

REGENERAÇÃO DE PLANTAS DE *ELAEIS OLEIFERA* E DE SEU HÍBRIDO COM *ELAEIS GUINEENSIS* VIA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA¹

LUIS PEDRO BARRUETO CID²

RESUMO - Visando a alcançar a regeneração de palmeiras caiaué (*Elaeis oleifera*) e de seu híbrido com dendezeiro (*Elaeis guineensis*) via embriogênese somática, foram inoculados embriões zigóticos em meio modificado Murashige & Skoog 1962 (MS), mais ácido 2,4 - diclorofenoxiacético (2,4-D) e N⁶ - (Δ^2 - isopentenil) adenina (2iP). A formação de embriões e o seu subsequente crescimento foram obtidos depois de os calos terem sido transferidos para uma sequência de meios MS sem auxina. Diferenças histológicas foram encontradas entre calos primários e secundários. O enraizamento das plântulas foi induzido com ácido naftaleneacético (ANA). As mudas foram colocadas em pré-viveiros, após um curto período sob condições de alta umidade.

PLANT REGENERATION FROM *ELAEIS OLEIFERA* AND OF THE HYBRID OF THIS WITH *ELAEIS GUINEENSIS*, VIA IN VITRO SOMATIC EMBRIOGENESIS

ABSTRACT - Aiming to obtain plantlets regeneration of "caiaué" (*Elaeis oleifera*) plants and of their hybrid with African oil palm plants (*Elaeis guineensis*) via somatic embryogenesis, zygotic embryos were inoculated into modified Murashige & Skoog 1962 (MS) medium, plus 2,4 dichlorophenoxyacetic acid and N⁶ - (Δ^2 - isopentenyl) adenine (2iP). The embryos formation and subsequent shoots growth were obtained after the developed calli were subcultured in a sequence of modified MS media without auxin. Histological differences were found between primary and secondary calli. The rooting of shoots was induced by naphthaleneacetic acid (NAA). The plantlets were put in a prenursery after a short period under high humidity conditions.

Do ponto de vista fisiológico, a embriogênese somática representa uma forma de diferenciação e uma alternativa viável para a regeneração de plantas a partir de embriões adventícios "fac-similes" de embriões zigóticos, quanto à morfologia e capacidade de originar plantas (Reynolds & Murashige 1979, Tisserat 1983). Pelo seu efeito multiplicador (grande número de plantas podem ser regeneradas a partir de um explante), além do alto potencial clonal dos mesmos, a embriogênese somática tem despertado muito interesse na dendeicultura, visando a produção de mudas clonais, troca de germoplasma e suporte prático para alcançar resultados mais rápidos nos programas de melhoramento genético, especialmente no relacionado com a fixação de caracteres da geração F₁ nos cruzamentos de híbridos interespecíficos ou intraespecíficos, ou mesmo, nos retro-cruzamentos entre dendê (*Elaeis guineensis*) e caiaué (*Elaeis oleifera*). Na área das palmáceas, *strictu sensu*, trabalhos sobre cultura de tecido de caiaué não têm sido descritos na literatura e os trabalhos com híbridos têm sido apenas mencionados. No laboratório do CNPDS, as pesquisas de cultura de tecido do caiaué, monocotiledônea arborescen-

¹ Aceito para publicação em 12 de setembro de 1986.
Trabalho realizado com apoio financeiro do Programa de Mobilização Energética (PME).

² Biólogo, M.Sc., Fisiologia Vegetal, Centro Nacional de Pesquisa de Seringueira e Dendê (CNPDS), Caixa Postal 319, CEP 69000 Manaus, AM.

te de alguns biomas amazônicos do Brasil e outras regiões de países tropicais neste continente, prendem-se às suas características de porte baixo, resistência a doenças e certa predominância de óleos não saturados no mesocarpo de seus frutos. Dentro deste mesmo contexto, espera-se que os híbridos mostrem um alto potencial agrônomico e que possam ser propagados através de clones obtidos por embriogênese somática. Por este motivo, vários experimentos relacionados com o aspecto da micropropagação nessas plantas foram realizados, sendo que os resultados de alguns deles são aqui apresentados.

Uma vez extraídas as sementes do calaué (*E. oleifera* (H.B.K.) Cortés) e do híbrido (*E. guineensis* x *E. oleifera*), de seus respectivos endocarpos lenhosos, provenientes de frutos maduros, estas foram lavadas com sabão líquido e depois, em câmara de fluxo laminar, submetidas a uma solução de água sanitária a 15% v/v, durante 15 minutos. Na mesma câmara, após serem as sementes lavadas com água esterilizada e sob condições padronizadas de assepsia, procedeu-se à extração dos embriões com a ajuda de pinças e bisturis. Os embriões foram inoculados (Fig. 1a, b) em frascos contendo 10 ml do meio Murashige & Skoog (1962) modificado, mais ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) e N^6 - (Δ^2 - isopentenil) adenina (2iP), (MS-1). As condições de temperatura e fotoperíodo foram de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ e ausência completa de luz.

Em todos os casos, antes da incorporação do agar, o pH foi ajustado a 5,7 com HCl ou NaOH e, logo após, os frascos contendo estes meios foram autoclavados à pressão de 1 kg/cm^2 durante 15 minutos. Os frascos com carvão ativado, depois de retirados do autoclave, não foram agitados.

Foram realizados cortes histológicos de alguns calos, os quais foram fixados em etanol absoluto 75%, desidratados numa série xilol/etanol, embebidos em parafina líquida, seccionados a $10 \mu\text{m}$ e corados com azul de astra.

Ao redor da quarta semana, após a inoculação nos frascos, começaram a ser visualizados alguns calos a partir dos explantes. Em geral, esses calos tornaram-se incipientes pela parte próxima do embrião ao polo germinativo da semente, aumentando sua intumescência na direção posterior do embrião (Fig. 1c, d). Após cinco a oito semanas, os calos primários alcançaram até 0,5 cm de diâmetro. Apresentaram-se amarelados, compactos, e, em alguns casos, oblongos e estriados. Durante este período, e dependendo do nível de pardamento, os calos foram transferidos para outro meio MS-1. Por volta de dois meses, os calos foram transferidos para outro meio modificado MS carente de 2,4-D, 2iP e carvão ativado (MS-2). A temperatura foi similar, mas o fotoperíodo foi de 8 h luz ($31.0 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Nessa nova condição, os calos primários, não embriogênicos, continuaram a crescer, mas na superfície de alguns deles, paulatinamente, começou a ser perceptível outro tipo de calo (calo secundário), que, a partir do quarto mês após a inoculação, apresentou um aspecto friável, úmido, translúcido e com agregações nodulares, cor creme (Fig. 2a, b). Internamente, estes calos mostraram, através de microscopia ótica, predominância de células parenquimáticas muito vacuoladas, e nas regiões mais periféricas do corte distinguiu-se uma camada de células com núcleos proeminentes, perto da qual foi possível distinguir massas celulares redondas, provavelmente relacionadas com a formação posterior dos embriões somáticos (Fig. 3a, b). Quanto aos calos primários, estes basicamente mostraram elementos fibrosos, vasos xilemáticos e células de grossos contornos (Fig. 3c).

Dos calos secundários ou embriogênicos, originaram-se, estruturas globulares amarelas que posteriormente evoluíram, sem clara sincronização, para formas bipolares de cor branca (Fig. 4a, b), constituindo-se nos embriões somáticos já descritos em outras espécies (Söndahl & Sharp 1977, Jones 1974, Boyes & Vasil 1984, Magnusson & Bornman 1985, Chen et al. 1985). Quando estes calos secundários foram repicados e transferidos para um meio similar a MS-2, exceto o que continha N^6 - benziladenina (BA) e caseína hidrolizada, os embriões "germinaram" aparentemente melhor que no meio MS-2 (Fig. 5a, b). Isoladas as plântulas dos calos e colocadas em MS-2, porém, com carvão ativado, estas evoluíram com um típico aparelho foliar, mas com escasso ou nenhum desenvolvimento radicular. Depois de enraizadas com ácido naftaleneacético (ANA) e MS-2, no qual os

macronutrientes haviam sido reduzidos à metade, as mudas (com quatro meses de idade e aproximadamente 15 cm de altura) foram transferidas para sacos de plástico contendo areia e colocadas temporariamente num ambiente de alta umidade e logo transferidas para solo de textura arenosa e levadas para condições de pré-viveiro (Fig. 6). Nas condições de laboratório, em geral, o híbrido despontou melhor que o caiaué quanto ao crescimento e enraizamento. Entretanto, em alguns híbridos, em presença de alta concentração de ANA, foi observada uma resposta floral (flores femininas e masculinas) e não radicular.

Estes resultados, embora preliminares, constituem subsídios para melhor compreensão da embriogênese somática nestas e em outras palmáceas, objetivando o uso de explantes (folhas, raízes, etc.) coletadas de plantas adultas no campo.

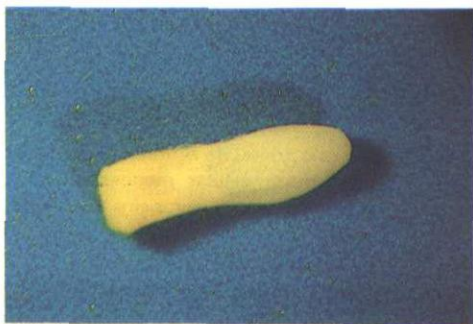


FIG. 1a. Embrião de caiaué. Comprimento 3 mm e aproximadamente x 16.

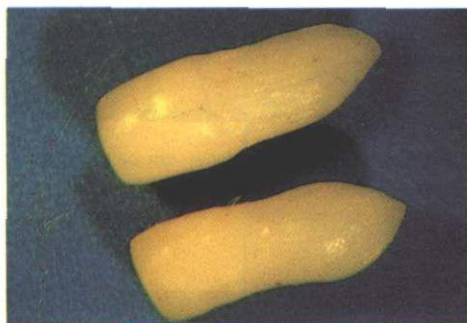


FIG. 1b. Embriões de híbrido. Comprimento 3 mm e aproximadamente x 16.



FIG. 1c. Embrião de caiaué formando calo. Comprimento 4 mm e aproximadamente x 12.



FIG. 1d. Embrião de híbrido formando calo. Comprimento 4 mm e x 10.

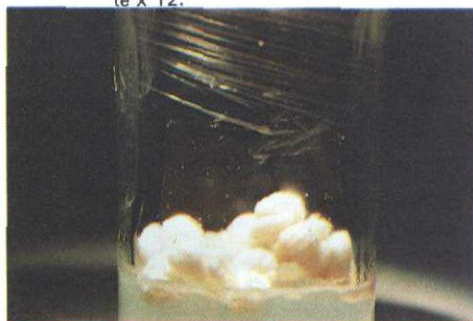


FIG. 2a. Desenvolvimento de calo secundário ou embriogenético em caiaué. Diâmetro aproximado 2 cm.



FIG. 2b. Desenvolvimento de calo secundário ou embriogenético no híbrido. Diâmetro aproximado 1,5 cm.

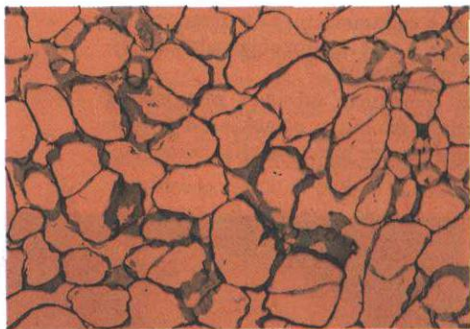


FIG. 3a. Células vacuoladas em calo friável do híbrido. x 400.

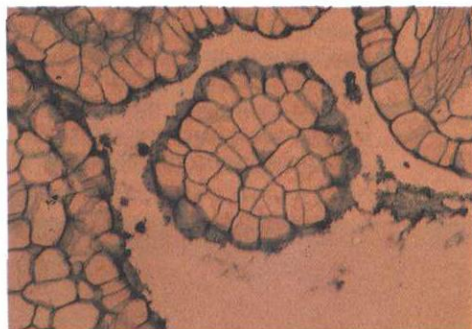


FIG. 3b. No calo friável do híbrido, vista parcial da camada celular monoestratificada e presença de um agrupamento celular. x 400.

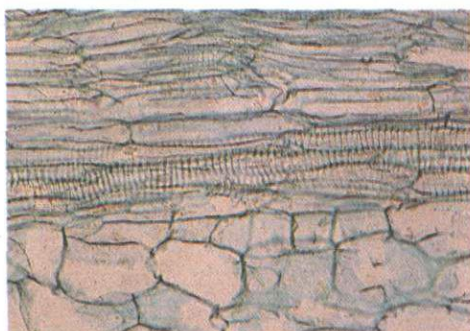


FIG. 3c. Aspecto interno de calo compacto do caiaué mostrando células pouco isodiamétricas e elementos traqueais. x 400.

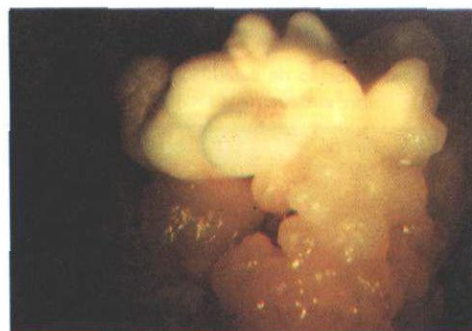


FIG. 4a. Agrupamento de embriões com diferentes níveis de maturação em caiaué. x.10.



FIG. 4b. Agrupamento de embriões com diferentes níveis de maturação no híbrido. x 10.



FIG. 5a. Embriões de caiaué, já "germinados", originando plântulas. Comprimento aproximado 2,5 cm.



FIG. 5b. Embriões de híbridos, já "germinados", originando plântulas. Comprimento aproximado 2,5 cm.

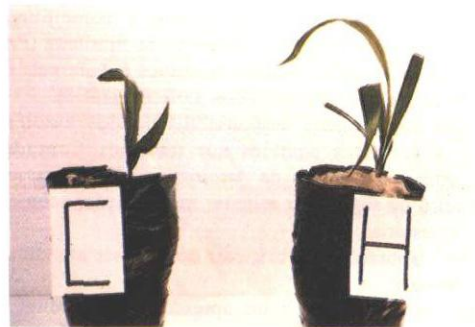


FIG. 6. Aspecto do caiaué (c) e do híbrido (H) já em condições para o pré viveiro. Comprimento aproximado 15 cm a 20 cm.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Marilene M. Braga ex-pesquisadora do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), pela sua colaboração na parte histológica e aos técnicos de laboratório, Srs. José A. de C. Souza e Davi F.S. Costa, pelo trabalho realizado.

REFERÊNCIAS

- BOYES, C.J. & VASIL, I.K. Plant regeneration by somatic embryogenesis from cultured young inflorescences of *Sorghum arundinaceum* (Desv.) Stapf. var. *sudanense* (Sudan grass). *Plant Sci. Lett.*, **35**:153-7, 1984.
- CHEN, T.H.; LAM, L.; CHEN, S.C. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cultured young inflorescences of *Oryza sativa* L. (rice). *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, **4**:51-4, 1985.
- JONES, L.H. Propagation of clonal oil palm by tissue culture. *Oil Palm News*, **17**:1-8, 1974.
- MAGNUSSON, I. & BORNMAN, C.H. Anatomical observations on somatic embryogenesis from scutellar tissues of immature zygotic embryos of *Triticum aestivum*. *Physiol. Plant.*, **63**:137-45, 1985.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, **15**:473-97, 1962.
- REYNOLDS, J.F. & MURASHIGE, T. Asexual embryogenesis in callus cultures of palms. *In Vitro*, **15**(5):383-7, 1979.
- SÖNDAHL, M.R. & SHARP, W.R. High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *coffea arabica* L. *Z. Pflanzenphysiol.*, **81**:395-408, 1977.
- TISSERAT, B. Tissue culture of palms, date a new method to propagate an ancient crop and a short discussion of the California Date Industry. *Principes*, **27**(3):105-17, 1983.