

Análises morfo-histológicas da embriogênese somática em açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.)¹.

Fermino² Jr, Paulo Cesar Poeta; Silva³, Ricardo Alexandre; Maciel, Simone⁴; Guedes, Rodrigo⁵; Pereira⁶, Jonny Everson Scherwinski

¹Trabalho realizado com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq. ²Professor da Universidade Federal do Acre, e-mail: paulofermino@ufac.br; ³Doutorando da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ/ PBV – Pós graduação em Biotecnologia Vegetal; ⁴Bolsista PIBIC/CNPq/Embrapa Acre; ⁵Mestrando em Produção Vegetal - UFAC. ⁶Pesquisador da Embrapa Acre, Laboratório de Morfogênese e Biologia Molecular – LABMOL e-mail: jonny@cpafac.embrapa.br

INTRODUÇÃO

O açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) é uma palmeira típica do estuário amazônico, encontrada em populações homogêneas nas matas de terra firme (Jardim et al., 1995). Das espécies frutíferas nativas com potencial mercadológico de ocorrência na Amazônia, o açai se destaca pela grande produção de frutos, palmito e celulose.

A despeito de seu potencial, a utilização de técnicas de propagação ineficientes e a ausência de material geneticamente melhorado têm contribuído negativamente para a exploração racional e econômica dessa espécie (Oliveira, 1999).

A propagação *in vitro* constitui-se numa importante técnica para plantas com grande dificuldade de multiplicação vegetativa, como ocorre com *Euterpe oleracea* Mart. A propagação *in vitro* via embriogênese somática oferece um grande potencial para a multiplicação clonal, onde uma célula isolada pode ser induzida a produzir primeiramente um embrião e então uma planta completa (Rout et al., 1999; Guedes et al., 2006).

O desenvolvimento vegetal é o resultado de um intrincado controle hormonal múltiplo espacial e temporal, o qual é oriundo da regulação e expressão de múltiplos sistemas gênicos (Barendse & Peeters, 1995). O mesmo autor ainda salienta que a variação no número de receptores e sua distribuição, durante o desenvolvimento, podem alterar a sensibilidade das células aos hormônios ou outros sinais. A multiplicação por embriogênese somática ocorre pelo desenvolvimento de estádios morfológicos característicos, de seqüências similares àquelas observadas no embrião zigótico, e origina uma planta completa (Williams & Maheswaram, 1986).

As alterações histológicas associadas com a posição e a atividade das células competentes têm sido muito estudadas na embriogênese somática (Cangahuala-Inocente et al., 2004). Maheswaran & Williams (1985) constataram que a embriogênese somática de *Trifolium repens* L., obtida a partir de embriões zigóticos imaturos, originava-se de células da epiderme do hipocótilo, que proliferavam produzindo embriões somáticos sem uma fase de calo. A iniciação do desenvolvimento da embriogênese somática de *Carya illinoensis* (Wagenh) C. Koch induzida por diferentes auxinas, revelou pela análise morfológica e anatômica que as auxinas ANA e 2,4-D induziram acentuada divisão celular na camada subepidérmica dos cotilédones de embriões imaturos (Rodriguez & Wetzstein, 1998).

Diante do exposto, o trabalho teve por objetivo avaliar aspectos morfo-anatômicos da indução e desenvolvimento de embriões somáticos a partir de embriões zigóticos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados embriões zigóticos de *Euterpe oleracea* como fontes de explantes, a partir de plantas obtidas na Embrapa Acre. A assepsia foi realizada em câmara de fluxo laminar com imersão dos embriões zigóticos em hipoclorito de sódio 1% por 10 minutos e em álcool 70% por 15 segundos e logo após submetidos a tríplice lavagem em água destilada e esterilizada. Em

seguida, os explantes foram inoculados em meio MS solidificado com ágar, acrescido dos reguladores Picloran e o 2,4-D nas concentrações de 225 e 450 μM . Posteriormente, foram transferidos para um meio de multiplicação contendo 0,537 μM de ANA combinado com 12,30 μM de 2iP. As culturas embriogênicas foram mantidas em meio cultura para maturação e regeneração, no qual foi composto pela metade dos sais e vitaminas de MS com 2,5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de carvão ativado. O experimento foi mantido em sala de crescimento com temperatura controlada entre 26 ± 2 °C na ausência de luz, conforme metodologia proposta por Guedes et al., (2006).

Após 150 dias de cultivo, amostras dos explantes responsivos foram preparadas para a análise morfo-anatômica. As amostras foram preparadas para microscopia óptica de acordo com James et al.(1994), com modificações. Estas, foram fixadas em solução de glutaraldeído 2,5 % em tampão fosfato 0,1M (pH 7,2) por 24 horas a temperatura ambiente. Após a fixação, as amostras foram lavadas por três vezes em tampão fosfato e desidratadas em série etanólica crescente (20% a100%). Após a desidratação as amostras foram embebidas em resina acrílica “LR White medium grade” (London Resin Company, UK) durante um período de 7 dias, sendo mantidas em geladeira para infiltração da resina. Posteriormente as amostras foram emblocadas em cápsulas transparentes de gelatina contendo resina e postas para polimerizar em estufa a 55 °C por um período de 18 horas. A partir destes blocos, secções semi-finas (1 μm) foram obtidas utilizando um ultramicrótomo Reichert-Jung Ultracut S (Leica) e coradas com azul de toluidina solução 0,1% sendo examinadas em um microscópio óptico Axioplan (Zeiss).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As células epidérmicas e sub-epidérmicas do calo apresentam núcleo proeminente e citoplasma denso (Figura 1). Observa-se intensa divisão celular na epiderme, com a formação de delgadas paredes celulares anticlinais e periclinais (Figura 2). Segundo Rodriguez & Wetzstein (1998) a iniciação do desenvolvimento da embriogênese somática de *Carya illinoensis* (Wagenh) C. Koch induzida por diferentes auxinas, revelou pela análise morfológica e anatômica que as auxinas NAA e 2,4-D induziram acentuada divisão celular na camada subepidérmica dos cotilédones de embriões imaturos.

As sucessivas divisões celulares organizam inicialmente uma protuberância com poucas células (Figura 2), progredindo para uma formação multicelular mais numerosa (Figura 3). Nesse momento, percebe-se a organização da massa celular pró-embriogênica.

O desenvolvimento da massa pró-embriogênica origina embriões somáticos com numerosas células em arranjo esférico, caracterizando embriões somáticos no estágio globular (Figura 4). A multiplicação por embriogênese somática ocorre pelo desenvolvimento de estádios morfológicos característicos, de seqüências similares àquelas observadas no embrião zigótico, e origina uma planta completa (Thorpe & Stasolla, 2001).

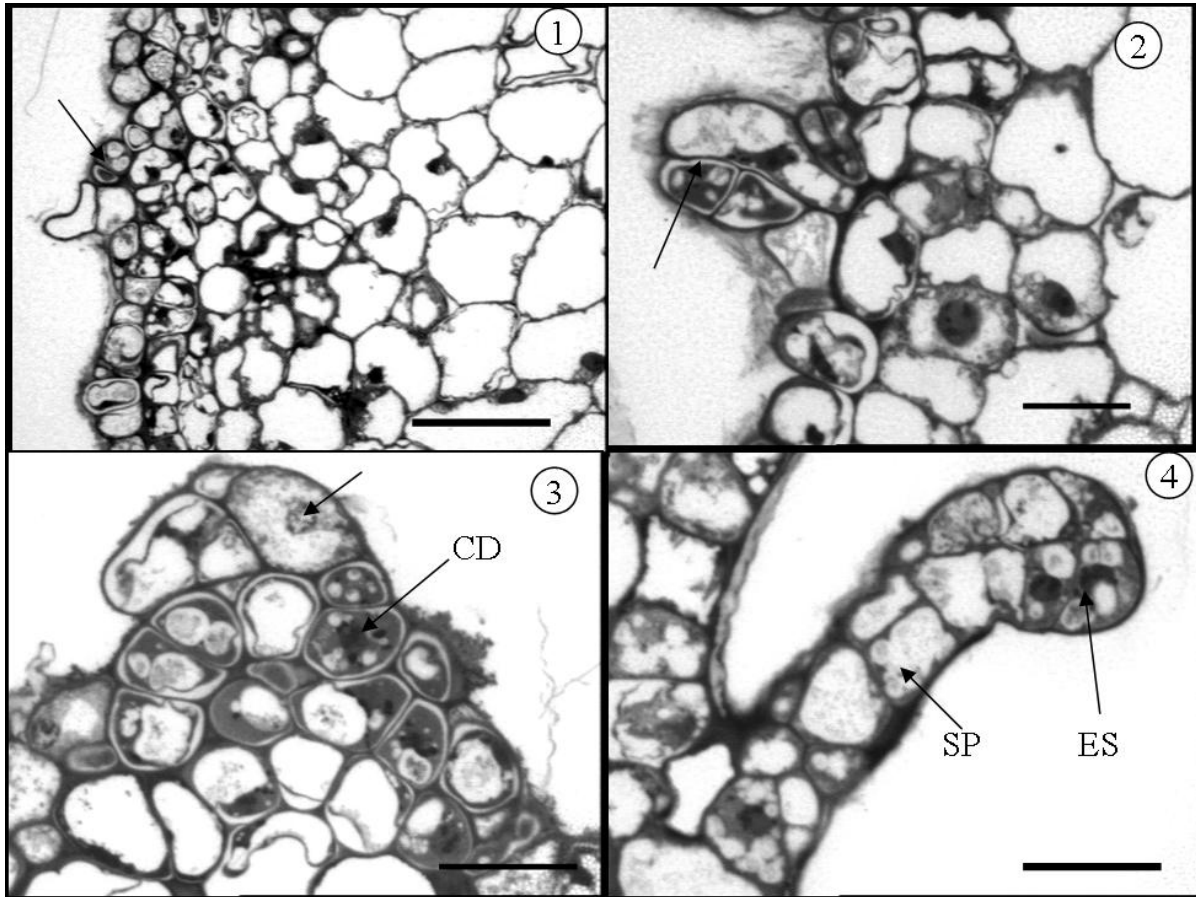
O processo de indução da embriogênese somática passa pela formação de calo, caracterizando uma rota regenerativa indireta (Guerra et al., 1999). Maheswaran & Williams (1985) constataram que a embriogênese somática de *Trifolium repens* L., obtida a partir de embriões zigóticos imaturos, originava-se de células da epiderme do hipocótilo, que proliferavam produzindo embriões somáticos sem uma fase de calo.

Na base da estrutura globular, observam-se células, semelhantes ao suspensor, conectando o embrião somático aos tecidos do embrião zigótico. De acordo com Nonohay et al., (1999), a presença de estruturas semelhantes ao suspensor indicam a origem unicelular do desenvolvimento de embriões somáticos. As características descritas sugerem que a embriogênese somática a partir de embriões imaturos de açaizeiro tem origem unicelular da epiderme.

O sucesso na iniciação e estabelecimento de culturas embriogênicas depende basicamente do tipo e estágio fisiológico dos explantes (Pompelli, 2002). Este é o primeiro passo importante para a transição de células somáticas em células embriogênicas (De Jong et al., 1993). Por isto, é fundamental o reconhecimento dos explantes que tenham a competência

morfogenética e que estejam em estágio específico de desenvolvimento (Harry & Thorpe, 1991).

A propagação *in vitro* via embriogênese somática oferece um grande potencial para a multiplicação clonal, onde uma célula isolada pode ser induzida a produzir primeiramente um embrião, e então, uma planta completa (Rout *et al.*, 1999).



FIGURAS 1-4. Ontogênese de embriões somáticos de açazeiro (*Euterpe oleraceae*). 1. Epiderme com intensa atividade de divisão celular (seta) da massa pró-embriogênica (Barra = 50 μ m). 2. Divisões celulares anticlinais (seta) e periclinais sucessivas (Barra = 10 μ m). 3. Células pró-embriogênicas com núcleos proeminentes (seta) e citoplasma denso (Barra = 10 μ m). 4. Embrião somático no estágio globular (seta) e suspensor (SP) (Barra = 10 μ m). Legenda: ES- embrião somático; SP- suspensor. CD – citoplasma denso.

CONCLUSÃO

A embriogênese somática passa por uma fase de calo, caracterizando uma rota regenerativa indireta. As características celulares da epiderme do calo tais como: formação de paredes celulares delgadas, núcleo proeminente e citoplasma denso expressas durante a cultura *in vitro*, juntamente com o desenvolvimento de suspensor, sugerem a origem unicelular dos embriões somáticos em açazeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARENDSE, G.W.M.; PEETERS, T.J.M. Multiple hormonal control in plants. **Acta Botanica Neerl.** 44 (1): 3-17. 1995.

CANGAHUALA-INOCENTE, G.C.; STEINER, N.; SANTOS, M.; GUERRA, M.P. Morphohistological analysis and hisrochemistry of *Feijoa sellowiana* somatic embryogenesis. **Protoplasma**, 224, 33-40. 2004.

De JONG, A.J.; SCHMIDT, E.D.L.; VRIES, S.C. Early events in higher-plant embryogenesis. **Plant Molecular Biology**, 22: 367-377. 1993.

GUEDES, R.S.; MACIEL, S.A.; PEREIRA, J.E.S. Indução da embriogênese somática em açazeiro a partir de embriões zigóticos imaturos. In: XIX Congresso Brasileiro de Fruticultura, 2006, Cabo Frio. **Anais**. Rio de Janeiro : UFRRJ. v. 1. p. 354-354.

GUERRA, M.P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. **Embriogênese somática e sementes sintéticas**. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (eds), **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. V.2, Brasília: SPI/Embrapa, 1999, p.533-568.

HARRY, I.S.; THORPE, T.A. Somatic embryogenesis and plant regeneration from mature zygotic embryos of red spruce. **Botanical Gazette**, 152 (4): 446-452. 1991.

JAMES, E.K; REIS, V.M.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, J.I. & DÖBEREINER, J. Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 45, p. 757-766, 1994.

JARDIM, M. A. G.; OASHI, S. T.; LAMEIRA, O. N. Cartilha informativa sobre a palmeira açai (*Euterpe oleracea* Mart.). Belém: **MPEG**, 1995. 11p

MAHESWARAN, G.; WILLIAMS, E.G. Origin and development of the embryoids formed directly on immature embryos of *Trifolium repens* *in vitro*. **Annals of Botany**, vol. 56, p. 619-630, 1985.

NONOHAY, J.S.; MARIATH, J.E.A.; WINGE, H. Histological analysis of somatic embryogenesis in Brazilians cultivars of Barley *Hordeum vulgare vulgare*, Poaceae. **Plant Cell Reports** 18: 929-934.

OLIVEIRA, M. do S. P. Açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.). In: EMBRAPA. Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental. (Ed.). **Programa de melhoramento genético e de adaptação de espécies vegetais para a Amazônia Oriental**. Belém, 1999. 137p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 16).

POMPELLI, M.F. **Morfogênese *in vitro*, Métodos de Micropropagação e Conservação de germoplasma de *Dickia distachya* Hassler**. Florianópolis, Dissertação de Mestrado, UFSC, 93p. 1999.

RODRIGUEZ, A.P.M.; WETZSTEIN, H.Y. A morfological and histological comparison of initiation and development of pecan (*Carya illinonensis*) somatic embryogenic culture induced with naphthaleniactic acid or 2,4-dichlorophenoxyiacetic acid. **Protoplasma** 204: 71-83. 1998.

ROUT, G.R. Biotechnology of the rose: a review of recent progress. **Scientia Horticulturae**, 81: 201-228. 1999.

THORPE, T.A.; STASOLLA, C. Somatic embryogenesis. In: BHOJWANI, S.S.; SOH, W.Y. (eds.) **Current trends in the embryology of angiosperms**. Kluwer, Dordrecht, pp.279-336. 2001.

WILLIAMNS, E.S.; MAHESWARAN, B. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cells as na embryogenic group. **Ann. Botany**, 57: 443-462. 1986.

PALAVRAS-CHAVES: *Euterpe oleraceae*; Arecaceae, histologia; embriogênese somática.