

Embriogênese Somática em Tamareira

Regina Ferro de Melo Nunes¹, Carlos Ferreira Damião Filho² e

Adália Maria Monteiro Rodrigues Rocha³

Introdução

A tamareira *Phoenix dactilifera* L. é uma palmeira do gênero Phoenix, que pode ser propagada de diversas formas: por sementes, rebentos, gemas e por cultivo *in vitro* de seus tecidos. A propagação por cultura de tecidos apresenta algumas vantagens em relação aos métodos convencionais de propagação tais como: a) rapidez e aumento na taxa de multiplicação, b) eliminação de pragas e doenças e auxiliando no melhoramento genético das espécies. Em tamareira, Bhansali & Kaul (1991), verificaram que dentre os métodos de cultivo *in vitro*, a embriogênese somática tem proporcionado bons resultados quanto a regeneração de plântulas, tornando-se o método mais freqüentemente utilizado para essa palmeira. Embriogênese somática é o processo de desenvolvimento de embriões a partir de células somáticas, podendo ser realizado de maneira direta, na qual os embriões se originam diretamente dos tecidos, sem a proliferação do calo e indireta quando o calo é formado, mantido e proliferado antes do desenvolvimento dos embriões. Em ambos os casos o meio de cultura é um fator determinante, onde a presença de auxinas em concentrações variadas, funciona como o indutor da formação dos embriões somáticos. Dentre as auxinas, o ácido 2,4 – Diclorofenoxiacético (2,4-D) segundo Al-Salih et al. (1987) tem promovido em tamareira a indução de embriões somáticos, quando utilizado em concentrações variando de 10 a 100 mg/l. Comparando-se com o ácido **Naftalenoácético** (NAA), o 2,4-D tem mais implicação na freqüência de anormalidades. Na cultivar de tamareira Deglet Nour, baixas doses de 2,4-D (1,0 mg/l) e de NAA (10 mg/l) foram suficientes para induzirem calos embriogênicos (Falcone & Marcheschi, 1988). Normalmente no processo propagativo *in vitro*, qualquer parte da planta pode ser utilizada como explante,

Nazeri et al. (1993) obtiveram a formação de embriões de tamareira nas variedades “Estamaram” e “Kabkab” utilizando extremidades de caules, gemas laterais e parte de folhas jovens quando cultivaram sobre meio de Murashige e Skoog (1962). Matter (1986) obteve embriões nas cultivares de tamareira Barhee e Hallawy utilizando ápices meristemáticos cultivados em meio de Murashige e Skoog (1962) com as auxinas NAA e 2,4-D.

Na cv. Khadrawi, Sharma et al (1984) obtiveram embriões e plantas viáveis a partir de calos de gemas auxiliares e extremidade de ápices caulinares.

¹ Eng. Agr. Ph.D. Pesquisador da Embrapa Semi-Árido, Caixa Postal 23, 56300-000, Petrolina-PE;

² Eng. Agr. Ph.D. Professor da FCAVJ – Departamento de Biologia Aplicada a Agropecuária.

³ Eng. Agr. M.Sc. Pesquisador da EBDA – Juazeiro-BA, E-mail: ebdajua@lkn.com.br

A embriogênese somática é influenciada pelo tipo de luz incidente na cultura. Calero et al (1990), estudaram os efeitos da luz vermelha, azul e branca em explantes de tamareira cultivados sobre o meio de Shenck & Hildebrant (1972) e verificaram que a luz vermelha, isoladamente foi efetiva nesse processo, quando comparada com os efeitos da luz azul, branca e do escuro.

Objetivou-se com este trabalho comparar o potencial de obtenção de propágulos de tamareira via embriogênese somática nas variedades Medjool, Zahidi, Deglet Nour, Khadrawy e Halawy, utilizando meio de cultura definido e em interação com luz vermelha.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido inicialmente no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas do Departamento de Biologia Aplicada a Agropecuária e, numa Segunda etapa, em condições de ripado, na Fazenda Experimental de Horticultura, ambos departamentos da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – UNESP. Utilizou-se como explantes sementes das cinco variedades de tamareira, (Medjool, Zahidi, Deglet Nour, Khadrawy e Halawy) indicadas como mais importantes e de cultivo disperso mundialmente. As sementes foram obtidas de frutos maduros, lavadas em água corrente e secadas à sombra. As mesmas foram adquiridas na Embrapa – Semi-Árido em Petrolina-PE.

Foram obtidas 50 plântulas, de cada variedade, utilizando o processo descrito por Tisserat (1982). Tais plântulas foram fontes de explantes, constituídos pelos embrióforos (“bainhas” cotiledonares). Estes foram excisados na sua porção terminal em pedaços de aproximadamente 0,5 cm de comprimento, contendo o eixo embrionário ou parte dele. Os explantes foram esterilizados superficialmente com a imersão em solução aquosa de etanol a 70%, com enxágües em água destilada e, posteriormente imersos (sob agitação contínua) em solução aquosa de alvejante comercial clorado a 20%, durante 10 minutos. Na câmara asséptica, foram enxaguados com água esterilizada, e inoculados individualmente no meio da cultura Schenck & Hildebrandt (1972) suplementado com 1,0 mg/L de 2,4-D; 0,1 mg/L de benziladenina (BA) e 10 g/L de sacarose. O meio foi semi solidificado com ágar (0,8% p/v) e o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. Distribuiu-se alíquotas de 10 ml do meio de cultura em tubos de vidro esterilizados. Para cada variedade, foram feitas 50 repetições (50 tubos de cultura) mantendo-se tal número por substituição dos frascos eventualmente contaminados.

Após a incubação, os explantes foram imediatamente submetidos a luz vermelha (655 ± 20 nm). Como fonte de luz foram utilizadas três lâmpadas do tipo GRO-lux (que emitem 39,92% na faixa do vermelho, 630-700nm), montadas em caixa provida de janela. Tal janela foi coberta por camadas de papel celofane vermelho, em número suficiente para aumentar e selecionar a emissão de luz na faixa do vermelho, em 655nm. Para determinação da luz emitida, foi utilizado um quantômetro (sensor de quantum), marca QSPAR, da Hansatech, específico para a região do

vermelho. O tratamento com luz vermelha foi fornecido durante duas semanas. Após esse período, os calos obtidos dos explantes, foram transferidos para o meio de cultura de Murashide & Skoog (1962), sem reguladores de crescimento, para indução dos embriões somáticos. Tais culturas foram mantidas sob luz (3000 lux), com fotoperíodo de 16 horas, a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, por duas a três semanas. Os embriões somáticos, foram transferidos para novo meio de cultura de Murashide & Skoog (1962) suplementado com 2 mg/L de cada um dos reguladores de crescimento: NAA; ácido naftoxiacético (NOA) e BA, objetivando a formação de plântulas com raízes e caules a partir dos embriões. Após três semanas nesse meio, as plântulas foram submetidas à aclimação, com o aumento da temperatura de 28°C para 32°C . Em seguida foram removidas dos tubos de cultura, lavadas em água corrente e tratadas por meio minuto com carbendazim (0,2%) e com estreptomicina (0,1%), e novamente enxaguadas com água destilada. Antes do plantio em embalagens plásticas (30x15x10cm), contendo mistura de terra, areia e matéria orgânica, na proporção de 1:1:1, previamente esterilizada, manteve-se as plantas em condições de alta umidade (70-90%), cobrindo-se as embalagens com sacos plásticos. Após dois meses, na condição *ex vitro*, as plantas foram transferidas para o campo. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado em parcelas subdivididas no “tempo” tendo como parcelas as cinco variedades de tamareira estudadas e como subparcelas os oito tempos de germinação. Os parâmetros de avaliação foram: porcentagem de germinação e comprimento do embrióforo apresentados na Tabela 1.

Resultados e Discussão

Para a porcentagem de germinação não houve interação significativa entre os fatores analisados variedades X tempo de germinação. Entretanto, houve diferença significativa na porcentagem de germinação para as diferentes variedades sendo a cultivar Zahidi a que apresentou menor porcentagem (Tabela 1). Observações semelhantes foram registradas por Tisserat (1979 a) e Nasir et al. (1994) com essas mesmas variedades.

Com relação ao número de raízes secundárias a variedade Medjool apresentou o melhor resultado, porém quanto ao comprimento dessas raízes a cultivar Deglet Nour mostrou-se superior não diferindo estatisticamente da Medjool e Zahidi (Tabela 2), estes resultados evidenciaram que estas variedades são importantes ao trabalho de multiplicação da tamareira e estão de acordo com Rhiss et al. (1979).

Tabela 1. Porcentagem de germinação e comprimento do embrióforo em variedades de tamareira. Jaboticabal-SP, 1999.

Variedades	Germinação (%)	Comprimento do embrióforo (cm)
Medjool	70,7 a	13,55 b
Zahidi	43,0 b	13,11 b
Deglet Nour	70,6 a	13,69 ab
Kdadrawy	53,4ab	14,72 a
Halawy	50,0ab	14,54 a

+ Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

A análise estatística revelou diferença entre as variedades quanto ao número de raízes no processo de multiplicação *in vitro* (Tabela 2). Quanto maior o tempo que permanece no cultivo há maior comprimento de raízes, porém o número de folhas não alterou. Estes resultados corroboram afirmações feitas por Duarte (1982) e Pierik (1990) que encontraram alto número de raízes em variedades cultivadas em um período de mais tempo de cultivo *in vitro*.

Tabela 2. Número médio de raízes secundárias (NRS), comprimento de raiz primária, (CRP) comprimento de raízes secundária (CRS) e número e comprimento de folhas (NF e CF) de tamareira, Jaboticabal-SP, 1999.

Variedades	NRS	CRP	CRS	NF	CF
Medjool	2,28 a ⁺	4,90 ab	24,30ab	1,28 a	11,65 a
Zahidi	1,60 b	3,87 b	22,17ab	1,19 a	9,95 ac
Deglet Nour	1,92 b	4,10 b	26,55 a	1,20 a	10,80ab
Kdadrawy	1,58 b	5,75 a	21,28 b	1,19 a	9,45 c
Halawy	1,83 b	3,95 b	20,55 b	1,22 a	9,40 c

+ Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Não houve diferença significativa para o número de folhas entre as variedades (Tabela 2), Porém elas diferiram quanto ao comprimento de folha. A variedade Medjool apresentou maior comprimento porém não diferiu da Deglet Nour. Quanto ao comprimento de raízes primárias e secundárias as variedade Khadrawy e Deglet Nour apresentaram os maiores comprimentos (Tabela 2).

Conclusões

As variedades Medjool e Deglet Nour apresentaram maiores percentuais de germinação. O poder germinativo das sementes foi praticamente acima de 50%.

A maior parte das variedades de tamareira estudadas mostraram-se aptas para a formação de mudas “in vitro”, com destaque para Medjool e Deglet Nour.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-SALIH, A.A., BADER, S.M., JARRAH, A.Z., AL-DADI, M.T. A comparative morphological and anatomical study of seed embryo culture derived seedling of Phoenix dactylifera L. **Date Palm Journal**, Bagdad, v.4, n.2, p.137-52, 1987.

- BHANSALI, R.R.; KAUL, R.K. Into future: date through tissue culture. **Indian Horticulture**, New Delhi, v.36, n.3, p.6-10, 1991.
- CALERO, N.; BLANC, A.; BENDADIS, A. Effects conjugués de la BAP e de la lumière rouge sur l'embryogénese somatique dans des gaines cotyledonaires de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) en culture "in vitro". **Bulletin de la Société Botanique de France, Lettres Botaniques**, Paris, v.137, n.1, p.13-19, 1990.
- FALCONE, A.M.; MARCHESCHI, G.L. Embriogenini somatica "in vitro" da tessuti de palma de datters (*Phoenix dactylifera* L.) resultati peliminari. **Revista de Agricultura Subtropical e Tropicale**, Florence, v.82, n.1/2, p.379-389, 1988.
- MATTER, A.A. "in vitro" propagation of *Phoenix dactylifera* L.. **Date Palms Journal**, Barsa Bagdad, v.4, n.2, p.137-152, 1986.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tabaco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen. v.15, n.7, p.473-497, 1962.
- NASIR, I.A.; KHAN, M.A.; BUTT, S.J. In vitro culture of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) through excised embryo. **Sarhad Journal of Agriculture**, Bagdad, v.10, n.6, p.633-637, 1994.
- NAZERI, D.; KHOSHKAN, D.; AFSHARI, M.; SHAKIB, A.M.; MASIDI, E. Somatic embryogenesis in date palm varieties Estamaran and Kabkab. **Seed and Plant**, Teerã, v.8, n.3/4, p.16-20, 1993.
- SCHENK, R.U. HILDERBRANDT, A. Medium and tecniques for induction and growel of monocotyledonous and dicotyledonous plant dell cultures. **Canadian Journal of Botany**, n.50, p.199-204, 1972.
- SHARMA, D.R.; DAWRA, S.; CHOWDHURY, J.B. Somatic embryogenesis and plant regeneration in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Khadrawy through tissue culture. **Indian Journal of Experimental Biology**, Hissar, v.22, n.11, p. 596-598, 1984.
- TISSERAT, B. Factors involved in the production of plantlets from date palm callus cultures. **Euphytica**, Wageningen, v.31, n.1, p.201-214, 1982.
- TISSERAT, B. Propagation of date-palm (*Phoenix dactylifera* L.) "in vitro". **Journal Experimental Botany**, New York, v.30, n.119, p.1275-1283, 1979.