

# Competência embriogenética em tecidos florais de *Acca sellowiana* (Myrtaceae)

Gabriela Claudia Cangahuala-Inocente<sup>1</sup>, Clarissa Alves Caprestano<sup>2</sup>, Jean Pierre Ducroquet<sup>3</sup> e Miguel Pedro Guerra<sup>4</sup>

## Introdução

A goiabeira serrana, *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret, é uma mirtácea nativa dos planaltos meridionais do sul do Brasil. Programas recentes têm buscado a domesticação desta espécie. Seus frutos são de alta qualidade organoléptica amplamente consumidos em outros países tais como a Austrália e Nova Zelândia.

As técnicas de cultura de tecidos vegetais apresentam grande potencial de uso para o melhoramento e conservação de germoplasma desta espécie [1, 2]. Dentre elas, a embriogênese somática é uma das principais técnicas de cultura *in vitro* e apresentam vantagens comparativamente as demais técnicas de micropropagação. Esta técnica é aplicável à conservação de germoplasma vegetal e para a propagação em larga escala de clones elites de plantas perenes como as coníferas e as angiospermas arbóreas. O aprimoramento de um protocolo de propagação clonal pode possibilitar a elucidação de processos aplicados à propagação e conservação desta espécie.

Assim, o presente trabalho tem como objetivo estabelecer culturas embriogenéticas e não embriogênicas a partir de tecidos somáticos.

## Material e métodos

### A. Material Vegetal

Botões florais foram coletados de plantas de *A. sellowiana* mantidas na coleção da Estação Experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI), São Joaquim, SC. Em câmara de fluxo laminar, os botões florais foram mergulhados em álcool 70 % por 1 minuto, seguido de hipoclorito de sódio (2 %) por 15 minutos, sendo posteriormente enxaguados três vezes com água destilada contendo ácido cítrico e ácido ascórbico (500 mg) filtro-esterilizados.

### B. Condições do cultivo *in vitro*

O meio básico utilizado foi o LPM [3] vitaminas de Morel [4], suplementado com 3 % maltose, 8 mM ácido glutâmico (Glu) e geleificado com 0,2 % phytigel. O pH foi ajustado a 5,8 antes da autoclavagem.

As culturas foram mantidas na ausência de luz (indução e multiplicação) em sala de crescimento com temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , UR de  $60 \pm 5\%$ .

### C. Culturas embriogenéticas e não embriogênicas

A fonte de explante para estabelecer as culturas foi constituída por filamentos de estames (filete), estilete e pétala dos acessos 101x458 (a e b), 101(a e b) e 458 de *A. sellowiana*. Foram conduzidos três experimentos: (a) Diferentes tipos (Picloram, Dicamba, Tiadizuron (TDZ) e ácido 2,4-Diclorofenoxilacético (2,4-D) e concentrações (10, 20 e 40  $\mu\text{M}$ ) de fitorreguladores; (b) 2,4-D (20 e 40  $\mu\text{M}$ ) combinado com 1 e 2  $\text{mg.L}^{-1}$  de citocininas [Benzilaminopurina (BAP) e 2 isopenteniladenina (2-IP)]; (c) Diferentes concentrações (2, 20 e 200  $\mu\text{M}$ ) das auxinas 2,4-D, Picloram e Dicamba.

As unidades experimentais foram constituídas por trinta filetes, cinco pétalas e três estiletos arranjados em blocos completamente casualizados. A percentagem de formação de calo foi avaliada aos 90 dias de cultivo, e os aspectos histoquímicos por meio da dupla coloração com carmim acético e azul de Evans, determinando assim culturas embriogênicas e não embriogênicas.

### D. Análise estatística

Os dados coletados em porcentagem foram submetidos ao teste de separação de médias SNK ao nível de 5 % de significância. Foram utilizados os softwares Statgraf 7.0 e Estatística 5.0, para auxílio nos procedimentos matemáticos e estatísticos.

## Resultados

### A. Resposta aos fitorreguladores.

Para o acesso 101x458a, a melhor resposta de indução de calo foi com 2,4-D (10 e 40  $\mu\text{M}$ ) e Dicamba (10 e 40  $\mu\text{M}$ ) a partir do estilete (50 %), e com Dicamba (10  $\mu\text{M}$ ) a partir do filete (8,2 %). Do acesso 101x458b, a melhor resposta de indução de calo foi com 2,4-D (10  $\mu\text{M}$ ) e Dicamba (10  $\mu\text{M}$ ) a partir do estilete (25 %).

Para o acesso 101a, a indução de calo foi obtida do estilete (50 %) com 2,4-D (40  $\mu\text{M}$ ) e Picloram (20  $\mu\text{M}$ ), e

1. Doutoranda do programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina. Rod. Ademar Gonzaga 1345, Florianópolis, SC, CEP 88040-100. E-mail: gcangahu@cca.ufsc.br

2. Aluna do curso de Agronomia, Bolsista PIBIC/CNPq, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina. Rod. Ademar Gonzaga 1345, Florianópolis, SC, CEP 88040-100.

3. Pesquisador da Estação Experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI), São Joaquim, SC. Rua João Araújo Lima 102, Bairro Jardim Caiçara, São Joaquim, SC, CEP 88600-000.

4. Professor Titular do Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina. Rod. Ademar Gonzaga 1345, Departamento de Fitotecnia, Florianópolis, SC, CEP 88040-100. E-mail: mpguerra@cca.ufsc.br

Apoio financeiro: CAPES, CNPq e FAPESC.

do filete (7,6 %) com Dicamba (20  $\mu\text{M}$ ). Do acesso 101b, a melhor resposta de indução de calo foi obtida do estilete (50 %) com Picloram (10  $\mu\text{M}$ ), e do filete (13,5 %) com Dicamba (10  $\mu\text{M}$ ).

Para o acesso 458, a melhor resposta de indução de calo foi obtida a partir dos estiletos (75 %) e filetes (33,4 %) em presença de 2,4-D (40  $\mu\text{M}$ ).

As auxinas que induziram culturas embriogênicas e não embriogênicas foram o 2,4-D a partir do estilete e Dicamba a partir do filete, independentemente do acesso utilizado (Fig. 1A, B) (Tab. 1A). Comparando todos os acessos, a melhor resposta de indução morfofogenética *in vitro* ocorreu com o acesso 458, com 35,4% de indução a partir do estilete e 11,8% a partir dos filetes (Tab. 1B).

#### B. Respostas ao 2,4-D combinado com citocininas

Para o estilete, a concentração de 40  $\mu\text{M}$  de 2,4-D proporcionou uma elevada percentagem de indução de calo, assim como a citocinina 2-iP. O BAP (2  $\text{mg.L}^{-1}$ ) inibiu a formação de calos (Tab. 2). Para o filete, a combinação 2,4-D (20  $\mu\text{M}$ ) e BAP (1 e 2  $\text{mg.L}^{-1}$ ) resultou em 100 % de indução de calos (Fig. 1C). Para as pétalas, todas as combinações formaram calos (Fig. 1D). Entretanto as combinações de 2,4-D (20  $\mu\text{M}$ ) com BAP (1  $\text{mg.L}^{-1}$ ) ou 2-iP (2  $\text{mg.L}^{-1}$ ) formaram calos com características embriogênicas (Tab. 2). As células destas culturas apresentavam-se redondas, pequenas e agrupadas, com reação positiva ao corante carmim acético (Fig. 1E, F).

#### C. Efeito das diferentes concentrações das auxinas 2,4-D, Picloram e Dicamba.

Para o estilete, a melhor resposta de indução foi obtida 2-iP (0,5  $\mu\text{M}$ ) e Dicamba ou 2,4D (2  $\mu\text{M}$ ) (Tab. 3). Para os filetes, a melhor resposta de indução de calos foi obtida 2-iP (0,5  $\mu\text{M}$ ) e qualquer auxina na concentração de 20  $\mu\text{M}$  (Tab. 3). Assim, como observado para o filete, concentrações elevadas das auxinas inibiram as respostas morfofogenéticas *in vitro*. Para as pétalas, a indução de calos foi obtida em todos os tratamentos. Entretanto, pode-se distinguir a formação de dois tipos de calo: compacto e friável, onde Picloram e Dicamba resultaram na indução de calo friável (Fig. 2).

## Discussão

A indução da embriogênese depende de uma série de fatores, entre os quais estão a fonte de carboidratos, de aminoácidos, de sais e de um balanço hormonal indutivo [5]. Muitos estudos têm revelado um papel fundamental da aplicação de auxinas exógenas, principalmente 2,4-D,

considerado uns dos principais indutores para a embriogênese somática [6].

No presente trabalho, as auxinas Picloram e Dicamba foram consideradas competentes para o estabelecimento de culturas embriogênicas a partir do estilete e filete de *A. sellowiana*. Stefanello *et al.* [7] reportaram que filamentos de estames desta espécie, inoculados em meio de cultura LPM geleificado e suplementado com Picloram (10  $\mu\text{M}$ ) e Kin (1  $\mu\text{M}$ ), ou Picloram (1  $\mu\text{M}$ ) e Kin (0,5  $\mu\text{M}$ ), quando transferidas para meio líquido LPM suplementado com 2,4-D (1  $\mu\text{M}$ ) e 2-iP (1  $\mu\text{M}$ ), apresentaram competência para a indução e estabelecimento de culturas embriogênicas.

Folhas de *Scaevola aemula* induzidas em meio MS suplementado 0,2  $\text{mg.L}^{-1}$  2,4-D e 0,2–0,5  $\text{mg.L}^{-1}$  BAP produziram vários estádios de desenvolvimento de embriões somáticos [8]. Onay *et al.* [9] obtiveram 65% de calo embriogênico a partir de botões florais de *Pistacia vera*, induzidos em meio MS modificado suplementado com 1  $\text{mg.L}^{-1}$  BAP e por o contrário, o uso de TDZ e ANA reduziram a embriogênese nesta espécie.

## Referências

- [1] GUERRA, M.P.; TORRES, A.C. & TEIXEIRA, J.B. 1999. Embriogênese Somática e Sementes Sintéticas. In: TORRES, A.C.; CALDAS L.S.; & BUSO J.A. (Eds.), *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*, v. 2, Brasília, Editora de Embrapa, p. 533-568.
- [2] PARK, Y.S. 2002. Implementation of conifer somatic embryogenesis in clonal forestry: technical requirements and deployment considerations. *Annals of Forest Science*, 59: 651 – 656.
- [3] VON ARNOLD, S. & ERIKSSON, T. 1981. In vitro studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta*. *Canadian Journal of Botany*, 59: 870 – 874.
- [4] MOREL, G.M. & WETMORE, R.H. 1951. Tissue culture of monocotyledons. *American Journal of Botany*, 38: 138 – 140.
- [5] EMONS, A.M.C., 1994. Somatic embryogenesis: cell biological aspects. *Acta Botanica Neerlandica*, 43: 1–14.
- [6] AMMIRATO, P.V. 1983. Embryogenesis. In EVANS D.A.; SHARP W.R.; AMMIRATO P.V. & YAMADA E.Y. (Eds.). *Handbook of Plant Cell Culture*, New York, Macmillan Publisher Co., p. 82 – 123.
- [7] STEFANELLO, S. DAL VESCO L.L.; DUCROQUET J.P.H.J.; NODARI R.O. & GUERRA, M.P. 2005 Somatic embryogenesis from floral tissues of feijoa (*Feijoa sellowiana* Berg) *Scientia Horticulturae* 105: 117 – 126.
- [8] WANG, Y.H. & BHALLA P.L. 2004. Somatic embryogenesis from leaf explants of Australian from flower *Scaevola aemula* R. Br. *Plant Cell Report*, 22: 408-414.
- [9] ONAY, A.; PIRINC, V.; TILKAT, E.; AKTURK, Z.; YILDIRIM, H. 2004. Somatic embryogenesis of pistachio from female flowers. *Journal of horticultural science & biotechnology*, 79: 960-964.

**Tabela 1.** Percentagem de indução de calo a partir do estilete e do filete em resposta a diferentes fitorreguladores (A) e acessos coletados (B) de *A. sellowiana*

Fitorregulador (A)	estilete	filete	Acessos (B)	estilete	filete
2,4-D	25,00a	4,10a	458	35,42a	11,78a
Picloram	16,67ab	1,87b	101x458a	20,83ab	1,03b
Dicamba	18,33ab	5,54a	101b	4,17b	1,12b
TDZ	1,67b	0,72b	101x458b	4,17b	0,00b
média	15,42	3,06	101a	12,50ab	1,35b
			média	15,42	3,06

Médias dentro de cada dado seguido por diferentes letras na vertical são diferentes estatisticamente entre si, segundo o teste SNK (95%), média de quatro repetições.

**Tabela 2.** Percentagem de indução de calo a partir do estilete, filete e pétala do acesso 101x458 de *A. sellowiana* em resposta ao 2,4-D e as citocininas BAP e 2-iP.

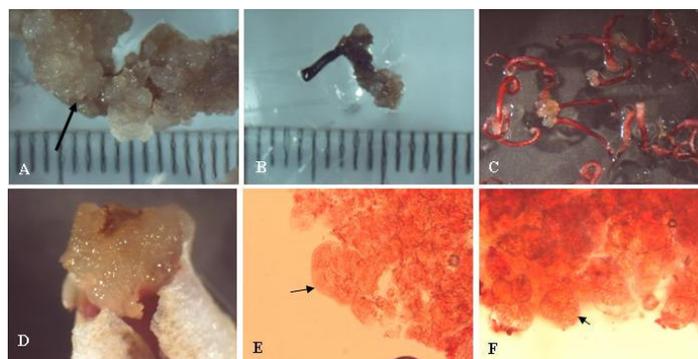
2,4-D	estilete			filete			pétala					
	20 $\mu$ M	40 $\mu$ M	média	20 $\mu$ M	40 $\mu$ M	média	Calo compacto			Calo friável		
							20 $\mu$ M	40 $\mu$ M	média	20 $\mu$ M	40 $\mu$ M	média
BA 1 mg.L <sup>-1</sup>	66,7	100,0	41,7b	100,0	16,7	66,4a	89,3	100,0	97,3a	10,7	0,0	2,7a
P 2 mg.L <sup>-1</sup>	0,0	0,0		100,0	48,9	66,4a	100,0	100,0	97,3a	0,0	0,0	2,7a
2iP 1 mg.L <sup>-1</sup>	100,0	100,0	91,7a	65,0	0,0	32,9b	100,0	100,0	95,8a	0,0	0,0	4,2a
2iP 2 mg.L <sup>-1</sup>	66,7	100,0		66,7	0,0	32,9b	83,3	100,0	95,8a	16,7	0,0	4,2a
<b>média</b>	<b>58,3a</b>	<b>75,0a</b>		<b>82,9a</b>	<b>16,4b</b>		<b>93,2a</b>	<b>100,0a</b>		<b>6,8a</b>	<b>0,0a</b>	

Médias dentro de cada dado seguido por diferentes letras na vertical e horizontal são diferentes estatisticamente entre si, segundo o teste SNK (95%), média de quatro repetições.

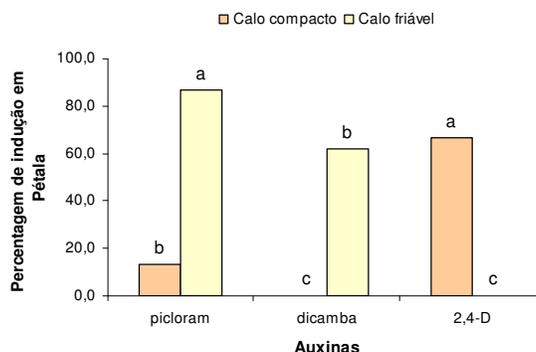
**Tabela 3.** Indução de calo a partir do estilete, e filete do acesso 101x458 de *A. sellowiana* em resposta a diferentes tipos (picloram, dicamba e 2,4-D) e níveis (2, 20 e 200  $\mu$ M) de auxinas.

	estilete				filete			
	2 $\mu$ M	20 $\mu$ M	200 $\mu$ M	média	2 $\mu$ M	20 $\mu$ M	200 $\mu$ M	média
picloram	83,3	83,3	16,7	61,1a	100,0	100,0	33,3	77,8a
dicamba	100,0	50,0	0,0	50,0a	100,0	100,0	0,0	66,7a
2,4-D	100,0	83,3	0,0	61,1a	100,0	100,0	0,0	66,7a
<b>média</b>	<b>94,4a</b>	<b>72,2b</b>	<b>5,6c</b>	<b>57,4</b>	<b>100a</b>	<b>100a</b>	<b>11,11b</b>	<b>70,3</b>

Médias dentro de cada dado seguido por diferentes letras na vertical e horizontal são diferentes estatisticamente entre si, segundo o teste SNK (95%), média de quatro repetições.



**Figura 1.** Indução de culturas embriogênicas e não embriogênicas de *A. sellowiana*. (A) a partir do estilete em meio de cultura com 2,4-D 10  $\mu$ M, (B) com TDZ 40  $\mu$ M aos 90 dias de cultura, (C) a partir de filete do acesso 101x458; (D) a partir de pétala; (E) e (F) Cultura embriogênica do acesso 101x458a obtida no meio de cultura com 2,4-D 20  $\mu$ M e BAP 1 mg.L<sup>-1</sup>. Seta mostrando grupo de células reagindo fortemente ao carmim acético e revelando características embriogênicas.



**Figura 2.** Indução de culturas embriogênicas de *A. sellowiana* a partir de pétala do acesso 101x458a em resposta aos fitorreguladores Picloram, Dicamba e 2,4-D aos 90 dias de cultivo. Letras minúsculas são diferentes estatisticamente entre si, segundo o teste SNK (95%), média de quatro repetições.