

Embriogênese somática em folhas de *Bertholletia excelsa*

Elismara Paula da Silva⁽¹⁾ e Maurício Reginaldo Alves dos Santos⁽²⁾

⁽¹⁾ Estudante de graduação da Universidade Federal de Rondônia, bolsista na Embrapa Rondônia, Porto Velho, RO

⁽²⁾ Pesquisador, Embrapa Rondônia, Porto Velho, RO

Resumo – A castanheira-da-amazônia é uma espécie importante na região Amazônica, gerando emprego e renda para os trabalhadores da região, no entanto, a produção extrativista tem diminuído, demandando tecnologias de produção de mudas para o estabelecimento de cultivos. A embriogênese somática é uma alternativa para a regeneração de plantas, induzindo embriões somáticos a partir do cultivo de tecidos vegetais em meio de cultura suplementado adequadamente. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo para a regeneração de plantas *in vitro* a partir de folhas. As folhas jovens foram coletadas em casa de vegetação, lavadas em solução de água e detergente e depois imersas em álcool 70% e hipoclorito de sódio 2,5%. Foram retirados explantes, que foram inoculados em meio de cultura WPM suplementado com os reguladores de crescimento 2,4-D e BAP em diferentes concentrações. Os cultivos foram incubados sob fotoperíodo de 16 horas, a 25 °C. Após 75 dias, todas as combinações dos reguladores haviam induzido embriões somáticos. As maiores porcentagens de explantes com embriões foram obtidas em meio com 2,0 mg L⁻¹ de BAP + 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 2,0 mg L⁻¹ de BAP + 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D. Concentrações acima de 2,0 mg L⁻¹ reduziram a porcentagem de indução de embriões somáticos nas folhas de *B. excelsa*.

Termos para indexação: cultura *in vitro*, reguladores de crescimento, castanheira-da-amazônia.

Somatic embryogenesis in leaves of *Bertholletia excelsa*

Abstract – The Amazon nut tree is an important species in the Amazon region, generating employment and income for workers in the region. However, however, extractive production has decreased, requiring seedling production technologies for the establishment of crops. Somatic embryogenesis is an alternative for plant regeneration, inducing somatic embryos from the cultivation of plant tissues in an appropriately supplemented culture medium. The objective of this work was to develop a protocol for *in vitro* plant regeneration from leaves. The young leaves were collected in a greenhouse, washed in a solution of water and detergent and then immersed in 70% alcohol and 2.5% sodium hypochlorite. Explants were removed and inoculated in WPM culture medium supplemented with the growth regulators 2,4-D and BAP in different concentrations. The cultures were incubated under a 16-hour photoperiod at 25°C. After 75 days, it was observed that all combinations of regulators induced somatic embryos. The highest percentages of explants with embryos were obtained in medium containing 2.0 mg L⁻¹ of BAP + 2.0 mg L⁻¹ of 2,4-D and 2.0 mg L⁻¹ of BAP + 1.0 mg L⁻¹ of 2,4-D. Concentrations above 2.0 mg L⁻¹ reduced the percentage of induction of somatic embryos in *B. excelsa* leaves.

Index terms: *in vitro* culture, growth regulators, Amazon nut tree.

Introdução

Bertholletia excelsa Bonpl. (Lecythidaceae), conhecida popularmente como castanheira-da-amazônia, é uma espécie economicamente importante na região Amazônica. O extrativismo das suas amêndoas gera emprego e renda para trabalhadores da região (Tonini, 2011). Contudo, a exploração do habitat e demandas por terra e assentamento aumentam a pressão sobre as populações nativas e ameaçam a diversidade genética da espécie (Sujii et al., 2015).

A propagação convencional da *B. excelsa* apresenta limitações: perda rápida da viabilidade da semente, germinação lenta e irregular, e baixo enraizamento nas plântulas (Figueiredo; Carvalho, 2002). Ainda, a propagação por estacas é problemática, por causa da lentidão e baixa taxa de enraizamento (Cordeiro et al., 2016).

O cultivo *in vitro* em meio de cultura com suplementação hormonal pode regenerar plantas a partir de tecidos vegetativos, sendo uma alternativa para propagar espécies com limitações dos métodos convencionais (George et al., 2008). Embriões somáticos são induzidos a partir do cultivo de tecidos vegetais em meio de cultura suplementado adequadamente, resultando em plântulas *in vitro* (Elhiti; Stasolla, 2022).

O objetivo deste trabalho foi determinar um protocolo para a regeneração *in vitro* de plantas de castanheira-da-amazônia a partir de explantes foliares. O estabelecimento de um método de propagação apoiará o melhoramento da espécie e será caracterizado pelo ineditismo.

Material e métodos

Folhas jovens foram coletadas de plantas de dois anos, cultivadas em casa de vegetação na Embrapa Rondônia, em Porto Velho-RO. As folhas foram levadas ao Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, onde foram lavadas com esponja e detergente comercial e imersas em solução de água e detergente por 5 minutos sob agitação. Em câmara de fluxo laminar horizontal, foram imersas em álcool 70% por um minuto, em hipoclorito de sódio 2,5% por 5 minutos, e enxaguadas três vezes. Foram retirados explantes foliares de 1,0 cm², com nervuras centrais e secundárias, os quais foram inoculados com a superfície abaxial em contato com o meio, em tubos de ensaio com 10 mL de meio WPM, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 6 g L⁻¹ de ágar e combinações da citocinina benzilaminopurina (BAP) e da auxina ácido diclorofenoxiacético (2,4-D), ambas nas concentrações de 0; 1,0; 2,0; e 3,0 mg mL⁻¹, totalizando 16 tratamentos. Foram inoculados 320 explantes, 20 por tratamento, incubados sob fotoperíodo de 16 horas, a 25 °C. Aos 45 dias, os calos resultantes foram subcultivados em meio fresco, com as mesmas concentrações de sacarose, ágar e reguladores de crescimento em que estavam, e mantidos sob as mesmas condições, visando à expressão de embriões somáticos. Aos 75 dias, foi observada a porcentagem de explantes nos quais ocorreu formação de embriões somáticos globulares. Os dados foram submetidos ao teste de Tukey, a 5% de probabilidade. O desenvolvimento dos embriões foi acompanhado visualmente durante 120 dias.

Resultados e discussão

A combinação da auxina 2,4-D com a citocinina BAP influenciou significativamente na indução de embriões somáticos nas folhas da castanheira-da-amazônia (Tabela 1). Sem 2,4-D não há indução de calos embriogênicos, assim como também não ocorre a indução sem a presença de BAP. É necessário que haja combinações entre auxina e citocinina para a obtenção de resultados. Corredoira et al. (2013) em seu trabalho de embriogênese somática em *Alnus glutinosa* L., obteve a indução de embriões somáticos em meio suplementado com 2,4-D e BAP, mas não houve a indução de embriogênese somática em meio suplementado apenas com BAP, corroborando com o resultado do presente estudo de que é necessária a combinação dos dois reguladores de crescimento para induzir embriões somáticos em espécies lenhosas.

Tabela 1. Porcentagens (%) de explantes com embriões somáticos em relação às concentrações de 2,4-D e BAP no meio de cultura, 75 dias após a inoculação.

BAP (mg L ⁻¹)	2,4-D (mg L ⁻¹)			
	0	1,0	2,0	3,0
0	0 G ⁽¹⁾	0 G	0 G	0 G
1,0	0 G	15 F	40 CD	30 E
2,0	0 G	65 A	70 A	50 B
3,0	0 G	45 BC	35 DE	10 F

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%).

Todas as combinações experimentais testadas resultaram na indução de embriões somáticos, sendo que duas delas se destacaram. As maiores porcentagens de explantes com embriões foram obtidas em meio com 2,0 mg L⁻¹ de BAP + 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 2,0 mg L⁻¹ de BAP + 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D. A embriogênese somática a partir da combinação de citocinina e auxina, também foi observada por Pinto et al. (2001), em explantes foliares de *Quercus suber* L., uma espécie florestal europeia. No entanto, foi utilizado no experimento um meio de indução suplementado com 0,1 mg L⁻¹ de auxina e 2,0 mg L⁻¹ de citocinina, que resultou em uma taxa de apenas 7,5% de explantes com calos embriogênicos. Esse contraste sugere que o aumento da concentração da auxina, conforme utilizado neste estudo, é significativamente mais eficaz na indução de calos embriogênicos. Ansari et al. (2021) relataram em seu estudo o sucesso da utilização do meio de cultura WPM suplementado com 1,86 mg L⁻¹ da auxina ácido naftalenoacético (ANA) e 2,25 mg L⁻¹ da citocinina BAP para cultivo de explantes de folhas jovens da espécie *Quercus suber* L. Esta combinação resultou em 23,3% de explantes com embriões somáticos. No presente estudo, com a utilização de concentrações aproximadas de auxina e citocinina, foi obtido resultado superior em relação à indução, de 65% e 70%.

As concentrações de reguladores de crescimento acima de 2,0 mg L⁻¹ causaram a diminuição da indução de calos embriogênicos, o que nos leva a concluir que um valor ideal para a indução de embriogênese somática em folhas da *B. excelsa* está dentro dos testes realizados.

Os embriões globulares obtidos são apresentados na Figura 1. Posteriormente, estes embriões serão periodicamente subcultivados visando ao seu desenvolvimento em embriões cordiformes, torpedos e cotiledonares, e subsequentemente em plântulas.

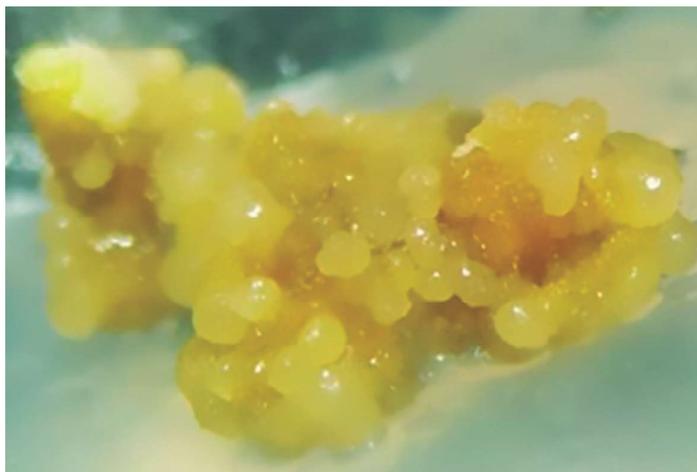


Figura 1. Explante foliar com embriões somáticos globulares, 120 dias após a inoculação, em meio WPM com $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP e $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D.

Conclusões

O estudo revela que o protocolo é eficaz na indução de embriões somáticos em explantes foliares de *B. excelsa*.

As combinações de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP com $1,0$ ou $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D foram adequadas. Concentrações superiores destes reguladores reduzem a eficiência da indução.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) de Elismara Paula da Silva, e à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária pelo financiamento do projeto.

Referências

- CORDEIRO, I. M.; LAMEIRA, O. A.; OLIVEIRA, F. D. A.; WENDLING, I. Enraizamiento de estacas juveniles de *Bertholletia excelsa* con diferentes concentraciones de ácido indol-butírico. **Agrociência**, v. 50, n. 2, p. 227–238, 2016.
- CORREDOIRA, E.; VALLADARES, S.; MARTÍNEZ, M. T.; VIEITEZ, A. M.; SAN JOSÉ, M. C. Somatic embryogenesis in *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. **Trees**, v. 27, n. 6. p. 1597-1608, 2013.
- EL ASARI, Z. N.; EL BOUZDOUDI, B.; ERRABII, T.; SAIDI, R., L'bachir El Kbiach, M. Induction of somatic embryogenesis from immature zygotic embryos and young apical leaves in cork oak (*Quercus suber* L.). **Journal of Plant Biotechnology**, v. 48, n. 1. p. 44-53, 2021.
- ELHITI, M.; STASOLLA, C. Transduction of Signals during Somatic Embryogenesis. **Plants**, v. 11, n. 2, p. 178, 2022. <https://doi.org/10.3390/plants11020178>.
- FIGUEIREDO, F. J. C.; CARVALHO, C. J. R. **Aspectos fisiológicos de sementes de castanha-do-brasil submetidas a condições de estresse: emergência e respiração**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento n. 05, 2002. 19 p.
- GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; KLERK, G.-J. **Plant Propagation by Tissue Culture**. 3rd ed. Dordrecht: Springer, 2008. 501p. v. 1.
- PINTO, G.; VALENTIM, H.; COSTA, A.; CASTRO, S.; SANTOS, C. Somatic embryogenesis in leaf callus from a mature *Quercus suber* L. tree. In **Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 38, p. 569-572, 2002.
- SUJII, P. S.; MARTNS, K.; WADT, L. H. O.; AZEVEDO, V. C. R.; SOLFERINI, V. N. Genetic structure of *Bertholletia excelsa* populations from the Amazon at different spatial scales. **Conservation Genetics**, v. 16, n. 4, p. 955-964, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10592-015-0714-4>.
- TONINI, H. Fenologia da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl., Lecythidaceae) no sul do estado de Roraima. **Cerne**, v. 17, n. 1, p. 123-131, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0104-77602011000100015>.