

Embriogênese somática em caroá*

Silveira, Daniela Garcia¹; Morais Lino, Lucymeire Souza²; Souza, Fernanda Vidigal Duarte³; Souza, Antônio da Silva³; Santana, José Raniere Ferreira de⁴.

¹Doutoranda da Pós-Graduação em Botânica (UEFS), Unidade Experimental Horto Florestal - Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, Av. Presidente Dutra, S/N, Santa Mônica, CEP 44055-000, Feira de Santana, BA, Fone (75) 3625-2300, e-mail: danielags@ig.com.br; ²Doutoranda da Pós-Graduação em Biotecnologia (UEFS), e-mail: ismorais@yahoo.com.br; ³Pesquisadores da *Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical*, C.P. 007, CEP 44380-000, Cruz das Almas, BA, Fone (75) 3621-8094, e-mail: fernanda@cnpmf.embrapa.br, assouza@cnpmf.embrapa.br; ⁴Professor da Pós-Graduação da UEFS, Unidade Experimental Horto Florestal - Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, e-mail: raniere@uefs.br.

INTRODUÇÃO

Neoglaziovia variegata (Arr. Cam.) Mez. é uma espécie de Bromeliaceae nativa da Caatinga Brasileira, conhecida como caroá e de grande importância econômica e social na Região Nordeste da Bahia. As fibras das suas folhas são a matéria-prima para o trabalho artesanal de diversas famílias, constituindo-se numa renda alternativa para os pequenos agricultores.

No entanto, o extrativismo predatório tem levado essa espécie à condição de ameaçada, já tendo praticamente desaparecido em outras regiões da Bahia. O sistema de corte das folhas adotado pelas artesãs e a expansão da atividade agropecuária na região são os principais fatores causadores dessa situação.

A necessidade de sistematizar o cultivo tem impulsionado uma série de estudos, dentre os quais o estabelecimento de sistemas eficientes de produção de mudas (Silveira et al., 2006). O caroá se reproduz tanto por sementes quanto pelo desenvolvimento de gemas e rizomas laterais (Xavier, 1982), porém seu desenvolvimento vegetativo é lento, necessitando de um longo tempo para a obtenção de um grande número de plantas.

O desenvolvimento de sistemas de propagação de plantas por cultura de tecidos já vem sendo relatada com êxito em diferentes espécies de Bromeliaceae, conforme Pompelli et al. (2005), Rech Filho et al. (2005) e Alves et al. (2006). A cultura de tecidos, com suas variadas técnicas, pode significar uma ferramenta significativa no estabelecimento de protocolos de micropropagação para bromélias, seja por organogênese ou embriogênese somática (Pompelli & Guerra, 2004).

A embriogênese somática é um processo análogo à embriogênese zigótica, em que uma única célula ou um grupo de células somáticas são precursoras de embriões somáticos (Ammirato, 1983). Além disso, a embriogênese é muito utilizada para a propagação massal de plantas elites, apresentando grande potencial, pois possibilita elevadas taxas de multiplicação.

Vários fatores podem ser determinantes para o êxito do processo embriogênico, desde o surgimento dos primeiros embriões até o número de embriões produzidos por explante. Dentre esses fatores destacam-se as combinações de reguladores utilizados na etapa de indução, a duração desta, a origem do explante e do estado fisiológico da planta matriz (Dublin, 1991). Por sua vez, em cenoura, o aminoácido glutamina favorece a produção de maior número de embriões somáticos formados de qualidade, quando comparado com os resultados obtidos em meio suplementado com o íon amônia (Higashi et al., 1997).

Como não há relatos sobre indução de calos e regeneração de plantas, via embriogênese somática, em caroá, e visando desenvolver um método de propagação e conservação eficiente para essa espécie, o objetivo desse trabalho foi avaliar a melhor fonte de explante e concentração de glutamina na indução de calos embriogênicos e formação de embriões somáticos em *N. variegata*.

* Agradecimentos a CAPES pela concessão da bolsa de doutorado do primeiro autor e ao BNB e FAPESB pelo financiamento do projeto de pesquisa.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da **Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical**, em Cruz das Almas, BA. Sementes foram coletadas de plantas de caroá oriundas do município de Valente, na caatinga baiana, e cultivadas *in vitro*. Das plântulas obtidas, segmentos de folhas, raízes (quando houve) e rizomas (cortes transversais) foram inoculados em placas de Petri contendo o meio de cultura de Strosse et al. (2003), constituído de sais e vitaminas do MS (Murashige & Skoog, 1962) com 30 g L⁻¹ de sacarose, solidificado com 7 g L⁻¹ de ágar, suplementado com 1 mg L⁻¹ de AIA, 4 mg L⁻¹ de 2,4-D, 1 mg L⁻¹ de ANA, variando-se as concentrações de glutamina (50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹), sendo o pH ajustado para 5,8. Como testemunha absoluta, foi utilizado o meio de cultura MS sem a presença de reguladores de crescimento e glutamina.

O delineamento foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3 (tipos de explante) x 4 (concentrações de glutamina) + 1 (tratamento adicional - testemunha), com 12 repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por 5 a 7 segmentos de cada tipo de explante, à depender da disponibilidade de material. As placas foram mantidas no escuro, em temperatura de 27 ± 1°C, até a formação de embriões somáticos. Após 60 dias de cultivo foram avaliadas as seguintes variáveis: frequência de explantes com ausência total de crescimento (%), frequência de explantes com calos embriogênicos (%) e frequência de explantes com embriões somáticos (%).

Os embriões formados foram transferidos para meio MS suplementado com 0,1 mg L⁻¹ de ANA e 0,2 mg L⁻¹ de BAP e cultivados sob fotoperíodo de 16 horas, com densidade de fluxo de fótons de 22 μE.m⁻².s⁻¹ e temperatura controlada (27±1 °C), para observar seu posterior desenvolvimento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação realizada aos 60 dias de cultivo mostrou diferentes respostas, tanto em relação aos tipos de explantes utilizados quanto às concentrações de glutamina adicionadas ao meio de cultivo (Tabela 1).

Os explantes que se mostraram menos responsivos às condições estabelecidas no trabalho foram as raízes, que regeneraram embriões em apenas uma concentração de glutamina (50 mg L⁻¹), sendo esta a menor taxa (16%) obtida entre os diferentes explantes avaliados, ainda que tenha sido registrado a formação de calos em todas as doses de glutamina, exceto a de 200 mg L⁻¹. O desenvolvimento desses embriões ocorreu nas extremidades das raízes como pode ser observado na Figura 1A.

Quanto aos explantes foliares, só formaram embriões no meio de cultura com as concentrações de 50 e 100 mg L⁻¹ de glutamina, sendo que nesta última dose se observou 66% de embriões formados na fase globular (Figura 1B). Nas outras doses de glutamina (150 e 200 mg L⁻¹), e até mesmo na testemunha, esses explantes mostraram-se oxidados, não apresentando nenhum tipo de crescimento ou embriões somáticos.

Os resultados mais promissores foram registrados no rizoma, que resultaram na maior frequência de explantes com embriões somáticos em todas as concentrações de glutamina, sendo que nos níveis de 100 e 150 mg L⁻¹ houve 100% de explantes com embrião nas fases globular e torpedo (Figura 1C). Já na concentração de 200 mg L⁻¹ de glutamina essa frequência foi menor, porém foi a que favoreceu a maior formação de calos embriogênicos (33%). Estes resultados estão de acordo com trabalhos desenvolvidos por Khalil et al. (2002) e Strosse et al. (2003), que obtiveram embriões somáticos em bananeira utilizando este mesmo meio de cultura, com 100 mg L⁻¹ de glutamina.

Em relação ao meio de cultura sem reguladores de crescimento, utilizado como testemunha, não houve formação de calos embriogênicos em nenhum dos três tipos de explante (Tabela 1), ocorrendo oxidação e necrose tanto nas folhas como nas raízes. No entanto, a maioria dos segmentos do rizoma desenvolveu brotos com raízes, provavelmente originados de regiões meristemáticas, caracterizando um processo tipicamente organogênico, o que é interessante, em vista da ausência total de reguladores de

crescimento desse meio. Foi observado, também nos rizomas, a presença de calos friáveis não embriogênicos.

A transferência dos embriões somáticos para o meio de cultura MS, suplementado com 0,1 mg L⁻¹ de ANA e 0,2 mg L⁻¹ de BAP possibilitou o desenvolvimento dos meristemas radicular e apical dos mesmos (Figura 1D), quando mantidos por 2 meses de cultivo.

Esses resultados mostram que a indução de embriogênese somática em caroá está fortemente relacionada ao tipo de explante utilizado e que a glutamina na concentração de 100 mg L⁻¹ favorece o processo embriogênico. Outro aspecto importante a ser mencionado foi a obtenção de plantas completas e normais a partir desses embriões.

Tabela 1. Freqüência (%) de explantes de caroá [*Neoglaziovia variegata* (Arr. Cam.) Mez.] sem nenhum crescimento (SC), com calos embriogênicos (CE) e com embriões somáticos (ES), cultivados sob diversas concentrações de glutamina.

Concentrações de glutamina (mg L ⁻¹).	Tipo de explantes								
	RAIZ			FOLHA			RIZOMA		
	SC	CE	ES	SC	CE	ES	SC	CE	ES
0	100	0	0	100	0	0	100	0	0
50	68	16	16	83	0	17	0	8	92
100	59	41	0	0	34	66	0	0	100
150	84	16	0	100	0	0	0	0	100
200	100	0	0	100	0	0	0	33	67

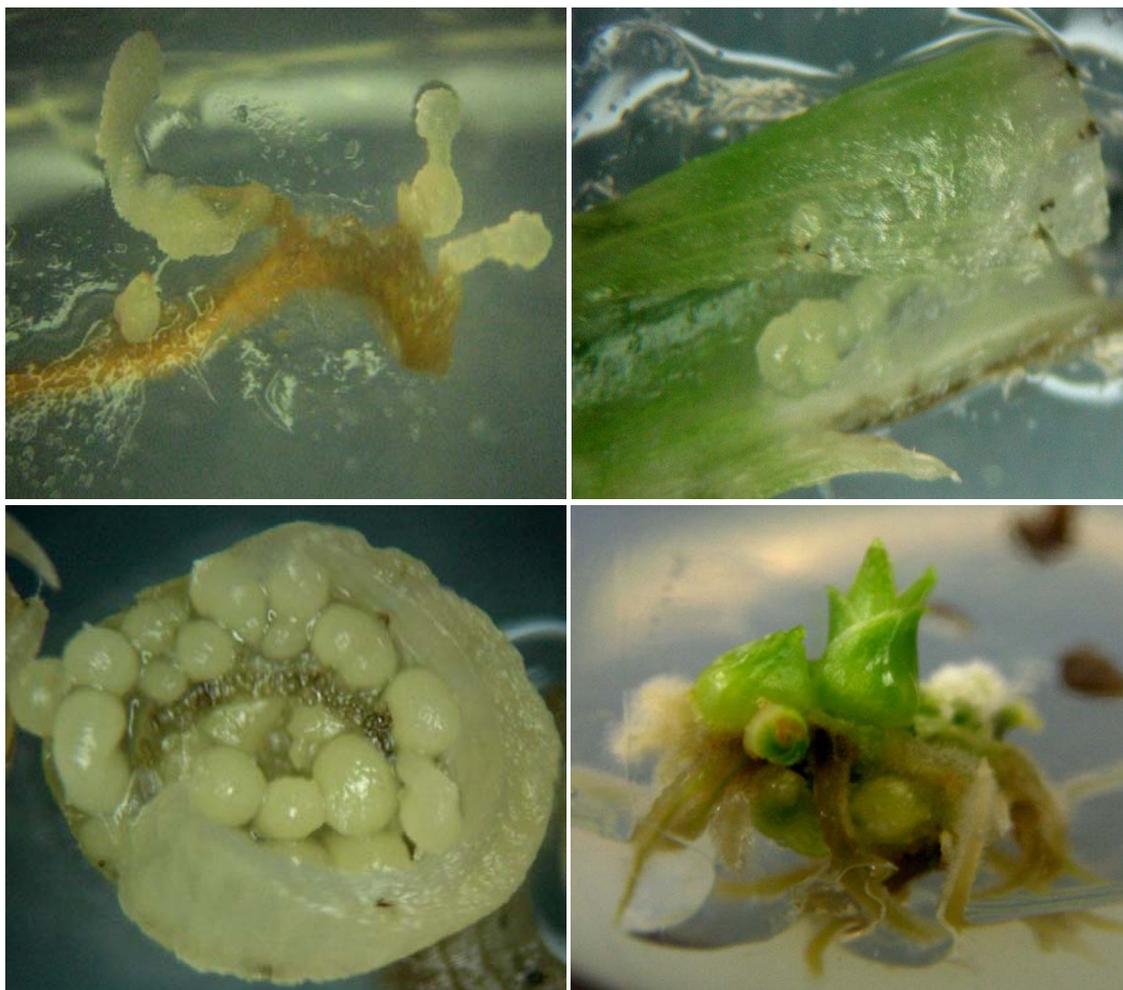


Figura 1. Embriogênese somática em caroá [*Neoglaziovia variegata* (Arr. Cam.) Mez.]. A: formação de embriões na extremidade da raiz; B: início da formação de embriões globulares na folha; C: embriões em fase globular e torpedo no rizoma; e D: brotos obtidos a partir de embriões somáticos.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos são promissores e mostram a viabilidade do uso desta técnica em programas de multiplicação e conservação da espécie *N. variegata*. No entanto, novos trabalhos devem ser realizados no sentido de ajustar um protocolo, a partir dos resultados encontrados nesse trabalho, visando aumentar a formação de embriões somáticos em plantas de caroá.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, G.M., DAL VESCO L.L., GUERRA, M.P. Micropropagation of the Brazilian endemic bromeliad *Vriesea reitzii* through nodule clusters culture. **Scientia Horticulturae**, v.110, p.204-207, 2006.

AMMIRATO, P.V. Embryogenesis. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. (Eds.). **Handbook of plant cell culture**. New York: Macmillan Publisher, 1983. p.82-123.

DUBLIN, P. Multiplicación vegetativa de café, hevea e cacao. In ROCA, W.M.; MROGINSKI, L.A. (Eds.). **Cultivo de tejidos en la agricultura; fundamentos y aplicaciones**. Cali: CIAT, 1991. p.612-642.

HIGASHI, K.; KAMADA, H., HARADA, H. The effects of reduced nitrogenous compounds suggests that glutamine synthetase activity is involved in the development of somatic embryos in carrot. **Plant Cell Tissue Organ and Culture**, v.45, p.109-114, 1997.

KHALIL, S.M.; CHEAH, K.T.; PEREZ, E.A.; GASKILL, D.A.; HU, J.S. Regeneration of banana (*Musa* spp. AAB cv. Dwarf Brazilian) via secondary somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**, v.20, p.1128-1134, 2002.

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

POMPELLI, M.F. & GUERRA, M.P. Ex situ conservation of *Dyckia distachya*: an endangered bromeliad from South Brazil. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.4, n.3, p.273-279, 2004.

POMPELLI, M.F.; FERNANDES, D.; GUERRA, M.P. Somatic embryogenesis in *Dyckia distachya* Hassler (Bromeliaceae) an endangered bromeliad from south Brazil. **Propagation of Ornamental Plants**, v.5, n.4, p.192-198, 2005.

RECH FILHO, A.; DAL VESCO, L.L.; NODARI, R.O.; LISCHKA, R.W.; MÜLLER, C.V.; GUERRA, M.P. Tissue culture for the conservation and mass propagation of *Vriesea reitzii* Leme and Costa, a bromeliad threatened of extinction from the Brazilian Atlantic Forest. **Biodiversity and Conservation**, v.14, p.1799-1808, 2005.

SILVEIRA, D. G.; SOUZA, F. V. D.; PELACANI, C.; SANTANA, J. R. F. Multiplicação *in vitro* de caroá [*Neoglaziovia variegata* (Arr. Cam.) Mez.]. In: Reunião Nordestina de Botânica, 29, 2006, Mossoró. **Resumos...**: Mossoró: Sociedade de Botânica do Brasil, 2006. 1 CD-ROM.

STROSSE, H.; DOMERGUE, R.; PANIS, B.; ESCALANT, J.; CÔTE, F. Banana and plantain embryogenic cell suspensions. 2003. In: VÉZINA, H.; PICQ, C.(Eds.). **INIBAP Technical Guidelines 8**. Montpellier: INIBAP, 2003. 31p.

XAVIER, L. P. **O caroá**. 2 ed. Natal: Emparn, 1982. 270 p. (Emparn. Documentos, 7. ESAM. Coleção Mossoroense, 247).

PALAVRAS-CHAVES

Neoglaziovia variegata (Arr. Cam.) Mez., Bromeliaceae, cultura de tecidos, moforgênese, produção de mudas.