

Indução da embriogênese somática em dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq) a partir de estruturas foliares e potencial de indução utilizando discos apicais de plantas jovens¹

Scherwinski-Pereira, Jonny Everson^{1,2}; Maciel, Simone de Alencar³; Silva, Tatiane Loureiro³; Guedes, Rodrigo^{1,4}; Fermino Jr., Paulo Cesar Poeta^{1,5}.

¹Programa Biotecnologia do Dendê – Apoio financeiro: CNPq

²Pesquisador da Embrapa Acre, Laboratório de Morfogênese e Biologia Molecular – LABMOL - C. Postal 321, 69908-970 Rio Branco – AC. Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq. E-mail: jonny@cpafac.embrapa.br; ³Bolsistas PIBIC/CNPq/Embrapa Acre; ⁴Mestrando em Produção Vegetal - UFAC; ⁵Professor do Depto. Ciências Agrárias UFAC, Rio Branco-AC.

INTRODUÇÃO

O dendezeiro (*Elaeis guineensis*), pertencente à família Arecaceae, é originário do continente Africano. Desenvolve-se em regiões de clima tropical, em vários tipos de solo e ricos em matéria orgânica (Carvalho et al., 2001).

As sementes estacam-se pela produção de óleo, o qual tem uso alimentício, medicinal, oleoquímico e industrial. O dendê é a oleaginosa mais produtiva do mundo, chegando a atingir 5 mil kg de óleo/ha. O programa brasileiro de biocombustíveis busca viabilizar a utilização do biodiesel, constituído das misturas de ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos, obtidos da reação química de transesterificação de diversos óleos, entre eles os do dendê (Miragaya 2005).

A propagação do dendezeiro ocorre através de sementes e, mesmo quando se utilizam híbridos selecionados, as plantas podem apresentar alta variabilidade, constituindo-se num dos principais fatores da baixa produtividade em plantios comerciais (Juan & Rodrigues, 1989).

Devido à dificuldade de usar a propagação via sementes, a cultura de tecidos surge como uma excelente alternativa para a multiplicação clonal de espécies selecionadas (Scherwinski-Pereira et al., 2006). A cultura de tecidos de plantas, em especial a embriogênese somática, se constitui como uma técnica eficaz para a multiplicação clonal de plantas lenhosas. Segundo Ammirato (1983), a embriogênese somática é um processo análogo à embriogênese zigótica em que, uma única célula ou um grupo de células somáticas são precursoras de embriões somáticos. A embriogênese somática pode ser implementada a partir de explantes de diversas origens, como: embriões zigóticos, inflorescência, ápices caulinares e folhas imaturas (Guerra et al., 1999). Alguns padrões morfogenéticos típicos ocorrem em tecidos vegetais cultivados *in vitro* tais como a formação de calos, isto é, uma massa de células de proliferação contínua e mais ou menos desordenada (George, 1993).

Este trabalho teve como objetivo a indução da embriogênese somática a partir de diferentes estruturas foliares de *Elaeis guineensis* em meio de cultura contendo diferentes tipos de auxinas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Morfogênese e Biologia Molecular – LABMOL - da Embrapa Acre, Rio Branco, AC.

Experimento 1: Indução da embriogênese somática a partir de folhas imaturas de plantas de dendezeiro.

Como fonte de explante, foram utilizadas folhas imaturas de plantas com até 3 meses de idade de três genótipos de dendezeiro. As plantas foram submetidas à lavagem com água corrente e assepsia, retirando-se as folhas externas e raízes. Em seguida, folhas próximas ao ápice caulinar foram seccionadas em porções de 2 a 3 cm e desinfestadas com álcool 70% por

30 segundos e em hipoclorito de sódio 1% por 20 minutos. Finalmente, o material foi submetido à tríplex lavagem em água esterilizada.

O meio de cultura utilizado para o pré-tratamento dos explantes foi o MS (Murashige & Skoog, 1962) acrescido de 30,0 g.L⁻¹ de sacarose, 2,5 g.L⁻¹ de Phytigel e suplementado com 225 µM de Picloran e 2,4-D. Para este experimento utilizou-se frascos de 250 mL com 30 mL de meio de cultura. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 5 repetições, sendo cada parcela formada por 6 explantes.

Após o primeiro procedimento, os calos passaram a ser cultivados em meio constituído pelos sais e vitaminas de MS, suplementados com 0,537 µM de ANA (Ácido Naftaleno Acético) e 12,30 µM de 2iP (2-isopenteniladenina). Após quatro meses de cultivo avaliaram-se os explantes quanto à presença de calos granulares e multi-granulares. Posteriormente, os calos foram transferidos para meio de multiplicação de calos, consistindo de meio MS, acrescido de altas concentrações de Picloran e 2,4-D (112,50; 225 e 450 µM). Para a montagem dos experimentos foram utilizados tubos (25x150 mm) contendo 10 mL de meio de cultura. Após três meses foram avaliados os calos embriogênicos quanto à massa fresca.

Experimento 2: Avaliação do potencial de indução de calos embriogênicos em dendezeiro a partir de discos apicais caulinares de plantas jovens.

Plantas jovens de dendezeiro de até três meses foram coletadas em condições de campo e em laboratório tiveram suas folhas mais externas e raízes removidas para obtenção de materiais com tecidos subapicais, meristema apical, primórdios e bainhas foliares. Em laboratório o material passou por um processo de desinfestação. Para a obtenção dos explantes propriamente dito foram realizados secções transversais de aproximadamente 1 mm de espessura contendo diferentes camadas histológicas. As secções foram feitas de maneira que, algumas camadas fossem compostas apenas por bainhas foliares, por tecidos subapicais e meristema apical, classificados como basal, mediano e apical.

O meio utilizado foi composto pelos sais de MS acrescido de 30,0 g.L⁻¹ de sacarose, 100 mg.L⁻¹ de inositol, 500 mg.L⁻¹ de L-glutamina e 300 mg.L⁻¹ de carvão ativado. Foram adicionados os reguladores Picloran e 2,4-D, nas concentrações de 0, 225 e 450 µM. Os discos transversais do ápice caulinar foram inoculados em frascos contendo 30 mL de meio.

A avaliação foi feita 90 dias após a inoculação, observando a presença de calos embriogênicos, de explantes vivos, de oxidação e de contaminação por microorganismos. O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso com 18 tratamentos e 5 repetições por tratamento, sendo cada parcela composta com 6 explantes por frasco.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento 1: Indução da embriogênese somática a partir de folhas imaturas de plantas de dendezeiro.

Verificou-se que o Picloran proporcionou melhores resultados, quando se refere à formação de número de embriões somáticos por explante (Figura 1 A e B). A influência de auxinas sob os explantes mostrou ser fundamental para a indução e conseqüentemente, a formação dos embriões somáticos. Nesse sentido, as auxinas (2,4-D, Picloran e Dicamba) são frequentemente utilizadas na indução da embriogênese somática em plantas (Guerra et al., 1999).

De modo geral, explantes oriundos de meios cultivados com Picloran foram melhores na multiplicação dos calos, principalmente na formação de calos multi-granulares, formados em até 19% dos explantes, enquanto que em cultivo com 2,4-D registrou-se apenas 11% dos explantes (Figura 1 D, E e F). Estes resultados estão de acordo com Pereira et al. (2006) que também verificaram resultados superiores quando o Picloran foi utilizado. Foram descritos como calos granulares os explantes que apresentaram uma única estrutura, ou seja, unidade/calco; e como calos multi-granulares àqueles com capacidade de formação de múltiplas estruturas/calco.

Com relação à massa fresca, constatou-se que o Picloram mostrou ter mais eficiência, com o aumento da massa fresca dos calos, enquanto que em cultivo com a auxina 2,4-D foi inferior. Observou-se que o aumento da massa fresca dos calos está diretamente proporcional ao aumento das concentrações de auxinas no meio de cultura. Estudos realizados utilizando Picloram na concentração de $0,06 \text{ mg.L}^{-1}$ em explantes da parte aérea de pupunha (*Bactris gasipaes* H.B.K), promoveu a formação de calos, após três meses no escuro. Após esse estágio, um novo meio com $0,03 \text{ mg.L}^{-1}$ de Picloram promoveu aumento na massa fresca e desenvolvimento dos calos, após 6 meses (Valverde, 1987).

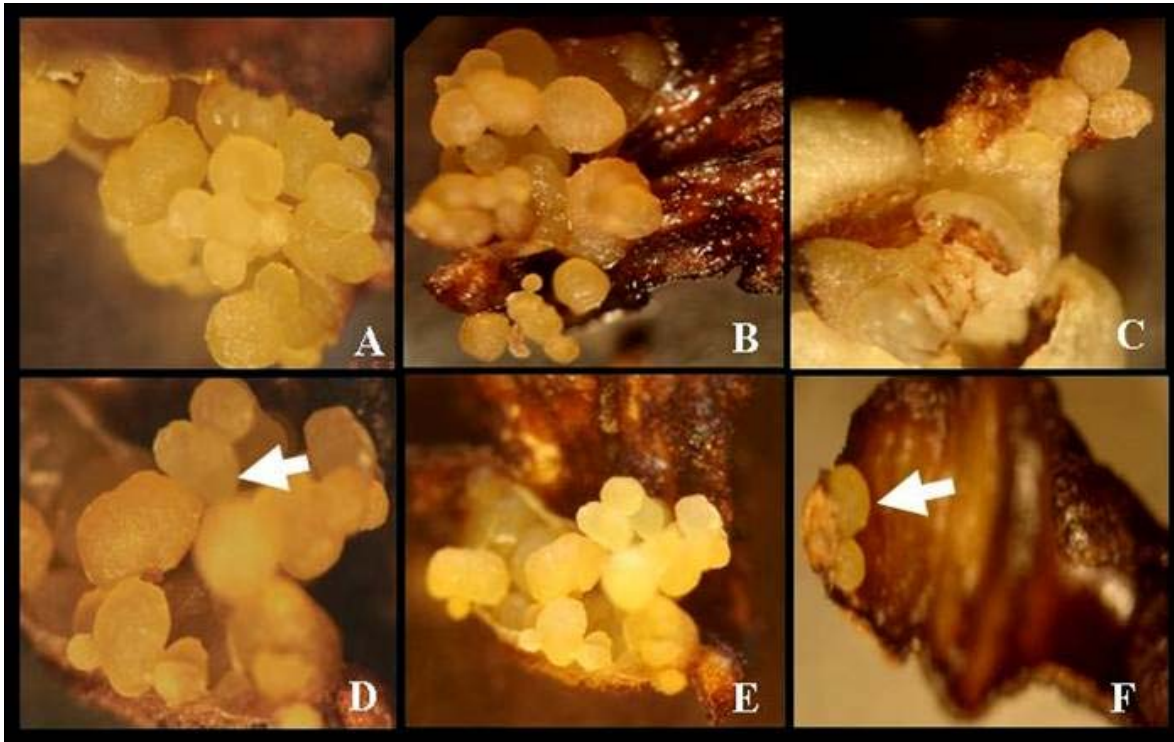


Figura 1. Indução da embriogênese somática a partir de folhas imaturas de dendezeiro. (A) e (B) embriões somáticos obtidos do genótipo GES4 e GES6, sendo cultivados em meio MS com $225 \mu\text{M}$ de Picloram; (C) explantes com embriões somáticos cultivados com 2,4-D; (D) e (E) calos multi-granulares obtidos com Picloram; (F) calos granulares obtidos com 2,4-D.

Experimento 2: Avaliação do potencial de indução de calos embriogênicos em dendezeiro a partir de discos apicais caulinares de plantas jovens.

A formação de calos foi significativamente maior nos tratamentos que continham Picloram, com 8% e 27% de calos formados, nas concentrações de $225 \mu\text{M}$ e $450 \mu\text{M}$, respectivamente (Figura 2 A-E). A região basal, em relação às regiões medianas e apicais, teve um melhor resultado quanto à reposta calogênica. Steinmacher (2005), trabalhando com embriogênese somática em pupunha, a partir de discos foliares, obteve calos embriogênicos com o uso do Picloram e suas concentrações testadas. O uso de 2,4-D na concentração de $225 \mu\text{M}$ também apresentou formação de calo (Figura 2 F), indicando que nessa concentração essa auxina induz a diferenciação de tecidos apicais do caule.

A formação de embriões a partir de células somáticas é uma característica que promove uma eficiente forma de regeneração de plantas *in vitro* (Steinmacher, 2005). Para Guerra et al. (1999), a embriogênese somática apresenta vantagens sobre as demais técnicas de micropropagação, como a capacidade de produzir grande número de embriões num espaço limitado.

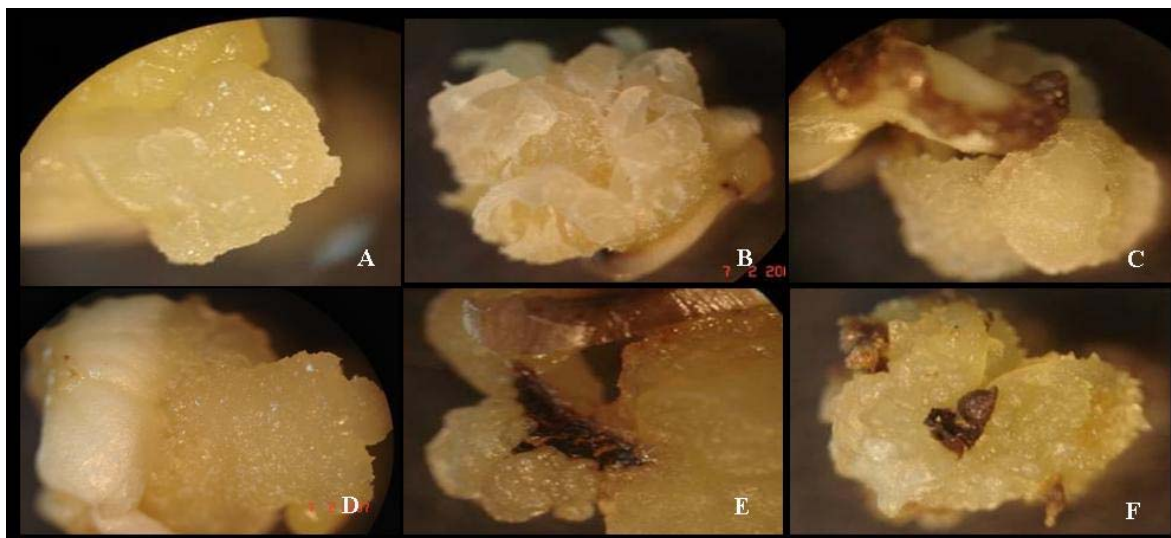


Figura 2. Aspectos morfológicos de calos potencialmente embriogênicos formados a partir de segmentos apicais caulinares de plântulas de dendezeiro. A, B, C e D: Estruturas formadas em meio contendo 450 µM de Picloram. E: Estruturas formadas em meio contendo 225 µM de Picloram. F: Estruturas formadas em meio contendo 225 µM de 2,4-D.

CONCLUSÕES

As estruturas foliares e porções apicais do caule são explantes competentes para indução da embriogênese somática em dendezeiro. O Picloram em altas concentrações demonstra ser uma auxina eficaz para a embriogênese somática em dendezeiro. Os diferentes genótipos de dendezeiro influenciam os processos embriogênicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMMIRATO, P.V. **Embryogenesis**. *In Handbook of plant cell culture* (D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato & Y. Yamada, eds.). Macmillan Publisher Co., New York, p.82-123. 1983.
- CARVALHO, A. R. V.; REIS, V. M. ; BALDANI, V. L. D. O dendê (*Elaeis guineensis* Jacq). **Rio de Janeiro: Embrapa agrobiologia. 25 p. 2001.**
- GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**. Exegetics, Edington. V.1, 555p. 1993.
- GUERRA, M.P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. **Embriogênese somática e sementes sintéticas**. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (eds), **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. V.2, Brasília: SPI/Embrapa, 1999, p.533-568.
- JUAN, A., RODRIGUES A. **Produção de embriões em dendê a partir da cultura de embriões imaturos**. Rev. Bras. Fisiol. Vegetal, 1(1):119-120, 1989.
- MIRAGAYA, J. C. G. **Biodiesel: tendências no mundo e no Brasil**. Informe agropecuário. Minas Gerais, V. 26, n. 229, 2005.
- PEREIRA, J.E.S.; COSTA, F.H.S.; MACIEL, S.A. Indução da embriogênese somática em genótipos de dendezeiro (*Elaeis guineensis*) a partir de explantes foliares. In: 3º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel, 2006, Varginha. **Anais**. Lavras: UFLA, 2006. v.1. p.1-5.
- STEINMACHER, D. A. **Germinação *in vitro*, criopreservação e embriogênese somática em pupunha**. Florianópolis. 124 p. 2005
- VALVERDE, R.; ARIAS, O.; THORPE, T. A. Picloram induced somatic embryogenesis in pejobaye palm (*Bactris gasipaes* H.B.K) **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 10: 149-156 (1987).
- PALAVRAS-CHAVES: *Elaeis guineensis*; embriogênese somática; auxinas; micropropagação.