

## Propagação *in vitro* de tucumã do Amazonas

### *In vitro* propagation of *Astrocaryum aculeatum*

Paulo Hercílio Viegas Rodrigues<sup>I</sup> Flávio Freires Ferreira<sup>II</sup> Gláucia Maria Bovi Ambrosano<sup>III</sup>  
Arlena Maria Guimarães Gato<sup>II</sup>

#### - NOTA -

#### RESUMO

O gênero *Astrocaryum* possui um grande número de espécies com potencial alimentício e produtoras de óleos. A espécie mais utilizada, o tucumã do Amazonas, é consumida em larga escala nos estados da região norte do Brasil e originado do extrativismo vegetal. Embriões zigóticos de sementes maduras e imaturas de tucumã do Amazonas (*Astrocaryum aculeatum* G. Mey) foram inoculados em meio de cultivo semi-sólido de Murashige e Skoog (MS) suplementado com vitaminas. Os embriões sobreviventes foram transferidos para o mesmo meio MS suplementado com 0,0; 1,0; 3,0 e 5,0mg L<sup>-1</sup> de BAP, obtendo-se taxa crescente de brotação, sendo as mais eficientes as doses de 3,0 a 5,0mg L<sup>-1</sup>.

**Palavras-chave:** micropropagação, citocinina, embrião imaturo, *Astrocaryum aculeatum*.

#### ABSTRACT

There is a large number of species within the genus *Astrocaryum* with the potential for use as food and for oil production. The most used species, tucumã do Amazonas, is consumed on a large scale in the States in the northern region of Brazil, originating from extractivism. Zygotic embryos of mature and immature tucumã do Amazonas (*Astrocaryum aculeatum* G. Mey.) seeds were inoculated in a semi-solid Murashige and Skoog (MS) culture medium supplemented with vitamins. The surviving embryos were transferred to the same MS medium supplemented with 0.0; 1.0; 3.0 and 5.0mg L<sup>-1</sup> of BAP, obtaining an increasing rate of shoot formation.

**Key words:** micropropagation, cytokinin, immature embryo, *Astrocaryum aculeatum*.

A palmeira *Astrocaryum aculeatum* Meyer, ou Tucumã do Amazonas, é uma planta monoica que apresenta crescimento monopodial e arborescente. Frequentemente associada a ambientes degradados ocorre em ecossistemas de terra firme da Amazônia Central e Ocidental (FERREIRA & GENTIL, 2005a). Da polpa e da semente, podem ser extraídos diferentes tipos de óleos comestíveis, cosméticos e outros propícios para a produção do biodiesel (YUYAMA et al., 2008). Cultura predominantemente de atividade extrativista em condições naturais, o tempo de germinação de suas sementes é de 730 a 1044 dias. A redução do tempo de germinação pode ser atingida com a retirada do endocarpo e embebição em água por nove dias. Nessas condições, a germinação foi antecipada para 160 dias, mas com perdas de 30% das sementes (ELIAS et al., 2006). A dificuldade na germinação das sementes e, portanto, consequente escassez de mudas, contribui para o pouco desenvolvimento da cultura do tucumã. O cultivo de embriões zigóticos *in vitro* representa uma técnica promissora para o avanço no conhecimento de determinadas espécies. A partir dela, existe a possibilidade de reproduzir e avaliar o desenvolvimento embrionário, a quebra da dormência e a produção de plântulas (HU & FERREIRA, 1998). No caso específico

<sup>I</sup>Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas Ornamentais, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), Av. Pádua Dias, 11, CP 09, 13418-900, Piracicaba, SP, Brasil. E-mail: phrviegas@usp.br. Autor para correspondência.

<sup>II</sup>Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA), Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, Manaus, AM, Brasil.

<sup>III</sup>Departamento de Odontologia Social, Bioestatística, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Piracicaba, SP, Brasil.

de palmeiras, que normalmente apresentam lento processo de germinação, a cultura de embriões zigóticos pode ser de grande utilidade para a obtenção de plantas em menor espaço de tempo. Tecidos embrionários são explantes promissores para serem usados em estudos de propagação *in vitro* devido a sua natureza juvenil e alto potencial regenerativo (PIERIK, 1990). Diante do restrito conhecimento e do potencial que representa a cultura do tucumã para a Amazônia, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o uso da citocinina benzilaminopurina (BAP) no desenvolvimento de embriões zigóticos de tucumã e na multiplicação *in vitro*.

Os frutos utilizados foram compostos por dois lotes; o primeiro de frutos imaturos, com 90 dias após a abertura floral (fertilização) e o segundo de frutos maduros, com 150 dias após a abertura floral, ambos adquiridos da Só Mudanças Agro-florestal Ltda, visando a obter a melhor fase de colheita para utilização do embrião no estabelecimento *in vitro*. Foram utilizados 90 frutos maduros (três repetições de 30 frutos) e a mesma quantidade para frutos imaturos de tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer). Os frutos imaturos foram lavados e, com o auxílio de uma faca, a casca e a polpa foram retiradas, deixando apenas o pirênio (semente com endocarpo). O mesmo ocorreu com os frutos maduros e, após a limpeza, procedeu-se à secagem do pirênio e à quebra do endocarpo. Os pirênios foram secos em temperatura ambiente com média de 25°C e umidade relativa de 55%, até que as sementes se soltassem dentro do endocarpo, verificado pela movimentação do pirênio, que ocorreu após duas semanas. Com o auxílio de uma morsa, o pirênio foi comprimido até que o endocarpo fosse rompido. Retirada a semente, isolou-se a porção contendo o embrião, que foi submetida à primeira assepsia em solução comercial de hipoclorito de sódio (10% v/v, com 2,5% NaOCl) por 24 horas. Ao término dessa fase, as porções foram lavadas com água destilada autoclavada, por três vezes, dentro de fluxo laminar. Na segunda assepsia, ainda no fluxo laminar, as porções foram submersas em álcool 70% por 5 minutos e 20 minutos em solução comercial de hipoclorito de sódio (50% v/v, com 2,5% NaOCl) e lavadas, por três vezes, em água destilada autoclavada. Os embriões, maduros e imaturos, foram excisados e inoculados em tubos de ensaio de 2,0cm (diâmetro) por 20,0cm (altura), contendo 20,0mL de meio de cultivo de MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), suplementado com 'Phytigel' (2,0g L<sup>-1</sup>), mio-inositol (100mg L<sup>-1</sup>), tiamina HCl (5,0mg L<sup>-1</sup>), piridoxina (1,5mg L<sup>-1</sup>), ácido nicotínico (0,9mg L<sup>-1</sup>), biotina (0,25mg L<sup>-1</sup>), glicina (2,0mg L<sup>-1</sup>), sacarose (30,0g L<sup>-1</sup>) e pH ajustado para 5,8. Os embriões permaneceram

por 45 dias em Biologic Oxygen Demand (BOD) sob temperatura constante de 28,5°C e no escuro. As avaliações ocorreram a cada cinco dias e verificou-se o desenvolvimento dos embriões e a ocorrência de contaminações. Dos embriões zigóticos desenvolvidos, foram selecionados os 60 melhores, que foram transferidos em frascos de 6,5cm (diâmetro) x 9,0cm (comprimento), contendo 40ml de meio de cultivo MS, suplementado com 'Phytigel' (2,0g L<sup>-1</sup>); tratamento contendo os mesmos compostos orgânicos citados anteriormente; sacarose (30,0g L<sup>-1</sup>); concentrações de 0,0; 1,0; 3,0 e 5,0mg L<sup>-1</sup> de BAP (Benzilaminopurina) e pH ajustado para 5,8, antes da autoclavagem a 120°C, 1,1atm por 20 minutos. Cada tratamento foi composto por quinze embriões, sendo cada embrião uma repetição. As culturas foram mantidas em sala de incubação com intensidade luminosa de 40 µmoles m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, temperatura de 25±2°C e fotoperíodo de 16 horas. A avaliação dos explantes ocorreu semanalmente, com trocas de meio de cultivo dos tratamentos a cada 30 dias, até completar três subcultivos, na qual foram individualizadas e quantificadas as brotações com os dados expressos pela média do número de brotações por explante. As brotações obtidas foram transferidas para meio MS, com metade de sua concentração de sais, 2,0g L<sup>-1</sup> de Phytigel, suplementado com vitaminas completas, sacarose (30,0g L<sup>-1</sup>) e 10,0mg L<sup>-1</sup> de AIB (ácido indolbutírico), em tubos de ensaio de 2,0cm (diâmetro) x 13,0cm (comprimento), contendo 20ml de meio de cultivo, para alongamento e enraizamento das brotações. As plântulas obtidas foram lavadas para retirada do excesso de meio de cultivo e transferidas para vaso com capacidade de 0,4L contendo substrato autoclavado com uma mistura de areia lavada e fibra de coco textura média (Amafibra), na proporção de 1:1 em volume e mantidas a 90% de umidade por três semanas para aclimatização. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Os graus de liberdade do fator concentração foram desdobrados em polinômio ortogonal. O nível de significância foi de 5% e foi utilizado o programa estatístico SAS (2008).

Houve efeito da maturidade do fruto de tucumã colhido sobre o desenvolvimento dos respectivos embriões zigóticos *in vitro*. Ocorreu desenvolvimento *in vitro* em 2,22% dos embriões zigóticos inoculados, originados de frutos com 150 dias da fertilização (maduros), enquanto que, em frutos com 90 dias da fertilização (imaturos) (Figura 1a e b), o desenvolvimento de embriões zigóticos *in vitro* foi eficaz em 90% das inoculações. Em 88,88% dos embriões zigóticos de frutos maduros, foi constatada necrose e oxidação dos embriões, que frustrou o desenvolvimento. Em nenhum momento, foi constatada

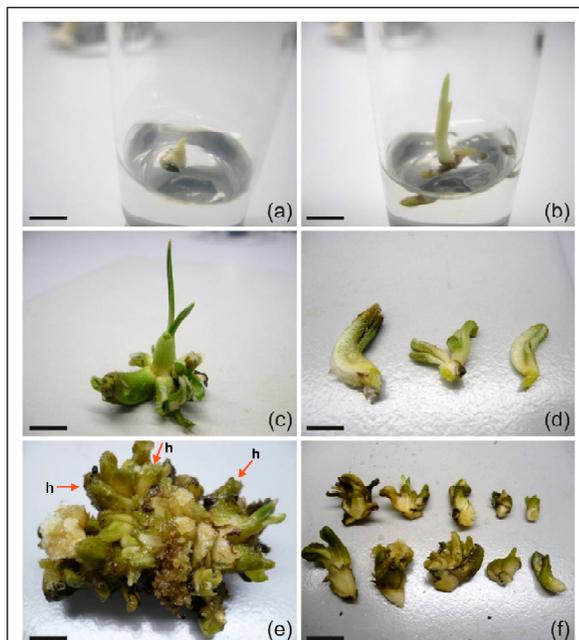
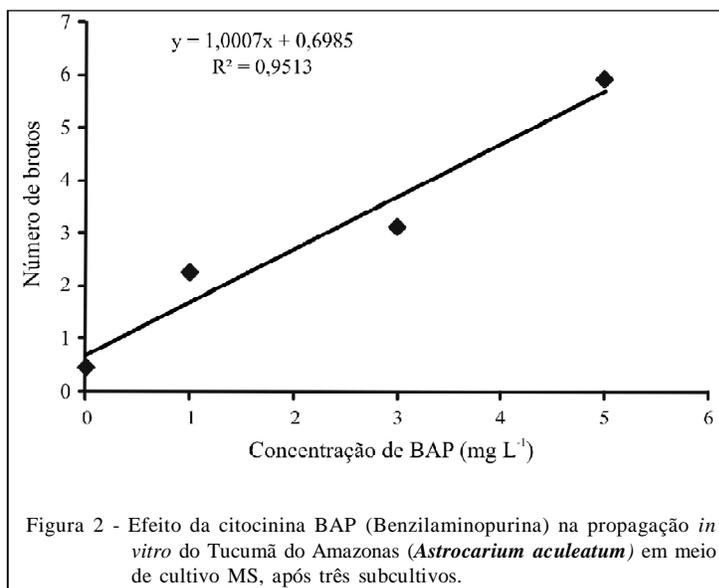


Figura 1 - Propagação *in vitro* de *Astrocarium aculeatum* em meio de cultivo MS. (a e b) Embriões zigóticos de frutos imaturos *in vitro* de 30 e 50 dias respectivamente, (c) brotações em meio contendo 3,0mg L<sup>-1</sup> de BAP, (d) brotações individualizadas em meio contendo 3,0mg L<sup>-1</sup> de BAP, (e) brotações em meio contendo 5,0mg L<sup>-1</sup> de BAP, (f) brotações individualizadas obtidas em meio com 5,0mg L<sup>-1</sup> de BAP. h = hiperhidria. Barra = 1,0cm

contaminação dos explantes, provavelmente proporcionada pela qualidade do material coletado e eficiência no processo de assepsia. Apesar de obter resultado semelhante para a germinação *in vitro* de embriões zigóticos imaturos de palmeira Murmuru (*Astrocarium ulei*), com valor de 89,5% em meio de cultura contendo 30g L<sup>-1</sup> de sacarose, PEREIRA et al. (2006) observaram também germinação *in vitro* de embriões zigóticos de frutos maduros em meios contendo 15, 30 e 45g L<sup>-1</sup> de sacarose, com germinação de 56,5; 25,0 e 41,3%, respectivamente. O uso de GA<sub>3</sub> no meio de inoculação utilizado por estes autores pode ter favorecido o desenvolvimento dos embriões zigóticos maduros. As giberelinas desempenham uma importante função na germinação, na quebra de dormência e no controle da hidrólise das reservas (TAIZ & ZIEGER, 2006), podendo provocar o amolecimento das camadas externas da semente, aumentando o suprimento de água e liberando os açúcares das paredes celulares (FRANCO & FERREIRA, 2002). Com relação à indução de brotações, doses crescentes de BAP acarretaram aumento no

número de propágulos obtidos por explante. A taxa de brotação foi maior nos tratamentos com BAP que no controle, mesmo não ocorrendo diferença significativa entre as concentrações de 1,0 e 3,0mg L<sup>-1</sup>, com taxas de 1:2,26 e 1:3,13, respectivamente. Observou-se tendência de aumento da formação de brotações, confirmada estatisticamente no tratamento com 5,0mg L<sup>-1</sup>, que apresentou taxa de 1:5,93 (Figura 2). Nota-se na figura 1c e d a formação de brotações com características morfológicas bem definidas dos brotos para o tratamento com 3,0mg L<sup>-1</sup> de BAP. A mesma formação bem definida de brotações não foi observada com 5,0mg L<sup>-1</sup> de BAP. Na figura 1e e f, observa-se quantidade superior de brotações ao tratamento com 3,0mg L<sup>-1</sup> de BAP, formação de calos e tecido apresentando hiperhidria. Essa concentração pode estar próxima do limite para induzir uma taxa de proliferação aceitável sem causar o amarelecimento ou malformação dos brotos. Em *Astrocarium aculeatum*, a formação de brotações, provavelmente por organogênese direta, induzida pelo BAP, pode facilitar o processo de propagação *in vitro* e reduzir a ocorrência



de variação somaclonal. Especificamente com o tucumã do Amazonas, essa formação de brotações não ocorre naturalmente em plantas endêmicas da floresta amazônica. A avaliação da morfologia de plântulas de tucumã, obtidas da germinação de sementes com endocarpo removido e embebidas em água, mostrou que, em apenas 4%, ocorreu a formação de perfilhos, apresentando de 1 a 4 brotações por planta (FERREIRA & GENTIL, 2005b). Outra espécie com resultado promissor na propagação *in vitro* obtido por organogênese direta foi em pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth). Almeida et al, 2012, estudaram as rotas e padrões morfogênicos utilizando análises histológicas e histoquímicas no processo de propagação *in vitro* de pupunha. Observaram que tanto organogênese direta como embriogênese somática ocorreram com a adição de 2,4mg L<sup>-1</sup> de ANA (ácido naftil acético), associada a 0,8mg L<sup>-1</sup> de BAP em meio MS. Concluíram que as rotas morfogênicas dependem do posicionamento das células competentes e sua interação com as células vizinhas. GRANER (2009), avaliando diferentes citocininas em microplantas de pupunha desenvolvidas *in vitro*, a partir de embriões excisados de sementes, constatou que a adição de 0,8mg L<sup>-1</sup> de BAP ao meio de cultura teve resultado positivo na formação de brotações adventícias na base do explante, sem a precedência de calos, via organogênese direta. Em tucumã, os propágulos obtidos no presente trabalho apresentaram a mesma formação, sem a precedência de calos, o que indica ser

a via de organogênese direta a responsável pela propagação. A fase de aclimatização, com 90% de umidade e aluminet 50% em casa de vegetação, foi o suficiente para aclimatizar 30 mudas selecionadas ao acaso, do total de 177 mudas obtidas. Desse modo, podemos concluir que o emprego de embriões zigóticos de sementes imaturas (90 dias de fecundação) é promissor como fonte de explante na propagação *in vitro* dessa espécie e o uso de BAP para indução de brotações foi eficiente nas doses entre 3,0 e 5,0mg L<sup>-1</sup>.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), ao Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA) pela concessão das bolsas CBA dos autores P.H.V Rodrigues, A.M.G Gato e F.F Ferreira, e a J.G Brancalion (CENA-USP), pela preparação das figuras.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, M. et al. Pre-procambial cells are niches for pluripotent and totipotent stem-like cells for organogenesis and somatic embryogenesis in the peach palm: a histological study. **Plant Cell Reports**, 2012. Disponível em: <<http://rd.springer.com/article/10.1007/s00299-012-1264-6>>. Acesso em: 12 jun. 2012. doi: 10.1007/s00299-012-1264-6.
- ELIAS, M.E.A et al. Emergência de plântulas de tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) em função da posição de sementeira. **Acta Amazônica**, v.36, n.3, p.385-388, 2006.
- FERREIRA, S.A.N.; GENTIL, D.F.O. Extração, embebição e germinação de sementes de tucumã (*Astrocaryum aculeatum*). **Acta Amazônica**, v.36, n.2, p.141-146, 2005.

- FERREIRA, S.A.N.; GENTIL, D.F.O. Morfologia da plântula em desenvolvimento de *Astrocaryum aculeatum* Meyer (Arecaceae). *Acta Amazônica*, v.35, n.3, p.337-342, 2005.
- FRANCO, E.T.H.; FERREIRA, A.G. Tratamentos pré-germinativos em sementes de *Didymopanax morototoni* (Aubl.) Dcne. et Planch. *Ciência Florestal*, v.12, n.1, p.1-10, 2002.
- GRANER, É.M. **Avaliações morfofisiológicas do desenvolvimento de microplantas de pupunheiras submetidas a tratamentos com biorreguladores.** 2009. 242p.. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11144/tde-09092009-100448/>>. Acesso em: 15 jun. 2012.
- HU, C.Y.; FERREIRA, A.G. Cultura de embriões. In: TORRES, A.C. et al. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília, DF: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPq, 1998. V.1, p.371-393.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, v.15, p.473-497, 1962.
- PEREIRA, J.E.S et al. Germinação *in vitro* de embriões zigóticos de mururu (*Astrocaryum ulei*). *Ciência Agrotecnológica*, v.30, n.2, p.251-256, 2006.
- PIERIK, R.L.M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores.** 3.ed. Madrid: Mundi-Prensa, 1990. 326 p.
- SAS - Statistical Analysis System: Release 9.1.3, (software). Cary, 2008. 620p.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology.** 4.ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 2006. 764p.
- YUYAMA, L.K.O. et al. Processamento e avaliação da vida-de-prateleira do tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) desidratado e pulverizado. *Ciência Tecnologia dos Alimentos*, v.28, n.2, p.408-412, 2008.