

Embriogênese Somática e Organogênese Indireta em *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken

Rejane Flores¹, Noeli Julia de Vasconcellos², Joseila Maldaner¹,
Tanea Maria Bisognin Garlet¹ e Fernando Teixeira Nicoloso³

Introdução

Pfaffia tuberosa (Amaranthaceae) é uma espécie medicinal conhecida popularmente como corango-de-batata, sendo distribuída de forma uniforme desde Goiás até o Rio Grande do Sul. Atualmente, o gênero *Pfaffia* compreende algumas espécies conhecidas como ginseng brasileiro devido ao uso de suas raízes como tônico, afrodisíaco e estimulante [1]. Diante das dificuldades de propagação vegetativa e reprodutiva de *P. tuberosa*, a cultura de tecidos vegetais é uma alternativa para a produção de mudas nesta espécie. Neste contexto, a embriogênese somática *in vitro* contribui para estudos fisiológicos, genéticos e bioquímicos que norteiam o desenvolvimento embrionário, além de ser um método apropriado quando se deseja manter a estabilidade genética [2]. Por outro lado, a organogênese a partir de calos desperta o interesse dos melhoristas como uma nova fonte de variabilidade genética, fornecendo perspectivas de seleção *in vitro* ou *ex vitro* de plantas superiores [3].

Recentemente, Martins & Nicoloso [4] estudaram a propagação clonal de *P. tuberosa in vitro* através do cultivo de segmentos nodais em meio MS [5], no entanto, não há relatos sobre indução de calos e regeneração de plantas via organogênese ou embriogênese somática nesta espécie. Em função disso, este estudo teve como propósito verificar a melhor fonte de explante e tipo de auxina na indução de embriões somáticos e na regeneração de plantas em *P. tuberosa*.

Material e métodos

A. Material vegetal

O material vegetal utilizado constou de plantas de *Pfaffia tuberosa* coletadas no Campus da UFSM, sendo uma exsiccata depositada no Herbário do Departamento de Biologia sob o número de SMDB 7818. Segmentos nodais das plantas foram desinfestados e multiplicados *in vitro* conforme metodologia proposta por Flores *et al.* [6].

B. Indução de embriogênese somática e organogênese

O meio de cultura básico utilizado foi o MS [5], com 30 gL⁻¹ de sacarose, 100 mgL⁻¹ de mio-inositol, 6 gL⁻¹ de

água e suplementado com ácido naftalenoacético (ANA) ou 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) em duas concentrações (1 ou 10 µM). O pH foi ajustado para 5,9 antes da adição do água e da autoclavagem. Testaram-se quatro fontes de explantes (folha, segmento nodal, entrenó e raiz), conforme esquema fatorial 2x2x4. Em todos os tratamentos, o meio de cultura foi suplementado com 1 µM de 6-benzilaminopurina (BAP). Após, o material foi mantido no escuro, em sala de crescimento, com temperatura de 25±2°C, durante o período de uma semana. Posteriormente, foram expostos a uma intensidade luminosa de 35 µmol m⁻²s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas.

As avaliações foram feitas após 40 dias de cultivo, considerando-se a formação de calos, a indução de embriogênese somática e a regeneração de brotações.

O delineamento experimental foi o inteiramente ao acaso com quatro repetições, sendo cada repetição formada por um frasco com cinco explantes. Os dados foram submetidos a análise da variância e as médias comparadas pelo teste de Duncan, com α=0,01.

Resultados e discussão

Houve formação de calos friáveis albinos em todos os tratamentos, os quais apresentaram expressões morfológicas distintas de acordo com o explante e meio nutritivo. Os explantes provenientes de raízes apresentaram alta competência embriogênica tanto na presença do 2,4-D (Fig. 1) como do ANA (Fig. 2). Independente da concentração de 2,4-D, esses explantes formaram 100% de calos embriogênicos (Fig. 1). Apesar dos órgãos reprodutivos serem os explantes mais utilizados para a indução de embriogênese somática, em algumas espécies, os explantes radiculares vem sendo utilizados com sucesso na formação de embriões [7, 8]. A rota embriogênica também foi induzida em 27% dos explantes foliares quando cultivados em meio com 1 µM de 2,4-D (Fig. 1). Resultados similares foram observados por Paramageetham *et al.* [9] em *Centella asiatica* L. Além disso, calos nodulares embriogênicos foram registrados nas raízes cultivadas com 10 µM de ANA em uma frequência de 100% (Fig. 2). Essa concentração de ANA também induziu embriogênese nos entrenós, porém em baixa frequência (3,8%). Independente do tipo de explante, não houve formação

1. Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, prédio 16 (CE), sala 3132, Santa Maria, RS, CEP 97105-900. E-mail: rejane.flores@terra.com.br

2. Curso de Pós-Graduação em Solos, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, prédio 16 (CE), sala 3132, Santa Maria, RS, CEP 97105-900.

3. Professor Adjunto do Departamento de Biologia, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, prédio 16 (CE), sala 3133, Santa Maria, RS, CEP 97105-900.

Apoio financeiro: CAPES.

de calos embriogênicos em meio suplementado com 1 μM de ANA (Fig. 2). Desta forma, verificou-se o efeito positivo tanto do ANA como do 2,4-D na indução de calos nodulares embriogênicos a partir de explantes radiculares de *P. tuberosa*, o que concorda com as observações de Zimmerman [2], de que o 2,4-D seguido pelo ANA são as auxinas mais efetivas na indução de embriogênese somática.

Houve regeneração de brotos a partir de células superficiais dos calos provenientes de segmentos nodais cultivados na presença de 1 μM de 2,4-D. A porcentagem de calos regenerativos foi 10%, os quais formaram 1 a 2 brotos/calco. O uso de uma combinação hormonal que favorece o crescimento do calo e ao mesmo tempo a regeneração indireta também foi relatado em *Cuminum cyminum* L. [10]. Não se observou a regeneração de brotos em meio com o ANA, o que pode ser devido ao uso de concentrações muito elevadas deste fitoregulador, pois em *Gomphrena officinalis* Mart., a presença do ANA em concentrações superiores a 0,5 μM inibiu a regeneração [11].

Os resultados obtidos no presente trabalho relataram importantes fatores que interferem na determinação da rota organogênica ou embriogênica em *P. tuberosa*. O cultivo de segmentos nodais com o 2,4-D mostrou-se importante para trabalhos que tenham como objetivo a regeneração indireta de brotações, tendo em vista a obtenção de somaclones. Por outro lado, os explantes radiculares mostraram-se ideais para trabalhos que tenham como propósito a indução de embriogênese somática. Apesar da regeneração de plantas ser possível via embriogênese ou organogênese, atualmente os esforços estão concentrados na regeneração de plantas a partir de embriões somáticos, os quais possuem ápices caulinares e radiculares conectados diretamente [2]. Ao contrário, a formação de brotos e raízes a partir dos calos ocorre de forma independente em relação ao tempo e à localização, sendo necessário a formulação de meios específicos para a regeneração indireta, isolamento, multiplicação e enraizamento dos brotos. Até o presente momento, não há registros de outros relatos referentes à organogênese indireta e embriogênese somática em *P. tuberosa*. No entanto, posteriores estudos serão necessários para estudar a origem, a ontogenia e a conversão dos embriões somáticos em plantas completas, bem como, testar combinações hormonais que favoreçam a regeneração brotos a partir de calos.

Os resultados permitem concluir que explantes radiculares de *P. tuberosa* produzem calos nodulares embriogênicos quando cultivados em meio contendo 1 μM BAP juntamente com 1 ou 10 μM de 2,4-D ou 10 μM de ANA. Por outro lado, a regeneração de brotos via

organogênese indireta ocorre quando segmentos nodais são cultivados com 1 μM de BAP e 1 μM de 2,4-D.

Agradecimentos

Os autores agradecem à CAPES pelo auxílio financeiro.

Referências

- [1] MAGALHÃES, P.M. 2002. *Agrotecnologia para o cultivo da Pfaffia*. Campinas, CPQBA-UNICAMP. 5p.
- [2] ZIMMERMAN, J.L. 1993. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *Plant Cell*, 5: 1411-1423.
- [3] LARKIN, P.J. & SCOWCROFT, W. R. 1981. Somaclonal variation a novel of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics*, 60: 197-214.
- [4] MARTINS, C.F. & NICOLOSO, F.T. 2004. Micropropagação de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 6: 53-61.
- [5] MURASHIGUE, T. & SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- [6] FLORES, R.; MALDANER, J. & NICOLOSO, F.T. 2006. Otimização da micropropagação de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. *Ciência Rural*, 36: 845-851.
- [7] CHANG, W.C. & HSIANG, Y.I. 1980. Plant regeneration through somatic embryogenesis in root derived callus of ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer). *Theoretical and Applied Genetic*, 43: 133-135.
- [8] WU, I.F.; CHEN, J.T. & CHANG, W.C. 2004. Effects of auxins and cytokinins on embryo formation from root-derived callus of *Oncidium 'Gower Ramsey'*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 77: 107-109.
- [9] PARAMAGEETHAM, C.; BABU, G.P. & RAO, J.V.S. 2004. Somatic embryogenesis in *Centella asiatica* L. na important medicinal and nutraceutical plant of India. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 79: 19-24.
- [10] EBRAHIMIE, E.; HABASHI, A.A.; GHAREYAZIE, B.; GHANNADHA, M. & MOHAMMADIE, M. 2003. A rapid and efficient method for regeneration of plantlets from embryo explants of cumin (*Cuminum cyminum*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 75: 19-25.
- [11] MERCIER, H.; VIEIRA, C.C.J. & FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. 1992. Tissue culture and plant propagation of *Gomphrena officinalis* - a Brazilian medicinal plant. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 28: 249-254.

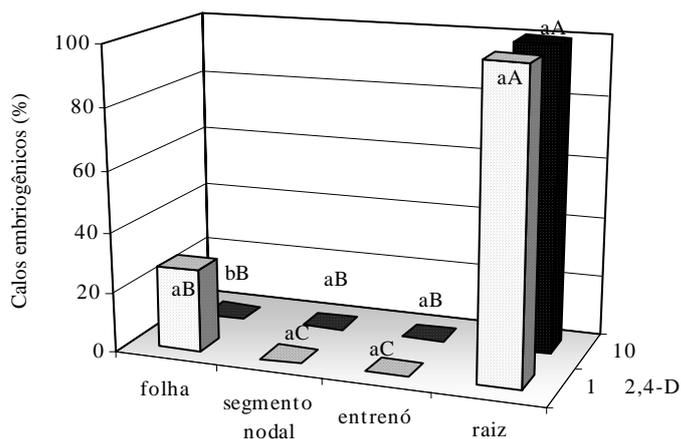


Figura 1. Efeito de concentrações de 2,4-D e de diferentes explantes na percentagem média de calos embriogênicos em *P. tuberosa*, após 40 dias de cultivo *in vitro* em meio MS. Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem quanto as concentrações de auxinas e maiúsculas quanto aos explantes, pelo Teste de Duncan ($\alpha=0,01$).

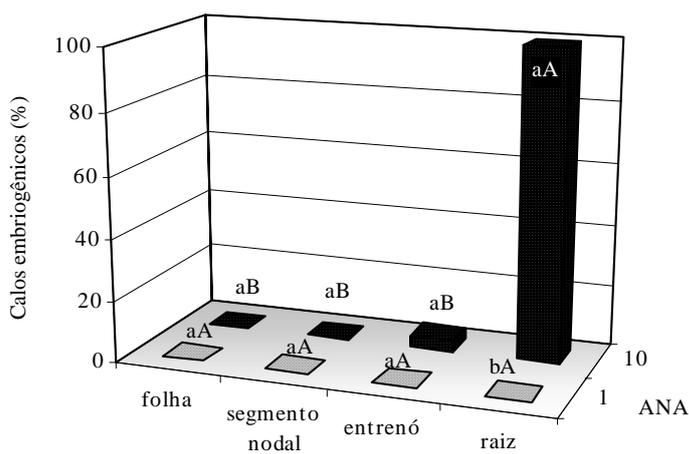


Figura 2. Efeito de concentrações de ANA e de diferentes explantes na percentagem média de calos embriogênicos em *P. tuberosa*, após 40 dias de cultivo *in vitro* em meio MS. Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem quanto as concentrações de auxinas e maiúsculas quanto aos explantes, pelo Teste de Duncan ($\alpha=0,01$).