

ENRAIZAMENTO *IN VITRO* DE EMBRIÕES SOMÁTICOS E DE PLÂNTULAS EM RESPOSTA A CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE E PEG 6000

GIOVANA R. **BARBOZA**¹; JULIETA A.S. **ALMEIDA**²; OLIVEIRO **GUERREIRO**
FILHO³

Nº 11115

RESUMO

O objetivo deste estudo foi verificar o efeito da alteração da concentração osmótica do meio de cultura no enraizamento *in vitro* de embriões somáticos e de plântulas de *Coffea arabica* da cultivar Catuaí e do híbrido 812, previamente, obtidos via embriogênese somática direta. Para tanto, foi utilizado meio de cultura com metade da concentração dos sais de MS e adição de diferentes doses de sacarose 0, 10, 20, 30 e 40 g/L ou de Polietilenoglicol 6000 (PEG 6000) 0, 10, 20, 30, 40 e 50 g/L. Realizaram-se quatro experimentos, sendo embriões ou plântulas cultivados em presença de sacarose e/ou de PEG 6000, mantidos sob 16 horas de luz, a 25°C. Cada tratamento constou de quinze repetições. Observou-se que as plântulas obtiveram melhor formação de raízes nas concentrações de 10 e 30 g/L de sacarose, assim como os embriões, porém posteriormente os embriões em 10 g/L passaram a oxidar. Para os experimentos com PEG 6000 verificou-se que as plântulas e os embriões apresentaram melhor formação de raízes em 10, 30 e 40 g/L de PEG 6000, porém os embriões posteriormente também passaram a oxidar.

¹ Bolsista CNPq: Graduação em Farmácia, UNIP, Campinas-SP, gi.brg@hotmail.com

² Orientadora: Pesquisadora, CENTRO DE CAFÉ "ALCIDES CARVALHO"/IAC, Campinas-SP.

³ Colaborador: Pesquisador, CENTRO DE CAFÉ "ALCIDES CARVALHO"/IAC, Campinas-SP.

ABSTRACT

The objective this study was to assess the effect of changing the osmotic concentration of the culture medium on *in vitro* rooting of somatic embryos and seedlings of *Coffea arabica* cultivar Catuaí and the hybrid 812 were used from the experiments somatic embryogenesis direct. It was used culture medium with half-strength MS salts and addition of sucrose 0, 5, 10, 20, 30 and 40 g/L and PEG 6000 (polyethylene glycol 6000) 0, 10, 20, 30, 40 and 50 g/L. Through were four experiments: embryos or seedlings cultivated with sucrose and PEG 6000, maintain under 16 hours of light and 25 °C. For each treatment it was prepared fifteen repetitions. It was observed that the seedlings had better root formation at concentrations of 10 and 30 g/L sucrose, as well as embryos, but later the embryos at 10 g/L started to oxidize. For the experiments with PEG 6000 it was showed that seedlings and embryos had better root formation in 10, 30 and 40 g/L PEG 6000, but later the embryos began to rust.

INTRODUÇÃO

Ao longo do desenvolvimento do embrião somático até o estágio de plântula, ocorre o enraizamento sendo que a formação de raízes pode ocorrer a partir do embrião somático ou posteriormente na plântula em condição *in vitro* ou *ex vitro*. O enraizamento na fase *in vitro* é mais desejável, devido ao melhor controle das condições de crescimento e desenvolvimento, o que leva a obtenção de alto percentual de sobrevivência das plântulas micropropagadas quando transferidas para o ambiente *ex vitro*.

O desenvolvimento das raízes de plantas cultivadas *in vitro* pode ser influenciado por vários fatores, como os componentes do meio de cultura, a temperatura, a iluminação, os reguladores de crescimento e outros (MANTELL et al. 1994). Fatores de estresse tem sido associados à indução de diferentes eventos de crescimento e desenvolvimento nas plantas. Tecidos vegetais cultivados *in vitro* estão sujeitos a uma quantidade variável de estresses, que o próprio ambiente de cultivo causa como a injúria mecânica, choque osmótico e o desequilíbrio hormonal (DESJARDINS et al., 2009). O estresse osmótico está associado a substâncias químicas que alteram a concentração osmótica do tecido vivo.

A sacarose é um dissacarídeo conhecido desde o ano 200 A.C., sendo o carboidrato cristalino mais abundante na natureza, e produzido em larga escala por

diversos países (100.000 ton/ano), principalmente o Brasil (FERREIRA, 2001). No cultivo *in vitro* este carboidrato é um fator importante e necessário para o crescimento ótimo do tecido vegetal. Culturas de embriões nos estágios iniciais de desenvolvimento necessitam de concentrações elevadas de sacarose, entre 12-18 % (CALDAS, 1990).

O Polietilenoglicol 6000 (PEG 6000) é uma molécula grande, formada por óxido de etileno constituído de polímeros com diferentes graus de polimerização. É uma substância com alta solubilidade e devido à sua estrutura laminar, pode ser utilizada na indústria química, na preparação de pílulas e como agente umectante na fabricação de maquiagem, sabão e outros. Em meio de cultura esta substância reduz a contaminação por fungos, pois provoca estresse hídrico (MEXAL & REID 1973 apud CARVALHO, J. C. B. 2001)

O objetivo deste estudo foi verificar o efeito da alteração da concentração osmótica do meio de cultura, por meio da adição de sacarose ou de PEG 6000, no enraizamento *in vitro* de embriões somáticos ou de plântulas de genótipos de *Coffea arabica*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Foram utilizados embriões e plântulas de *C. arabica* da cultivar Catuaí e do híbrido 812 obtidos, previamente, via embriogênese somática direta. As plântulas utilizadas apresentavam até dois pares de folhas e ausência de raízes. Os embriões se encontravam em estágio de eixo embrionário, com a presença definida dos ápices apical e radicular, e coloração verde.

Meio de cultura

Foi utilizado meio de cultura que consistiu da metade da concentração dos sais de MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) modificado por SONDHAL & SHARP (1977) sem reguladores de crescimento de planta, com adição de 0, 10, 20, 30 e 40 g/L de sacarose ou de PEG 6000, sendo 0, 10, 20, 30, 40 e 50 g/L. No meio de cultura com PEG 6000 também foi adicionado 20 g de sacarose. O pH do meio foi ajustado para 5,8 e gelificado com ágar (5 g/L). O meio foi autoclavado a 121 °C e 1,5 atm por vinte minutos.

Foram realizados quatro experimentos, sendo embriões ou plântulas cultivados em presença de sacarose e/ou de PEG 6000. Para todos os experimentos foi adotado

o delineamento inteiramente casualizado. Cada tratamento constou de quinze repetições. Todos os experimentos foram avaliados semanalmente quanto à presença de raiz e comprimento da raiz principal.

Ensaio Experimentais

Para os experimentos com embriões, estes foram inoculados com posicionamento horizontal em relação à superfície do meio de cultura, e para os tratamentos com plântulas, as mesmas foram introduzidas em posição vertical em relação ao meio de cultura. (FIGURA 1). Todos os experimentos com embriões e plântulas foram mantidos em presença de 16 horas luz, sob 25 °C, por cerca de 90 dias de cultivo.

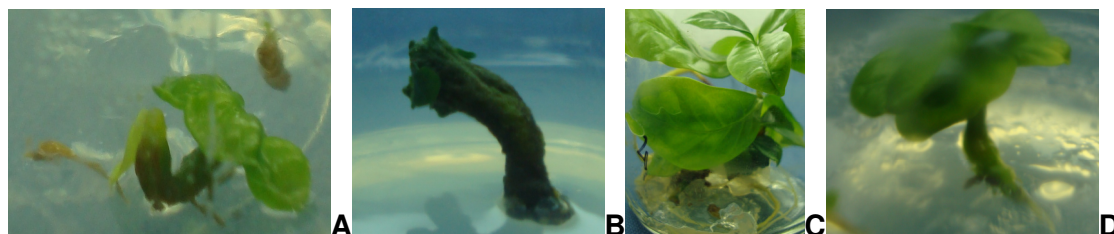


FIGURA 1: Enraizamento *in vitro* de embriões e plântulas de *Coffea*.

A. Embrião com raiz B. Embrião sem raiz C. plântula com raiz D. plântula sem raiz

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento 1. Embriões somáticos em meio de cultura com adição de sacarose

Os embriões apresentaram melhor formação de raízes nas concentrações de 10, 20 e 30 g/L de sacarose (FIGURA 2A). Por outro lado, para o comprimento da raiz a melhor resposta ocorreu em 30 g/L de sacarose (FIGURA 2B). Observou-se que os embriões utilizados em estágio mais avançado de desenvolvimento, eixo embrionário, apresentaram melhor formação de raízes do que embriões mais jovens em estágio de torpedo.

Experimento 2. Plântulas em meio de cultura com adição de sacarose

As plântulas atingiram melhores respostas de formação de raízes nas concentrações de 10, 20 e 40 g/L de sacarose (FIGURA 3A). As raízes formadas nessas plântulas apresentaram comprimento médio semelhante em todas concentrações de sacarose, exceto em 0 g/L (FIGURA 3B).

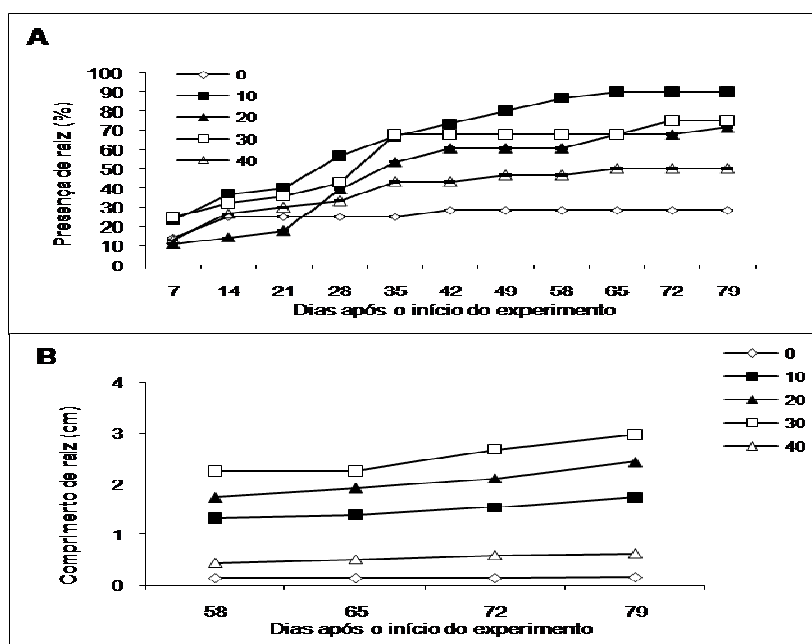


FIGURA 2: Efeito da adição de diferentes concentrações de sacarose no enraizamento de embriões somáticos de *C. arabica* cv Catuaí mantidos em presença de 16 horas de luz, sob 25 °C. **A.** Porcentagem de formação de raiz; **B.** Comprimento médio de raiz

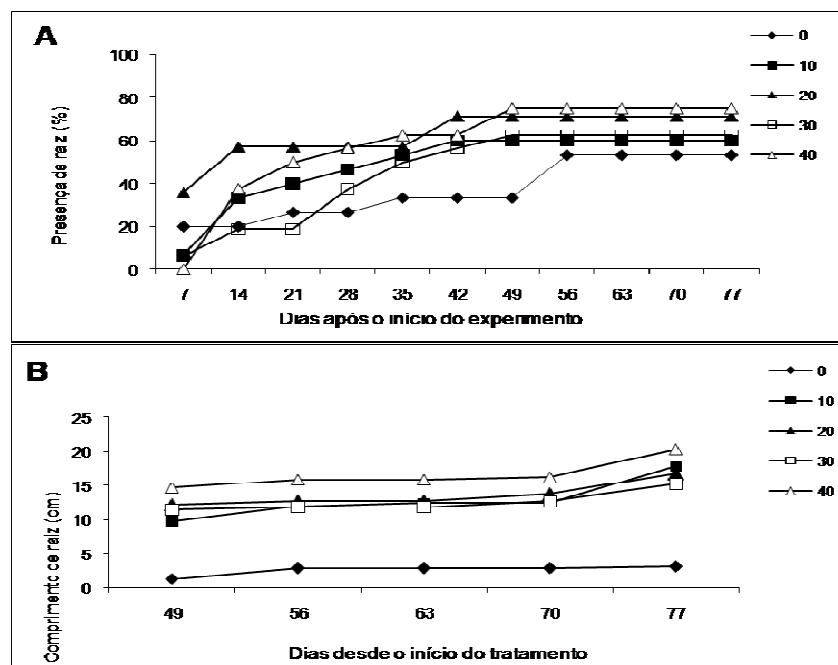


FIGURA 3: Efeito da adição de diferentes concentrações de sacarose no enraizamento de plântulas de *C. arabica* híbrido 812 mantidas em presença de 16 horas de luz, sob 25 °C. **A.** Porcentagem de formação de raiz; **B.** Comprimento médio de raiz

Verifica-se que inicialmente 20 g de sacarose favoreceu a iniciação da formação raízes, porém, posteriormente, o tratamento com 40 g também causou efeito semelhante. No entanto, nota-se que 40 g/L de sacarose também tendeu a promover maior crescimento de raízes nas plântulas (FIGURA 3B).

Para o enraizamento de embriões e plântulas de *Coffea*, em geral, utilizam-se 20 g/L de sacarose. No entanto, os resultados deste estudo indicam que, possivelmente, a melhor eficiência do enraizamento de *Coffea* pode ser atingida com o uso de concentrações mais elevadas de sacarose.

Experimento 3. Embriões somáticos em meio de cultura com adição de PEG 6000

Na FIGURA 4 verifica-se o efeito de PEG 6000 no enraizamento de embriões de *Coffea*. Na FIGURA 4A nota-se que o tratamento com 10 g/L de PEG 6000 favoreceu maior porcentagem de formação de raízes seguido das concentrações de 20 e 30 g/L, respectivamente. Por outro lado a concentração mais elevada, 50 g/L, inibiu este processo. Para o comprimento de raiz nota-se maior crescimento em 10 g/L do que nas outras concentrações (Figura 4B).

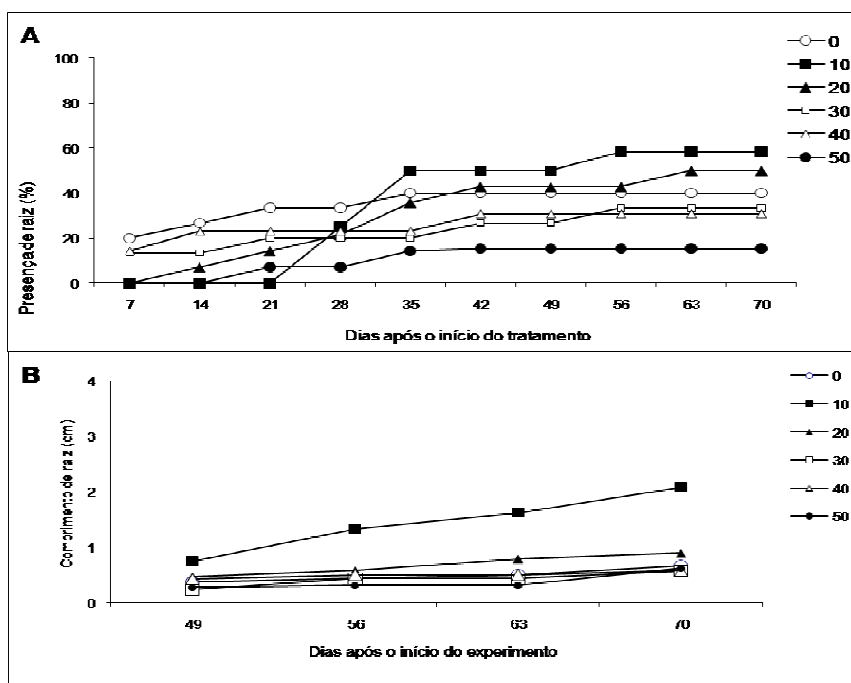


FIGURA 4: Efeito da adição de diferentes concentrações de PEG 6000 no enraizamento de embriões somáticos de *C. arabica* cultivar Catuaí mantidos em presença de 16 horas de luz sob 25°C. **A.** Porcentagem de formação de raiz; **B.** Comprimento médio de raiz

Experimento 4. Plântulas em meio de cultura com adição de PEG 6000

A FIGURA 5 apresenta o efeito de PEG 6000 no enraizamento de plântulas de *Coffea*. Na FIGURA 5A nota-se que 0 g/L de PEG 6000 favoreceu maior porcentagem de formação de raízes seguido da concentração de 10 g/L, enquanto as concentrações mais elevadas tenderam a inibir este processo. Para o comprimento de raiz nota-se que as concentrações de 0 e 10 g/L de PEG 6000 também favoreceram o maior crescimento (FIGURA 5B).

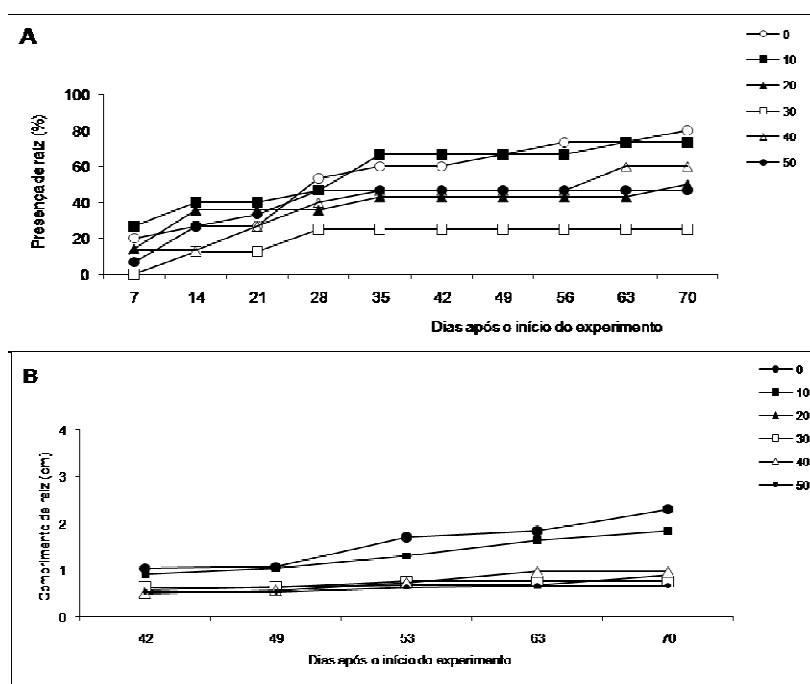


FIGURA 5: Efeito da adição de diferentes concentrações de PEG 6000 no enraizamento de plântulas de *C. arabica* cultivar Catuaí mantidas em presença de 16 horas de luz e sob 25°C. **A.** Porcentagem de formação de raiz; **B.** Comprimento médio de raiz

CONCLUSÃO

Dos dados obtidos observou-se que as concentrações mais altas de sacarose favoreceram o enraizamento dos embriões e das plântulas tanto em relação a porcentagem de formação das raízes quanto de seu comprimento. Os resultados obtidos com PEG 6000 indicam que as concentrações mais elevadas favoreceram a ocorrência de maior porcentagem de emissão de raízes, porém, neste caso, estas não atingiram maior comprimento.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ – PIBIC, pela bolsa concedida.

Ao CENTRO CAFÉ 'Alcides Carvalho - IAC, pela oportunidade de estágio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD MSA; JAVED F; ASHRAF M. 2007. **Iso-osmotic effect of NaCl and PEG on growth, cations and free proline accumulation in callus tissue of two indica rice (*Oryza sativa* L.) genotypes**. Plant Growth Regulation 53:53-63.
- BRESSAN RA; HASEGAWA PM; HANDA AK. 1981. **Resistance of cultured higher plant cells to polyethylene glycol-induced water stress**. Plant Sci Lett 21:23-30.
- CARVALHO, J.C.B. **CRESCIMENTO MICELIAL DE *Colletotrichum lindemuthianum* EM RELAÇÃO À RESTRIÇÃO HÍDRICA DO SUBSTRATO AGARIZADO** Ciênc. agrotec., Lavras, v.25, n.4, p.999-1005, jul./ago., 2001
- DESESJARDINS Y.; DUBUC J.-F; BADR A. 2009. **In Vitro Culture of Plants: a stressful activity**. Acta Hort. (Ishs) 812:29-50. www.Actahort.Org/Books/812/812_1.Htm
- FERREIRA, V.F. & SILVA, F.C. **Sacarose no Laboratório de química orgânica de graduação**. Química Nova, Vol.24, no.6, São Paulo – SP, Nov./Dec. 2001
- MANTELL, S.H.; MATTHEWS, J.A.; MCKEE, R.A. **Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1994. 333p.
- MEXAL, J.; REID, C.P.P. **The growth of selected mycorrhizal fungi in response to induced water stress**. Canadian Journal of Botany, Ottawa, v. 51, n. 9, p. 1579- 1588, Sept. 1973.
- MURASHIGE T; SKOOG F. 1962. **A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures**. Physiologia Plantarum, v.15, p.473-497.
- SÖNDAHL, M.R.; SHARP, W.R. 1977. **High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L.** Z.Pflanzenphysiol. 81:395-408.
- TORRES, A.C. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Editores Antonio Carlos Torres e Linda Styer Caldas. Brasília, ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990.