



**Cultura de embriões zigóticos
de açaizeiro (*Euterpe oleracea*)**

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL

Presidente

Fernando Henrique Cardoso

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO

Ministro

Marcus Vinícius Pratini de Moraes

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA

Presidente

Alberto Duque Portugal

Diretores

Dante Daniel Giacomelli Scolari
Elza Ângela Battaglia Brito da Cunha
José Roberto Rodrigues Peres

Chefia da Embrapa Amazônia Oriental

Emanuel Adilson Souza Serrão – Chefe Geral
Jorge Alberto Gazel Yared – Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento
Antonio Carlos Paula Neves da Rocha – Chefe Adjunto de Comunicação, Negócios e Apoio
Antonio Ronaldo Teixeira Jatene – Chefe Adjunto de Administração

ISSN 1517-2228

Boletim de Pesquisa Nº 23

Dezembro, 1999

***CULTURA DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE
AÇAIZEIRO (Euterpe oleracea Mart.)***

Oriel Filgueira de Lemos
Francisca Valéria N. da Rocha
Osmar Alves Lameira
Ilmarina Campos de Menezes

Embrapa

ISSN 1517-2228

Boletim de Pesquisa Nº 23

Dezembro, 1999

***CULTURA DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE
AÇAIZEIRO (Euterpe oleracea Mart.)***

Oriel Filgueira de Lemos
Francisca Valéria N. da Rocha
Osmar Alves Lameira
Ilmarina Campos de Menezes

Embrapa

Exemplares desta publicação podem ser solicitados à:

Embrapa Amazônia Oriental

Trav. Dr. Enéas Pinheiro, s/n

Telefones: (91) 276-6653, 276-6333

Fax: (91) 276-9845

e-mail: cpatu@cpatu.embrapa.br

Caixa Postal, 48

66095-100 – Belém, PA

Tiragem: 200 exemplares

Comitê de Publicações

Leopoldo Brito Teixeira – Presidente

Antonio de Brito Silva

Antonio Pedro da S. Souza Filho

Expedito Ubirajara Peixoto Galvão

Joaquim Ivanir Gomes

Maria do Socorro Padilha de Oliveira

Maria de N. M. dos Santos – Secretária Executiva

Revisores Técnicos

Carlos da Silva Martins – Embrapa Amazônia Oriental

Cláudio José Reis de Carvalho – Embrapa Amazônia Oriental

José Edmar Urano de Carvalho – Embrapa Amazônia Oriental

Maria de Lourdes Reis Duarte – Embrapa Amazônia Oriental

Expediente

Coordenação Editorial: Leopoldo Brito Teixeira

Normalização: Célia Maria Lopes Pereira

Revisão Gramatical: Maria de Nazaré Magalhães dos Santos

Maria de Lourdes Reis Duarte (texto em Inglês)

Composição: Euclides Pereira dos Santos Filho

LEMOS, O.F. de; ROCHA, F.V.N. da; LAMEIRA, O.A.; MENEZES, I.C. de.

Cultura de embriões zigóticos de açaizeiro (*Euterpe Oleracea* Mart.).

Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 1999. 15p. (Embrapa Amazônia Oriental. Boletim de Pesquisa, 23).

ISSN 1517-2228

Açaí – Cultura de embrião. 2. Açaí – Cultura *in vitro*. I. Rocha, F.V.N. da, colab. II. Lameira, O.A., colab. III. Menezes, I.C. de, colab. IV. Embrapa. Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental (Belém, PA). V. Título. VI. Série.

CDD: 575.49

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	6
MATERIAL E MÉTODOS.....	8
RESULTADOS E DISCUSSÃO	10
CONCLUSÕES	14
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14

CULTURA DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE AÇAIZEIRO (*Euterpe oleracea* Mart.)

Oriel Filgueira de Lemos¹
Francisca Valéria N. da Rocha²
Osmar Alves Lameira³
Ilmarina Campos de Menezes⁴

RESUMO: Este trabalho teve como objetivo estabelecer protocolo para a produção de plântulas a partir da germinação *in vitro* de embriões zigóticos de açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.). Os frutos foram despolidos, as sementes desinfestadas, os embriões excisados sob condições assépticas e cultivados em meio de cultura MS, modificados pela adição de $0,17 \text{ g.L}^{-1} \text{ NaH}_2\text{PO}_4$, carvão ativado 0,2% e diferentes combinações de ácido α -naftalenoacético (ANA) 0,1; 0,5 e $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ com 6-benzilaminopurina (BAP) 0,1; 0,5 e $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ e um tratamento sem regulador de crescimento. Os embriões germinaram e, aos 30 dias, desenvolveram plântulas. A percentagem de conversão de embriões zigóticos em plântulas entre tratamentos variou entre 10% e 70%. A menor percentagem foi obtida no tratamento com BAP ($0,1 \text{ mg.L}^{-1}$) mais ANA ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$) e a maior percentagem no tratamento com BAP ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$) mais ANA ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$). Por outro lado, quando os embriões foram cultivados em meio de cultura sem regulador de crescimento, somente 12,5% desenvolveram plântulas.

Termos para indexação: cultura de embrião, *Euterpe oleracea* Mart., açaizeiro, germinação *in vitro*.

¹Eng.-Agr., M.Sc., Pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental, Caixa Postal 48, CEP 66017-970, Belém, PA.

²Bióloga, Caixa Postal 085, CEP 68 371-150, Altamira, PA.

³Eng.-Agr., Doutor, Pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental.

⁴Eng.-Agr., M.Sc., Técnico de Nível Superior da Embrapa Amazônia Oriental.

CULTURE OF AÇAÍ PALM ZYGOTIC EMBRYOS (*Euterpe oleracea* Mart.)

ABSTRACT: This work had as objective to determinate a protocol for production of seedlings from *in vitro* germination of açai palm zygotic embryo (*Euterpe oleracea* Mart.). Flesh of fruits were take out, the seeds were sterilized, the embryos excised under aseptic conditions and cultivated on medium MS modified with addition NaH_2PO_4 (0,17 mg.L^{-1}), actived charcoal 0,2% and α -naftalenoacetic acid (NAA) 0,1; 0,5; and 1,0 mg.L^{-1} with 6-benzylaminepurine (BAP) 0,1; 0,5; and 1,0 mg.L^{-1} at different combinations and a treatment without growth regulator. The embryos germinated and at 30 days developed seedlings. The percentage of conversion zygotic embryo into seedling between treatments was 10 to 70%. Least percentage was obtained on treatment with BAP (0,1 mg.L^{-1}) plus NAA (0,5 mg.L^{-1}) and the greatest percentage on treatment with BAP (0,5 mg.L^{-1}) plus NAA (0,5 mg.L^{-1}). Otherwise, when the embryos were cultivated on culture medium without growth regulator only 12,5% developed seedlings.

Index terms: embryo culture, *Euterpe oleracea* Mart., açai palm, *in vitro* germination

INTRODUÇÃO

O açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) é uma palmeira típica do trópico úmido brasileiro e, a maior reserva natural, encontra-se no Estado do Pará. É uma planta que atinge até 30 m de altura, cujo manejo adequado nas áreas de ocorrência permite um maior retorno econômico através da produção de frutos e da exploração do palmito (Calzavara, 1972; Costa et al. 1973 e 1974 e Jardim et al. 1995).

As técnicas de cultura de tecidos têm permitido a conservação de germoplasma, recuperação de plantas livres de vírus, micropropagação, e auxiliado no melhoramento genético de plantas (Torres & Caldas, 1990; Betti, 1991; Guerra & Handro, 1991). Dentre essas técnicas, a cultura de embrião é usada para recuperar híbridos raros; testar viabilidade de

sementes; e como fonte de explantes, com tecido de elevada totipotência; e obter uma variedade que possa ser explorada a curto prazo (Giacometti, 1990; Villalobos & Thorpe, 1991; Hu & Ferreira, 1999).

O ponto marcante da cultura de embrião foi a descoberta de que o mesmo poderia ser separado do tecido maternal e de reserva, e ser cultivado em meio de cultura artificial. Embriões relativamente maduros de *Raphanus sativus*, *R. landra*, *R. caudatus* e *Cochlearia danica* foram cultivados pela primeira vez em meios salinos suplementados com açúcar (Mantell & Matthews, 1994). Llano-Agudelo & Gonzalez-Rosas (1994) obtiveram plântulas a partir de embriões isolados de sementes de abacate em meio de cultura MS contendo ácido indolbutírico e Cinetina, enquanto Pence (1991) criopreservou embriões imaturos de cacau (*Theobroma cacao*) e resgatou em meio de cultura contendo ácido α -naftalenoacético.

As sementes do açaizeiro são recalcitrantes, cuja viabilidade é perdida com a redução da umidade, sendo de difícil conservação a longo prazo. A germinação *in vitro* de embriões zigóticos abre a possibilidade de criopreservação de embriões zigóticos e posterior resgate como uma alternativa a manter a ampla variabilidade genética apresentada pela espécie na região amazônica. O presente trabalho descreve uma metodologia para a produção de plântulas *in vitro* a partir da cultura de embriões zigóticos isolados de sementes de frutos maduros de açaizeiro sob a ação de diferentes combinações de auxina (ácido α -naftalenoacético) e citocinina (6-benzilaminopurina).

MATERIAL E MÉTODOS

As atividades foram realizadas no Laboratório de Recursos Genéticos e Biotecnologia da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, Pará, conforme mostrado na Fig. 1.

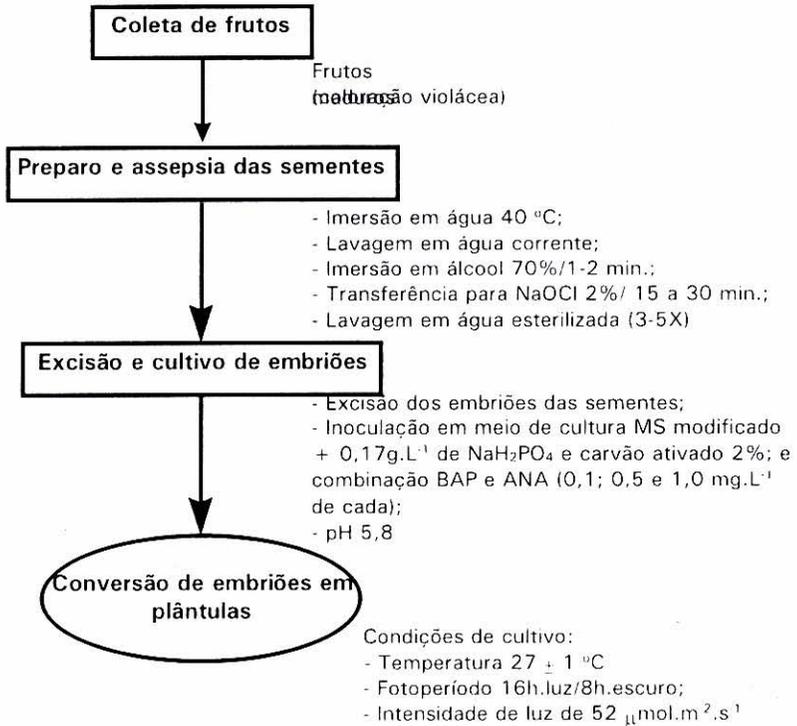


FIG. 1. Fluxograma da metodologia adotada para conversão *in vitro* de embriões zigóticos em plântulas de açaizeiro.

Frutos maduros de açazeiro foram colhidos de plantas do Banco de Germoplasma de Palmáceas da Embrapa Amazônia Oriental, lavados em água corrente e, em seguida, imersos em água à temperatura de 40°C durante 15 a 30 minutos, para facilitar a remoção da polpa. A água utilizada para imersão dos frutos foi previamente destilada e autoclavada. Após o despulpamento, as sementes, em câmara de fluxo laminar asséptica, foram desinfestadas através da imersão por 1 a 2 minutos em álcool etílico 70% (v/v), em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) 2% com tween 20 (0,01%) por 15 a 30 minutos e, em seguida, lavadas com água esterilizada por três a cinco vezes. Os embriões foram excisados das sementes assépticas com auxílio de pinças, bisturis, canivetes e transferidos para placas de Petri contendo solução de ácido cítrico (150 a 250 mg.L⁻¹), os quais permaneceram por cinco minutos. Então, cada embrião foi transferido para tubo de ensaio contendo 15 ml de meio de cultura.

O meio básico de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) foi usado, modificado pela adição de 0,17 g.L⁻¹ de NaH₂PO₄ e carvão ativado 0,2%, sacarose 3% e ágar 0,7%, suplementado com ácido α -naftalenoacético (ANA) e 6-benzilaminopurina (BAP) combinados nas concentrações de 0,1; 0,5 e 1,0 mg.L⁻¹ de cada regulador de crescimento. O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem por 15 minutos, à temperatura de 121°C. Os embriões em cultura foram transferidos para sala de crescimento e mantidos durante todo o período de cultivo à temperatura de 27±1°C, fotoperíodo de 16h.luz/8h.escuro e intensidade de luz de 52 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

O experimento foi constituído de dez tratamentos, incluindo uma testemunha sem regulador de crescimento. Cada tratamento constou de dez repetições, sendo cada parcela representada por um tubo de ensaio com um embrião zigótico. Os embriões foram excisados sem danificá-los e estabeleceram-se com sucesso em cultura. As observações foram realizadas aos 30 dias de cultivo quanto à ação dos tratamentos para desenvolvimento de plântula normal; anormal; e embrião sem desenvolvimento (sem resposta), e foram tomados dados de comprimento de raízes e parte aérea.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os frutos maduros foram facilmente despulpados após a imersão em água morna (40°C) e o processo de desinfestação das sementes com solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2% alcançou uma eficiência de 91% (somente nove embriões contaminaram dos cem cultivados). A morfogênese ocorrida durante a conversão normal dos embriões zigóticos em plântula é apresentada na Fig. 2. Houve comportamento diferenciado quanto ao desenvolvimento do embrião em meio de cultura, em função dos tratamentos aos quais foram submetidos (diferentes concentrações de ANAxBAP). Resultados semelhantes foram observados por Pence (1991), com embriões de *Theobroma cacao* em meio de cultura contendo diferentes concentrações de ácido α -naftalenoacético (ANA).

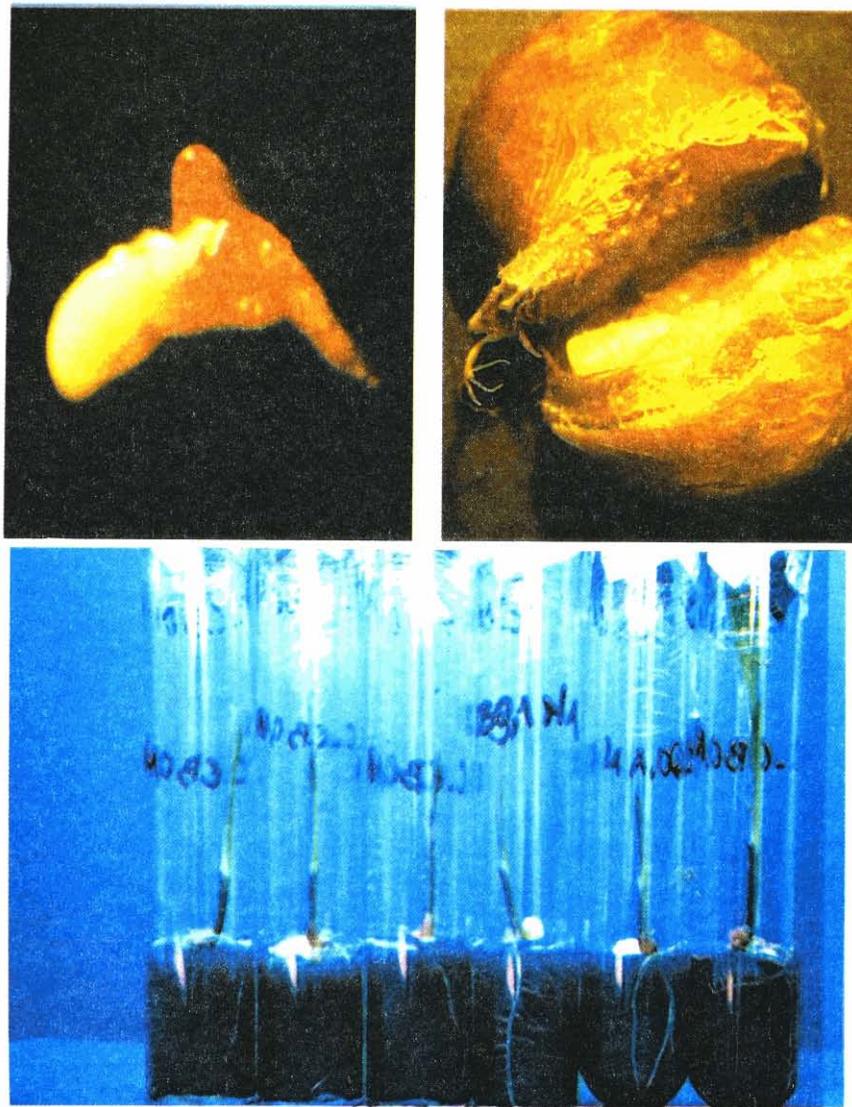


FIG. 2. Conversão de embrião zigótico em plântula: **A**-embrião aderido à semente; **B**-embrião em cultura diferenciando radícula e caulículo; e **C**-conversão em plântula aos 30 dias de cultivo em meio MS modificado, suplementado com ANA e BAP.

As maiores percentagens de plântulas normais foram obtidas nos tratamentos contendo ANA mais BAP a 0,5 mg.L⁻¹ de cada e ANA 1,0 mg.L⁻¹ mais BAP 0,1 mg.L⁻¹, respectivamente, 70,0% e 66,7%. As menores percentagens (10,0% e 12,5%) foram obtidas nos tratamentos com ANA 0,5 mg.L⁻¹ mais BAP 0,1 mg.L⁻¹ e sem regulador de crescimento, respectivamente. Os tratamentos de maior conversão de embriões zigóticos em plântula apresentaram maior comprimento médio das raízes (36,5 e 43,9 mm), o que evidencia o principal papel da auxina (ANA 0,5 e 1,0 mg.L⁻¹, respectivamente) na formação de raízes (Tabela 1).

TABELA 1. Respostas de embriões zigóticos de açaizeiro em meio de cultura MS modificado, suplementado com diferentes combinações de ANA e BAP após 30 dias de cultivo¹.

ANA (mg.L ⁻¹)	BAP (mg.L ⁻¹)	Plântula ²		Embrião ² s/ resposta	Média crescimento (mm)	
		Normal	Anormal		Raiz	P. aérea
1,0	1,0	55,6 a	00,0 b	44,4 abc	29,9	11,8
1,0	0,5	44,5 ab	33,3 ab	22,2 bcd	24,7	10,9
1,0	0,1	66,7 a	22,2 ab	11,1 bcd	43,9	10,4
0,5	1,0	50,0 ab	40,0 ab	10,0 cd	34,6	13,0
0,5	0,5	70,0 a	30,0 ab	00,0 d	36,5	13,8
0,5	0,1	10,0 b	40,0 ab	50,0 abc	22,9	6,2
0,1	1,0	25,0 ab	62,5 a	12,5 bcd	26,5	9,7
0,1	0,5	44,5 ab	11,1 b	44,4 abc	28,2	14,8
0,1	0,1	33,3 ab	11,1 b	55,6 ab	35,0	10,6
0,0	0,0	12,5 b	12,5 b	75,0 a	33,4	12,2

¹Sais básicos e vitaminas de MS; 0,17g.L⁻¹ NaH₂PO₄, carvão ativado 0,2%, pH5,8;

²Comparação de média através do programa Estat: médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan, em nível de 5% de significância.

Em meio de cultura sem regulador de crescimento, 75% dos embriões não desenvolveram e quando à concentração de BAP $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ mais ANA $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ 62,5% dos embriões formaram plântulas anormais (atrofiadas). Esses resultados demonstraram que em concentração elevada da citocinina (BAP $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$) em relação à auxina (ANA $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$) há formação anormal de plântulas e que, na ausência de regulador de crescimento, os embriões de açaizeiro não diferenciam. Na maior concentração da auxina (ANA $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$), em relação a menor da citocinina (BAP $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$), as raízes induzidas apresentaram maior crescimento, enquanto maior crescimento da parte aérea foi observada em BAP ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$) e ANA ($0,1 \text{ mg.L}^{-1}$) evidenciando que balanço de regulador de crescimento voltado para auxina favorece a formação de raízes e para citocinina favorece a formação de parte aérea, desde que o suprimento exógeno seja superior a $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ e relação citocinina/auxina igual a 1,0 ou inferior a 5,0 mg.L^{-1} . Também foi observado que tanto raízes quanto parte aérea cresceram menos em meio de cultura contendo BAP ($0,1 \text{ mg.L}^{-1}$) e ANA ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$), 6,2 e 22,9 mm, respectivamente.

Esses resultados corroboram aqueles obtidos por Llano-Agudelo & Gonzalez-Rosas (1994), que produziram plântulas *in vitro* de abacate (*Persea americana*) a partir de embriões zigóticos, isolados de sementes maduras, em meio de cultura contendo a auxina (AIB $0,3 \text{ mg.L}^{-1}$) mais a citocinina (cinetina $0,1$ a $0,3 \text{ mg.L}^{-1}$). Entretanto, Matews & Rao (1984) produziram plântulas de pimenta-do-reino a partir da germinação de sementes maduras em meio básico de White sem regulador de crescimento, mas quando utilizaram sementes verdes (imaturas) não obtiveram plântulas, todavia essas sementes induziram calos na periferia em meio básico MS com diferentes concentrações das auxinas (2,4-D; NOA; e outras) e citocininas (BAP, cinetina e 2ip). Tais resultados demonstraram que, dependendo da espécie, é necessário um suprimento exógeno de regulador de crescimento e num balanço adequado (auxina x citocinina) para formação de plântula, sendo este aspecto demonstrado neste trabalho.

CONCLUSÕES

Este trabalho permite as seguintes conclusões:

- é possível a conversão *in vitro* de embriões zigóticos isolados de sementes maduras de açaizeiro em plântulas;

- é necessário o uso de reguladores de crescimento (auxina e citocinina) em meio de cultura MS modificado para a conversão dos embriões em plântulas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BETTI, J.A. Obtenção de material propagativo vegetal testado livre de vírus. In: CROCOMO, O.J.; SHARP, W.R.; MELO, M., Ed. **Biotecnologia para produção vegetal** Piracicaba: CEBTEC/FEALQ, 1991. p.145-170.
- CALZAVARA, B.B.G. **As possibilidades do açaizeiro no estuário amazônico**. Belém: FCAP, 1972. 103p. (FCAP. Boletim, 5).
- COSTA, A.C.A.; SOUZA, C.B. de; BASTOS, L.M.P.; FROTA, M.I. da; FERREIRA, R.M.; DIAS, S. da. **Projeto palmito de açaí**. 2. ed. Belém: IDESP, 1973.
- COSTA, M.F. da; LOUREIRO, M.R.; ALBUQUERQUE, C.R. de; ZEBINO, P. **Perspectivas para o aproveitamento integral da palmeira açaí**. Belém: IDESP, 1974. 84p.
- GUERRA, M.P.; HANDRO, W. Micropropagação do palmitero. In: CROCOMO, O.J.; SHARP, W.R.; MELO, M. (Eds.). **Biotecnologia para produção vegetal**. Piracicaba: CEBTEC/FEALQ, 1991. p.345-354.
- HU, C.Y.; FERREIRA, A.G. Cultura de embriões. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.M.; ed. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrpa-CNPq, 1999, v.1, p.371-393.

- GIACOMETTI, D.C. Impacto atual da cultura de tecidos em plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicação da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: Ministério da Agricultura, 1990. p.19-25.
- JARDIM, M.A.G.; OHASHI, S.T.; LAMEIRA, O.N. **Cartilha informativa sobre a palmeira açáí (*Euterpe oleracea* Mart.)**. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, 1995. 11p.
- LLANO-AGUDELO, B.; GONZALEZ-ROSAS, H. *In vitro* culture of mature avocado embryos. **Fruits**, Paris, v.50, n.1, p.59-64, 1994.
- MANTELL, S.; MATTHEWS, J.A. Técnicas de cultura de tecidos. In: MANTELL, S.; MATTHEWS; MCKEE, R.A. **Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1994. p.101-176,.
- MATHEWS, M.R.; RAO, P.S. *In vitro* responses of black pepper (*Piper nigrum* L.). **Current Science**, v.53; n.4, p.183-186, 1984.
- MURASHIGE, T.; SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497.
- PENCE, V.C. Cryopreservation of immature embryos of *Theobroma cacao*. **Plant Cell Reports**, v.10, p.144-147, 1991.
- TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. Histórico da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S; ed. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/Embrapa-CNPH, 1990. p.15-28.
- VILLALOBOS, V.M.; THORPE, T.A micropropagación: conceptos, metodología y resultados. In: ROCA, W.M.; MROGINSKI, L.A., ed. **Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones**. Cali: CIAT, 1991. p.128-172.



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Ministério da Agricultura e do Abastecimento
Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental
Trav. Dr. Enéas Pinheiro s/n, Caixa Postal 48,
Telex (91) 1210, Fax (091) 276-9845 CEP 66017-970
e-mail: cpatu@cpatu.embrapa.br*



Trabalhando em todo o Brasil