

Desenvolvimento *in vitro* de embriões zigóticos de tamareira¹

In vitro development of zygotic embryo of date palm

Najara Maria de Sena Costa² e Magdi Ahmed Ibrahim Aloufa³

Resumo - O cultivo de embriões zigóticos é uma técnica usada para superar dormência de sementes, estudar aspectos nutricionais e fisiológicos do desenvolvimento do embrião, recuperar híbridos de cruzamentos incompatíveis e como fontes de explantes com tecido de elevada totipotência. Este trabalho objetivou analisar o desenvolvimento *in vitro* de embriões zigóticos de tamareira (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Khadrawy mediante a utilização de ácido 3-indolacético (AIA) e 6-benzilaminopurina (BAP). Embriões zigóticos maduros foram inoculados em meio MS com 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,1 g L⁻¹ de inositol, 7 g L⁻¹ de agar e três combinações de reguladores de crescimento distintas: (0,05; 0,1 e 0,2 mg L⁻¹) de IAA e (5; 10 e 20 mg L⁻¹) de BAP, além de um meio controle, sem fitoreguladores. Houve um efeito negativo da adição de IAA e BAP, resultando em plântulas anormais. As combinações de 0,05 mg L⁻¹ de IAA + 5 mg L⁻¹ de BAP e 0,1 mg L⁻¹ de IAA + 10 mg L⁻¹ de BAP foram igualmente significativas para a obtenção de maior número de folhas. O meio controle desenvolveu plântulas. O melhor desenvolvimento dos embriões ocorreu em meio MS sem reguladores de crescimento, com uma taxa de 66,6% de conversão de embriões zigóticos em plântulas.

Termos para indexação: *Phoenix dactylifera* L., cultura de embrião, reguladores de crescimento

Abstract - Zygotic embryo culture is a technique used to surpass dormancy of seeds, to study nutritional and physiological aspects of the embryo development, to recover hybrids of incompatible crossings and as sources of explants with high totipotency. This study aimed to evaluate the effect of indole-3-acetic acid (IAA) and BAP (6-benzilaminopurine) in the development of *in vitro* zygotic embryos of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. khadrawy. Mature zygotic embryos were inoculated in MS medium with 30 g L⁻¹ sucrose, 0.1 g L⁻¹ myo-inositol, 7 g L⁻¹ agar and three different hormonal combinations: (0.05; 0.1 and 0.2 mg L⁻¹) IAA and (5; 10 and 20 mg L⁻¹) BAP, besides a medium control, without regulators. A negative effect of the addition of IAA and BAP regulators was observed, with the production of abnormal plantlets. The combinations of 0.05 mg L⁻¹ IAA + 5 mg L⁻¹ BAP and 0.1 mg L⁻¹ IAA + 10 mg L⁻¹ BAP were equally significant for the obtainment of bigger leaf number. Medium without regulators produced more complete plantlets. Therefore, the best development of the embryos occurred in medium without growth regulators, with 66.6% of conversion of zygotic embryos in plantlets.

Index terms: *Phoenix dactylifera* L., embryo culture, growth regulators

¹ Recebido para publicação em 11/08/2006; aprovado em 14/05/2007

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Botânica, Ecologia e Zoologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)

² Bióloga, Mestranda do Curso de Pós-graduação de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Cx. Postal 1524, CEP 59072-970, Natal-RN, najara_cb@yahoo.com.br

³ Eng. agrônomo, D.Sc., Prof. do Dep. de Botânica, Ecologia e Zoologia da UFRN, Natal-RN, magdi-aloufa@bol.com.br

Introdução

A tamareira (*Phoenix dactylifera* L.) é uma espécie da família *Arecaceae* originária do Oriente Médio, comercialmente explorada em diferentes regiões áridas e semi-áridas do mundo (DJERBI, 1996). Para muitos países, é a principal fonte de divisas e sua exploração interessa aos diversos setores da economia, principalmente o da alimentação (BOOIJ; PIOMBO; RIS-, 1992). Por apresentar ótima adaptabilidade à região dos trópicos, e devido ao bom desenvolvimento sob sol pleno e em terrenos arenosos e salinizados, torna-se uma ótima opção para o Nordeste brasileiro.

A propagação *in vitro* constitui-se numa ferramenta importante para plantas com dificuldade de serem multiplicadas vegetativamente, como é o caso das palmeiras (LEDO et al., 2001). Em *P. dactylifera*, embora a propagação por rebentos possibilite a preservação dos caracteres da planta-mãe, esse método pode tornar-se inviável pela baixa quantidade de rebentos produzidos (NUNES; QUEIROZ; SILVA, 1989). A micropropagação tem sido vista como uma alternativa atrativa para a propagação da tamareira em larga escala.

Normalmente, na propagação *in vitro* os reguladores de crescimento constituem-se numa primeira etapa a ser abordada, em que o modo de interação entre auxinas e citocininas é freqüentemente dependente da espécie e do tipo de tecido utilizado na cultura (COENEN; LOMAX, 1997; PIERIK, 1997). Dentre as técnicas de cultura de tecidos, a cultura de embriões, por tentar reproduzir *in vitro* o desenvolvimento normal de embriões, apresenta-se como uma ferramenta para o controle da embriogênese, o resgate de embriões interespecíficos quando apresentam alguma incompatibilidade, a produção de haplóides, a quebra de dormência e a produção de plântulas assépticas, além de elucidar alguns problemas como nutrição do embrião no óvulo entre outras aplicações (LEDO et al., 2001; HU e FERREIRA, 1998). Sittolin e Cunha (1987), utilizaram a técnica de cultura de embriões *in vitro* para produzir mudas da palmeira macaúba (*Acrocomia aculeata*), visando a implantação de um banco de germoplasma para possibilitar o acompanhamento e avaliação do potencial da cultura para produção do óleo. Tabai et al. (1990) utilizaram a cultura de embriões para reduzir o tempo de germinação das sementes de macaúba.

Sharma et al. (1980), cultivaram *in vitro* embriões zigóticos de tamareira, em diversas composições salinas, como MS, SH e Y3, suplementados com os reguladores de crescimento ANA, 2,4-D, KIN e BAP, sozinhos ou em várias combinações. Os embriões mostraram-se bastante

responsivos e foram os únicos explantes, dentre os utilizados, a não apresentarem escurecimento devido à oxidação.

O aspecto mais importante da cultura de embrião, é a determinação do meio de cultura que sustentará o crescimento dos embriões. Os nutrientes requeridos variam dependendo da idade (BURUN; POYRAZOGLU, 2002). De acordo com Hu e Ferreira (1998), embriões excisados no estágio maduro ou próximo a este, são quase autotróficos, dispensando a utilização de reguladores vegetais. Este trabalho objetivou avaliar o desenvolvimento *in vitro* de embriões zigóticos de tamareira sob o efeito do ácido 3-indolacético (IAA) e 6-benzilaminopurina (BAP).

Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Botânica, Ecologia e Zoologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). As sementes de tamareira foram coletadas em 2004 em Bebedouro-PE e fornecidas pela Embrapa Semi-Árido localizada em Petrolina, Pernambuco.

As sementes de tamareira cv. Khadrawy foram desinfestadas por imersão em etanol 70% por 5 minutos e em hipoclorito de sódio a 10% de cloro ativo por 20 minutos. Em seguida foram lavadas três vezes (por 10 minutos cada) em água destilada esterilizada em autoclave.

Em câmara asséptica, os embriões zigóticos maduros foram excisados e inoculados individualmente em frascos de 300 mL contendo 30 mL de meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,1 g L⁻¹ de mio-inositol e diferentes combinações de ácido 3-indolacético (IAA) e 6-benzilaminopurina (BAP): 0,05 mg L⁻¹ de IAA e 5,0 mg L⁻¹ de BAP (T1), 0,1 mg L⁻¹ de IAA e 10,0 mg L⁻¹ de BAP (T2) e 0,2 mg L⁻¹ de IAA e 20,0 mg L⁻¹ de BAP (T3), e somente em MS (T0). O pH do meio foi ajustado em 5,8 e o meio solidificado com 7 g L⁻¹ de agar Difco antes da autoclavagem a 121 °C por 20 minutos.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com três repetições de 10 frascos para cada tratamento com oito embriões por frasco. As observações foram feitas por um período de 180 dias e a cada 30 dias era realizado o subcultivo dos explantes para meio fresco de mesma composição. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 12 horas, temperatura de 25 ± 2 °C e intensidade luminosa de 30 mmol m⁻² s⁻¹.

As variáveis avaliadas foram formação ou não de parte aérea, radicular e espessamento da região caulinar, porcentagem de conversão de embriões em plântulas, por-

centagem de plântulas anormais, número de folhas e número de raízes. Como plântulas anormais, foram consideradas aquelas que apresentavam ausência ou crescimento atrofiado da parte aérea ou sistema radicular. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Resultados e Discussão

Os resultados mostraram um efeito negativo da adição dos reguladores IAA e BAP na cultura *in vitro* de embrião zigótico de tamareira, exceto para o número de folhas. Os testes estatísticos detectaram efeitos significativos das combinações de 0,05 mg L⁻¹ de IAA + 5 mg L⁻¹ de BAP e 0,1 mg L⁻¹ de IAA e 10 mg L⁻¹ de BAP sobre o número de folhas diferenciadas por plântula (Figura 1).

Aos 42 dias, observou-se a emissão de parte aérea através de uma fenda no eixo caulinar (pecíolo cotiledonar) nos explantes do meio adicionado com 0,1 mg L⁻¹ de IAA e 10 mg L⁻¹ de BAP, concordando com Aloufa e Oliveira (1989), em observações acerca da cultura de embrião zigótico de *P. dactylifera* L cv. Zaghoul em meio MS de mesma composição, que verificaram que aos 45 dias de cultivo, folhas emergiram do explante. Estas eram primeiramente brancas e em seguida tornaram-se clorofiladas. Esse fato também foi registrado neste trabalho. Sharma et al. (1980), relataram a obtenção de plântulas de tamareira a partir de embriões, dentro de seis semanas, utilizando o meio de MS (MURASHIGE; SGOOG, 1962), sem adição de reguladores de crescimento.

A emissão da radícula foi observada aos 60 dias no tratamento sem fitoreguladores e nas combinações 0,1 mg L⁻¹ de IAA + 10 mg L⁻¹ de BAP e 0,2 mg L⁻¹ de IAA + 20 mg L⁻¹ de BAP. Não houve a formação de raízes secundárias em nenhum dos tratamentos. Apenas as plântulas do meio controle apresentavam raiz primária normal, sendo todas as dos demais tratamentos, atrofiadas ou, em alguns casos, inexistentes, caracterizando plântulas anormais (Figura 1).

O meio acrescido com 0,05 mg L⁻¹ de IAA e 5 mg L⁻¹ de BAP propiciou diferenciação exuberante de parte aérea (média de 3 folhas por plântula), porém não diferiu do tratamento com 0,1 mg L⁻¹ de IAA + 10 mg L⁻¹ de BAP (Figura 1).

A adição de reguladores de crescimento ao meio causou o alargamento da região terminal caulinar de 100% dos explantes (Tabela 1). Trata-se de uma região “inchada” devido acentuada divisão celular. Os explantes de T1 (0,05 mg L⁻¹ de IAA e 5 mg L⁻¹ de BAP) e T2 (0,1 mg L⁻¹ de IAA e 10 mg L⁻¹ de BAP) desenvolveram alargamentos caulinares

globosos, enquanto T3 (0,2 mg L⁻¹ de IAA e 20 mg L⁻¹ de BAP) apresentavam alargamentos alongados.

O tratamento sem reguladores (T0) mostrou ser o mais eficiente para o desenvolvimento de embriões zigóticos de tamareira e formação de plântulas (66,6%), comparado aos demais tratamentos, que apresentaram 100% de plântulas anormais (Figura 1). Muitas vezes, o acréscimo de hormônios exógenos pode não ser benéfico devido aos teores indeterminados de hormônios endógenos do embrião. Observou-se, aos 180 dias, a formação de raiz primária e parte

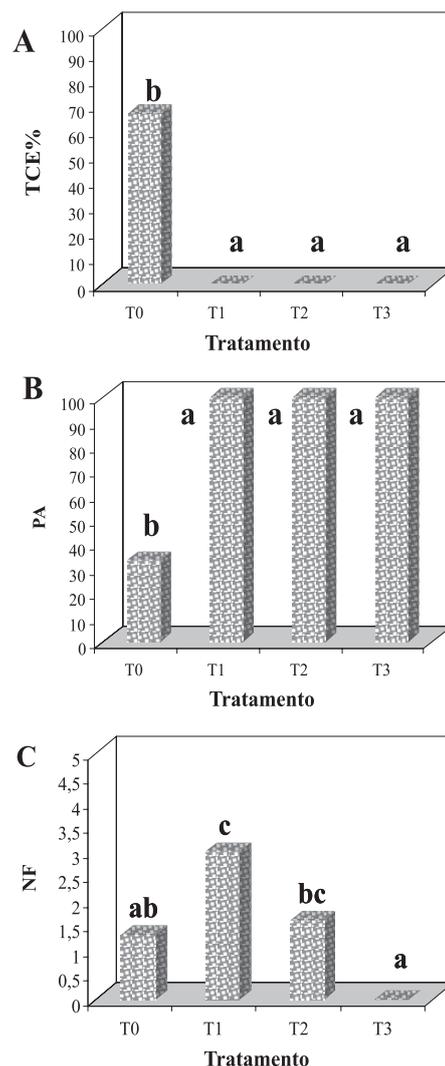


Figura 1 - (A) Taxa de obtenção de plântulas a partir de embriões zigóticos de tamareira (%) (B) Porcentagem de plântulas anormais (C) Número médio de folhas/plântula, em meio de cultura MS com IAA e BAP (T0: MS; T1: MS + 0,05 mg L⁻¹ de IAA e 5 mg L⁻¹ de BAP; T2: MS + 0,1 mg L⁻¹ de IAA e 10 mg L⁻¹ de BAP; T3: MS + 0,2 mg L⁻¹ de IAA e 20 mg L⁻¹ de BAP) na cultura *in vitro* de embriões zigóticos de *Phoenix dactylifera* L.

Tabela 1 - Percentuais para formação de parte aérea (PA), raiz primária (RP) e alargamento da região terminal caulinar (AC) em cada tratamento (T0: MS sem reguladores vegetais; T1: MS + 0,05 mg L⁻¹ de IAA e 5 mg L⁻¹ de BAP; T2: MS + 0,1 mg L⁻¹ de IAA e 10 mg L⁻¹ de BAP; T3: MS + 0,2 mg L⁻¹ de IAA e 20 mg L⁻¹ de BAP) na cultura de embrião zigótico de *Phoenix dactylifera* L., aos 180 dias de cultivo *in vitro*

Tratamentos	PA(%)	RP(%)	AC(%)
T0	66,6	100	0
T1	100	40	100
T2	83,3	50	100
T3	0	100	100

aérea em 100% e 66,6% dos explantes nesse tratamento, respectivamente. As raízes e folhas das plântulas de T0 apresentavam maior comprimento que às dos demais tratamentos.

Esses resultados concordam com Silva (2002), que observou que os meios de cultura MS com diferentes concentrações de 2,4-D foram mais efetivos para a obtenção de plântulas de *Cocos nucifera* L. via cultura de embriões, com a diferenciação de parte aérea e raiz, e na presença de reguladores de crescimento. Em apenas alguns casos ocorreu formação da parte aérea, sem a formação do sistema radicular.

Hu e Ferreira (1998), relatam que embriões excisados no estágio maduro ou próximo podem germinar e crescer num meio inorgânico, e os reguladores de crescimento tornam-se dispensáveis. Nos explantes inoculados no meio acrescido de 0,1 mg L⁻¹ de IAA e 10 mg L⁻¹ de BAP, o percentual de diferenciação de parte aérea e formação de raiz primária corresponde a 83,3% e 50%, respectivamente. Não houve formação de parte aérea em T3 (0,2 mg L⁻¹ de IAA e 20 mg L⁻¹ de BAP) (Tabela 1). Foi observada a morte de 88,88% dos explantes desse meio próximo ao fim dos 180 dias de cultura, talvez devido a intoxicação pelas altas concentrações de reguladores de crescimento utilizadas.

Conclusões

1. O melhor desenvolvimento de embriões zigóticos de tamareira ocorreu em meio sem suplementação de reguladores, com a formação de plântulas;
2. As combinações 0,05 mg L⁻¹ de IAA + 5 mg L⁻¹ de BAP e 0,1 mg L⁻¹ de IAA + 10 mg L⁻¹ de BAP foram significativamente favoráveis à diferenciação de um maior número de folhas; e
3. Os meios com adição de reguladores de crescimento causaram a formação de 100% de plântulas anormais.

Referências Bibliográficas

- ALOUFA, M.A.I.; OLIVEIRA, L.M.A. *In vitro* embryo culture of date palm. In: CONGRESSO DE CIÊNCIAS DA UFRN, 1., 1989, Natal. **Anais do I congresso de Ciências da UFRN**. Natal: UFRN, 1989. p. 15-18.
- ALVES, E.C.S.C.; XAVIER, A.; OTONI, W.C. Organogênese *in vitro* a partir de explante caulinar na regeneração de clones de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden X *E. urophylla* S. T. Blake. **Revista Árvore**, v. 28, n. 5, p. 643-653, 2004.
- BOOIJ, I.; PIOMBO, G.; RISTERUCCI, J.M. Chemical composition analysis of five varieties of dates at different stages of maturity. **Fruits**, Paris, v. 47, n. 6, p. 667-677, 1992.
- BURUN, B.; POYRAZOGLU, E.Ç. Embryo culture in Barley (*Hordeum vulgare* L.). **Turkish Journal of Biology**, v. 26, n. 3, p. 175-180, 2002.
- DJERBI, M. **Precis de Phéniciculture**. Roma: FAO, 1996. 190p.
- HU, C. Y.; FERREIRA, A.G. Cultura de embriões. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/SPI, 1998. v. 1. p. 371-393.
- LEDO, A.S.; LAMEIRA, O.A.; BENBADIS, A.K.; MENEZES, I.C.; LEDO, C.A.S.; OLIVEIRA, M.S.P. Cultura *in vitro* de embriões zigóticos de açaizeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 3, p. 468-472, 2001.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- NUNES, R.F. de M.; QUEIROZ, M.A.de; SILVA, C.M.M.de S. **Instruções para produção de mudas e plantio da tamareira**. Petrolina: EMBRAPA-CPATSA, 1989. 36p. EMBRAPA-CPATSA (Circular Técnica 21).
- SHARMA, D. R.; KUMARI, R.; CHOWDHURY, J. B. *In vitro* culture of female date palm (*Phoenix dactylifera* L.) tissues. **Euphytica**, Wageningen, v. 29, n. 1, p. 169-174, 1980.
- SILVA, V.S. **Regeneração in vitro de embriões de Cocos nucifera** L. 2002. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP, Piracicaba.
- SITTOLIN, I.M.; CUNHA, L.H.S. Cultura de embriões de macaúba (*Acrocomia* sp.) *in vitro* visando a implantação de um banco ativo de germoplasma. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 2., 1987, Brasília. **Resumos...** Brasília: ABCTP, 1987. p.13.
- TABAI, S.; MELO, M.; CROCOMO, O.J. Control of somatic embryos formation the palm macaúba (*Acrocomia aculeata*). In: INTERNATIONAL CONGRESS PLANT TISSUE AND CELL CULTURE, 7., 1990, Amsterdam. **Resumos...** Amsterdam: IAPTC, 1990. p.248.