

Indução da embriogênese somática em pupunheira (*Bactris gasipaes* H. B. K.) a partir de embriões zigóticos imaturos¹.

Pereira, Jonny Everson Scherwinski²; Maciel, Simone de Alencar³; Fermino-Jr., Paulo Cesar Poeta⁴.

¹Trabalho realizado com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.

²Pesquisador da Embrapa Acre, Laboratório de Morfogênese e Biologia Molecular – LABMOL, C. Postal 321, 69908-970 Rio Branco – AC, Pesquisador Bolsista em Produtividade do CNPq, email: jonny@cpafac.embrapa.br; ³Bolsista PIBIC/CNPq/Embrapa Acre; ⁴Professor Depto. Ciências Agrárias-UFAC.

INTRODUÇÃO

A pupunha é uma Arecaceae que apresenta aptidão para a produção de frutos e palmito. A composição dos frutos faz desta uma excelente fonte alimentícia essencialmente energética, com boas quantidades de lipídios e caroteno (provitamina A) (Mora-Urpí et al, 1997).

A pupunha tem sido o objeto de pesquisas intensivas e desenvolvimento em várias partes da América tropical (Clement, 1995), devido principalmente as suas características de precocidade, rusticidade, elevada produtividade e perfilhamento. Sua reprodução é assexuada pela formação de perfilho. No entanto, a formação de mudas para plantios comerciais é feita normalmente por meio de sementes. Por ser uma planta alógama a produção de mudas por sementes pode provocar alta variabilidade genética nesses plantios.

A cultura de tecidos é uma excelente técnica na micropropagação de plantas, manipulação genética, conservação (George, 1993). A cultura de tecidos permite aumentar a velocidade e a eficiência de muitos programas de melhoramento, criando novas fontes de variabilidade genética. Entre as principais contribuições dessa tecnologia na agricultura, destacam-se: a micropropagação, cultura de embriões, seleção *in vitro*, produção de plantas duplohaplóides, hibridização somática, variação somaclonal e transformação genética (Karp, 1995).

Dentre as técnicas, podemos mencionar a embriogênese somática. Essa rota morfogênica constitui-se numa fonte eficaz para a multiplicação clonal em plantas lenhosas. Segundo Ammirato (1983), a embriogênese somática é um processo análogo à embriogênese zigótica em que uma única célula, ou um grupo de células somáticas são precursoras dos embriões somáticos. Este sistema é utilizado para a propagação massal de plantas elites, apresentando grande potencial, pois possibilita elevadas taxas de multiplicação (Gupta *et al.* 1993). Na embriogênese somática, ocorre a formação de embriões somáticos, com fases similares às de formação do embrião zigótico, sem fecundação (Segura, 1993).

O sucesso na iniciação e estabelecimento de culturas embriogênicas depende basicamente do tipo e estágio fisiológico dos explantes (Pereira *et al.*, 2006). Potencialmente muitos tecidos vegetais têm capacidade para originar calos *in vitro*, contudo poucos explantes têm habilidade para produzir calos embriogênicos (De Jong *et al.*, 1993). Explantes embrionários possuem maior competência morfogênica (Guedes *et al.*, 2006), podendo suas células apresentar receptores específicos e de maior sensibilidade aos hormônios vegetais (Guerra *et al.*, 1998).

Este trabalho teve por objetivo induzir a embriogênese somática em pupunheira a partir de embriões zigóticos imaturos.

MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Morfogênese e Biologia Molecular – LABMOL da Embrapa Acre, Rio Branco-AC. Utilizou-se como fonte de explante embriões zigóticos imaturos de pupunha. A desinfestação das sementes consistiu na retirada do

endocarpo dos frutos de forma não asséptica, com o auxílio da prensa manual, e posteriormente, foram retirados os embriões zigóticos. A desinfestação foi realizada na câmara de fluxo laminar onde os embriões foram imersos em álcool (70%) por 15 segundos, mergulhados por 10 minutos no hipoclorito de sódio (1%). Em seguida, os embriões foram lavados, novamente, por três vezes consecutivas com água esterilizada. Finalmente, o material foi hidratado por 15 minutos em água esterilizada.

Os explantes foram pré-tratados em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescido de 30 g.L⁻¹ de sacarose, 2,5 g.L⁻¹ de Phytigel[®], vitaminas de Morel & Wethmore (1951), e suplementados com Picloram e 2,4-D na concentração de 25 µM e BAP (0, 5 e 10 µM). Para a inoculação utilizaram-se frascos com capacidade de 110 mL, contendo aproximadamente 20 mL de meio de cultura.

Após 103 dias do efeito do pré-tratamento, as culturas embriogênicas foram transferidas para meio MS, suplementado com 450 µM de Picloram e 2,4-D.

As culturas embriogênicas obtidas em tratamento anterior foram transferidas após 179 dias de cultivo para meio de maturação, composto de sais de MS suplementado com 45 µM de Picloram e 2,4-D e 11,25 µM de 2iP.

O meio de cultura teve o pH ajustado para 5,8±0,1 antes da adição do Phytigel[®], sendo posteriormente autoclavado a 121°C por 15 minutos em 1,3 atm de pressão. Os experimentos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25±1°C na ausência de luz. Após 5 meses de cultivo foram avaliados quanto a presença de calos primários, de calos embriogênicos e de oxidação dos explantes.

O delineamento foi inteiramente casualizado com 8 repetições e 5 embriões/frasco.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Aos 41 dias de cultivo os embriões zigóticos apresentaram um intumescimento na região do mesocótilo (Figura 1A). Houve formação de calos nos tratamentos testados, os quais variaram em tamanho e potencial morfogênico de acordo com cada concentração hormonal (Figura 1B). De acordo com as observações de George & Sherrington (1984), os calos apresentam expressões morfogênicas distintas, conforme o explante e meio nutritivo. Os mesmos autores relatam que, de forma geral, o tipo de calo formado em um determinado genótipo, seu grau de diferenciação celular e potencial morfogênico dependem do explante e dos constituintes do meio de cultura.

Observou-se que na região do mesocótilo (Figura 1D), a auxina 2,4-D induziu o desenvolvimento dos calos primários. O crescimento de calos primários foi de forma lenta e gradativa e aos 164 dias de cultivo mostrou incrementos significativos sob ação de Picloram e 2,4-D (Figura 1C). Segundo Karp (1995), as diferenças observadas na proliferação dos calos ocorrem porque os explantes podem variar em sua sensibilidade para os fitorreguladores e/ou devido a diferenças no teor endógeno de hormônios.

De modo geral, os tecidos competentes em embriões zigóticos diferenciaram calos embriogênicos sob ação das auxinas Picloram e 2,4-D em 450 µM, onde a presença de estruturas granulares foram observadas (Figura 1 H e I). A indução da rota embriogenética ou organogenética é influenciada e determinada pelo tipo de explante, genótipo, fitorreguladores, meio de cultura e condições de cultivo (Hou & Jia, 2004; Paramageetham et al. 2004). Guerra & Handro (1998), observaram que a rota da embriogênese somática em *Euterpe edulis* Mart. ocorria como resposta à interação entre o estágio fisiológico do explante, tipo e concentração de fitorreguladores presentes no meio de cultura.

A morfogênese *in vitro* resulta da interação entre os processos de indução, competência celular, determinação e diferenciação celular (Christianson & Warnick, 1983), que culminam na obtenção de órgãos ou embriões somáticos.

Após a obtenção de calos embriogênicos, estes foram transferidos para o meio de cultura de maturação. Nesse processo foi observado que a interação da citocinina e auxina

influenciou no desenvolvimento dos calos embriogênicos e notou-se a presença de estruturas globulares (Figura 1M). Este tipo de resposta embriogênica ocorreu em baixa frequência, concordando com os resultados obtidos por Steinmacher (2005).

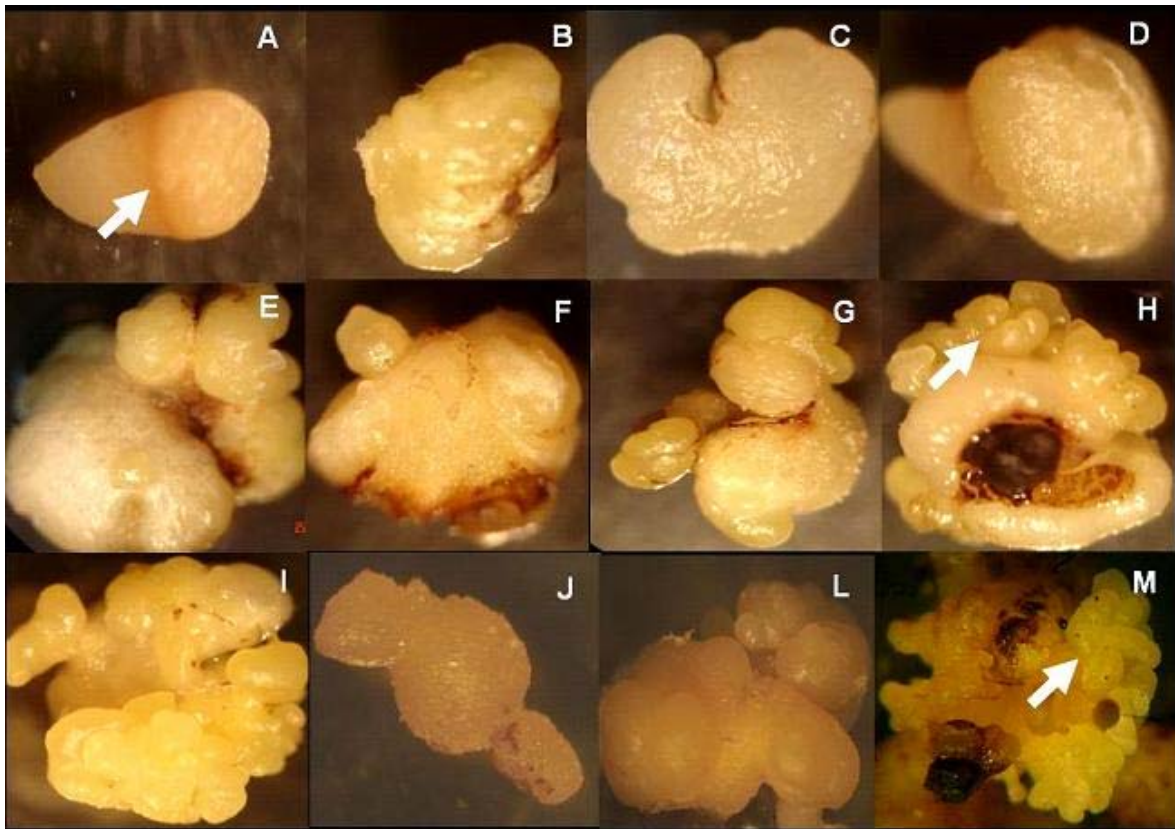


FIGURA 1: Aspectos morfológicos da embriogênese somática em pupunheira: (A) Intumescimento na região do mesocótilo do embrião zigótico (seta); (B e C) Início do desenvolvimento do calo primário induzidos pelas auxinas Picloram e 2,4-D com 25 μ M; (D) Crescimento do calo primário no embrião após 41 dias de cultivo; (E e F) Estruturas granulares na superfície calo primário obtidas com 450 μ M de 2,4-D; (G) Desenvolvimento de estruturas globulares na superfície do calo primário; (H e I) Calo embriogênico obtido após 164 dias (seta); (J) Detalhe do embrião somático isolado; (L) Estruturas diferenciadas no início da maturação dos embriões; (M) Maturação e multiplicação dos embriões somáticos (seta).

CONCLUSÕES

A utilização de embriões zigóticos imaturos são explantes responsivos na indução da embriogênese somática. Altas concentrações de auxinas 2,4-D e Picloram no meio de cultura são necessárias para a indução de estruturas embriogênicas. A combinação de auxinas e citocininas favorecem a maturação dos calos embriogênicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMMIRATO, P.V. **Embryogenesis**. In Handbook of plant cell culture (D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato & Y. Yamada, eds.). Macmillan Publisher Co., New York, p.82-123. 1983.
CHRISTIANSON, M.L.; WARNICK, D. A. Competence and determination in the process of in vitro shoot organogenesis. **Development Biology**, v.35, p.288-93, 1983.

- CLEMENT, C. R. Growth and analysis of peijibaye (*Bactris gasipaes kunth, plamae*) in Hawaii. Honolulu, 1995. 221p. Thesis (Ph.D.) – University of Hawaii.
- De JONG, A.J.; SCHMIDT, E.D.L.; VRIES, S.C. Early events in higher-plant embryogenesis. **Plant Molecular Biology**, **22**: 367-377. 1993.
- GUERRA, M.P.; HANDRO, W. Somatic embryogenesis and plant regeneration in different organs of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae): Control and structural features. **Journal of Plant Research**, **111**: 65-71. 1998.
- GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. Embriogênese Somática e Sementes Sintéticas. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S.; Buso, J. A (eds). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**, Brasília: Embrapa, v.2, p.533–568, 1998.
- GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**. Exegetics, Edington, v.1, 555p. 1993.
- GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. **Plant propagation by tissue culture**. Eversley: Eastern Press, 1984, 709p.
- 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.
- GUPTA, P.K., PULLMAN, G., TIMMIS, R., KREITINGER, M., CARLSON, W.C., GROB, J. & WELTY, E. 1993. Forestry in the 21st Century. **Bio/Technology** 11:454-459.
- HOU, S.W.; JIA, J.F. High frequency plant regeneration from *Astragalus melilotoides* hypocotul and stem explants via somatic embryogenesis and organogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.79, p.95-100, 2004.
- KARP, A. Somaclonal variation as a tool for crop improvement. **Euphytica**, v.85, p.295-302, 1995.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tabacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- MOREL, G. And Wetmore, R.H. Tissue culture of monocotyledons. **American Journal of Botany**, v.38, p.138-140, 1951.
- MORA-URPI, J.; WEBER, J.C.; CLEMENT, C.R. **Preach-palm (*Bactris gasipaes kunth*) – Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops**. Rome: Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research and Intenacional Plant Genetic Resources Institute, 1997.
- PARAMAGEETHAM, C. BABU, G.P.; RAO, J.V.S. Somatic embryogenesis in *Centella asiatica* L. an important medicinal and neutraceutical plant of India. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.79, p.19-24, 2004.
- PEREIRA, J. E. S.; COSTA, F.H.S.; ALVES JR., B; GUEDES, R.S. Respostas morfológicas *in vitro* de inflorescências imaturas de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) influenciada por fatores do meio de cultura. In: 3º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel., 2006, Varginha. **Anais**. Lavras : UFLA, 2006. v.1, p.1-5.
- SEGURA, J. Morfogênese *in vitro*. In: BIETO, J. A.; TALON, M. (Ed.) **Fisiologia y Bioquímica Vegetal**. Madrid: Interamericana, 1993. p. 381-392.
- STEINMACHER, D.A. **Germinação *in vitro*, Criopreservação e Embriogênese Somática em pupunha**. Pós-graduação em recursos Genéticos vegetais na Universidade federal de Santa Catarina – Florianópolis, 2005.

PALAVRAS – CHAVE

Bactris gasipaes; embriogênese somática; auxinas; calos embriogênicos.