville, v. 125, n. 1, p. 94-97, 2001.

JOST, J.P. Nuclear extracts of chicken embryos promote an active demethylation of DNA by excision repair of 5-methyldeoxycytidine. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 90, n. 10, p. 4684–4688, 1993.

JOY IV, R.W.; YEUNG, E.C.; KONG, L.; THORPE, T.A. Development of white spruce somatic embryos. I. Storage product deposition. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, New York, v. 27, n. 1, p. 32–41, 1991.

KAEPLER, S.M.; KAEPLER, H.F.; RHEE, Y. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.43, n.2-3, p.179-188, 2000.

KANCHANAPOOM, K.; DOMYOAS, P. The origin and development of embryoids in oil palm (*Elaies guineensis* Jacq.) embryo culture. **Science Asia**, Mahidol, v. 25, p. 195-202, 1999.

KARNOVSKY, M.J.A. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 27, n. 2, p. 137-138, 1965.

KARUN, A.; SIRIL, E.A.; RADHA, E.; PARTHASARATHY, V.A. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from leaf and inflorescence explants of arecanut (*Areca catechu* L.). **Current Science**, Bangalore, v. 86, n. 12, p. 12-25, 2004.

KERBAUY, G.B. **Aspectos citológicos e fisiológicos de tecidos e calos de *Nicotiana tabacum* L. cv. Wisconsin 38**. 1981. 159 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1981.

KERR, J.F.R.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, Basingstoke, v. 26, n. 4, p. 239-257, 1972.

KESHET, I.; LIENMN-HURWITZ, J.; CEDAR, H. DNA methylation affects the formation of active chromatin. **Cell**, Cambridge, v. 44, n. 4, p. 535-543, 1986.

KEVERS, C.; BISBIS, B.; PENEL, C.; GREPPIN, H.; DOMMÈS, J.; GASPAR, T. Changes in the levels of hormones and related enzyme activities in the course of a neoplastic progression in sugarbeet cells in culture: a critical appraisal. **Current Topics in Phytochemistry**, Trivandrum, v. 2, p. 35-49, 1999.

KEVERS, C.; FILALI, M.; PETIT-PALY, G.; HAGÉGE, D.; RIDEAU, M.; GASPAR, T. Habituation of plant cells does not mean insensitivity to plant growth regulators. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, New York, v. 32, n. 3, p. 204–209, 1996.

KIM, K.; DOI, A.; WEN, B.; NG, K.; ZHAO, R.; CAHAN, P.; KIM, J.; ARYEE, M.J.; JI, H.; EHRLICH, L.I.R.; YABUCHI, A.; TAKEUCHI, A.; CUNNIFF, K.C.; HONGGUANG, H.; McKINNEY-FREEMAN, S.; NAVEIRAS, O.; YOON, T.J.; IRIZARRY, R.A.; JUNG, N.; SEITA, J.; HANNA, J.; MURAKAMI, P.; JAENISCH, R.; ORKIN, S.H.; WEISSMAN, I.L.; FEINBERG, A.P.; DALEY, G.Q. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. **Nature**, London, v. 467, n. 7313, p. 285-290, 2010.

KÖHLER, C.; HENNIG, L.; BOUVERET, R.; GHEYSELINCK, J.; GROSSNIKLAUS, U.; GRUISSEM, W. *Arabidopsis* MSI1 is a component of the MEA/FIE Polycomb group complex and required for seed development. **EMBO Journal**, Oxford, v. 22, n. 18, p. 4804–4814, 2003.

KONAN, K.E.; GASSELIN, T.D.; KOUADIO, Y.J.; FLORI, A.; RIVAL, A.; DUVAL, Y.; PANNETIER, C. *In vitro* conservation of oil palm somatic embryos for 20 years on a hormone-free culture medium: characteristics of the embryogenic cultures, derived plantlets and adult palms. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 29, n. 1, p. 1-13, 2010.

KOOP, D.M.; CONCEIÇÃO, L.; CARDOSO, S.E.A.; SILVA, D.C., GARCIA, D. Estudo histológico e molecular da morte celular programada (PCD) na interação *Hevea brasiliensis*-*Microcyclus ulei*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 55, 2009, Águas de Lindóia. **Resumos...** Águas de Lindóia: SBG, 2009. p. 101.

KOUKALOVÁ, B.; KOVARÍK, A.; FAJKUS, J.; SIROKÝ, J. Chromatin fragmentation associated with apoptotic changes in tobacco cells exposed to cold stress. **FEBS Letters**, Heidelberg, v. 414, n. 2, p. 289-292, 1997.

KRISHNAMURTHY, K.V.; KRISHNARAJ, R.; CHOZHAVENDAN, R.; CHRISTOPHER, F.S. The programme of cell death in plants and animals: a comparison. **Current Science**, Bangalore, v. 79, n. 9, p. 1169-1181, 2000.

KUMAR, A.; ALTABELLA, T.; TAYLOR, M.A.; TIBURCIO, A.F. Recent advances in polyamine research. **Trends in Plant Science**, London, v. 2, n. 4, p. 124-130, 1997.

KUZNETSOV, S.; LYANGUZOWA, M.; BOSH, T.C.G. Role of epithelial cells and programmed cell death in *Hydra* spermatogenesis. **Zoology**, Göttingen, v. 104, n. 1, p. 25-31, 2001.

LABAT-MOLEUR, F.; GUILLERMET, C.; LORIMIER, P.; ROBERT, C.; LANTUEJOUL, S.; BRAMBILLA, E.; NEGOESCU, A. TUNEL Apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, New York, v. 46, n. 3, p. 327-334, 1998.

LAMBÉ, P.; MUTAMBEL, H.; FOUCHÉ, H.; DELTOUR, R.; FOIDART, J.; GASPAR, T. DNA methylation as a key process in regulation of organogenic totipotency and plant neoplastic progression? **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, New York, v. 33, n. 3, p. 155–162, 1997.

LARKIN, P.J.; SCOWCROFT, W.R. Somaclonal variation: a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 60, n. 4, p. 197–214, 1981.

LAUREYS, F.; DEWITTE, W.; WITTERS, E.; MONTAGU, M. van; INZÉ, D.; ONCKELEN, H. van. Zeatin is indispensable for the G2-M transition in tobacco BY-2 cells, **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 426, n. 1, p. 29–32, 1998.

Le DILY, F.; KEVERS, C.; HUAULT, C.; BILLARD, J.P. Le cal habitué de betterave sucrière: déviations métaboliques et caractérisation. **Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège**, Liège, v. 67, p. 165-176, 1998.

LECHINOSKI, A.; FREITAS, J.M.N.; CASTRO, D.S.; LOBATO, A.K.S.; OLIVEIRA NETO, C.F.; CUNHA, R.L.M. Influência do estresse hídrico nos teores de proteínas e aminoácidos solúveis totais em folhas de Teca (*Tectona grandis* L. f.). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 4, p. 927-929, 2007. Suplemento 2.

LECOURIEUX-OUAKED, F.; PUGIN, A.; LEBRUN-GARCIA, A. Phosphoproteins involved in the signal transduction of cryptogein, an elicitor of defense reactions in tobacco. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 13, n. 8, p. 821-829, 2000.

LEDO, A.S.; GOMES, K.K.P.; BARBOZA, S.B.S.C.; VIEIRA, G.S.C.; TUPINAMBÁ, E.A.; ARAGÃO, W.M. Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos e aclimatização de plântulas de coqueiro-anão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 2, p. 147-154, 2007.

LEDO, A.S.; LAMEIRA, O.A.; BENBADIS, A.K.; MENEZES, I.C.; LEDO, C.A.S.; OLIVEIRA, M.S.P. Cultura *in vitro* de embriões zigóticos de açaizeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 3, p. 468-472, 2001.

LEDO, A.S.; LAMEIRA, O.A.; BENBADIS, A.K.; MENEZES, I.C.; OLIVEIRA, S.P.; MEDEIROS FILHO, S. Somatic embryogenesis from zygotic embryos of *Euterpe oleracea* Mart. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 3, p. 601-603, 2002.

LETHAM, D.S.; PALNI, M.S. The biosynthesis and metabolism of cytokinins. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 34, p. 163-197, 1983.

LI, S.W.; XUE, L.; XU, S.; FENG, H.; AN, L. Mediators, genes and signaling in adventitious rooting. **The Botanical Review**, New York, v. 75, n. 2, p. 230-247, 2009.

LI, W.; AHN, I.P.; NING, Y.; PARK, C.H.; ZENG, L.; WHITEHILL, J.; LU, H.; ZHAO, Q.; DING, B.; XIE, Q.; ZHOU, J.M.; DAÍ, L.; WANG, G.L. The U-box/ARM E3 ligase PUB13 regulates cell death, defense and flowering time in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 159, n. 1, p. 239-250, 2012.

LIM, P.O.; KIM, H.J.; NAM, H.G. Leaf senescence. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 58, n. 1, p. 115-136, 2007.

LIMA, L.M.S.; ALQUINI, Y.; BRITO, C.J.F.A. de; DESCHAMPS, F.C. Área de tecidos de folhas e caules de *Axonopus scoparius* (Flügge) Kuhl. e *Axonopus fissifolius* (Raddi) Kuhl. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 3, p. 425-430, 2001.

LIPPMAN, Z.; MARTIENSSSEN, R. The role of RNA interference in heterochromatic silencing. **Nature**, London, v. 431, n. 7006, p. 364-370, 2004.

LISTER, R.; PELIZZOLA, M.; KIDA, Y.S.; HAWKINS, D.; NERY, J.R.; HON, G.; ANTOSIEWICZ-BOURGET, J.; O'MALLEY, R.; CASTANON, R.; KLUGMAN, S.; DOWNES, M.; YU, R.; STEWART, R.; REN, B.; THOMSON, J.A.; EVANS, R.M.; ECKER, J.R. Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. **Nature**, London, v. 471, n. 7336, p. 68-75, 2011.

LIU, Y.; BASSHAM, D.C. Autophagy: pathways for self-eating in plant cells. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 63, p. 215-237, 2012.

LJUNG, K.; HULL, A.K.; KOWALCZYK, M.; MARCHANT, A.; CELENZA, J.; COHEN, J.D.; SANDBERG, G. Biosynthesis, conjugation, catabolism and homeostasis of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 50, n. 3/4, p. 309-332, 2002.

LOHMAN, K.N.; GAN, S.; JOHN, M.C.; AMASINO, R.M. Molecular analysis of natural leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 92, n. 2, p. 322-328, 1994.

LOIDL, P. A plant dialect of the histone language. **Trends in Plant Science**, London, v. 9, n. 2, p. 84-90, 2003.

LUDWIG-MÜLLER, J. Indole-3-butyric acid in plant growth and development. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 32, n. 2/3, p. 219-230, 2000.

LYNCH, P.; SOUCH, G.; TRIGWELL, S.; KELLER, J.; HARDING, K. Plant cryopreservation: from laboratory to genebank. **Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology**, Malaysia, v. 18, n. 1, p. 239-242, 2011.

MANSFIELD, S.G.; BRIARTY, L.G. Early embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. II. The developing embryo. **Canadian Journal of Botany**, Guelph, v. 69, p. 461-476, 1991.

MARCHIORO, L.E.T. **Produção de ácido indol acético e derivados por bactérias fixadoras de nitrogênio**. 2005. 74 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia Básica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

MARQUES, D.A. **Influência de fitorreguladores e fontes de nitrogênio na morfogênese in vitro de *Chrysanthemum morifolium* (Ramat) Tzvelev cv. Amarelo**. 1996. 90 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1996.

MARTINEZ-FERNANDEZ, A.; NELSON, T.J.; TERZIC, A. Nuclear reprogramming strategy modules differentiation potential of induced pluripotent stem cells. **Journal of Cardiovascular Translational Research**, London, v. 4, n. 2, p. 131-137, 2011.

MASTROBERTI, A.A.; MARIATH, J.E.A. Leaf anatomy of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze (Araucariaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 343-353, 2003.

MATER, A.A. Effect of auxin-cytokinin interaction on micropropagation of date palm. **Agricultural Science**, Riyadh, v. 2, p. 211-223, 1990.

MATÉES, M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, Limerick, n. 153, p. 83-104, 2000.

MAXWELL, K.; JOHNSON, G.N. Chlorophyll fluorescence: a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, n. 345, p. 659-668, 2000.

Mc CABE, P.F.; LEAVER, C.J. Programmed cell death in cell cultures. In: LAM, E.; FUKUDA, H.; GREENBERG, J. (Ed.). **Programmed cell death in higher plants**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2000. v. 44, p. 115-124.

Mc MANUS, M.T.; THOMPSON, D.S.; MERRIMAN, C.; LYNE, L.; OSBORNE, D.J. Transdifferentiation of mature cortical cells to functional abscission cells in bean. **Plant Physiology**, Rockville, v. 116, n. 3, p. 891-899, 1998.

MEINS, F. Jr. Habituation: hereditable variation in the requirement of cultured plant cells for hormones. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 23, p. 395-408, 1989.

MEINS, F. Jr., LUTZ, J. Tissue-specific variation in the cytokinin habituation of cultured tobacco cells. **Differentiation**, Heidelberg, v. 15, n. 1/3, p. 1-6, 1979.

MEINS, F. Jr; SELDRAN, M. Pseudodirected variation in the requirement of cultured plant cells for cell-division factors. **Development**, Cambridge, v. 120, p. 1163-1168, 1994.

MEINS, F. Jr; WENZLER, H. Stability of the determined state. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, Oxford, n. 40, p. 155-170, 1986.

MEISTER, A.; ANDERSON, M.E. Glutathione. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 52, p. 711-760, 1984.

MELO, B.; PINTO, J.E.B.P.; LUZ, J.M.Q.; PEIXOTO, J.R.; JULIATTI, F.C. Efeitos de ANA e AIB *in vitro* no enraizamento e crescimento da parte aérea da plântula da guarirrobeira [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.]. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 17, n. 1, p. 49-59, 2001.

MERCIER, H.; SOUZA, B.M.; KRAUS, J.E.; HAMASAKI, R.M.; SOTTA, B. Endogenous auxin and cytokinin contents associated with shoot formation in leaves of pineapple cultured *in vitro*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 15, n. 2, p. 107-112, 2003.

MITALIPOV, S.; WOLF, D. Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. **Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology**, Heidelberg, v. 114, p. 185-199, 2009.

MOK, D.W.S.; MOK, M.C. Cytokinin metabolism and action. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 52, p. 89-118, 2001.

MOK, M.C.; MOK, D.W.S.; TURNER, J.E.; MUJER, C.V. Biological and biochemical effects of cytokinin-active phrnylurea derivatives in tissue culture systems. **HortScience**, Alexandria, v. 22, n. 6, p. 1194-1197, 1987.

- MONACO, L.C.; SÖNDAHL, M.R.; CARVALHO, A.; CROCOMO, O.J.; SHARP, W.R. Applications of tissue culture in the improvement of coffee. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y.P.S. (Ed.). **Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture**. Berlin: Springer-Verlag, 1977. p. 109-129.
- MONCALEÁN, P.; ALONSO, P.; CENTENO, M.L.; CORTIZO, M.; RODRÍGUEZ, A.; FERNÁNDES, B.; ORDÁS, R.J. Organogenic response of *Pinus pinea* cotyledons to hormonal treatments: BA metabolism and cytokinin content. **Tree Physiology**, Victoria, v. 5, n. 1, p. 1-9, 2005.
- MORA-URPÍ, J.; WEBER, J.C.; CLEMENT, C.R. **Peach palm. *Bactris gasipaes* Kunth. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops.20**. Gatersleben: Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research; Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 1997. 83 p.
- MORA-URPÍ, J.; VARGAS, E.; LOPEZ, C.A.; VILLAPLANA, M.; ALLON, G.; BLANCO, C. **The pejibaye palm (*Bactris gasipaes* H.B.K.)**. San Jose: FAO, 1984. 16 p.
- MOSQUINA, A.; KATZ, A.; SHOCHAT, S.; GRAFI, G.; OHAD, N. Interaction of FIE, a Polycomb protein, with pRB: a possible mechanism regulating endosperm development. **Molecular Genetics and Genomics**, Heidelberg, v. 271, n. 6, p. 651–657, 2004.
- MOURA, E.F. **Embriogênese somática em macaúba: indução, regeneração e caracterização anatômica**. 2007. 66 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.
- MÜLLER, A.; DÜCHTING, P.; WEILER, E.W. A multiplex GC-MS/MS technique for the sensitive and quantitative single-run analysis of acidic phytohormones and related compounds, and its application to *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, New York, v. 216, n. 1, p. 44-56, 2002.
- MÜLLER, E.; BROWN, P.T.H.; HARTKE, S.; LORZ, H. DNA variation in tissue-culture-derived rice plants. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 80, n. 5, p. 673–679, 1990.
- MUNNÉ-BOSCH, S. Aging in perennials. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Philadelphia, v. 26, n. 3, p. 123-138, 2007.
- MUNNÉ-BOSCH, S.; ALEGRE, L. Die and let live: leaf senescence contributes to plant survival under drought stresses. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 31, n. 3, p. 203-216, 2004.
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Annual Review of Plant Physiology**, Columbus, v. 25, p. 135-166, 1974.
- MURASHIGE, T.; NAKANO, R. Morphogenetic behavior of tobacco tissue cultures and implication of plant senescence. **American Journal of Botany**, Palo Alto, v. 52, n. 8, p. 819-127, 1965.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NAGL, W. Ultrastructure and developmental aspects of autolysis in embryo-suspensors. **Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft**, Berlin, v. 89, p. 301–311, 1976.

NELSON, T.; DENGLER, N. Leaf vascular pattern formation. **Plant Cell**, Waterbury, v. 9, n. 7, p. 1121–1135, 1997.

NORMANLY, J.; SLOVIN, J.P.; COHEN, J.D. Rethinking auxin biosynthesis and metabolism. **Plant Physiology**, Rockville, v. 107, n. 7, p. 323–329, 1995.

NYATHI, Y.; BAKER, A. Plant peroxisomes as a source of signalling molecules. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1763, p. 1478–1495, 2006.

OBARA, K.; KURIYAMA; FUKUDA, H. Direct evidence of active and rapid nuclear degradation triggered by vacuole rupture during programmed cell death in *Zinnia*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 125, n. 2, p. 615–626, 2001.

OHGANE, J.; YAGI, S.; SHIOTA, K. Epigenetics: the DNA methylation profile of tissue-dependent and differentially methylated regions in cells. **Placenta**, Eastbourne, v. 29, n. 1, p. 29–35, 2008.

ORZÁEZ, D.; GRANELL, A. DNA fragmentation is regulated by ethylene during carpel senescence in *Pisum sativum*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 11, n. 1, p. 137–144, 1997.

OSBORNE, B.A.; SCHWARTZ, L.M. Essential genes that regulate apoptosis. **Trends in Cell Biology**, Cambridge, v. 4, n. 11, p. 394–398, 1994

OTTO, S.; V.WALBOT. DNA methylation in eukaryotes: kinetics of demethylation and de novo methylation during the life cycle. **Genetics**, Austin, v. 124, n. 2, p. 429–437, 1990.

OVERMYER, K.; BROSCHE, M.; PELLINEN, R.; KUITTINEN, T.; TUOMINEN, H.; AHLFORS, R.; KEINAENEN, M.; SAARMA, M.; SCHEEL, D.; KANGASJAERVI, J. Ozone-induced programmed cell death in the *Arabidopsis* radical-induced cell death 1 mutant. **Plant Physiology**, Rockville, v. 137, n. 3, p. 1092–1104, 2005.

PALAVAN-UNSAL, N.; ARISAN, D.E. Evidences for the presence of caspase-like activities in plants. **Fen Bilimleri Dergisi**, Istanbul, v. 23, n. 2, p. 57–69, 2011.

PALAVAN-UNSAL, N.; BUYUKTUNCER, E.D.; TUFEKCI, M.A. Programmed cell death in plants. **Journal of Cell and Molecular Biology**, Istanbul, v. 4, n. 1, p. 9–23, 2005.

PALOMINO, G.; DOLEZEL, J.; CID, R.; BRUNNER, I.; MÉNDEZ, I.; RUBLUO, A. Nuclear genome stability of *Mammillaria san-angelensis* (Cactaceae) regenerants induced by auxins in long-term *in vitro* culture. **Plant Science**, Atlanta, v. 141, n. 2, p. 191–200, 1999.

PAN, M.J.; STADEN, J. van. The use of charcoal *in vitro* culture: a review. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 26, n. 3, p. 155–163, 1998.

PANG, Y.; ZHANG, J.; CAO, J. YIN, S.Y.; HE, X.Q.; CUI, K.M. Phloem transdifferentiation from immature xylem cells during bark regeneration after girdling in *Eucommia ulmoides* Oliv. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, n. 6, p. 1341-1351, 2008.

PAPP, B.; PLATH, K. Reprogramming to pluripotency: stepwise resetting of the epigenetic landscape. **Cell Research**, Shanghai, v. 21, n. 3, p. 1-16, 2011.

PARK, S.-Y.; YU, J.-W.; PARK, J.-S.; LI, J.; YOO, S.-C.; LEE, N.-Y.; LEE, S.-K.; JEONG, S.-W.; SEO, H.S.; KOH, H.-J.; JEON, J.-S.; PARK, Y.-II; PAEK, N.-C. The senescence-induced staygreen protein regulates chlorophyll degradation. **Plant Cell**, Waterbury, v. 19, n. 5, p. 1649-1664, 2007.

PASTORI; G.M.; Del RIO, L.A. Natural senescence of pea leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 113, n. 2, p. 411-418, 1997.

PEARSE, A.G.E. **Histochemistry theoretical and applied**. Boston: Little, Brown & Company, 1968. 759 p.

PENCE, V. The possibilities and challenges of *in vitro* methods for plant conservation. **Kew Bulletin**, Kew, v. 65, n. 4, p. 539-547, 2010.

PENNELL, R.I.; LAMB, C. Programmed cell death in plants. **Plant Cell**, Waterbury, v. 9, n. 7, p. 1157-1168, 1997.

PEREIRA, F.D.; PINTO, J.E.B.P.; CARDOSO, M.G.; LAMEIRA, O.L. Propagação *in vitro* de chapéu-de-couro (*Echinodorus cf. scaber* Rataj), uma planta medicinal. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, p. 74-80, 2000.

PERES, L.E.P. Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 25, p. 44-48, 2002.

PERES, L.E.P.; KERBAUY, G.B. High cytokinin accumulation following root tip excision changes the endogenous auxin-to-cytokinin ratio during root-to-shoot conversion in *Catasetum fimbriatum* Lindl. (Orchidaceae). **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 18, n. 12, p. 1002-1006, 1999.

PERES, L.E.P.; MERCIER, H.; KERBAUY, G.B.; ZAFFARI, G.R. Níveis endógenos de AIA, citocininas e ABA em uma orquídea acaule e uma bromélia sem raiz, determinados por HPCL e ELISA. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Lavras, v. 9, n. 3, p. 169-176, 1997.

PETRUSSE, E.; BERTOLINI, A.; CASOLO, V.; KRAJŇÁKOVÁ, J.; MACRÌ, F.; VIANELLO, A. Mitochondrial bioenergetics linked to the manifestation of programmed cell death during somatic embryogenesis of *Abies alba*. **Planta**, Berlin, v. 231, n. 1, p. 93-107, 2009.

PHILLIPS, G.C. *In vitro* morphogenesis in plants: recent advances. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, New York, v. 4, n. 4, p. 342-345, 2004.

PHILLIPS, R.L.; KAEPLER, S.M.; OLHOFT, P. Genetic instability of plant tissue cultures - breakdown of normal controls. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 91, n. 12, p. 5222–5226, 1994.

PICOLI, E.A.T.; OTONI, W.C. Morfogênese *in vitro* em berinjela influenciada por higromicina e períodos de exposição em ANA. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 6, p. 1474-1481, 2001.

PINO-NUNES, L.E. **Obtenção e uso de mutantes com alterações no balanço auxina/citocinina no estudo da competência organogênica em micro-tomateiro (*Lycopersicon esculentum* cv Micro-Tom)**. 2005. 73 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

PINTO, D.L.P.; ALMEIDA, A.M.R.; RÊGO, M.M.; SILVA, M.L.; OLIVEIRA, E.J.; OTONI, W.C. Somatic embryogenesis from mature zygotic embryos of commercial passionfruit (*Passiflora edulis* Sims) genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 107, n. 3, p. 521–530, 2011.

PISCHKE, M.S.; HUTTLIN, E.L.; HEGEMAN, A.D.; SUSSMAN, M.R. A Transcriptome-based characterization of habituation in plant tissue culture. **Plant Physiology**, Rockville, v. 140, n. 4, p. 1255-1278, 2006.

POLLACK, A.; TERRY, N.H.A.; WHITE, R.A.; CAO, S.; MEISTRICH, M.L.; MILAS, L. Proliferation kinetics of recruited cells in mouse mammary carcinoma. **Cancer Research**, Baltimore, v. 54, n. 3, p. 811-817, 1994.

POLLMANN, S.; DÜCHTING, P.; WEILER, E.W. Tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis by ‘IAA-synthase’ proceeds via indole-3-acetamide. **Phytochemistry**, Elmsford, v. 70, n. 4, p. 523-531, 2009.

POLO, J.M.; LIU, S.; FIGUEROA, M.E.; KULALERT, W.; EMINLI, S.; TAN, K.Y.; APOSTLOU, E.; STADTFELD, M.; LI, Y.; SHIODA, T.; NATESAN, S.; WAGERS, A.; MELNICK, A.; EVANS, T.; HOCHEDLINGER, K. Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. **Nature Biotechnology**, London, v. 28, n. 8, p. 848–855, 2010.

PORTA, H.; ROCHA-ROSA, M. Plant lipooxygenases. physiological and molecular features. **Plant Physiology**, Rockville, v. 130, n. 1, p. 15-20, 2002.

PRAXEDES, S.C.; SILVA JÚNIOR, A.F.; FIGUEIREDO, F.L.B.; FIGUEIREDO, M.L.; CÂMARA, F.A.A.; OLIVEIRA, O.F. Estiolamento *in vitro* do abacaxizeiro pérola em presença de ANA e AIA. **Caatinga**, Mossoró, v. 14, n. 1/2, p. 13-15, 2001.

PREECE, F.E.; SUTTER, E.G. Acclimatization of micro propagated plants to the greenhouse and field. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. (Ed.). **Micropropagation**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. p. 71-93.

RAHMAN, S.M.; HOSSAIN, M.; RAFIUL ISLAM, A.K.M.; JOARDER, O.I. Effects of media composition and culture conditions on *in vitro* rooting of rose. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 52, n. 1/2, p. 163-169, 1992.

REAPE, T.J.; MOLONY, E.M.; McCABE, P.F. Programmed cell death in plants: distinguishing between different modes. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, n. 3, p. 435-444, 2008.

REED, B.M.; ABDELNOUR-ESQUIVEL, A. The use of zeatin to initiate *in vitro* cultures of *Vaccinium* species and cultivars. **HortScience**, Alexandria, v.26, n.10, 1320-1322, 1991.

REED, B.M.; DENOMA, J.; LUO, J.; CHANG, Y.; TOWILL, L. Cryopreservation and long-term storage of pear germplasm. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Berlin, v. 34, n. 3, p. 256-260, 1998.

REIS, E.; BATISTA, M.T.; CANHOTO, J.M. Effect and analysis of phenolic compounds during somatic embryogenesis induction in *Feijoa sellowiana* Berg. **Protoplasma**, Berlin, v. 232, n. 3/4, p. 193–202, 2008.

REZNICKOVA, S.A.; DICKINSON, H.G. Ultrastructural aspects of storage lipid mobilization in the tapetum of *Lilium hybrida* var. Enchantment. **Planta**, Berlin, v. 155, n. 5, p. 400-408, 1982.

RIHA, K.; MCKNIGHT, T.D.; GRIFFING, L.R.; SHIPPEN, D.E. Living with genome instability: plant responses to telomere dysfunction. **Science**, Washington, v. 291, n. 5509, p. 1797–1800, 2001.

ROCHA, D.I.; VIEIRA, L.M.; TANAKA, F.A.O.; SILVA, L.C.; OTONI, W.C. Somatic embryogenesis of a wild passion fruit species *Passiflora cincinnata* Masters: histocytological and histochemical evidences. **Protoplasma**, Berlin, v. 249, n. 3, p. 747-748, 2011.

ROBATZEK, S.; SOMSSICH, I.E. Targets of At WRKY6 regulation during plant senescence and pathogen defense. **Genes and Development**, New York, v. 16, n. 9, p. 1139-1149, 2002.

RODRIGUES, L.V. **Apoptose na eliminação pulpar durante a reabsorção radicular fisiológica de dentes decíduas humanos**. 2008. 45 p. Dissertação (Mestre em Patologia Geral) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

RUBIN, S.; LIMA, C.S.M.; BANDEIRA, J.M.; RIBEIRO, M.V.; BENITZ, L.C.; PETERS, J.A.; BRAGA, E.J.B. Reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de *Thymus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 480-482, 2007.

RUBLUO, A.; MARÍN-HERNÁNDEZ, T.; DUVAL, K.; VARGAS, A.; MÁRQUEZ-GUZMÁN, J. Auxin induced morphogenetic responses in long-term *in vitro* subcultured *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada (Cactaceae). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 95, n. 4, p. 341-349, 2002.

SAKAI, W.S. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. **Stain Technology**, Baltimore, v. 48, n. 5, p. 247-249, 1973.

SALAJOVA, T.; SALAJ, J.; KORMUTAK, A. Initiation of embryogenic tissues and plantlet regeneration from somatic embryos of *Pinus nigra* Arn. **Plant Science**, Atlanta, v. 145, n. 1, p. 33–40, 1999.

SALDANHA, C.W. **Conservação *in vitro* de *Euterpe edulis* Martius através da embriogênese somática**. 2007.108 p. Dissertação (Mestrado em Geomática) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

SANÉ, D.; ABERLENC-BERTOSSI, F.; GASSAMA-DIA, Y.K.; SAGNA, M.; TROUSLOT, M.F.; DUVAL, Y.; BORGEL, A. Histocytological analysis of callogenesis and somatic embryogenesis from cell suspensions of date palm (*Phoenix dactylifera*). **Annals of Botany**, Oxford v. 98, n. 2, p. 301-308, 2006.

SANTOS, F.; HENDRICH, B.; REIK, W.; DEAN, W. Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. **Developmental Biology**, New York, v. 241, n. 1, p. 172–182, 2002.

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

SARASAN, V.; RAMSAY, M.M.; ROBERTS, A.V. *In vitro* germination and induction of direct somatic embryogenesis in ‘Bottle Palm’ [*Hyophorbe lagenicaulis* (L. Bailey) H.E. Moore], a critically endangered Mauritian palm. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 20, n. 12, p. 1107–1111, 2002.

SAS INSTITUTE. **SAS/ETS user’s guide, version 6**. 2nd ed. Cary, 1993. 1022 p.

SCHIAVONE, F.M.; RACUSEN, R.H. Microsurgery reveals regional capabilities for pattern re-establishment in somatic carrot embryos. **Developmental Biology**, New York, v. 141, n. 1, p. 211–219, 1990.

SCHNABLOVÁ, R.; SYNKOVÁ, H.; VICÁNKOVÁ, A.; BURKETOVÁ, L.; EDER, J.; CVIKROVÁ, M. Transgenic *ipt* tobacco overproducing cytokinins overaccumulates phenolic compounds during *in vitro* growth. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 44, n. 10, p. 526–534, 2006.

SCHULTHEIS, J.R.; CHÉE, R.P.; CANTLIFFE, D.J. Embriões somáticos e sementes sintéticas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCT; EMBRAPA, CNPH, 1990. p. 226-249.

SCHUSSLER, E.E.; LONGSTRETH, D.J. Changes in cell structure during the formation of root aerenchyma in *Sagittaria lancifolia* (Alismataceae). **American Journal of Botany**, Palo Alto, v. 87, n. 1, p. 12-19, 2000.

SCOTT, I.; LOGAN, D.C. Mitochondria and cell death pathways in plants. **Plant Signaling & Behavior**, Austin, v. 3, n. 7, p. 475-477, 2008.

- SEABRA, A.L.R. **Lesão de isquemia-reperfusão após clampagem contínua ou intermitente do pedículo hepático no coelho**. 2008. 106 p. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008).
- SENA COSTA, N.M.; ALOUFA, M.A.I. Organogênese direta de *Phoenix dactylifera* L. via pecíolo cotiledonar. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 36, n. 3, p. 195-198, 2006.
- SGONC, R.; BOECK, G.; DIETRICH, H.; GRUBER, J.; RECHEIS, H.; WICK, G. Simultaneous determination of cell surface antigens and apoptosis. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v. 10, n. 2, p. 41-42, 1994.
- SHARMA, T.; MODGIL, M.; THAKUR, M. Factors affecting induction and development of *in vitro* rooting in apple rootstocks. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v. 45, n. 9, p. 824-829, 2007.
- SHIPPEN, D.E.; MCKNIGHT, T.D. Telomeres, telomerase and plant development. **Trends in Plant Science**, London, v. 3, n. 4, p. 126–130, 1998.
- SHISHKOVA, S.; DUBROVSKY, J.G. Developmental programmed cell death in primary roots of sonoran desert cactaceae. **American Journal of Botany**, Palo Alto, v. 29, n. 9, p. 1590-1594, 2005.
- SHUN-BIN, N.; LING, W.; YUN-CHUN, S. An ELISA assay for detection of apoptosis in plant cells. **Developmental and Reproductive Biology**, Wuhan, v. 9, n. 2, p. 61-68, 2000.
- SIEGEL, S. Nonparametric statistics. **The American Statistician**, Alexandria, v. 11, n. 3, p. 13-19, 1957.
- SIEGEL, S.; CASTELLAN, N.J. **Nonparametric statistics for the behavioural sciences**. New York: McGraw-Hill, 1988. 399 p.
- SIES, H. Glutathione and its role in cellular functions. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, n. 27, p. 916-921, 1999.
- SILVA, V.S. **Regeneração *in vitro* de *Cocos nucifera* L.** 2002. 78 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.
- SILVA JÚNIOR, J.M. [*Etiligera elatior* (Jack) R. M. Smith]: **propagação *in vitro*, anatomia e obtenção de protoplastos**. 2007. 104 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.
- SKIRVIN, R.N.M.; NORTON, M.; MCPHEETERS, K.D. Somaclonal variation has it proved useful for plant improvement. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 336, p. 333-340, 1993.
- SKOOG, F.; MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, Oxford, v. 11, p. 118-131, 1957.

SLATER, A.F.G.; STEFAN, C.; NOBEL, I.; DOBBELSTEEN, D.J. van den; ORRENIUS, S. Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis. **Toxicology Letters**, Amsterdam, n. 82/83, p. 149-153, 1995.

SMETANA, O.; ŠIROKÝ J.; HOULNÉ, G.; OPATRNÝ, Z.; CHABOUTÉ, M.E. Non-apoptotic programmed cell death with paraptotic-like features in bleomycin-treated plant cells is suppressed by inhibition of ATM/ATR pathways or NtE2F overexpression. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 63, n. 7, p. 2631-2644, 2012.

SPINELLI, L.; TORRICELLI, A.; UBEZIO, P.; BASSE, B. Modelling the balance between quiescence and cell death in normal and tumour cell populations. **Mathematical Biosciences**, Londres, v. 202, n. 2, p. 349-370, 2006.

STAUTON, M.J.; GAFFNEY, E.F. Apoptosis. Basic concepts and potential significance in human cancer. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, Chicago, v. 122, n. 4, p. 310-319, 1998.

STEIN, V.C.; PAIVA R.; VARGAS, D.P.; SOARES, O.S.; ALVES, E.; NOGUEIRA, G.F. Ultrastructural calli analysis of *Inga vera* Willd. subsp. *Affinis* (DC.) T.D. Penn. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 34, n. 5, p. 789-796, 2010.

STEINMACHER, D.A.; CLEMENT, C.R.; GUERRA, M.P. Somatic embryogenesis from immature peach palm inflorescence explants: towards development of an efficient protocol. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 89, n. 1, p. 15-22, 2007.

STEINMACHER, D.A.; CAGAHUALA-INOCENTE, G.C.; CLEMENT, C.R.; GUERRA, M.P. Somatic embryogenesis from peach palm zygotic embryos. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Berlin, v. 43, n. 2, p. 124-132, 2007.

STEINMACHER, D.A.; GUERRA, M.P.; SAARESURMINSKI, K.; LIEBEREI, R.A. Temporary immersion system improves *in vitro* regeneration of peach palm through secondary somatic embryogenesis. **Annals of Botany**, Oxford, v. 108, n. 8, p. 1463-75, 2011.

SVENSSON, E. Guidelines to statistical evaluation of data from rating scales and questionnaires. **Journal of Rehabilitation Medicine**, San Juan, v. 33, n. 1, p. 47-48, 2001.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 719 p.

TAYLOR, C.B. Plant vegetative development: from seed and embryo to shoot and root. **The Plant Cell**, Waterbury, v. 9, n. 7, p. 981-988, 1997.

THOMAS, H.; OUGHAM, H.J.; WAGSTAFF, C.; STEAD, A.D. Defining senescence and death. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, n. 385, p. 1127-1132, 2003.

THOMPSON, D.S. Space and time in the plant cell wall: relationships between cell type, cell wall rheology and cell function. **Annals of Botany**, Oxford, v. 101, n. 12, p. 203-211, 2008.

THORPE, T.A.; JOY IV, R.W.; LEUNG, D.W.M. Starch turnover in shoot-forming tobacco callus. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 66, n. 1, p. 58-62, 1986.

TISSERAT, B. Palms. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. (Ed.). **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987. v. 3, p. 338-356.

TISSERAT, B.; DeMASON, E.A. A histological study of development of adventive embryos in organ cultures of *Phoenix dactylifera* L. **Annals of Botany**, Oxford, v. 46, n. 4, p. 465-472, 1980.

_____. Occurrence and histological structure of offshoots and inflorescences produced from *Phoenix dactylifera* L. plantlets *in vitro*. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, New York, v. 112, n. 1, p. 35-42, 1985.

TORRES, M.A. ROS in biotic interactions. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 138, n. 4, p. 414-429, 2010.

TORREY, J.G. Morphogenesis in relation to chromosomal constitution in long-term plant tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 20, n. 2, p. 265-275, 1967.

TSCHOPP, J.; THOME, M.; HOFMANN, K.; MEINL, E. The fight of viruses against apoptosis. **Current Opinion in Genetics and Development**, London, v. 8, n. 1, p. 82-87, 1998.

TUCKER, W.Q.J.; WARREN WILSON, J.; GRESSHOFF, P.M. Determination of tracheary element differentiation in lettuce pith explants. **Annals of Botany**, Oxford, v. 57, n. 5, p. 675-679, 1986.

TURGEON, R. Cytokinesis, cell expansion, and the potential for cytokinin-autonomous growth in tobacco pith. **Plant Physiology**, Rockville, v. 70, n. 4, p. 1071-1074, 1982.

VALLEDOR, L.; MEIJÓN, M.; HASBÚN, R.; CAÑAL, M.J.; RODRÍGUEZ. Variations in DNA methylation, acetylated histone H4, and methylated histone H3 during *Pinus radiata* needle maturation in relation to the loss of *in vitro* organogenic capability. **Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 167, n. 5, p. 351-357, 2010.

VALLEDOR, L.; HASBÚN, R.; MEIJÓN, M.; RODRÍGUEZ, J.L.; SANTAMARÍA, E.; VIEJO, M.; BERDASCO, M.; FEITO, I.; FRAGA, M.F.; CAÑAL, M.J.; RODRÍGUEZ, R. Involvement of DNA methylation in tree development and micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 91, n. 2, p. 75-86, 2007.

VALVERDE, R.; ARIAS, O.; THORPE, T. Estudio histológico em callos de pejibaye. **Agronomía Costarricense**, San Jose, v. 16, n. 2, p. 225-229, 1992.

VALVERDE, R.; GÓMES, L.; ARIAS, O.; THORPE, T. Respuesta morfogénica de los ápices de pejibaye (*Bactris gasipaes* H.B.K.) cultivados *in vitro* en condiciones de luz y oscuridad. **Agronomía Costarricense**, San Jose, v. 11, n. 1, p. 97-102, 1987.

VAN, K.M.T.T. Control of morphogenesis *in vitro* cultures. **Annual Review of Plant Physiology**, Columbus, v. 32, p. 291-311, 1981.

VANDEPUTTE, G.E.; DELCOUR, J.A. From sucrose to starch granule to starch physical behavior: a focus on rice starch. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 58, n. 3, p. 245-266, 2004.

VARTAPETIAN, A.B.; TUZHIKOV, A.I.; CHICHKOVA, N.V.; TALIANSKY, M.; WOLPERT, T.J. A plant alternative to animal caspases: subtilisin-like proteases. **Cell Death and Differentiation**, Cambridge, v. 18, p. 1289–1297, 2011.

VERDEIL, J.L.; ALEMANNO, L.; NIEMENAK, N.; TRANBARGER, T.J. Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? **Trends in Plant Science**, London, v. 12, n. 6, p. 245–252, 2007.

VESCOVI, M.; RIEFLER, M.; GESSUTI, M.; NOVÁK, O.; SCHUMÜLLING, T.; LO SCHIAVO, F. Programmed cell death induced by high levels of cytokinin in *Arabidopsis* cultured cells is mediated by the cytokinin receptor CR1/AHK4. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 63, n. 7, p. 2825–2832, 2012.

VIDI, P.A.; KANWISCHER, M.; BAGINSKY, S.; AUSTIN, J.R.; CSUCS, G.; DÖRMANN, P.; KESSLER, F.; BRÉHÉLIN, C. Tocopherol cyclase (VTE1) localization and vitamin E accumulation in chloroplast plastoglobule lipoprotein particles. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 281, n. 16, p. 11225-11234, 2006.

VIROLAINEN, E.; BLOKHINA, O.; FAGERSTEDT, K. Ca²⁺-induced high amplitude swelling and cytochrome c release from wheat (*Triticum aestivum* L.) mitochondria under anoxic stress. **Annals of Botany**, Oxford, v. 90, n. 4, p. 509-516, 2002.

VLASOVA, T.I.; DEMIDENKO, Z.N.; KIRNOS, M.D.; VANYUSHIN, .B.F. *In vitro* DNA methylation by wheat nuclear cytosine DNA methyltransferase: effect of phytohormones. **Gene**, Amsterdam, v. 157, n. 1/2, p. 279–281, 1995.

VUOSKU, J.; SUTELA, S.; SAASKILAHTI, M.; KESTILA, J.; JOKELA, A.; SARJALA, T.; HAGGMAN, H. Dealing with the problem of non-specific *in situ* mRNA hybridization signals associated with plant tissues undergoing programmed cell death. **Plant Methods**, London, v. 7, n. 6, p. 1-25, 2010.

WANG, J.; BAYLES, K. Programmed cell death in plants: lessons from bacteria? **Trends in Plant Science**, London, v. 18, n. 3, p. 133-139. 2012.

WANG, Q.M.; WANG Y.Z.; SUN, L.L.; GAO, F.Z.; SUN, W.; HE, J.; GAO, X.; WANG, J. Direct and indirect organogenesis of *Clivia miniata* and assessment of DNA methylation changes in various regenerated plantlets. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 31, n. 7, p. 1283-1296, 2012.

WATSON, J.M.; RIHA, K. Telomeres, aging, and plants: from weeds to Methuselah - a mini-review. **Gerontology**, Basel, v. 57, n. 2, p. 129-136, 2011.

WAWROSCH, C.; MALIA, R.R.; KOPP, B. Clonal propagation of *Lilium nepalense* D. Don, a threatened medicinal plants of Nepal. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 10, n. 4, p. 457-460, 2001.

WEISS, A.; KESHET, I.; RAZIN, A.; CEDAR, H. DNA demethylation in vitro: involvement of RNA. **Cell**, Cambridge, v. 86, n. 5, p. 709–718, 1996.

WETZSTEIN, H.Y.; SOMMER, H.E. Leaf anatomy of tissue-cultured *Liquidambar styraciflua* (hamamelidaceae) during acclimatization. **American Journal of Botany**, Palo Alto, v. 69, n. 10, p. 1579-1586, 1982.

WHITE, P.R. Neoplastic growth in plants. **Quarterly Review of Biology**, Chicago, v. 26, n. 1, p. 1-16, 1951.

WIGHTMAN, F.; SCHNEIDER, E.A.; THIMANN, K.V. Hormonal factors controlling the initiation and development of lateral roots. II. Effects of exogenous growth factors on lateral root formation in pea roots. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 49, n. 3, p. 304-314, 1980.

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

WILSON, P.J.; STADEN, J. van. Rhizocaline, rooting cofactors and the concept of promoters and inhibitors of adventitious rooting: a review. **Annals of Botany**, Oxford, v. 66, p. 479-490, 1990.

WINGLER, A.; PURDY, S.; MacLEAN, J.A.; POURTAU, N. The role of sugars in integrating environmental signals during the regulation of leaf senescence. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 2, p. 391–399, 2006.

WOLTERING, E.J., BENT, A. van der; HOEBERICHTS, F.A. Do plant caspases exist? **Plant Physiology**, Rockville, v. 130, n. 4, p. 1764–1769, 2002.

WOODWARD, A.W.; BARTEL, B. Auxin: regulation, action, and interaction. **Annals of Botany**, Oxford, v. 95, n. 5, p. 707-735, 2005.

WRIGHT, H.; DOORN, W.G. van; GUNAWARDENA, A.H. *In vivo* study of developmental programmed cell death using the lance plant (*Aponogeton madagascariensis*; Aponogetonaceae) leaf model system. **American Journal of Botany**, Palo Alto, v. 96, n. 5, p. 865-876, 2009.

WRIGHT, W.E.; SHAY, J.W. Telomere positional effects and the regulation of cellular senescence. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v. 8, n. 6, p. 193–197, 1992.

WYLLIE, A.H. The biology of cell death in tumors. **Anticancer Research**, Athens, n. 5, p. 131-142, 1985.

WYLLIE, A.H.; KERR, J.F.; CURRIE, A.R. Cell death: the significance of apoptosis. **International Review of Cytology**, New York, v. 68, p. 251-306, 1980.

XU, N.; PAPAGIANNAKOPOULOS, T.; PAN, G.; THOMSON, J.A.; KOSIK, K.S. MicroRNA-145 regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and represses pluripotency in human embryonic stem cells. **Cell**, Cambridge, v. 137, n. 4, p. 647-658, 2009.

YANG, S.H.; BERBERICH, T.; SANO, H.; KUSAANO, T. Specific association of transcripts of *tbzF* and *tbz17*, tobacco genes encoding basic region leucine zipper-type transcriptional activators, with guard cells of senescing leaves and/or flowers. **Plant Physiology**, Rockville, v. 127, n. 1, p. 23-32, 2001.

YUYAMA, K. Sistemas de cultivo para produção de palmito da pupunheira. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 15, p. 191-198, 1997. Supplement.

ZAID, A.; TISSERAT, B. Morphogenetic responses obtained from a variety of somatic explant tissues of date palm. **The Botanical Magazine**, Tokyo, v. 96, n. 2, p. 67-73, 1983.

ZAFFARI, G.; KERBAUY, G.B.; KRAUS, J.E.; ROMANO, E.C. Hormonal and histological studies related to *in vitro* banana bud formation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 63, n. 3, p. 187-192, 2000.

ZAPATA, J.M.; GUÉRA, A.; ESTEBAN-CARRASCO, A.; MARTÍN, M.; SABATER, B. Chloroplasts regulate leaf senescence - delayed senescence in transgenic *ndhF* -defective tobacco. **Cell Death and Differentiation**, Cambridge, v. 12, n. 10, p. 1277-1284, 2005.

ZAVALETA-MANCERA, H.A.; THOMAS, B.J.; THOMAS, H.; SCOTT, I.M. Regreening of senescent *Nicotiana* leaves. II. Redifferentiation of plastids. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 50, n. 340, p. 1683-1689, 1999.

ZHAO, J.; MOROZOVA, N.; WILLIAMS, L.; LIBS, L.; AVIVI, Y.; GRAFI, G. Two phases of chromatin decondensation during dedifferentiation of plant cells. Distinction between competence for cell fate switch and a commitment for S phase. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 276, n. 5, p. 22772-22778, 2001.

ZHURAVLEV, Y.N.; OMELKO, A.M. Plant morphogenesis *in vitro* 1. **Russian Journal of Plant Physiology**, Moscow, v. 55, n. 5, p. 579-596, 2008.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News in Physiological Sciences**, Rockville, v. 19, p. 124-128, 2004.

ZIMMERMAN, J.L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **The Plant Cell**, Waterbury, v. 5, n. 10, p. 1411-1423, 1993.

ZORZETTO, R. Memórias de origem. **Pesquisa FAPESP**, São Paulo, n. 180, p. 64-65, 2011.

ANEXOS

ANEXO A - Análises comparativas entre as microplantas do grupo A (GA) e as plântulas do grupo BI (GBI) de *B. gasipaes* para os resultados obtidos com os testes histoquímicos aplicados à detecção de amido, lipídeos totais, proteínas totais e compostos fenólicos nas folhas. Os valores das medianas foram obtidos da escala qualitativa ordinal atribuída à intensidade de resultados observados nas folhas, raízes e bases caulinares de ambos os grupos e classificados como 1= negativo (-), 2 = reduzido (+), 3 = moderado (++) e 4 = elevado (+++)

Repetições	Substâncias ergásticas							
	amido		lipídeos totais		proteínas totais		compostos fenólicos	
	GA	GBI	GA	GBI	GA	GBI	GA	GBI
R1	1	4	4	3	1	1	4	2
R2	1	4	4	3	1	1	4	3
R3	2	4	4	3	1	1	4	3
R4	1	4	4	3	1	1	4	3
R5	1	4	4	3	1	1	2	2
R6	1	4	4	3	1	1	4	2
R7	1	4	4	3	1	1	2	3
R8	1	4	4	3	1	1	4	3
Medianas	1	4	4	3	1	1	4	3

ANEXO B - Análises comparativas entre as microplantas do grupo A (GA) e as plântulas do grupo BI (GBI) de *B. gasipaes* para os resultados obtidos com os testes histoquímicos aplicados à detecção de amido, lipídeos totais, proteínas totais e compostos fenólicos nas raízes. Os valores das medianas foram obtidos da escala qualitativa ordinal atribuída à intensidade de resultados observados nas folhas, raízes e bases caulinares de ambos os grupos e classificados como 1= negativo (-), 2 = reduzido (+), 3 = moderado (++) e 4 = elevado (+++)

Repetições	Substâncias ergásticas							
	amido		lipídeos totais		proteínas totais		compostos fenólicos	
	GA	GBI	GA	GBI	GA	GBI	GA	GBI
R1	1	1	2	2	1	1	4	1
R2	1	1	4	2	1	1	4	3
R3	1	1	4	2	1	1	4	3
R4	1	1	4	1	3	1	2	3
R5	4	1	4	2	1	1	2	3
R6	1	1	4	2	1	1	4	3
R7	1	1	4	2	4	1	4	3
R8	1	1	4	2	1	1	4	3
Medianas	1	1	4	2	1	1	4	3

ANEXO C - Análises comparativas entre as microplantas do grupo A (GA) e as plântulas do grupo BI (GBI) de *B. gasipaes* para os resultados obtidos com os testes histoquímicos aplicados à detecção de amido, lipídeos totais, proteínas totais e compostos fenólicos nas bases caulinares. Os valores das medianas foram obtidos da escala qualitativa ordinal atribuída à intensidade de resultados observados nas folhas, raízes e bases caulinares de ambos os grupos e classificados como 1= negativo (-), 2 = reduzido (+), 3 = moderado (++) e 4 = elevado (+++)

Repetições	Substâncias ergásticas							
	amido		lipídeos totais		proteínas totais		compostos fenólicos	
	GA	GBI	GA	GBI	GA	GBI	GA	GBI
R1	4	4	4	3	1	2	2	4
R2	4	4	4	3	1	1	2	4
R3	4	4	4	3	1	1	2	4
R4	4	4	4	3	4	1	2	4
R5	4	4	4	3	1	2	2	4
R6	4	4	4	3	4	1	2	4
R7	1	4	4	3	1	1	2	4
R8	4	4	1	3	1	1	2	4
Medianas	4	4	4	3	1	1	2	4

ANEXO D - Comprimentos radiculares (cm) observados por microplanta de *B. gasipaes* estabelecida e cultivada *in vitro* por oito anos (grupo A)

[illegible]

ANEXO E - Comprimentos radiculares (cm) observados por plântula de *B. gasipaes* estabelecida e cultivada *in vitro* por um ano (grupo BII)

Repetições	Comprimento das raízes						Média. plântula ⁻¹
R1	2,50	2,50	2,40	1,60	1,50	-	2,10
R2	2,50	2,00	2,00	-	-	-	2,17
R3	2,40	2,40	2,30	1,80	1,70	1,70	2,05
R4	1,50	1,50	1,50	0,80	0,60	-	1,18
R5	2,50	1,60	1,50	-	-	-	1,87
R6	7,30	7,20	7,20	3,00	3,00	-	5,54
R7	3,00	2,10	1,90	-	-	-	2,33
R8	3,20	-	-	-	-	-	3,20
Média geral							2,55