



20º Seminário de
Iniciação Científica e
4º Seminário de Pós-graduação
da Embrapa Amazônia Oriental

ANNAIS 2016

21 a 23 de setembro

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Amazônia Oriental
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*



20º Seminário de
Iniciação Científica e
4º Seminário de Pós-graduação
da Embrapa Amazônia Oriental

ANNAIS 2016

21 a 23 de setembro

Embrapa Amazônia Oriental
Belém, PA
2016



INDUÇÃO À EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA POR PICLORAM NO CULTIVO *in vitro* DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE TUCUMÃ-DO-PARÁ (*Astrocaryum vulgare* MART.)

Orlando Maciel Rodrigues Junior¹, Oriel Filgueira de Lemos², Gleyce Kelly de Souza Ramos³, Danielle Pereira Mendonça⁴, Fernanda Beatriz Bernaldo da Silva⁵, Ilmarina Campos de Menezes⁶

¹ Graduando em Agronomia, Universidade Federal Rural da Amazônia. orlando_maciel@hotmail.com.

² Pesquisador D.Sc. em Genética e Melhoramento de Plantas, Embrapa Amazônia Oriental. oriel.lemos@embrapa.br.

³ Mestranda em Biotecnologia Aplicada à Agropecuária, Universidade Federal Rural da Amazônia. gleyceramos17@yahoo.com.br

⁴ Graduanda em Agronomia, Universidade Federal Rural da Amazônia. danielleprereiraam@gmail.com,

⁵ Graduanda em Agronomia, Universidade Federal Rural da Amazônia. fernanda_bernaldo@hotmail.com

⁶ Analista A, D.Sc. em Genética e Biologia Molecular, Embrapa Amazônia Oriental. ilmarina.menezes@embrapa.br

Resumo: O tucumã-do-pará (*Astrocaryum vulgare* Mart.) é uma palmeira oleaginosa que apresenta potencial para a indústria de biocombustíveis. Devido ao longo período de germinação das sementes, a obtenção de mudas em grande quantidade ainda não é possível pelos métodos tradicionais de propagação. Este trabalho objetivou o cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de tucumã-do-pará excisados de frutos imaturos para a indução à embriogênese somática. Frutos imaturos foram coletados e, após o processamento, os embriões foram inoculados em meio de cultura MS com 4 concentrações de picloram: 0; 120; 240 e 360 µM. Após 90 dias, verificaram-se porcentagens de viabilidade superiores a 80% para todos os tratamentos, indução de estruturas semelhantes à embriões somáticos superior a 50% em meio de cultura com picloram e maior crescimento do explante na concentração de 120 µM, diâmetro médio superior aos demais. Houve somente formação de plântulas em meio de cultura livre de regulador de crescimento. O cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de tucumã-do-pará é viável, gera plântulas após 90 dias de cultivo em meio de cultura sem regulador de crescimento e os embriões excisados de frutos imaturos são induzidos a estruturas semelhantes a embriões somáticos pela ação do picloram a partir de 120 µM via embriogênese somática. O método de assepsia adotado propicia isenção total de contaminações.

Palavras-chave: Assepsia, fitorregulador, micropropagação



Introdução

O tucumã-do-pará (*Astrocaryum vulgare* Mart.) pertence à família Arecaceae, é nativo da região amazônica e, além dos seus usos mais tradicionais de óleo e polpa comestíveis, apresenta grande potencial para a indústria de biocombustíveis. Entretanto, seu cultivo em escala ainda não é viável devido à dificuldade na obtenção de mudas, já que a germinação das sementes é muito lenta (NASCIMENTO; OLIVEIRA, 2011). Além disso, o processamento dos frutos maduros para a obtenção das amêndoas a serem semeadas é muito laborioso. Adicionalmente, para que os trabalhos de melhoramento genético dessa oleaginosa possam avançar mais rapidamente, é importante que haja um método de propagação consistente para a obtenção de plantas oriundas de parentais selecionados visando ao teste de progênes. Neste sentido, as técnicas de cultura de tecidos podem ser bastante úteis por meio do cultivo de embriões zigóticos e pela indução e regeneração de plantas embriogênese somática, o que multiplicaria o número de plântulas obtidas ao término do processo (STEINMACHER et al., 2013). Assim, este trabalho objetivou o cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de tucumã-do-pará excisados de frutos imaturos visando à regeneração de plantas via embriogênese somática.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia e Recursos Genéticos da Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA. Frutos de tucumã-do-pará foram coletados quando ainda verdes, na fase em que o endosperma da amêndoa está totalmente solidificado, porém, a superfície da amêndoa ainda não aderiu às paredes internas do endocarpo. Foi observado durante o monitoramento da maturação dos frutos que esta fase ocorre por volta dos cinco a sete meses após a antese. Os frutos verdes foram então levados para o laboratório, onde foram individualmente envolvidos em tecido espesso de algodão e cuidadosamente quebrados com um martelo. As amêndoas foram retiradas e transferidas imediatamente para uma solução de hipoclorito de sódio comercial a 10%, 5 gotas de detergente/L e água não destilada. Em seguida, foram enxaguadas para a retirada de sedimentos, transferidas para um béquer de 2L e imersas durante 20 minutos em uma solução de hipoclorito de sódio comercial a 20% e água destilada. Transcorrido o tempo, o béquer foi coberto com uma folha de papel alumínio, drenou-se a solução e transferiu-se o conjunto para câmara de fluxo laminar após a assepsia superficial com álcool etílico 70%. Os embriões zigóticos



foram excisados das amêndoas por meio de cortes superficiais sobre e ao redor do poro germinativo e mantidos em água destilada autoclavada até a submissão à assepsia. Para simplificar o processo e para que o tempo de assepsia fosse igual para todos, os embriões zigóticos foram postos em um infusor esférico de chá de aço inoxidável e fez-se a imersão em álcool etílico 70% por 1 minuto, seguida da imersão por 20 minutos em solução de hipoclorito de sódio comercial a 10% (v/v), 1 gota de surfactante Tween 80 para cada 100 ml de solução e água destilada autoclavada, com leve agitação a cada 5 minutos. Após esse período, fez-se a tríplice lavagem pela imersão em água destilada autoclavada, por cerca de 1 minuto por lavagem. Em seguida, os embriões zigóticos foram inoculados em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) previamente preparados, suplementados com 30 g/L de sacarose, 200 mg/L de ácido ascórbico, 0,22% de Phytigel (p/v) e 0,3% de carvão ativado (p/v). Os tratamentos consistiram em 4 concentrações de picloram no meio de cultura: 0; 120; 240 e 360 μ M. O pH do meio foi ajustado para 5.8 com solução diluída de NaOH e HCl. Foram utilizados cerca de 40ml de meio de cultura por frasco. A autoclavagem foi feita por 20 minutos a 121°C. Após a inoculação, os embriões somáticos foram mantidos em câmara tipo B.O.D., na ausência de luz e à temperatura de 25°±2C. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com 4 tratamentos e 8 repetições, sendo cada repetição composta por um frasco contendo 5 embriões zigóticos. Após 90 dias, foram avaliadas, em todos os tratamentos, a porcentagem de viabilidade (representando os embriões vivos e que apresentaram qualquer forma de desenvolvimento) e porcentagem de indução de estruturas semelhantes a embriões somáticos (embriões zigóticos com estruturas de embriões somáticos visíveis). Adicionalmente, para a testemunha, foi avaliado o comprimento da parte aérea e da raiz primária; para os tratamentos contendo picloram, foi avaliado o diâmetro final do explante. A análise estatística foi realizada com software Assistat e aplicou-se o teste de Tukey para a comparação de médias a 5% de significância.

Resultados e Discussão

As médias dos principais parâmetros analisados estão sintetizadas na Tabela 1. Vale ressaltar que a contaminação foi zero para todos os tratamentos, indicando a eficiência da assepsia. Quanto à porcentagem de viabilidade *in vitro* dos embriões zigóticos, todos os valores foram iguais ou superiores a 80%, não havendo diferença estatística entre si. A viabilidade *in vitro*, aqui definida como o desenvolvimento do embrião para qualquer forma (plântula, calos embriogênicos ou calos



não embriogênicos), indica que os embriões zigóticos já estão formados, ainda que o fruto não tenha completado sua maturação morfológica, estando, portanto, aptos para o uso em técnicas de cultura de tecidos. A fase do fruto imaturo em que a amêndoa está bem formada, porém não aderida ao interior do endocarpo é conveniente por dispensar o laborioso e longo processo de despulpamento e secagem. É de relativamente fácil identificação no campo pela quebra de alguns frutos verdes do cacho, apresentando, porém, a limitação de que seu período médio de duração ainda não foi determinado. Rodrigues et al. (2013), trabalhando com a espécie *Astrocaryum aculeatum*, encontraram uma viabilidade de 90% para embriões advindos de frutos imaturos e de menos de 3% os advindos de frutos maduros.

Tabela 1: Médias da % de Viabilidade, % de Indução de embriogênese somática e Diâmetro médio dos explantes induzidos à embriogênese somática (cm) de tucumã-do-pará (*Astrocaryum vulgare* Mart.).

Concentração de picloram (μM)	% Viabilidade	% Indução de ES	Diâmetro médio (cm)
0	85,0 \pm 17,7 a*	0,0 \pm 0,0 b	- - - -
120	90,0 \pm 10,7 a	72,5 \pm 18,3 a	1,27 \pm 0,12 a
240	82,5 \pm 12,8 a	60,0 \pm 26,2 a	0,96 \pm 0,07 b
360	80,0 \pm 15,1 a	55,0 \pm 27,8 a	0,92 \pm 0,07 b
CV% =	16,98	45,16	8,36

* médias com letras minúsculas iguais na coluna não diferem significativamente entre si.

Em relação à porcentagem de indução de embriogênese somática, observou-se que não houve diferença estatística entre as concentrações acima de zero, porém, o maior valor foi verificado na concentração de 120 μM de picloram (72,5%) e o menor, na concentração de 360 μM (55,0%). O diâmetro médio dos tecidos formados também foi maior com 120 μM , havendo diferença significativa deste tratamento em relação às concentrações maiores, que não diferiram entre si. Segundo Steinmacher et al. (2013) acredita-se que o picloram é o análogo de auxina de maior efeito, e, dependendo da cultura e da origem do explante, as concentrações podem variar desde 10 μM a mais de 300 μM , sobretudo quando há carvão ativado no meio de cultura, havendo a necessidade de se testar diversas concentrações para cada fim desejado. A testemunha não foi analisada para este último parâmetro, já que os embriões zigóticos desenvolveram-se diretamente em plântulas. Seu comprimento da parte aérea foi de 4,15 \pm 0,8 cm e o da raiz primária, de 0,63 \pm 0,2 cm após os 90 dias de inoculação. Considerando as baixas taxas de germinação *ex vitro* das sementes de tucumã-do-



20º Seminário de Iniciação Científica e 4º Seminário de Pós-graduação
da Embrapa Amazônia Oriental

21 a 23 de setembro de 2016, Belém, PA.

pará, as quais podem chegar a até dois anos, (NASCIMENTO; OLIVEIRA, 2011), o cultivo de embriões zigóticos imaturos é uma promissora alternativa para contornar os entraves que ocorrem na macropropagação, sendo necessário, contudo, estudos adicionais para o estabelecimento de protocolos completos de multiplicação até o estágio de obtenção de plantas aclimatizadas.

Conclusões

A formação de plântulas pelo cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de tucumã-do-pará é viável em meio de cultura sem adição de regulador de crescimento.

Embriões excisados de frutos imaturos são induzidos à embriogênese somática pela ação do picloram em concentração a partir de 120 µM com estruturas semelhantes a embriões somáticos.

O método de assepsia adotado propicia a isenção total de contaminações.

Agradecimentos

Os autores agradecem à FAPESPA pelo apoio ao projeto.

Referências Bibliográficas

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NASCIMENTO, W. M. O. do; OLIVEIRA, M. do S. P. de. **Produção de mudas de tucumanzeiro-do-pará (*Astrocaryum vulgare* Mart.) por perfilhos**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2011. 5 p. (Embrapa Amazônia Oriental. Comunicado técnico, 230). Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/921174/1/COM230.pdf>>. Acesso em: 24 jul. 2016.

RODRIGUES, P. H. V.; FERREIRA, F. F.; AMBROSANO, G. M. B.; GATO, A. M. G. Propagação *in vitro* de tucumã do Amazonas. **Ciência Rural**, v.43, n. 1, p. 55-59, 2013.

STEINMACHER, D. A.; JIMENEZ, V. M.; GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis and plant regeneration in peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth). In: ASLAM, J.; SRIVASTAVA, P. S.; SHARMA, M. P. (Org.). **Somatic embryogenesis and genetic transformation in plants**. New Dehli: Narosa Publishing House, 2013. v. 1, p. 75-94.