

Área: agropecuária

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E REGENERAÇÃO DE PLANTAS EM

Euterpe oleracea Mart.

Ana da Silva LEDO¹; Osmar Alves LAMEIRA²; Abdellatif BENBADIS³

RESUMO

Os objetivos do presente trabalho foram estabelecer protocolos básicos para a instalação de culturas viáveis de embriões zigóticos de *Euterpe oleracea* Mart. e regeneração de plantas. A embriogênese foi induzida em meio de cultura básico MS, com 0,6 % de ágar, 0,25 % de carvão ativado, 3 % de sacarose, 500 mg.L⁻¹ de caseína hidrolisada e suplementado com 339,36 µM de 2,4-D. A manutenção e multiplicação das culturas no estágio globular foram alcançadas com a transferência para meio secundário MS suplementado com 0,6 % de ágar e 2 % de sacarose, na presença de 0,537 µM de ANA e de 12,30 µM de 2iP. Para a conversão dos embriões somáticos em plântulas, as culturas foram transferidas para meio terciário ½ MS, suplementado com 0,6 % de ágar e 1 % de sacarose, na ausência de reguladores de crescimento. O processo embriogenético foi direto sem a formação de calos e em algumas culturas foi verificada a formação de embriões somáticos a partir dos primeiros embriões somáticos diferenciados, configurando um modelo embriogenético secundário ou repetitivo de alta frequência e longa duração. Este modelo apresenta a possibilidade de obtenção de um padrão contínuo de produção de embriões somáticos com riscos mínimos de alterações genéticas e grande potencial de aplicabilidade em estudos de eventos bioquímicos e fisiológicos relacionados com a determinação, no resgate de embriões interespecíficos, obtenção de linhagens e na conservação *in vitro* de *E. oleracea* Mart.

PALAVRAS-CHAVE: micropropagação, embriogênese somática, embriões zigóticos, açazeiro, cultura de tecidos.

INTRODUÇÃO

A perspectiva de exploração sócio econômico de espécies frutíferas nativas da região Amazônica tem sido crescente nos últimos anos. Dentre elas, destaca-se o açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.), pelas suas diferentes possibilidades de uso e o potencial de comercialização de produtos e subprodutos no mercado nacional e internacional.

Grande parte da produção de frutos e palmito de açaí provém do extrativismo praticado em áreas de populações naturais (Siqueira et al., 1998). A utilização de

¹ Eng. Agr. D.Sc., pesquisadora da Embrapa Acre, Caixa Postal 392, CEP. 69900-000, Rio Branco-AC; analedo@cpafac.embrapa.br

² Eng.-Agr., D.Sc., Pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental, Caixa Postal 48, CEP 66017-970, Belém-PA.

³ Professor visitante, Ph.D. Universidade Federal do Ceará.

técnicas de propagação pouco eficientes e a ausência de material genético melhorado têm contribuído negativamente para a exploração racional e econômica dessa espécie.

Programas de melhoramento têm sido implementados por diversas instituições de pesquisa na região, com ênfase à seleção de materiais com características agrônomicas de interesse. Neste contexto, as técnicas de cultura de tecidos, quando integradas em programas de melhoramento genético, são um valioso instrumento para o intercâmbio e preservação de germoplasma, multiplicação de genótipos, obtenção de transformantes via engenharia genética, introgressão de genes, quebra de barreiras de incompatibilidade genética, obtenção de haplóides, dentre outras aplicações (Ferreira et al., 1998). Informações sobre a propagação *in vitro* de açaizeiro são escassas.

Os objetivos do presente trabalho foram estabelecer protocolos básicos para a instalação de culturas viáveis de embriões zigóticos de *E. oleracea* Mart. e regeneração de plantas.

MATERIAL E MÉTODOS

Frutos maduros, com peso médio de 2,35 gramas, oriundos da coleção de acessos de açaizeiro da Embrapa Amazônia Oriental, foram lavados em água corrente e submetidos ao despulpamento em água a 40°C. As sementes foram desinfestadas em câmara de fluxo laminar, com a imersão em álcool etílico a 70 % por dois minutos e, em seguida, em solução de NaClO a 2 % por 20 minutos sob agitação e lavadas quatro vezes em água destilada e autoclavada. Os embriões zigóticos, excisados de sementes assépticas sob câmara de fluxo laminar, foram inicialmente inoculados em meio de cultura básico MS (Murashige & Skoog, 1962), com 0,6 % de ágar, 0,25 % de carvão ativado, 3 % de sacarose, 500 mg.L⁻¹ de caseína hidrolisada e suplementado com seis concentrações de 2,4-D (113,12; 226,24; 339,36; 454,48; 565,61 e 678,73 µM).

As culturas embriogenéticas iniciadas no meio primário foram transferidas, aos 85 dias de cultura, para meio secundário MS com 0,6 % de ágar, 2 % de sacarose, 0,537 µM de ANA e 12,30 µM de 2iP. Aos 150 dias de cultura, foram transferidas para meio terciário ½ MS, com 0,6 % de ágar e 1 % de sacarose, na ausência de reguladores de crescimento.

Avaliaram-se a frequência embriogenética obtida pela percentagem de culturas embriogenéticas em relação ao total de explantes do meio primário (A), o número de embriões somáticos por explante (B); a eficiência embriogenética (A X B)/100 (Lazzeri et al., citados por Guerra, 1989); frequência embriogenética obtida pela percentagem de

culturas embriogénicas em relação ao total de explantes do meio secundário, o número de embriões somáticos na fase bipolar e o número de plântulas regeneradas por cultura. As avaliações qualitativas consistiram da caracterização dos estágios embriogénicos e do comportamento das culturas.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 26°C ± 2, umidade relativa do ar média em torno de 70 % e fotoperíodo de 16 horas de luz branca fria (52 µmol.m⁻².s⁻¹ de irradiância)/oito horas de escuro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Aos 40 dias de cultura, nos embriões zigóticos cultivados em meio suplementado com 339,36; 454,48 e 565,61 µM de 2,4-D foi observada a iniciação de estruturas embriogénicas granulares. Aos 60 dias de cultura, sob essas estruturas, agregados de embriões somáticos globulares típicos de coloração amarelada foram visualizados, sendo facilmente destacados do tecido matriz. Resultados semelhantes foram obtidos por Guerra & Handro (1998) em embriões zigóticos maduros de *Euterpe edulis* Mart. cultivados em meio inicial com 454,48 µM de 2,4-D. O comportamento morfogenético pôde ser caracterizado por dois aspectos: a iniciação embriogénica ocorreu diretamente a partir da formação de tecido embriogénico de aspecto granular na região do nó cotiledonar e em nenhum caso foi verificada a iniciação a partir dos tecidos da lâmina cotiledonar (haustório), concordando com observado por Guerra & Handro (1998). Aos 35 dias após a transferência para meio secundário, verificou-se o início da progressão dos embriões para o estágio de desenvolvimento bipolar nos explantes pré-cultivados em meio com 339,36 µM de 2,4-D.

Apesar dos tratamentos primários com 454,48 e 565,61 µM de 2,4-D terem induzido a iniciação de estruturas pró-embriogénicas na fase inicial, observou-se alta intensidade de oxidação dos explantes, menor número de embriões somáticos por explante e paralisação do desenvolvimento dos embriões somáticos no estágio globular, sem a progressão para os estágios subseqüentes, aos 150 dias de cultura (Tabela 1). De acordo com Vasil (1982) a competência embriogénica é adquirida nos primeiros estágios de cultura na presença de 2,4-D. Provavelmente as altas concentrações, apesar de terem induzido uma competência embriogénica nos explantes no meio primário, podem ter alterado o desenvolvimento da rota morfogenética, promovendo a paralisação do desenvolvimento dos embriões no meio secundário.

Outros aspectos observados foram que o desenvolvimento embriogenético não foi sincronizado e a formação de embriões somáticos a partir dos primeiros embriões somáticos diferenciados, configurando um modelo embriogenético secundário ou repetitivo de alta frequência e longa duração. Aos 30 dias após a transferência das culturas para meio ½ MS, na ausência de reguladores de crescimento, foi detectado o início da maturação dos embriões somáticos e, aos 60 dias, a conversão de plântulas normais (Tabela 2).

Este modelo apresenta grande potencial de aplicabilidade em estudo de eventos bioquímicos e fisiológicos relacionados com a determinação, no resgate de embriões interespecíficos, obtenção de linhagens e na conservação *in vitro* de *E. oleracea* Mart.

CONCLUSÕES

- A expressão de um modelo de embriogênese somática direta, repetitiva e não sincronizada e com alta eficiência e frequência embriogenética é alcançada em embriões zigóticos maduros cultivados em meio primário MS suplementado com 2,4-D e transferidos para meio secundário MS na presença de ANA e 2iP.
- A maturação de embriões somáticos e a conversão em plântulas normais são obtidas em meio ½ MS, na ausência de reguladores de crescimento.

BIBLIOGRAFIA

SIQUEIRA, G.C.L. et al. **Açaí: produtos potenciais da Amazônia**. Brasília: MMA/SUFRAMA/SEBRAE/GTA, 1998a. 51p.

FERREIRA, A.T.; CALDAS, L.S.; PEREIRA, E.A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CNPH, 1998. v.1, p.21-24.

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

GUERRA, M.P. **Embriogênese somática em *Euterpe edulis* Mart. (Palmae)**. 1989. 233f. Tese (Doutorado em Ciências)-Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1989.

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**, Tokyo, v.111, n.1101, p.65-71, Mar. 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-SPI/ EMBRAPA-CNPH, 1999. v.2, p.533-568.

VASIL, I.K. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cereals and grasses. In: FUJIWARA, A. (Ed.). **Plant tissue culture**. Tokyo: Mazuren, 1982. p.101-103.

TABELA 1 - Médias da frequência embriogenética (FRE), do número de embriões somáticos (NES) por cultura e da eficiência embriogenética (EFE) de embriões zigóticos maduros de *Euterpe oleracea* Mart. cultivados em meio secundário MS na presença de 0,537 μ M de ANA e 12,30 μ M de 2iP, aos 150 dias de cultura. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2000.

Meio primário (μ M 2,4-D)	FRE (%) ¹ (A)	NES (B)	EFE (A X B)/100	Observações
339,36	86,7	25,5	22,1	Embriogênese repetitiva e não sincronizada e embriões somáticos em todos os estágios.
454,48	60,0	12,5	7,5	Leve oxidação dos embriões somáticos no estágio globular e regressão das culturas.
565,61	37,7	4,8	1,8	Oxidação intensa dos embriões somáticos no estágio globular e regressão das culturas.

¹ média de culturas embriogenéticas em relação ao total de explantes do meio primário.

TABELA 2 - Médias da frequência embriogenética (FRE), do número de embriões somáticos na fase bipolar (NEB) e do número de plântulas regeneradas (NPR) por cultura, a partir de embriões zigóticos maduros de *Euterpe oleracea* Mart. cultivados em meio 1/2 MS, na ausência de reguladores de crescimento, aos 210 dias de cultura. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2001.

Meio primário (μ M 2,4-D)	FRE ¹ (%)	NEB	NPR	Observações
339,36	92,3	16,3	14,8	Maturação e germinação dos embriões somáticos, embriogênese repetitiva e não sincronizada.
454,48	33,3	0	0	Embriogênese paralisada no estágio globular, sem progressão das culturas.

¹ média de culturas embriogenéticas em relação ao total de explantes do meio secundário.