

INDUÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS E ANÁLISE ANATÔMICA EM HÍBRIDOS DE *E. urophylla* X *E. grandis*

EVÂNIA GALVÃO MENDONÇA¹, TÂNIA REGINA BATISTA², VANESSA CRISTINA STEIN³,
LUCIANO VILELA PAIVA⁴, MARLÚCIA SOUZA PÁDUA⁵, HORLLYS GOMES BARRETO⁶

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar o efeito da auxina dicamba na embriogênese somática de calos de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*. Para indução de calos embriogênicos, meristemas foram excisados de plantas matrizes cultivadas *ex vitro* e inoculados em meio de cultura contendo doses crescentes de dicamba (0,25; 1,00; 2,00 mg L⁻¹). A avaliação foi realizada aos 90 dias de cultivo, sendo observado o número de embriões e estágio de desenvolvimento dos mesmos. Para análise anatômica dos embriões, secções transversais dos calos foram corados com Azul de Astra e Safranina para a montagem de lâminas semi-permanentes, que foram analisados em microscópio óptico acoplado a câmera digital. Foram observados embriões somáticos nas fases globular, torpedo e cotiledonar, sendo que na concentração de 0,25 mg.L⁻¹ observou-se o maior número de embriões na fase torpedo. Na análise anatômica foi possível observar a formação de embriões em estágio de desenvolvimento globular e torpedo.

Palavras-chaves: Anatomia Vegetal, Micropropagação, Embriogênese Somática, Eucalyptus

INTRODUÇÃO

Devido à grande demanda por produtos florestais, o cultivo *in vitro* apresenta-se como um método viável para propagação clonal em larga escala de diversas espécies florestais. A otimização do processo de micropropagação leva ao incremento acelerado do número de plantas derivadas de determinado genótipo, o que ocasiona uma redução do tempo de multiplicação, possibilitando clonar grande quantidade de plantas em uma área reduzida e com maior controle sobre a sanidade do material que se propaga (MROGINSKI & ROCA, 1996).

A micropropagação de espécies lenhosas vem sendo estudada há várias décadas e tem como objetivo básico o estabelecimento de uma metodologia de multiplicação clonal de indivíduos superiores ou conservação genética por meio de criação de bancos de germoplasmas, a qual tem sido realizada, principalmente, por cultivo de gemas pré-existentes ou cultura de calos derivados de diferentes tecidos (NASCIMENTO, 2006).

Dentro desta técnica de cultivo, a micropropagação via embriogênese somática envolve o desenvolvimento de embriões a partir de células somáticas embriologicamente competentes *in vitro* (AHUJA, 2002). A embriogênese somática pode ser descrita como o processo pelo qual células somáticas desenvolvem estruturas semelhantes a embriões zigóticos, por meio de uma seqüência ordenada de estádios embriogênicos característicos, sem ocorrência de fusão dos gametas (GUERRA et al., 1999; JIMENEZ, 2001).

Fomento: FAPEMIG, CAPES, CNPq

¹ Doutoranda em Fisiologia Vegetal, DBI/ UFLA, evaniafloresta@hotmail.com

² Mestranda em Fisiologia Vegetal, DBI/ UFLA taniareginabatista@hotmail.com

³ Pós-doutoranda em Biotecnologia Vegetal, LCBM/UFLA, vanessa.stein@hotmail.com

⁴ Professor Adjunto, DQI/UFLA, luciano@ufla.br

⁵ Mestranda em Biotecnologia Vegetal, LCBM/UFLA marlucia.sp@hotmail.com

⁶ Mestrando em Biotecnologia Vegetal, LCBM/UFLA horllys@hotmail.com

Durante o seu desenvolvimento, embriões somáticos passam por estádios similares àqueles observados na embriogênese zigótica, caracterizados como estrutura bipolar sem nenhuma conexão vascular com o tecido materno (DURZAN, 1988; VICIENT e MARTINEZ, 1998).

Dentre as principais aplicações na área florestal, está o uso de embriões somáticos na propagação em massa de *Eucalyptus*, especialmente para aquelas espécies ou clones de difícil enraizamento, proporcionando uma alternativa ao enraizamento de estacas e de brotações micropropagadas (BAJAJ, 1995). Embora o *Eucalyptus* apresente altas taxas de multiplicação por gemas axilares, estudos realizados com outras espécies florestais indicam o potencial de obtenção de taxas muito maiores com a embriogênese somática, além da possibilidade de encapsulamento e armazenamento de embriões como sementes sintéticas (BAJAJ, 1995). Além disso, a embriogênese somática constitui-se numa técnica básica para outras aplicações biotecnológicas, incluindo transformação genética, hibridação somática e preservação de germoplasma (VICIENT & MARTINEZ, 1998).

Esforços para induzir embriogênese somática têm sido descritos para muitas espécies de interesse econômico, em que as metodologias utilizadas envolvem mudanças no meio de cultura, estabelecimento de diferentes tipos e concentrações de reguladores de crescimento e outras condições de cultura, como a densidade de células, nutrientes e iluminação.

Em relação ao fator regulador de crescimento, a auxina dicamba (ácido 3,6-dicloroanísico), como indutora de embriogênese somática, tem sido investigada com frequência em espécies agrônomicas. Dicamba promoveu a formação de embriões somáticos em trigo (GEORGE, 1993), *Musa* (LEE et al., 1997) e *Arachis hypogaea* (LITTLE et al., 2000), sendo que investigações sobre o efeito de dicamba na embriogênese somática se restringe a trabalhos com *E. globulus* (NUGENT et al., 2001) e *E. urophylla* (ARRUDA et al., 2000).

Apesar das vantagens deste tipo de cultivo em relação à organogênese, a conversão de embriões somáticos em plantas ainda é uma etapa que pode apresentar dificuldades e, desta forma, estudos anatômicos tornam-se importantes para elucidar as possíveis causas relacionadas a este do processo.

Neste contexto, objetivou-se avaliar o efeito da auxina dicamba, sobre o desenvolvimento de embriões somáticos originados de calos de híbridos de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Local do experimento

O experimento foi conduzido nos Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras.

Material Vegetal

Com a finalidade de avaliar o efeito da auxina dicamba na embriogênese somática, meristemas apicais excisados de plantas matrizes de híbridos de *E. urophylla* x *E. grandis* cultivados *ex vitro* foram inoculados em meio de cultivo MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) suplementado com 0,25; 1,00 e 2,00 mg L⁻¹ de dicamba e mantidos em sala de crescimento a temperatura de 25 ± 2 °C, na ausência de luz por 90 dias.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com 5 repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por 7 explantes.

Análise anatômica

Os calos foram fixados em FAA (solução de formaldeído, ácido acético glacial e álcool etílico, 50%) por 72 horas, após a fixação foram conservados em álcool 70% até o momento da desidratação. A desidratação foi realizada em série etílica crescente (70%, 80%, 90% e 100%), permanecendo por 1 hora em cada concentração. Após a desidratação, o material foi deixado “over night” em historesina e álcool 100% (1:1). A infiltração do material foi feita em historesina, onde os calos permaneceram por 24 h. Posteriormente os calos foram emblocados em historesina Leica de acordo com o protocolo do fabricante. Foram feitos cortes com espessura de 5 µm em micrótomo de rotação. Os cortes foram corados com azul de toluidina na concentração de 0,1% e visualizados em

microscópio óptico Leica.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o software Sisvar (FERREIRA, 1999), sendo realizada análise de variância e o teste de Tukey a 5% para o estudo das médias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados referentes ao efeito da auxina dicamba na indução de embriões somáticos está representado na Figura 1.

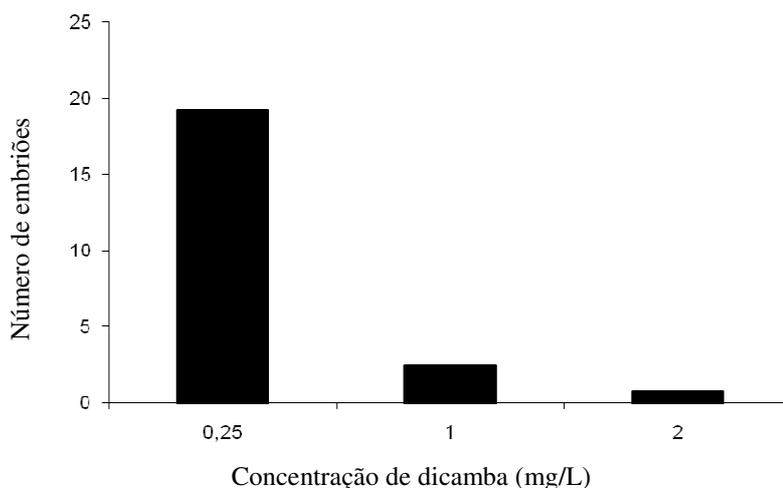


Figura 1 – Número de embriões observados em calos embriogênicos de híbrido de *E. urophylla* x *E. grandis*, cultivado nas concentrações de 0,25; 1,00 e 2,00 mg.L⁻¹ de dicamba.

As concentrações de dicamba diferiram estatisticamente entre si na indução e desenvolvimento dos embriões somáticos. A concentração de 0,25mg.L⁻¹ foi a mais eficiente para a formação de embriões, onde foi observada a média de 19 embriões por explante, diferindo das concentrações de 1 mg.L⁻¹ e 2 mg.L⁻¹ onde foram observadas médias de 2,48 e 0,77 respectivamente. Indicando que altas concentrações de auxina no meio de cultura inibem o desenvolvimento de embriões de eucalipto. Foram observados embriões somáticos nas fases globular, torpedo e cotiledonar, sendo que na concentração de 0,25 mg.L⁻¹ observou-se o maior número de embriões na fase torpedo.

Na análise anatômica foi possível observar que calos do híbrido *E. urophylla* x *E. grandis* cultivado em meio de cultivo suplementado com 0,25 mg.L⁻¹ de dicamba, apresentaram embriões em estágios de desenvolvimento globular e torpedo (Figura 2 A) e quando os calos foram cultivados em meio contendo 1,0 mg.L⁻¹ de dicamba, os embriões apresentavam-se em estágio cotiledonar (Figura 2 B). Os cortes anatômicos dos calos cultivados na concentração de 2,0 mg.L⁻¹ de dicamba, demonstram que as células não se encontram organizadas como nas demais concentrações e os embriões não se encontram em um estágio de desenvolvimento bem definido (Figura 2 C).

Os resultados indicam que para o híbrido *E. urophylla* x *E. grandis* o meio de cultivo contendo menores concentrações de dicamba, proporcionam a produção de um maior número de embriões somáticos, que se encontram em estágios de desenvolvimento diferentes (Figuras 1 e 2).

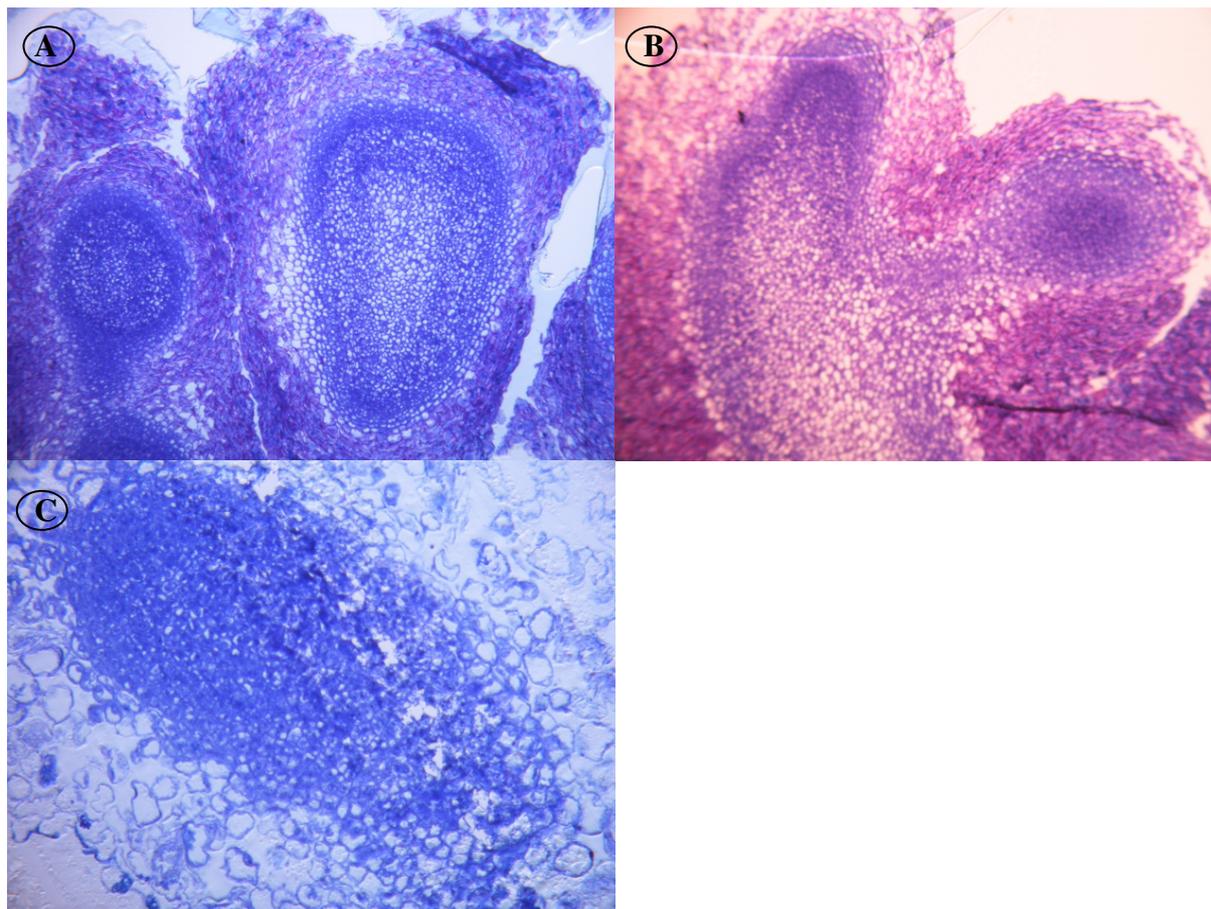


Figura 2 – Embriões de híbridos de *E. urophylla* X *E. grandis* nos estágios globular e torpedo cultivados em meio de cultivo contendo $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ de dicamba (A). Embrião em estágio cotiledonar cultivado em meio de cultivo contendo $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de dicamba (B). Embrião cultivado em meio de cultivo contendo $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de dicamba (C).

CONCLUSÃO

Foram observados embriões somáticos nas fases globular, torpedo e cotiledonar, sendo que na concentração de $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ observou-se o maior número de embriões na fase torpedo.

Na análise anatômica foi possível observar a formação de embriões somáticos em estágio de desenvolvimento globular, torpedo e cotiledonar.

REFERÊNCIAL BIBLIOGRÁFICO

AHUJA, M. R. **Micropropagation of woody plants**. London: Kluwer Academic Publishers, 1992. v. 41, 507 p.

ARRUDA, S. C. C. et al. Anatomical and biochemical characterization of the calcium effect on *Eucalyptus urophylla* callus morphogenesis *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.63, p.143-154, 2000.

BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Somatic embryogenesis and synthetic seed I**. Biotechnology in agriculture and forestry. New York: Springer-Verlag, v.30. 472p, 1995.

XIX CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA
27 de setembro a 01 de outubro de 2010

DURZAN, D. J. Somatic polyembryogenesis for the multiplication of tree crops. **Biotechnology Genetics Engineering Review**, v.6, p.339-376, 1988.

FERREIRA, D. F. **SISVAR 4.3**: Sistema de análises estatísticas, Lavras: UFLA, 1999.

GEORGE, E. F. Plant propagation by tissue culture. **The technology**. 6 ed. England: Exegetics, 1993. v.1. 575p.

GUERRA, P.G.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, I.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. EMBRAPA: Brasília, 1999. v. 2, p. 533-568.

JIMENEZ, V. L. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n.2, p.196-223, 2001.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**, 2. ed. New York: Mc-Graw-Hill, 1940, 523p.

LITTLE, E. L.; MAGBANUA, Z. V.; PARROTT, W. A. A protocol for repetitive somatic embryogenesis from mature peanut epicotyls. **Plant Cell Reports**, v.19, p.351-357, 2000.

LEE, K. S. et al. Histology of somatic embryo initiation and organogenesis from rhizome explants of *Musa* spp. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.51, p.1-8, 1997.

MROGINSKI, L.A.; ROCA, W.M. Micropropagación de la yerba mate (*Ilex paraguariensis* St.Hil): efecto del origen del explante en el establecimiento *in vitro* de los cultivos. **Phyton**, Buenos Aires, v. 59, n. 1/2, p. 161-170, 1996.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

NASCIMENTO, A.C. **Micropropagação de uvaieira**. 2006. 110 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

NUGENT, G. et al. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus globulus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.67, p.85-88, 2001.

VICIENT, C. M.; MARTINEZ, F. X. The potential uses of somatic embryogenesis in agroforestry are not limited to synthetic seed technology. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, n.10, v.1, p.1-12, 1998.