

Indução de embriões somáticos a partir de embriões zigóticos de *Heliconia bihai* (L.) L. cv. Lobster Claw Two¹

Cláudia Ulisses², Cynthia Cavalcanti de Albuquerque³, Lilia Willadino², Terezinha Rangel Camara⁴

RESUMO

As flores tropicais têm contribuído para o aumento do mercado florístico no Brasil; dentre elas destacam-se as do gênero *Heliconia*. A propagação de helicônias que atinge maior número de mudas ocorre por via vegetativa, por meio da divisão de rizomas, aumentando a probabilidade de disseminação de doenças, podendo, num futuro próximo, comprometer a produção de flores. O cultivo *in vitro* surge como importante alternativa para proporcionar a produção de mudas de helicônia com elevado padrão de qualidade. Entretanto, a micropropagação de helicônias via ápices caulinares depara-se com problemas de contaminação endofítica, dificultando a multiplicação do explante. Diante disso, fez-se necessário avaliar alternativas que promovam a produção de mudas *in vitro*, por meio da utilização de outros explantes. Para tanto, realizou-se um experimento, utilizando embriões zigóticos, provenientes de frutos imaturos e maduros de *H. bihai* (L.) L. cv. Lobster Claw Two, em combinações de AIA (0; 5,70 e 11,41 $\mu\text{m L}^{-1}$) e 2,4-D (0; 22,62; 45,24; 67,86 e 90,48 $\mu\text{m L}^{-1}$), para induzir a formação de embriões somáticos durante 90 dias. Por meio de análise histológica, observou-se a formação de embriões somáticos apenas nos embriões zigóticos, provenientes de frutos maduros, cultivados na ausência de reguladores de crescimento.

Palavras-chave: cultivo *in vitro*, calogênese, regulador de crescimento, histologia.

ABSTRACT

Somatic embryogenesis from zygotic embryos of *Heliconia bihai* (L.) L. cv. Lobster Claw Two

Tropical flowers have contributed to the growth of the cut flower market in Brazil, especially plants of the genus *Heliconia*. Heliconias are usually propagated vegetatively, although this method can spread diseases and in the near future may severely comprise commercial flower production. *In vitro* cultivation represents an important potential alternative for guaranteeing the production of high-quality heliconia planting stocks. However, the micropropagation of these plants using stalk apices faces severe problems of endophytic contamination, making it difficult the supply of enough explants. Therefore, alternative techniques for the *in vitro* production of planting stock were investigated using other explant tissues to induce somatic embryogenesis. Zygotic embryos from immature and mature fruits of *H. bihai* (L.) L. cv. Lobster Claw Two were cultured in combinations of IAA (0; 5.70, e 11.41 $\mu\text{m L}^{-1}$) and 2,4-D (0; 22.62; 45.24; 67.86 e 90.48 $\mu\text{m L}^{-1}$) to induce somatic embryos during 90 days of culture. Histological analyses showed that somatic embryos were formed only with zygotic embryos derived from mature fruits cultivated in the absence of growth regulators.

Key words: *In vitro* culture, callogenesis, growth regulator, histological.

Recebido para publicação em 28/10/2010 e aprovado em 16/09 2011

¹ Parte da tese de doutorado da primeira autora apresentada ao Programa de Pós-graduação em Botânica, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) para obtenção do título de doutor

² Biólogas, Doutoradas. Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil. claudia@db.ufrpe.br (autora para correspondência), lilia@pq.cnpq.br

³ Bióloga, Doutora. Departamento de Biologia, Universidade Estadual do Rio Grande do Norte, Mossoró, C. P. 70, 59.610-090, Rio Grande do Norte, Brasil. cyncavalcanti@gmail.com

⁴ Engenheira-Agrônoma, Doutora. Departamento de Química, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil. teca.camara@gmail.com

INTRODUÇÃO

As espécies de plantas ornamentais tropicais têm atraído o mercado de flores, por sua beleza, exotismo e durabilidade pós-colheita das inflorescências. O Brasil possui grande contingente de espécies nativas ou introduzidas, que se enquadram nesses padrões de referência; dentre elas destacam-se as helicônias (Abalo, 1999).

As helicônias possuem um rizoma subterrâneo, comumente usado para propagação, a partir do qual se desenvolvem os novos perfilhos e as gemas florais (Castro, 1995). Esse sistema de propagação vegetativa apresenta sérios riscos de disseminação de pragas e doenças. Assim, o cultivo *in vitro* surge como importante alternativa para proporcionar a produção, em larga escala, de mudas de helicônia com elevado padrão de qualidade. Entretanto, a micropropagação de helicônias via ápices caulinares depara-se com problemas de contaminação endofítica bacteriana, dificultando a multiplicação do explante, conforme registrado por diversos autores (Nathan *et al.*, 1992; Atehortua *et al.*, 1999; Dias & Rodrigues, 2001). Diante desse problema, faz-se necessária a utilização de outros tipos de explantes, associados a diferentes técnicas de micropropagação. Existem hipóteses, relatadas por vários autores, de que, em explantes jovens, os vasos condutores não conseguem atingir tecidos indiferenciados e em constante multiplicação, dificultando, dessa forma, o contato de micro-organismos com esses tecidos (Pasqual *et al.*, 2010).

A embriogênese somática é uma das técnicas de micropropagação que se destaca por apresentar vantagens que aumentam suas perspectivas, no âmbito da biotecnologia vegetal, como, por exemplo, a possibilidade de obtenção de inúmeros propágulos a partir de um reduzido número de explantes (Vasil & Vasil, 1986; Vasil, 1988; Jiménez, 2001; Maciel *et al.*, 2003).

A adequação de um protocolo para micropropagação, a partir da embriogênese somática, envolve a definição de doses e combinações de reguladores de crescimento, além do tipo de explante (Guerra *et al.*, 1999). O sucesso da produção *in vitro* depende do ajuste de um protocolo adequado para cada espécie ou variedade a ser micropropagada.

O presente trabalho objetivou estabelecer protocolos para a obtenção de embriões somáticos, a partir de embriões zigóticos provenientes de frutos imaturos e maduros de *H. bihai* (L.) L. cv. Lobster Claw Two.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se, como explante, embriões zigóticos provenientes de frutos extraídos de plantas de *H. bihai* cv. Lobster Claw Two, procedentes de uma área de produção, localizada no município de Paulista, no Estado de

Pernambuco (07°56'27"S, 34°52'23"O e 13 m de altitude). Os embriões foram extraídos de frutos classificados por grau de maturação: imaturo (branco) e maduro (azul escuro) (Figura 1A), sendo retirados das brácteas das inflorescências e submetidos a uma lavagem com detergente comercial e enxágue em água corrente.

Em câmara de fluxo laminar, os embriões foram imersos em álcool 70%, por um minuto, seguindo de duas imersões em solução de hipoclorito de cálcio, a primeira a 3%, contendo três gotas de tween 20, durante 20 minutos, e, a segunda, a 1,5%, contendo, também, três gotas de tween 20, por 15 minutos. Finalmente, foram feitas três lavagens com água destilada estéril. Logo após a desinfestação dos frutos, retirou-se seu pericarpo com auxílio de pinça e bisturi, e, em seguida, pressionando-se a semente na região da radícula, com um alicate, o embrião foi extraído e inoculado em tubo de ensaio (2,5 x 15 cm), contendo 10 mL de meio nutritivo MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose e 2 g L⁻¹ de phytigel. O pH do meio nutritivo foi ajustado para 5,8, antes de se esterilizar em autoclave, a 121 °C, durante 20 minutos. Os embriões foram mantidos em temperatura de 25 ± 2 °C, durante 90 dias e na ausência de luminosidade, para evitar a oxidação e induzir a formação de embriões somáticos.

Os tratamentos foram estabelecidos conforme o estádio de maturação dos frutos (imaturos e maduros). Frutos imaturos e maduros foram cultivados em meio nutritivos, com combinações de três níveis de AIA (0; 5,70 e 11,41 µm L⁻¹) e cinco níveis de 2,4-D (0; 22,62; 45,24; 67,86 e 90,48 µm L⁻¹), perfazendo um esquema fatorial 3 x 5, inteiramente casualizado, com 10 repetições por tratamento. As avaliações foram realizadas aos 30, 60 e 90 dias após a inoculação, com base em observações visuais com o auxílio de estereomicroscópio.

Aos 90 dias em meio de indução, foram selecionados os calos que apresentaram superfície nodular; uma parte desses calos foi preparada para análise histológica e a outra parte foi transferida para meio de expressão, para conversão dos embriões somáticos em plântulas. O meio de expressão foi o MS acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, 2 g L⁻¹ de phytigel e 4,44 µm L⁻¹ de BAP. Os calos foram mantidos à temperatura de 25 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 horas e luminosidade de 50 µmols m².s⁻¹, durante 60 dias.

Na análise histológica, foram avaliados os tecidos constituintes do embrião zigótico (maduro e imaturo) e os calos que apresentaram estruturas nodulares na superfície. Essas amostras (embriões e calos) foram fixadas em FAA 50, desidratadas progressivamente pelas misturas de etanol-butanol e incluídas em parafina a 58 °C (Kraus & Arduin, 1997), no processador automático Tissue-Tec. Posteriormente, os cortes obtidos em micrótomo automático rotativo, com espessura variando de 4 µm a 6 µm,

foram desparafinizados e corados com hematoxilina e eosina (Johansen, 1940) e, finalmente, montados em bálsamo do Canadá, conforme técnicas usuais. As lâminas foram analisadas e fotografadas em microscópio óptico (Carl Zeiss).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise da estrutura interna dos embriões zigóticos provenientes de frutos imaturos revelaram a presença de opérculos, apresentando coloração amarela, endosperma e ápices caulinares em estágio de desenvolvimento inicial (Figura 1B). Nos embriões provenientes de frutos maduros, não foi observada a presença de opérculos, os ápices caulinares apresentavam-se em estágio de desenvolvimento mais avançado, quando comparados com o dos embriões provenientes dos frutos imaturos, fato este que pode ser constatado pela presença do procâmbio (tecido meristemático das células do sistema vascular), da protoderme e do meristema fundamental, que se diferenciarão em epiderme e parênquima cortical, respectivamente (Figura 1C).

Os embriões zigóticos provenientes de frutos imaturos apresentaram-se mais intumescidos, ao final de 90 dias de cultivo (Figura 1D), do que os embriões provindos de frutos maduros (Figura 1E). Entretanto, só foram visualizados nódulos com características embriogênicas em calos provenientes de embriões zigóticos extraídos de frutos maduros (Figura 1F), cultivados no tratamento sem auxinas (Controle).

Nos nódulos provenientes de embriões zigóticos de frutos maduros, foram observados embriões somáticos em corte histológico, mostrando uma estrutura cilíndrica no ápice (coleóptilo), localizada na superfície do tecido de característica globular e o meristema apical caulinar posicionado lateralmente (Figura 1G). Segundo Beltrati (1994), o desenvolvimento embrionário em monocotiledôneas e dicotiledôneas é similar até o estágio globular e, posteriormente, nas monocotiledôneas, o cotilédone (coleóptilo) inicia-se cilíndrico, já que é uma característica desse grupo apresentar apenas um cotilédone e o meristema apical caulinar é lateral, em relação ao coleóptilo.

Por causa do maior intumescimento dos embriões zigóticos provenientes de frutos imaturos, alguns autores (Vasil *et al.*, 1983; Kamo *et al.*, 1985; Cruz *et al.*, 1990; Guerra & Handro, 1988; Vikrant & Rashid, 2002) admitiram que a utilização de tecidos indiferenciados é um fator essencial para a obtenção de resultados satisfatórios, na indução de embriogênese somática. Entretanto, a conversão dos calos em embriões somáticos pode ser induzida *in vitro*, a partir de tecidos considerados maduros, como embriões zigóticos provenientes de frutos maduros, como foi observado no presente trabalho e, também, em *Lonicera japonica* Thunb. (Kim *et al.*, 2003). Resultados

similares também foram alcançados por Zale *et al.* (2004), os quais observaram que os embriões zigóticos maduros de cultivares de *Triticum monococcum* L. e *T. tauschii* (Coss.) Schmalh. foram eficientes na indução de embriões somáticos e na conversão desses em plantas.

A existência de níveis endógenos de auxinas ou de substâncias receptoras de origem proteica no explante pode desencadear uma resposta da célula, quando associada às substâncias do meio nutritivo, induzindo a formação de calos (Kerbauy, 1999). Em *Citrus paradisi* Macfad., foi detectada a presença de maiores concentrações de uma proteína específica nos tecidos maduros (proteína de maturação), quando comparadas com as ocorridas em tecidos similares de plantas juvenis, sugerindo que a presença de determinadas proteínas, em alguns tecidos maduros, torna-os mais responsivos ao cultivo *in vitro* (Snowball *et al.*, 1991). Vikrant & Rashid (2002) observaram um aumento na frequência de embriões somáticos provenientes de embrião zigótico maduro de *Paspalum scrobiculatum* L.

Nos tratamentos com combinações de AIA e 2,4-D, apesar do intumescimento do explante inoculado, não houve formação de calos durante os 90 dias de cultivo. Observou-se, além do tratamento controle, maior intensidade de intumescimento nos embriões zigóticos, cultivados nos meios nutritivos contendo apenas 5,70 e 11,41 $\mu\text{m L}^{-1}$ de AIA, para embrião imaturo e maduro, respectivamente, ou seja, em meio nutritivo desprovido de 2,4-D, demonstrando a ausência de tendência combinatória entre o explante e as concentrações de 2,4-D utilizadas.

De maneira geral, a embriogênese somática é induzida por auxinas fortes, mas, neste trabalho, as auxinas não influenciaram diretamente nas respostas do explante por meio de mudanças na sua concentração. O fato que poderá ter influenciado na formação de embriões somáticos são as alterações na sensibilidade das células responsivas do próprio explante. Dessa maneira, a resposta a um determinado hormônio pode ser alterada por algumas mudanças, tais como: o número e afinidade de receptores e o nível de substâncias endógenas (hormônios, proteínas, etc.) no explante. Esses aspectos, analisados em conjunto, explicam porque determinados explantes são competentes para a embriogênese somática e outros não.

Os embriões somáticos que foram transferidos para o meio de expressão MS acrescido de 4,44 $\mu\text{m L}^{-1}$ de BAP não se converteram em plantas. Alguns fatores podem interferir no processo de conversão do embrião somático em planta, tais como: o tipo e a concentração exógena do fitorregulador; do nível endógeno de fitorreguladores no explante, da capacidade do tecido em sintetizar os fitorreguladores. Além desses fatores, a reativação do meristema apical do embrião somático, para que ocorra o desenvolvimento em planta, é um processo complexo,

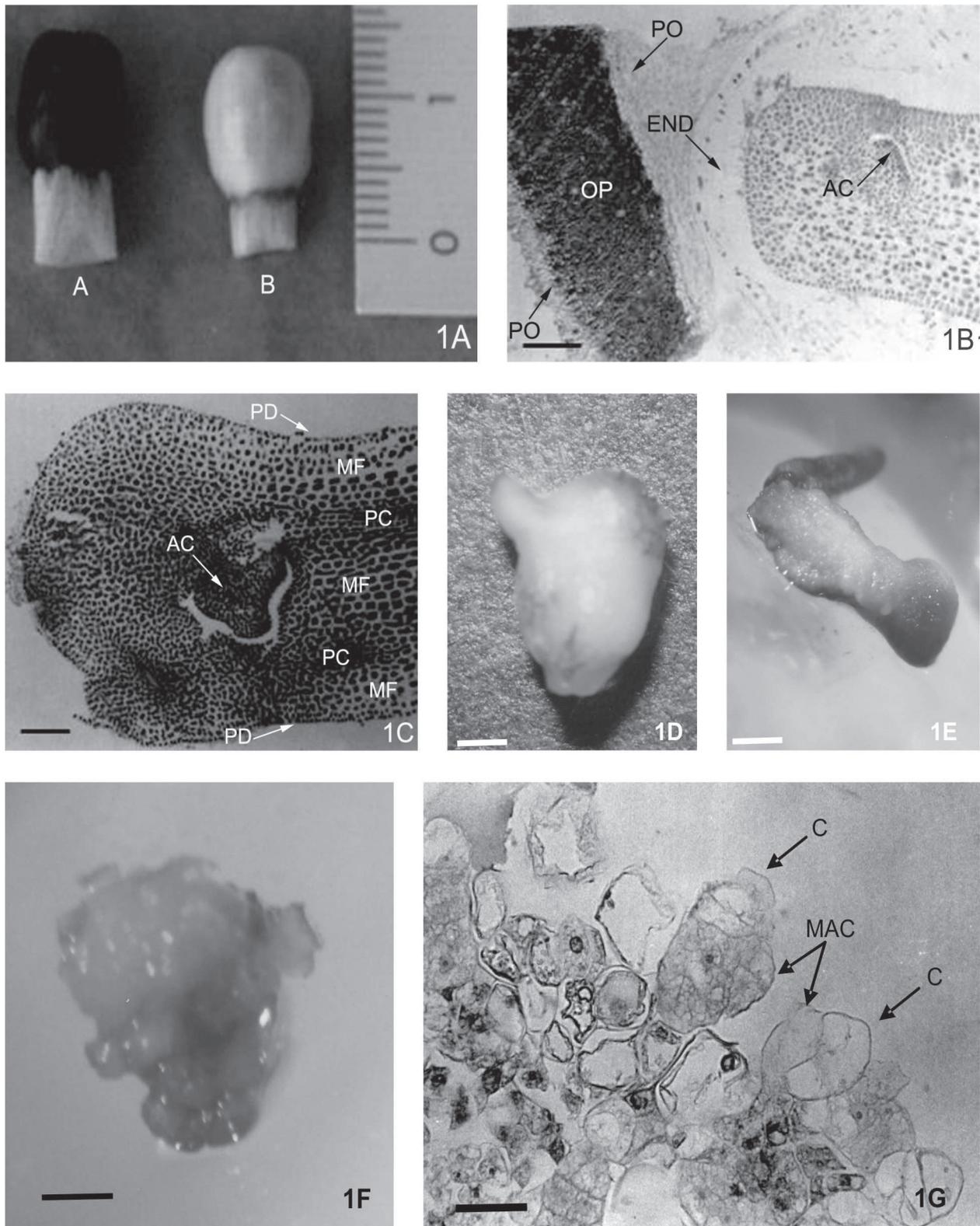


Figura 1. *Heliconia bihai* cv. Lobster Claw Two: **1A** - Frutos maduro (**A**) e fruto imaturo (**B**); **1B** - Secção histológica longitudinal de embrião zigótico imaturo, indicando o opérculo (OP), parede do opérculo (PO), endosperma (END) e o início da diferenciação do ápice caulinar (AC) (Bar = 1 mm); **1C** - Secção histológica longitudinal de embrião zigótico maduro, indicando ápice caulinar desenvolvido (AC), protoderme (PD), meristema fundamental (MF) e procâmbio (PC) (Bar = 1 mm); **1D** - Embrião imaturo intumescido aos 90 dias de cultivo (Bar = 1 mm); **1E** - Embrião maduro aos 90 dias de cultivo (Bar = 1 mm); **1F** - Calos nodulares, provenientes de embrião maduro aos 90 dias de cultivo (Bar = 1 mm); **1G** - Secção longitudinal de embriões somáticos (setas) a partir de embrião zigótico de fruto maduro aos 90 dias de cultivo em meio MS sem regulador de crescimento (C = coleóptilo; MAC = meristema apical caulinar) (Barra = 0,25 mm).

pois requer um balanço entre a proliferação e diferenciação das células. Kong & Yeung (1992) observaram falhas na atividade mitótica nos pólos apicais de embriões incapazes de se converterem em plantas. Stasolla & Yeung (2007) observaram que se faz necessária uma série de divisões coordenadas das células dos meristemas apicais da raiz e do caule, para promover o desenvolvimento do embrião.

CONCLUSÕES

Os embriões zigóticos provenientes de frutos maduros de *Heliconia bihai* cv. Lobster Claw Two promoveram a formação de embriões somáticos em meio MS sem regulador de crescimento, mas não apresentaram capacidade de conversão em plantas quando cultivados em meio MS acrescido de 4,44 µm L⁻¹ de BAP.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Azami (LIKA), pelas análises histológicas realizadas; ao Banco do Nordeste do Brasil (BNB) e à CAPES, pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- Abalo JE (1999) Heliconias for the ornamental industry. *Acta Horticulturae*, 486:313-315.
- Atehortua L, Urrea AL, Gil U, Mora B, Valencia C, Corrales M, Carmona A & Vallejo A (1999) Heliconia tissue culture. *Bulletin of Heliconia Society International*, 9:16-17.
- Beltrati CM (1994) Morfologia e anatomia de sementes. Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Área de Biologia Vegetal. Depto. de Botânica. UNESP. 108p.
- Castro CEF de (1995) Helicônia para exportação: Aspectos técnicos da produção. Brasília, Editora FRUPEX. 44p. (Publicações Técnicas, 16)
- Cruz GS, Canhoto JM & Abreu MAV (1990) Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryos of *Feijoa sellowiana* Berg. *Plant Science*, 66:263-270.
- Dias MA & Rodrigues PHV (2001) Fontes de explantes e contaminantes isolados em cultivo *in vitro* de helicônia. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*, 7:165-168.
- Guerra MP & Handro W (1988) Somatic embryogenesis and plant regeneration in embryo culture of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae). *Plant Cell Reports*, 7:505-552.
- Guerra MP, Torres AC & Teixeira JB (1999) Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: Torres AC, Caldas LS & Buso JA (Eds.) *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília, EMBRAPA. p.533-568.
- Jiménez VM (2001) Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 13:196-223.
- Johansen DA (1940) *Plant microtechnique*. New York, McGraw-Hill. 523p.
- Kamo KK, Becwar MR & Hodges TK (1985) Regeneration of *Zea mays* L. from embryogenic callus. *Botanical Gazette*, 146:327-334.
- Kerbaui GB (1999) Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: Torres AC, Caldas LS & Buso JA (Eds.) *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília, EMBRAPA. p.519-531.
- Kim SW, Oh SC, In DS & Liu JR (2003) High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration in zygotic embryo cultures of Japanese honeysuckle. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 72:277-280.
- Kraus JE & Arduin M (1997) *Manual básico de métodos em morfologia vegetal*. Rio de Janeiro, EDUR. 198p.
- Kong L & Yeung EC (1992) Development of white spruce somatic embryos: II. Continual shoot meristem development during germination. *In vitro Cellular Development Biology Plant*, 28:125-131.
- Maciel ALR, Pasqual M, Pereira AR, Rezende JC, Silva AB & Dutra LF (2003) Embriogênese somática indireta em explantes foliares de *Coffea arabica* L. cv. Oboatã. *Revista Ciência e Agrotecnologia*, 27:107-116.
- Murashige T & Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15:473-497.
- Nathan MS, Goh CJ & Kumar PP (1992) *In vitro* propagation of *Heliconia psittacorum* by bud culture. *Hortscience*, 27:450-452.
- Pasqual M, Dutra LF, Araújo AG de & Pereira AR (2010) Prevenção de contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas. In: Scherwinski-Pereira JE (Ed.) *Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas*. Brasília, EMBRAPA. p.61-161.
- Snowball AM, Zeman AM, Tchan YT, Mullins MG & Goodwin PB (1991) Phase change in *Citrus*. Immunologically detectable differences between juvenile and mature plants. *Australian Journal of Plant Physiology*, 18:385-396.
- Stasolla C & Yeung E. (2007) Cellular ascorbic acid regulates the activity of major peroxidases in the apical poles of germinating white spruce (*Picea glabra*) somatic embryos. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45:188-198.
- Vasil V, Lu CY & Vasil IK (1983) Proliferation and plant regeneration from the nodal region of *Zea mays* L. (maize, Gramineae) embryos. *American Journal of Botany*, 70: 951-954.
- Vasil IK (1988) Progress in the regeneration and genetic manipulation of cereal crops. *Nature Biotechnology*, 6:397-402.
- Vasil IK & Vasil V (1986) Regeneration in cereal and other grass species. In: Vasil IK (Ed.) *In cell culture and somatic cell genetics of plants*. Vol. 3. *Plant regeneration and genetic variability*. Academic Press, New York. p.121-150.
- Vikrant & Rashid A (2002) Somatic embryogenesis from immature and mature embryos of a minor millet *Paspalum scrobiculatum* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69:71-77.
- Zale JM, Borchardt-Wier H, Kidwell KK & Steber CM (2004) Callus induction and plant regeneration from mature embryos of a diverse set of wheat genotypes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 76:277-281.