

Cultura de embriões zigóticos e indução de embriogênese somática em *Campomanesia guasumifolia* Berg (sete-capotes).

Michel, Adriano¹; Augustin, Lizete²; Calvete, Eunice O.³; Suzin, Marilei⁴

¹Biólogo; MSc. Produção Vegetal, Prof. da Escola Agrotécnica Federal de Sertão (EAFS), Engenheiro Luis Englert, RS 135-Km 25, CEP 99170-000, Sertão - RS. Fone: (54) 3345-1341 E-mail: adriano.michel@bol.com.br

²Eng^a. Agr^a. MSc em Fitotecnia Prof. da FAMV/UPF;

³Eng^a. Agr^a. Dr^a. em Fitotecnia Prof. da FAMV/UPF;

⁴Eng^a Agr^a. MSc em Fitotecnia Prof. da FAMV/UPF.

INTRODUÇÃO

A *C. guasumifolia* Berg., conhecida popularmente por sete-capotes apresenta-se distribuída por quase todos os estados do Brasil, sendo encontrada do Rio de Janeiro ao Rio Grande do Sul. É uma árvore de pequeno a médio porte, de copa irregular, com casca adstringente muito rica em tanino. A madeira é usada para carpintaria, lenha e carvão. Os frutos são do tipo baga subglobosa e muitos saborosos. Apresenta crescimento lento, desuniformidade na germinação das sementes e curta viabilidade das mesmas o que dificulta a obtenção de mudas para a utilização em grandes plantios (Corrêa, 1978; Longhi 1995). Por ser uma espécie nativa merece destaque, sendo considerada uma espécie de elevado potencial para uso em programas de melhoramento genético, como planta ornamental e medicinal.

Há uma grande carência de informações sobre o cultivo *in vitro* de espécies arbóreas, principalmente as nativas. Portanto, o conhecimento gerado através desta pesquisa vem contribuir para o desenvolvimento de trabalhos futuros de micropropagação em espécies nativas semelhantes a *C. guasumifolia* Berg.

O presente trabalho teve por objetivos: (1) verificar o potencial morfogenético de embriões para o cultivo *in vitro*; (2) avaliar a taxa de sobrevivência dos embriões zigóticos durante o cultivo *in vitro*; (4) desenvolver um protocolo de indução de embriogênese somática em *Campomanesia guasumifolia* Berg., utilizando diferentes concentrações de auxina e embriões de diferentes estádios de desenvolvimento visando acelerar a produção de mudas através da micropropagação.

MATERIAL e MÉTODOS

O trabalho constituiu-se de duas etapas: 1) Avaliação do desenvolvimento dos frutos do sete-capotes; 2) Cultura de tecidos. Para a cultura de tecidos utilizou-se embriões de três diferentes genótipos, em três diferentes estádios de desenvolvimento, onde utilizou-se dois procedimentos: Procedimento I: Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos e Procedimento II: Indução de embriogênese somática

* Procedimento I – Cultura de embriões zigóticos imaturos e maduros

Embriões imaturos foram resgatados dos frutos após a assepsia em álcool 70% (10 segundos) e hipoclorito de sódio 1,25% de cloro ativo por 15 minutos. Após os frutos foram lavados em água destilada e esterilizada. Para o resgate dos embriões maduros foram utilizadas sementes submetidas ao mesmo processo de assepsia. Após a assepsia os embriões foram inoculados em placas de Petri contendo meio MS, as quais foram mantidas em câmara de cultivo a uma temperatura de $\pm 25^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas/luz. O desenvolvimento dos embriões foi analisado através da porcentagem de germinação dos embriões em três estádios de desenvolvimento.

* Procedimento II – Indução de embriogênese somática

Os embriões foram inoculados em placas de Petri contendo meio MS suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D (1; 2 e 3 mg.L⁻¹) além de 30 g.L⁻¹ de sacarose e 6g.L⁻¹ de ágar. O pH do meio foi ajustado antes da autoclavagem para 5,8. Em cada placa

de Petri, foram inoculados cinco embriões. O resgate dos embriões foi feito através da retirada do tegumento da semente com o auxílio de bisturi e pinça. Os explantes foram mantidos em câmara de cultura a uma temperatura média de 25°C e um fotoperíodo de 16 horas/luz. O desenvolvimento dos embriões e a produção de embriões somáticos foram avaliados mediante observações periódicas.

RESULTADOS e DISCUSSÃO

Avaliação do desenvolvimento dos frutos de sete-capotes

Observou-se que a espécie *C. guasumifolia* Berg. apresenta suas sementes alojadas dentro de lóculos os quais possuem paredes protegidas por uma camada de glândulas oleaginosas. A fecundação não ocorre no mesmo instante em todos os lóculos, de forma que, em um mesmo fruto pode-se encontrar embriões em diferentes estádios: embriões alongados e com distinta diferenciação entre epicótilo e hipocótilo (medindo cerca de 02 - 03 mm) e embriões apresentando forma globular, medindo menos que 01 mm³. Não verificou-se sincronia na fecundação, ou seja, a fecundação não segue um sentido determinado (horário ou anti-horário) já que embriões mais e/ou menos desenvolvidos se encontravam dispostos de forma intercalada.

Em todos os frutos foi constatada a ocorrência de aborto de embriões. Cerca de 10% do total de óvulos de cada fruto foi abortado durante o seu desenvolvimento. Isso pode estar relacionado a abscisão precoce dos frutos antes de completar o seu desenvolvimento. Porém, se houver ao menos um embrião viável no seu interior, o fruto permanece aderido à planta. Provavelmente, o controle da abscisão é feito por algum tipo de fitorregulador produzido pelo lóculo ou pelo próprio embrião, durante o desenvolvimento. Essas informações concordam com as descrições feitas por Landrum (1982), o qual afirma que o aborto de todos os óvulos, exceto um em cada lóculo, bem como a transformação da parede interna do lóculo em um tecido glandular protetor e, o aumento no número de lóculos por ovários, são características únicas do gênero *Campomanesia*. Assim, o aborto dos óvulos deve iniciar pela "ordem" da planta mãe em direcionar seus recursos para determinados lóculos. (Figura 1).

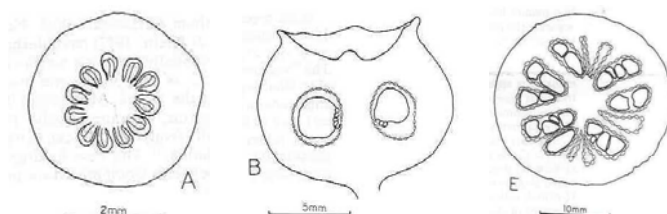


Figura 1. Esquema da disposição dos lóculos dentro do fruto e os lóculos onde foram abortados os embriões, adaptado de Landrum (1982).

Procedimento I: Cultura de embriões zigóticos

Não se observou influência do genótipo sobre a formação de plântulas, havendo diferenças somente com relação à época de florescimento, formação de sementes e maturação dos embriões.

Tabela 1: Porcentagem de plântulas obtidas a partir de embriões zigóticos em diferentes estádios de desenvolvimento.

Estádio	N.º de Embriões inoculados	Plântulas obtidas (%)
T ₁	05	0%
T ₂	05	80%
T ₃	05	95%

T₁- Embriões de frutos medindo 14-15 mm de diâmetro; T₂ Embriões de Frutos medindo 20-25 mm de diâmetro; T₃ Embriões maduros.

Os embriões zigóticos, mostraram-se responsivos a cultura *in vitro*, especialmente os que se encontravam nos estádios mais avançados de desenvolvimento.

Os embriões no estágio T_1 de desenvolvimento não apresentaram modificações morfológicas em nenhum dos meios utilizados. Quinze dias após a inoculação, 20% do total de embriões imaturos apresentaram desidratação. Essa pode ser atribuída à composição do meio de cultura e a carência de uma cutícula bem formada na superfície dos embriões em virtude de seu rudimentar estágio de desenvolvimento, deixando-os suscetíveis em uma alta concentração osmótica. Já os embriões do estágio T_2 , sofreram um acentuado aumento de volume, alongação em toda a sua extensão e, 60 dias após a inoculação, a maior parte deles encontravam-se totalmente modificados quanto ao seu padrão fenológico. Não foi observado nenhum sinal de desidratação, o que reforça a hipótese de que, conforme o estágio de desenvolvimento do embrião há maior desenvolvimento da cutícula.

No estágio T_3 , duas semanas após a inoculação, os embriões já se encontravam esverdeados, principalmente na região do epicótilo e, nitidamente mais alongados. A partir deste ponto os embriões se desenvolveram rapidamente, aumentando seu comprimento e diâmetro, sendo que 80 dias após a inoculação observou-se o desenvolvimento de plântulas com aproximadamente cinco centímetros (Figura 2). Contudo, o tempo de vida das plântulas parece não exceder os 100 dias, período esse em que começam a apresentar sinais de necrose nas folhas, necrosando totalmente dentro de uma ou duas semanas.

A morte das plântulas deve estar associada a carência nutricional, uma vez que as plântulas cultivadas *in vitro* apresentam baixa taxa fotossintética, ocasionando o consumo total das reservas embrionárias. Aliado a isso, por se tratar de uma espécie lenhosa, durante esta fase tem início o processo de lignificação dos tecidos, prejudicando a absorção dos nutrientes, uma vez que não há a formação de um sistema radicular eficaz. Porém, em alguns casos, ocorre a formação de uma única raiz que rapidamente se alonga, onde até podem ser visualizados segmentos epicotiledonares. Contudo, não foi possível observar diferenças significativas na sobrevivência das plântulas enraizadas espontaneamente.

Procedimento II: Indução de Embriogênese Somática

Todos os embriões do estágio T_1 não apresentaram modificações morfológicas, sendo que pôde-se constatar a necrose de alguns explantes devido a desidratação.

Os embriões T_2 apresentaram modificações morfológicas, aumentaram de volume e emitiram várias estruturas semelhantes a raízes, todas ricamente recobertas por tricomas. Estas modificações foram observadas somente no hipocótilo do embrião. As estruturas semelhantes a raízes não ultrapassaram 0,5 cm de comprimento e não se mostraram funcionais. O índice de embriões formados foi praticamente nulo, sendo que apenas os explantes de um dos genótipos apresentaram resposta favorável ao processo, quando cultivados no meio contendo 1 mg.L^{-1} de 2,4-D.

Embriões T_3 sofreram aumento de volume seguido de alongação e intenso processo de rizogênese em todos os meios utilizados. Todas as concentrações de 2,4-D se mostraram eficazes no processo de indução de embriogênese somática. As estruturas embriogênicas formaram-se próximo a região de inserção do pecíolo e ao longo da nervura central das folhas cotiledonares (Figura 2).

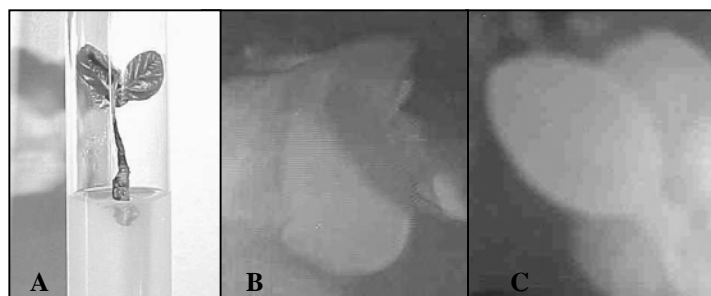


Figura 2. A) Embrião de sete-capotes germinado em meio MS. B) Embrião somático formado a partir de células da nervura central de folhas de embriões zigóticos; C) Embriões somáticos formando um aglomerado sobre a região cotiledonar de embriões zigóticos.

O estágio de desenvolvimento do embrião influencia de maneira significativa na taxa de embriões somáticos formados. A alta intensidade de formação de raízes adventícias, que ocorre a partir do estágio T₂, deve ser influenciada presença de 2,4-D, uma vez que este é considerado uma auxina forte. O fato das raízes surgirem ao longo de todo o explante parece indicar que os embriões submetidos à cultura perdem o padrão básico de desenvolvimento, de forma que o crescimento celular deixa de seguir uma simetria definida para dar origem a um aglomerado de células totipotentes de crescimento independente – os pró-embriões. A Tabela 2 mostra a porcentagem de estruturas embriogênicas formadas.

Tabela 2: Porcentagem estruturas embriogênicas obtidas de embriões de diferentes estádios de desenvolvimento.

Estádio	N.º de embriões inoculados	Taxa de estruturas embriogênicas
T ₁	15	0%
T ₂	15	60%
T ₃	15	95%

* T₁- Embriões de frutos medindo 14-15 mm de diâmetro; T₂ Embriões de Frutos medindo 20-25 mm de diâmetro; T₃ Embriões maduros.

* Não levou-se em conta a concentração de 2,4-D no meio de cultura.

CONCLUSÕES

Embriões zigóticos maduros germinaram facilmente quando cultivados no meio MS, comprovando o potencial morfogênético destes explantes;

A embriogênese somática pode ser obtida através do cultivo *in vitro* de embriões zigóticos em meio MS suplementado com o ácido 2,4-D, desde que estes já se encontrem próximo ao estágio de maturação;

Torna-se necessária a realização de mais pesquisas para o desenvolvimento de um protocolo eficaz para a multiplicação *in vitro* de *C. guasumifolia* Berg.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CORRÊA, M. Pio; **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil**, v. VI (S-Z), p.112-115; 1978.
- LANDRUM, L. R.; **The development of the fruits and seed of *Campomanesia* (Myrtaceae)**. New York Botanical Garden, 1982.
- LONGHI, R. A.; **Árvores e Arvoretas do Sul**, Editora L & PM Editores S/A. Porto Alegre, 1995.