

RESPOSTAS *IN VITRO* DE BROTAÇÕES DE PUPUNHEIRA ESTABELECIDAS EM MEIO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BENZILAMINOPURINA

Jonny Everson Scherwinski Pereira; Tissiane M. Silva Maciel²; Maria A. Alves Pereira³

Introdução

Apesar de todo potencial da pupunha e dos esforços da pesquisa no intuito de selecionar materiais com características agronômicas de interesse, a propagação da pupunheira é feita por sementes que, apesar de ser a mais utilizada pela facilidade e economia, apresenta o inconveniente da formação de plantios heterogêneos, segregando para a maioria das características, causando desuniformidade na produção, inclusive no perfilhamento das plantas. De acordo com Bergo (2004) há uma preocupação quanto a multiplicação de progênies selecionadas nos programas de melhoramento da espécie, pois a multiplicação por sementes requer um período de regeneração excessivamente longo (superior a 4 anos) até que entrem em floração para então obter novas sementes. A propagação vegetativa, feita por perfilhos, é problemática e apresenta pouco sucesso, uma vez que as mudas formadas são frágeis, necessitando de um período prolongado de adaptação em viveiros, não sendo um método recomendável de propagação pela baixa eficiência (Bovi et al., 1994; Yokoo, et al., 1992). Portanto, a seleção de plantas que reúnam características agronômicas desejáveis, aliada a um processo mais eficiente de multiplicação é de grande importância para o desenvolvimento da cultura na região Amazônica.

Devido a impraticabilidade de se usar a propagação via sementes e via perfilhos, a micropropagação surge como uma importante opção para a multiplicação clonal da pupunha, pois a multiplicação pela via sexual produz plantas altamente heterozigotas e populações desuniformes, além do ciclo longo para produzir novas sementes (Yokoo et al., 1992). Dessa forma, é de fundamental importância o estabelecimento de protocolos para a propagação clonal *in vitro* desta cultura, seja para a implantação de populações economicamente viáveis ou para acelerar os programas de melhoramento genético da espécie.

Embora a técnica de cultura de tecidos já tenha proporcionado bons resultados para algumas palmáceas, na cultura da pupunha a técnica é ainda pouco explorada com resultados não satisfatórios. De acordo com alguns autores (Arias & Huert, 1983; Almeida & Kerbauy, 1996; Crespo, 1997), de modo geral, as expressões morfogenéticas em pupunha apresentam baixa frequência, com elevado grau de aleatoriedade, o que torna difícil o trabalho desta espécie *in vitro*, especialmente se alguns aspectos básicos do cultivo, como a contaminação e oxidação dos tecidos, não forem controlados de forma eficiente. No entanto, concordam que a cultura de tecidos é uma das alternativas promissoras para a espécie, numa clara evidência que os trabalhos *in vitro* com a pupunha devem ser melhor e mais estudados.

O presente trabalho teve por objetivo avaliar respostas de brotações de pupunheira estabelecidas *in vitro* em meio com diferentes concentrações de benzilaminopurina.

Material e Métodos

Os estudos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Acre, Rio Branco, AC.

Estabelecimento in vitro das brotações de pupunheira

Brotações de 3 a 4 cm de altura, obtidos a partir de sementes germinadas em viveiro, passaram por lavagem em água corrente para retirada do substrato (vermiculita). Em seguida, foram separadas da

semente, passando pelo primeiro processo de desinfestação que consistiu na imersão das brotações em álcool (70%) por 1 minuto e hipoclorito de cálcio (CaOCl_2) (1%) por 15 minutos. Em condições assépticas raízes e folhas basais foram eliminadas passando pela segunda desinfestação, realizada com álcool (70%) por 2 minutos e 15 minutos em hipoclorito de sódio (NaClO) (50% v/v do produto comercial) e tríplice lavagem em água destilada e esterilizada. As brotações tiveram o tamanho reduzido para cerca de 1,5 cm sendo inoculados, individualmente, em tubos de ensaio com 10 ml de meio de cultura de MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com 0,25 mg.L⁻¹ de ácido giberélico, 0,1 mg.L⁻¹ de ácido naftalenoacético e cinco concentrações de Benzilaminopurina (BAP): 0; 2,5; 5; 7,5 e 10 mg.L⁻¹. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da adição de 5 g.L⁻¹ de ágar e esterilização por autoclavagem.

Avaliação de protocolos para a descontaminação das brotações

Visando diminuir os altos índices de contaminação observados no estabelecimento, num segundo ensaio, brotações, após imersão por 1 min em álcool 70%, tiveram as bainhas e os tecidos sub-apicais retirados até atingirem a região de folhas aclorofiladas. Em seguida foram tratadas por cinco protocolos de descontaminação (PD), assim definidos: PD1: 1 min em álcool (70%) e 15 min em CaOCl_2 (1%); PD2: 1 min em álcool (70%) e 15 min em NaClO (1%); PD3: 1 min em álcool (70%) e 15 min em bicloreto de mercúrio (HgCl_2) (0,25%); PD4: 1 min em álcool (70%), 10 min em HgCl_2 (0,25%) e 10 min em CaOCl_2 (1%); PD5: 1 min em álcool (70%), 10 min em HgCl_2 (0,25%) e 10 min em NaClO (1%).

Após os tratamentos, todos os explantes passaram por tríplice lavagem em água destilada e esterilizada, sendo colocados individualmente em tubos de ensaio com 10 ml de meio de cultura de MS, solidificado com 5,0 g.L⁻¹ de ágar.

Para ambos experimentos, o delineamento experimental foi inteiramente casualizados, com quatro repetições, sendo cada parcela formada por quatro tubos de ensaio com uma brotação. Foram coletados dados sobre contaminação geral, contaminação fúngica, contaminação bacteriana, contaminação fúngica e bacteriana e crescimento das brotações por um período de até 35 dias.

O cultivo foi mantido em sala de crescimento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 16 horas de fotoperíodo e irradiação luminosa de $25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes (40w).

Os dados foram submetidos a análise de variância e regressão. As médias foram comparadas pelo teste Duncan em 5% de probabilidade. Dados expressos em percentagem (x) foram transformados segundo arco seno $\sqrt{x/100}$.

Resultados e Discussão

Foi constatada contaminação por fungos e bactérias, sendo que a contaminação fúngica deu-se em proporções superiores àquela causada por bactérias. Aos 35 dias de cultivo 66,7% dos explantes apresentaram algum tipo de contaminação, sendo que, deste total, a contaminação fúngica foi de 87,5% e a contaminação bacteriana de 7,2%. A ocorrência conjunta de fungos e bactérias somou 5,3% (Tabela 1).

Tabela 1. Porcentagem de contaminação de brotações de pupunha estabelecidas *in vitro* em relação aos dias de cultivo. Embrapa Acre, 2004.

	Dias de cultivo					Média
	7	14	21	28	35	
Contaminação Total (%) ¹	44,0	63,3	64,3	65,3	66,7	60,7

Contaminação fúngica (F) (%) ²	90,0	88,7	87,0	87,3	87,5	88,1
Contaminação bacteriana (B) (%) ³	3,3	5,7	7,4	7,3	7,2	6,2
F + B (%) ⁴	6,7	5,6	5,6	5,5	5,3	5,7

¹ contaminação relativa ao total de explantes em cultivo; ² porcentagem de contaminação causada por fungos em relação à contaminação total observada; ³ porcentagem de contaminação causada por bactérias em relação à contaminação total observada; ⁴ porcentagem de contaminação causada por fungos e bactéria em relação à contaminação total observada.

Escurecimento na base de algumas brotações e no meio de cultura destas foi observado após cerca de três semanas de cultivo do material propagativo (Figura 1). Autores descreveram o escurecimento do explante como consequência de oxidações dos compostos fenólicos liberados pelos tecidos injuriados e levando inclusive à morte dos explantes (Reynolds, 1984).

Verificou-se que o BAP exerceu influência significativa sobre a altura das brotações, embora a concentração mais baixa deste regulador já tivesse proporcionado melhoria nas resposta do cultivo (Figura 2). Apesar do baixo coeficiente de determinação observado ($R^2 = 0,60$), os melhores resultados para altura das brotações foram obtidas com a concentração de 10 mg.L^{-1} de BAP. Em média, nesta concentração o ganho de crescimento das brotações atingiu até 70% ao final de 35 dias de cultivo (Figura 2A).

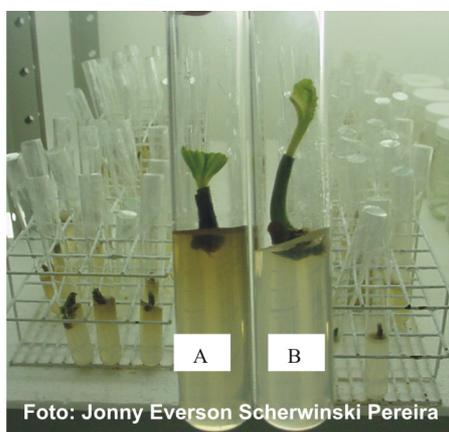


Figura 1. Brotações de pupunheira sob desenvolvimento *in vitro* apresentando aspecto oxidado (A) e não oxidado (B) em meio de cultura. Embrapa Acre, 2004.

A curva de regressão para altura das brotações em relação ao tempo de cultivo mostrou um comportamento linear ascendente, com uma tendência de aumentar as diferenças de ganho em tamanho das brotações com o aumento do tempo de permanência das mesmas no meio de cultura (Figura 2B).

Apesar das elevadas concentrações de BAP no meio de cultura, não foi observada a indução direta de gemas na base das brotações estabelecidas.

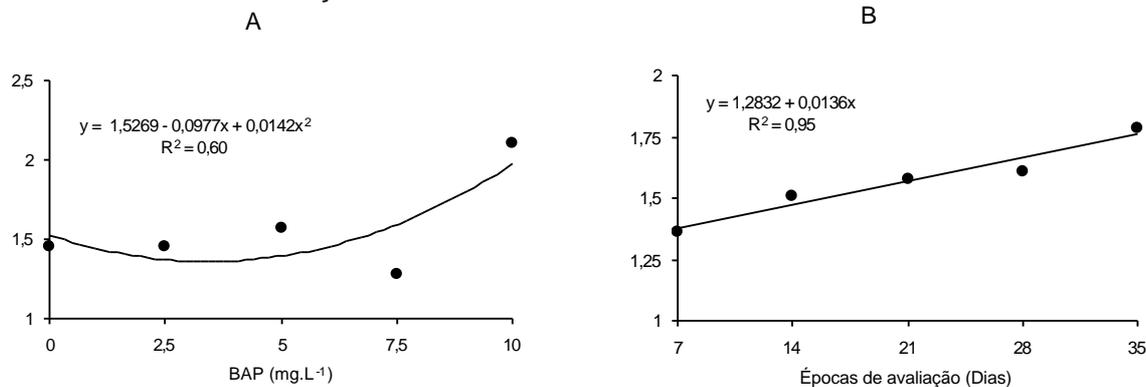


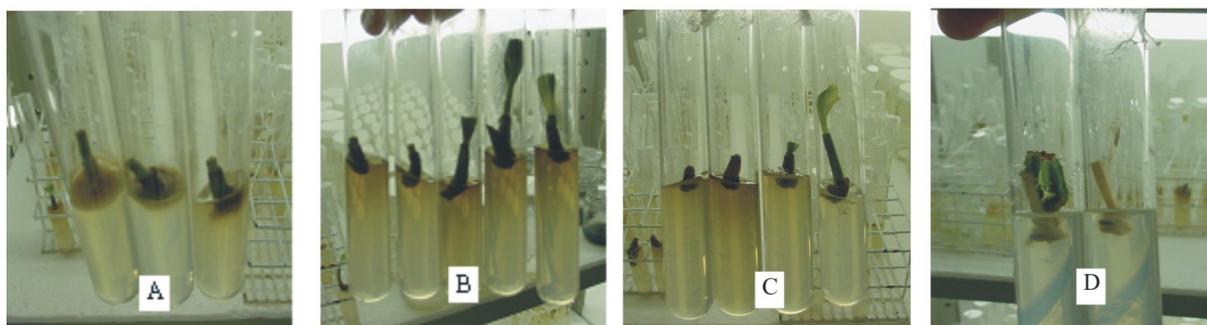
Figura 2. Efeito das concentrações de BAP (A) e das épocas de avaliação (B) no crescimento de brotações apicais de pupunheira estabelecidas *in vitro*. Embrapa Acre, 2004.

No ensaio de descontaminação das brotações, os melhores resultados foram obtidos com os protocolos T3, T4 e T5, com taxas de 12,5%, 5,6% e 0% de contaminação dos explantes. Não houve contaminação por fungos nos tratamentos T4 e T5 e, especialmente no tratamento T4 a contaminação foi causada exclusivamente por bactérias (Tabela 2). O aspecto das brotações de pupunha estabelecidas *in vitro* pode ser observado na Figura 3.

Tabela 2. Avaliação de protocolos de descontaminação (PD) visando o estabelecimento *in vitro* de brotações apicais de pupunha. Embrapa Acre, 2004.

Tratamento	Explantos inoculados	Contaminados (%)	Desenvolvidos (%)	Não desenvolvidos (%)	Mortos (%)	Contaminados por Fungos (F) (%)	Contaminados por bactérias (B) (%)	F+B
T1	17	88,2	11,8	0	0	40	13,3	46,7
T2	16	87,5	6,25	0	6,25	42,9	14,2	42,9
T3	16	12,5	31,25	43,75	12,5	0	50	50
T4	18	5,6	22,2	16,7	55,5	0	100	0
T5	16	0	12,5	31,25	43,75	0	0	0

T1: 1 min em álcool (70%) e 15 min em CaOCl₂ (1%); T2: 1 min em álcool (70%) e 15 min em NaClO (1%); T3: 1 min em álcool (70%) e 15 min em bicloreto de mercúrio (HgCl₂) (0,25%); T4: 1 min em álcool (70%), 10 min em HgCl₂ (0,25%) e 10 min em CaOCl₂ (1%); T5: 1 min em álcool (70%), 10 min em HgCl₂ (0,25%) e 10 min em NaClO (1%). Após os tratamentos, todos os explantes passaram por tríplex lavagem em água destilada e esterilizada.



Fotos: Jonny Everson Scherwinski Pereira

Figura 3. Brotações de pupunha sob desenvolvimento *in vitro*: aspecto das contaminações ocorridas (A); diferentes estádios de desenvolvimento observados (B); aspecto de brotações mais ou menos oxidadas (C) e aspecto de brotações desenvolvidas e não desenvolvidas após a retirada mais intensa das folhas e bainhas externas no momento do estabelecimento (D). Embrapa Acre, 2004.

Conclusões

Algumas dificuldades nos trabalhos *in vitro* ficaram evidentes e sinalizam para que as pesquisas avancem para se obter e adaptar protocolos nas diferentes etapas do processo de clonagem da pupunha. As elevadas taxas de contaminação, principalmente fúngica, evidenciam que medidas preventivas e o teste de novos protocolos e substâncias antimicrobianas sejam estudados. Apesar de não se ter observado a formação de múltiplas gemas, brotações podem ser promissoras materiais propagativos iniciais por fornecerem diferentes tipos de explantes, como por exemplo folhas, de grande interesse para futuros trabalhos de calogênese e organogênese, inclusive embriogênese somática.

Referências bibliográficas

- ALMEIDA, M.; KERBAUY, G.B. Micropropagation of *Bactris gasipaes* (Palmae) through flower bud culture. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.8, n.3, p.215-217, set. 1996.
- ARIAS, M.O.; HUETE, V.F. Propagacion vegetativa in vitro de pejobaye (*Bactris gasipaes* H.B.K.). **Turrialba**, San José, v.33, n.2, p.103-108, 1983.
- BERGO, C.L. Seleção de progênies de meio-irmãos de pupunheira para palmito e estimativas de parâmetros genéticos, no Estado do Acre. **Relatório de Pesquisa**, Embrapa Acre, 8p. (não publicado).
- BOVI, M.L.A. **Palmito pupunha: informações básicas para o cultivo**. Instituto Agrônomo de Campinas: Campinas. 1994. 10p. (Boletim informativo).
- CRESPO, L.E.D. **Técnicas de clonagem in vitro da pupunha (*Bactris gasipaes* H.P.K.)**. 1997. 71f. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Produção Vegetal) - Universidade Estadual Norte Fluminense, Rio de Janeiro, 1997.
- YOKOO, E.Y.; RAMOS, L.C.S.; BOVI, M.L. **Cultura de tecidos de híbridos e espécies de palmito no Instituto Agrônomo**. Campinas, Instituto Agrônomo, 1992. 24p.