

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DO MAMOEIRO E ESTABELECIMENTO DE UM PROTOCOLO DE SELEÇÃO COM GLUFOSINATO DE AMÔNIO (GA) VISANDO À GERAÇÃO DE PLANTAS GENETICAMENTE MODIFICADAS.

¹Emanuel Felipe Medeiros Abreu; ²Maria Laine Penha Tinoco; ⁵Camila Chabi de Jesus; ⁶Helen Carolina de Oliveira; ⁷Carolina Senhorinho Ramalho; ⁴Eduardo Chumbinho de Andrade; ³Giovanni Rodrigues Vianna; ³Francisco José Lima Aragão.

¹Doutorando em Biologia Molecular; Analista Embrapa Mandioca e Fruticultura.

²Doutora em Biologia Molecular; Bolsista Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

³Doutor em Biologia Molecular; Pesquisador Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

⁴Doutor em Fitopatologia; Pesquisador Embrapa Mandioca e Fruticultura.

⁵Graduando em Biologia; Bolsista Embrapa Mandioca e Fruticultura.

⁶Bacharel em Biologia; Bolsista Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

⁷Graduando em Biologia; Bolsista Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

RESUMO

O Brasil é o principal produtor mundial de mamão, sendo responsável por 10% da área plantada e 25% da produção mundial em 2006, o que mostra uma alta produtividade da cultura no país. O desenvolvimento da cultura do mamoeiro tem sido limitado por diversos fatores como os relacionados à sua natureza dióica, à heterozigose, à suscetibilidade a doenças e à falta de métodos comerciais de multiplicação vegetativa. A embriogênese somática tem sido bem estudada em vários cultivares comerciais de mamoeiro. Esta técnica é, portanto, o meio pelo qual células somáticas se desenvolvem em estruturas que se assemelham aos embriões zigóticos (isto é, bipolar e sem conexão vascular ao tecido parental) com uma série de estádios embriológicos característicos, sem fusão de gametas. O presente trabalho teve como objetivo induzir e desenvolver calos e embriões somáticos da variedade de mamoeiro Sunrise a partir de sementes oriundas de frutos imaturos de mamão presentes no BAG de mamão (Banco Ativo de Germoplasma) situado na Embrapa Mandioca e Fruticultura. Os frutos imaturos com aproximadamente 90 a 120 dias foram coletados no BAG, lavados com água corrente e hipoclorito 2%, e posteriormente, encaminhados para câmara de fluxo laminar, onde foi realizado o processo de desinfestação em condições assépticas. O meio de cultura foi composto de 1/2MS suplementado com 10mg/L de 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético), 60g/L de sacarose, 10ml/L de vitamina de mamão (L-Glutamina, myo-inositol, tiamina, glycine, ácido nicotínico e piridoxina), 8g/L de ágar e pH 5,8. Para o estabelecimento da curva de seleção com calos embriogênicos de mamão utilizando como agente seletivo glufosinato de amônio. As concentrações usadas foram 0; 1; 2,5; 5; 10 e 15 mg/L. A formação de calos contendo embriões somáticos primários iniciou-se três a quatro semanas após a inoculação in vitro dos explantes, contudo pode-se observar um maior número de explantes em estádios mais tardios (torpedo e cotiledonar) após cinco semanas de cultivo. Para o experimento da curva de seleção com o herbicida glufosinato de amônio, foi possível observar inibição no crescimento e

desenvolvimento de embriões somáticos nas concentrações de 5, 10 e 15 mg/L. Nossos resultados sugerem que o protocolo de indução de embriogênese somática de mamoeiro testado foi reproduzível, e apresentou uma alta frequência na indução de embriões somáticos secundários. O sistema Bar/Glufosinato de amônio (GA) para a seleção de embriões transgênicos de mamoeiro, deve ser realizado em concentração igual ou superior a 5 mg/L de GA.

INTRODUÇÃO

O Brasil é o principal produtor mundial de mamão, sendo responsável por 10% da área plantada e 25% da produção mundial em 2006 (FAO, 2007), o que mostra uma alta produtividade da cultura no país que é quase três vezes superior à média mundial. O valor da produção nacional de mamão em 2005 foi de 763 milhões de reais (IBGE, 2006). Em nível nacional, temos como grandes destaques o estado da Bahia, responsável por 50% do mamão produzido no país, e por 40% da área cultivada, seguido pelo Espírito Santo com 40% da produção e 30% da área cultivada (IBGE, 2006). Atualmente, as variedades de mamoeiro mais cultivadas comercialmente pertencem aos grupos Solo e Formosa. As variedades do grupo Solo são exploradas em várias regiões do mundo, por produzirem frutos preferidos no processo de exportação, com tamanho menor (Dantas e Oliveira, 2009). O desenvolvimento da cultura do mamoeiro tem sido limitado por fatores relacionados à natureza dióica, heterozigose, à suscetibilidade a doenças e à falta de métodos comerciais de multiplicação vegetativa. Nas últimas décadas, diversas técnicas de biotecnologia têm sido empregadas com sucesso em apoio a programas de melhoramento do mamoeiro, tais como resgate de embriões, cultura de anteras, isolamento e cultivo de protoplastos, produção de sementes artificiais, micropropagação, marcadores moleculares e transformação genética (Oliveira, 1996).

A propagação do mamoeiro pode ser feita através de sementes, estacas, enxertia ou ainda utilizando as técnicas de cultura *in vitro*. Neste último caso, plantas são regeneradas via organogênese ou embriogênese somática, podendo-se obter milhares de mudas com alto padrão de qualidade e condições fitossanitárias aceitáveis (Lima, 2003).

A Embriogênese somática é, portanto, o meio pelo qual células somáticas se desenvolvem em estruturas que se assemelham aos embriões zigóticos (isto é, bipolar e sem conexão vascular ao tecido parental) com uma série de estádios embriológicos característicos, sem fusão de gametas (Jiménez, 2001). A embriogênese somática tem sido bem estudada em vários cultivares comerciais de mamoeiro. Entre as dificuldades apresentadas na literatura está a falta de sincronização nos processos de maturação dos embriões, o surgimento de

anomalias (embriões isolados entre si, ausência de meristema apical, cotilédones fundidos), baixas taxas de germinação e hiperidricidade (Koehle, 2004).

A embriogênese somática também tem sido bem documentada para outras espécies do gênero, tais como *Caricastipulata* V.M. Badillo (Litz e Conover, 1978), *Caricapentagona* Heilborn (Vega de Rojas e Kitto, 1991; Jordan e Velozo, 1997), e *Caricapubescens* Lenné & C. Koch (Jordan e Velozo, 1996; 1997), todas pertencentes a um grupo de espécies conhecido como “papayashighland”, particularmente comuns em algumas regiões subtropicais (Cardenas, 1989). O interesse nessas espécies reside principalmente na procura de genes de resistência a doenças e tolerância a baixas temperaturas (Koehler, 2004). Nas vários cultivares, embriões somáticos de mamoeiro já foram induzidos a partir de explantes de pecíolos, caules, folhas, raízes e embriões zigóticos (Chen., 1987; Fitch & Manshardt, 1990; Yang & Ye, 1992; Fitch, 1993; Khatoom & Sultana, 1994; Mondal, 1994).

O presente trabalho teve como objetivo induzir e desenvolver calos e embriões somáticos da variedade de mamoeiro Sunrise a partir de sementes oriundas de frutos imaturos de mamão presentes no BAG de mamão (Banco Ativo de Germoplasma) situado na Embrapa Mandioca e Fruticultura.

MATERIAL E MÉTODOS

Os frutos imaturos com aproximadamente 90 a 120 dias foram coletados no BAG (Banco Ativo de Germoplasma), lavados com água corrente e hipoclorito 2%, e posteriormente, encaminhados para câmara de fluxo laminar, onde foi realizado o processo de desinfestação em condições assépticas. As sementes foram retiradas dos frutos com auxílio de uma pinça e bisturi e logo em seguida colocados dentro de um béquer. A desinfestação foi realizada em solução de etanol 70% durante cinco minutos, solução comercial de hipoclorito de sódio 1% por 25 minutos, seguido de 4 enxagues com água destilada autoclavada.

Após as sementes serem desinfestadas, os embriões zigóticos foram retirados com auxílio de lupa, pinça e bisturi dentro da câmara de fluxo laminar e em condições assépticas. Posteriormente, os embriões zigóticos foram inoculados em placas de petri contendo 15 ml de meio de cultura. O meio de cultura foi composto de 1/2MS suplementado com 10mg/L de 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético), 60g/L de sacarose, 10ml/L de vitamina de mamão (L-Glutamina, myo-inositol, tiamina, glycine, ácido nicotínico e piridoxina), 8g/L de ágar e pH 5,8 (Cai et al. 1999).

Após 4 a 5 semanas dos embriões zigóticos em meio de indução, os calos contendo embriões somáticos primários foram transferidos para membrana de nitrocelulose e esmagados com o auxílio de uma espátula. As membranas contendo as células

embriogênicas provenientes dos embriões somáticos primários foram inoculados em novos meios de indução. Todas as placas de petri contendo os embriões e calos foram mantidas no escuro a $\pm 25^{\circ}$ C de temperatura. O experimento de indução de embriogênese somática foi repetido por duas vezes para que fosse avaliada a capacidade de reprodutibilidade do protocolo em questão.

Para o estabelecimento da curva de seleção com calos embriogênicos de mamão utilizando como agente seletivo glufosinato de amônio, foram selecionados calos com aproximadamente 60 dias que continham embriões somáticos secundários em estágios mais avançados. Estes embriões foram macerados em membrana de nitrocelulose e, em seguida, transferidos para meio de indução contendo diferentes concentrações do referido herbicida. As concentrações usadas foram 0; 1; 2,5; 5; 10 e 15 mg/L. Para cada tratamento realizou-se triplicatas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A formação de calos contendo embriões somáticos primários iniciou-se três a quatro semanas após a inoculação *in vitro* dos explantes, contudo pode-se observar um maior número de explantes em estágios mais tardios (torpedo e cotiledonar) após cinco semanas de cultivo. Resultados semelhantes foram observados por Cai et al. (1999), em que se induziu embriogênese somática de mamoeiro cv. Sunrise Solo utilizando a mesma composição do meio de indução. Em ambos os trabalhos pode-se observar, calos contendo embriões com coloração amarelo-pálida.

Após cinco semanas de cultivo em meio de indução, os embriões somáticos primários foram excisados dos embriões zigóticos e inoculados novamente em meio de indução fresco. Contudo, os embriões excisados foram inicialmente esmagados em membrana de nitrocelulose com o auxílio de uma espátula e, em seguida, a membrana contendo as células embriogênicas provenientes dos embriões somáticos esmagados foi transferida para um novo meio de indução. Após 3 a 4 semanas em meio de indução, pode-se observar a formação de embriões somáticos em estágios avançados (torpedo e cotiledonar). Num mesmo calo embriogênico pôde-se observar embriões em estágios distintos (Almeida, 2001). Os embriões secundários foram produzidos a partir das células embriogênicas expostas com o esmagamento dos embriões somáticos primários (Figura 1). A frequência de embriões somáticos secundários obtidos foi aumentada sensivelmente em relação à frequência de embriões somáticos primários. Resultados semelhantes FORAM observados por Fitch et al. (1990) e Cai et al. (1999).

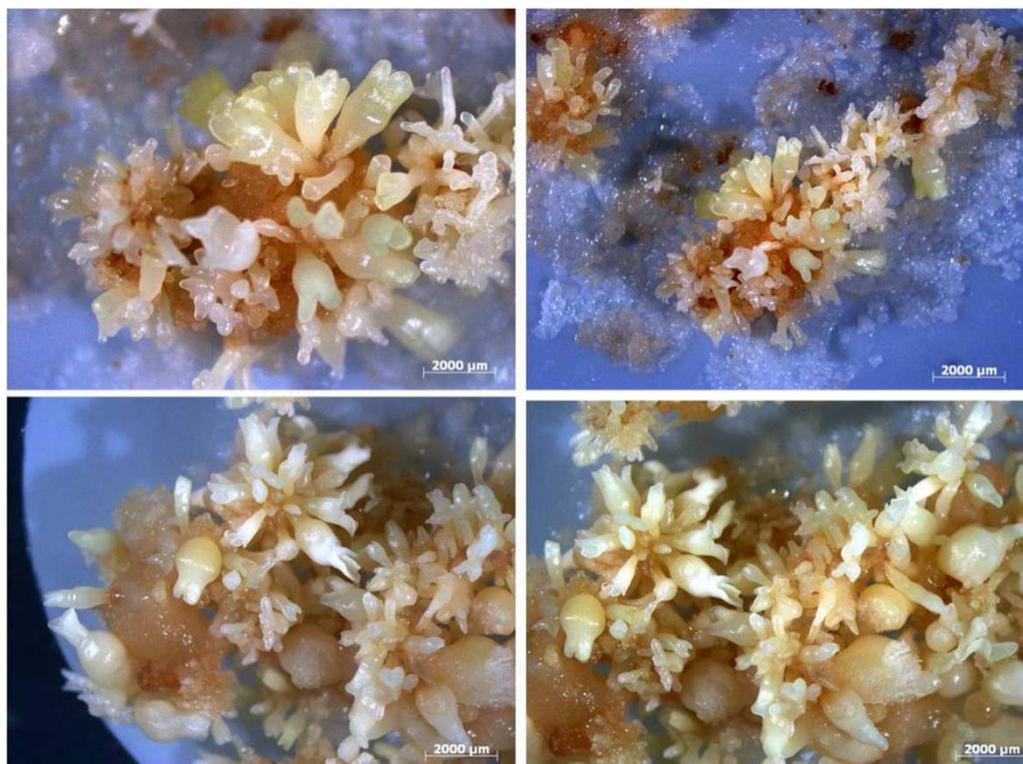


Figura 1. Regeneração de embriões somáticos de mamoeiro cv. Sunrise Solo obtido em meio de indução suplementado com 10 mg/L 2,4-D (Cai et al., 1999). A e B. Embriões somáticos 5 semanas após a inoculação em meio de indução em diferentes estágios de desenvolvimento (torpedo e cotiledonar). C e D. Embriões somáticos maduros 6 a 7 semanas após a inoculação em meio de indução.

O experimento da curva de seleção com o herbicida glufosinato de amônio teve como objetivo principal encontrar uma dosagem adequada para inibir o crescimento das células embriogênicas, e consequente inibição do desenvolvimento de embriões somáticos. Esta análise é fundamental para o desenvolvimento de um protocolo de transformação genética eficiente que visa encontrar um sistema adequado para selecionar células transformadas de células não transformadas.

Para o estabelecimento do experimento, calos embriogênicos com 60 dias foram esmagados em membrana de nitrocelulose, e transferidos para meio de indução com diferentes concentrações de glufosinato de amônio. Após 20 dias de inoculação os calos foram avaliados visualmente; estas avaliações foram realizadas a cada semana durante 60 dias. Ao final do experimento foi possível observar inibição no crescimento e desenvolvimento de embriões somáticos nas concentrações de 5, 10 e 15 mg/L. Contudo, os tratamentos com 10 e 15 mg/L os calos não só deixaram de se desenvolver como apresentaram um alto grau de oxidação. Provavelmente, essa oxidação foi devido à alta concentração do herbicida (Figura 2). Resultados semelhantes foram encontrados por Souza Junior et al. (2001), em que foi possível observar a paralisação total no

desenvolvimento dos embriões somáticos primários e secundários em concentrações acima de 5 mg/L de glufosinato de amônio.

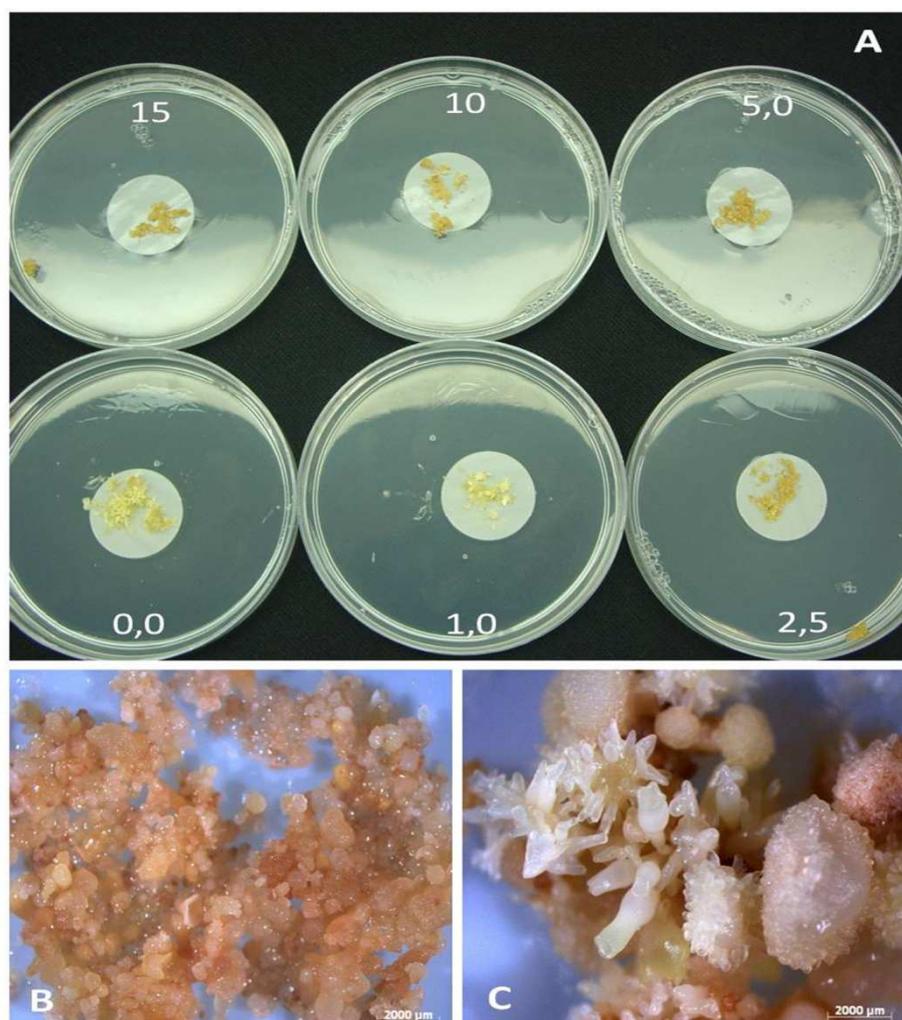


Figura 2. Curva de seleção de calos embriogênicos de mamoeiro presentes em meio suplementado com diferentes concentrações de glufosinato de amônio (GA). A. Meio de indução suplementado com diferentes concentrações de GA (0; 1,0; 2,5; 5,0; 10 e 15 mg / L). B. Calo oxidado em meio de indução com 5 mg/L de GA. C. Calos embriogênicos em meio de indução sem GA.

CONCLUSÕES

Nossos resultados sugerem que o protocolo de indução de embriogênese somática de mamoeiro testado foi reproduzível, e apresentou uma alta frequência na indução de embriões somáticos secundários.

O sistema *Bar*/Glufosinato de amônio (GA) para a seleção de embriões transgênicos de mamoeiro, deve ser realizado em concentração igual ou superior a 5 mg/L de GA.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, E. P. Indução e Desenvolvimento de Calos e Embriões Somáticos em Mamoeiro. **ScientiaAgricola**, v.58, n.1, p.51-54, jan./mar. 2001.
- CADERNAS, M. 1989. **Manual de Plantas econômicas de Bolívia. La Paz** : Ed. Los Amigos Del Libro , 333p.
- CAI, W., GONSALVES, C., TENNANT, P., FERMIN, G., SOUZA JR., M.T., SARINDU, N., JAN, F.J., ZHU, H.Y. & GONSALVES, D. A protocol for eficiente transformation and regeneration of *Carica papaya* L. **In Vitro Cellular & Development Biology** - Plant 35:61-69. 1999.
- CHEN, M.H.; WANG, P.J.; MAEDA, E. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Carica papaya* L. tissue culture derived from root explants. **Plant Cell Report**, v.6, p.348-351, 1987.
- DANTAS, J. L. L. ; OLIVEIRA, E. J. . O melhoramento genético do mamoeiro: avanços, desafios e perspectivas. **In: I Simpósio Nordestino de Genética e Melhoramento de Plantas**, 2009, Fortaleza -CE. O melhoramento genético no contexto atual. Fortaleza - CE : Embrapa Agroindústria Tropical,2009. v. 1. p. 151-180.
- FAO. **Perspectiva de Alimentos no Mundo**. Disponível em: <http:// www.fao.org.br/>. Acesso em: 25 julho. 2011.
- FITCH, M.M.M.; MANSCHARDT, R.M. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of papaya (*Carica papaya* L.). **Plant Cell Report**, v.9, p.320-324, 1990.
- FITCH, M. M. M. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from papaya hypocotyl callus. **Plant Cell Tissue Organ Cult.** 32:205--212; 1993.
- IBGE. **Censo agropecuário 2006**. Disponível em: <http:// www.ibge.gov.br/>. Acesso em: 25 julho. 2011.
- JIMÉNEZ, V. M. 2001. Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on the of endogenous hormones. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.13 n.2 p.196-223.
- JORDAN, M. VELOSO, J. Improvement of somatic embryogenesis in highland-papaya cell suspensions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 44, p. 189-194, 1996.
- JORDAN, M. VELOSO, J. In vitro propagation of highland papayas (*Carica pubescens* and *C. pentagona*). **Acta Horticulturae**, v. 447, p. 103-106, 1997.
- KHATOOM, K.; SULTANA, R. Plant regeneration from *Carica papaya* cv. Malir grown in tissue culture. **Pakistan Journal of Botany**, v.26, p.191-195, 1994.
- KOEHLER, A. D. **Embriogênese Somática em Mamoeiro (Carica papaya L.): Anatomia, Histoquímica e Influência de ACC, AVG e STS e de pulsos de 2,4-D**. (Dissertação Mestrado). UFV, 2004.
- LIMA S. A. A. C. Formação de Calos a Partir de Hipocótilos de Mamoeiro Submetidos a Diferentes Concentrações de 2,4-D e Sacarose. **Congresso Brasileiro de Fruticultura**. Belém. 2003.
- LITZ, R. E., CNOVER, R.A. Somatic embryogenesis in cell cultures of *Carica stipulate*. **HortScience**, v.15, p.733-735, 1978.

MONDAL, M.; GUPTA, S.; MUKHERJEE, B.B. Callus culture and plantlet production in *Carica papaya* (var. HoneyDew). **PlantCellReports**, v.13, p.390-393, 1994.

OLIVEIRA, R.P.; DANTAS, J.L.L.; ALMEIDA, E.P.; NICKEL, O.; VILARINHOS, A.D.; MORALES, C.F.G. **Uso da biotecnologia no melhoramento genético e propagação do mamoeiro**. In: MENDES, L.G.; DANTAS, J.L.L.; MORALES, C.F.G. (Ed.). **Mamão no Brasil**. Cruz das Almas : UFBA/Embrapa-CNPMPF, 1996. 179p.

RAJEEVAN, M.S.; PANDEY, R.M. Economics of mass propagation of papaya through tissue culture. In: WITHERS, L.A.; ANDERSON, P.G. (Ed.). **Plant tissue culture and its agricultural applications**. London :Butterworths, 1986. p.211-215.

Revista Brasileira de Fruticultura, disponível em:
<http://www.scielo.br/pdf/rbf/v32n3/a01v32n3.pdf>.

SOUZA, S. M. A. **MAMÃO NO BRASIL: distribuição regional da produção e comportamento dos preços no período 1996-2005**. Informações Econômicas, SP, v.37, n.9, set. 2007.

SOUZA JUNIOR, M.T.; VENTUROLI, M.F.; COELHO, M.C.F.; RECH FILHO, E.L. Análise de sistemas gene marcador/ agentes seletivos alternativos para seleção positiva de embriões somáticos transgênicos de mamoeiro. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. 13 (3): 365-372, 2001.

VEGA DE ROJAS, R. KITTO S. L. 1991.Regeneration of babaco(*Caricapentagona*). **Journal of the American Society for Horticultural Science from ovular allus**, v. 116. p. 747-752.

YANG, J.S.; YE, C.A. Plant regeneration from petioles of *in vitro* regenerated (*Carica papaya* L.) shoots. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v.33, p.375-381, 1992.