

## ARTIGO



## AUTORES:

Joseane de Nazaré  
Oliveira Cardoso<sup>1</sup>

Vicente Savoniti  
Miranda<sup>2</sup>

Oriel Filgueira de Lemos<sup>3</sup>

Iwanne Lima Coelho<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Doutoranda, Universidade Federal Rural da Amazônia, Ufra, Av. Tancredo Neves, 2505, 66077-530, Belém, Pará, Brasil.

<sup>2</sup> Universidade Federal Rural da Amazônia, Ufra, 66077-530, Belém, PA, Brasil.

<sup>3</sup> Embrapa Amazônia Oriental, Av. Dr. Enéas Pinheiro, s/n, Marco, 66095-100, Belém, Pará, Brasil.

Recebido: 03/03/2010

Aprovado: 17/11/2010

## AUTOR CORRESPONDENTE:

Joseane de Nazaré Oliveira  
Cardoso  
E-mail: josi.card@yahoo.com.br

## PALAVRAS-CHAVE:

Cultura de tecidos,  
*Elaeis guineensis*,  
*Elaeis oleifera*,  
 Regeneração in vitro.

## KEY WORDS:

*Elaeis guineensis*,  
*Elaeis oleifera*,  
 Tissue culture,  
 Regeneration in vitro

## Obtenção de plântulas de híbridos de dendezeiro por cultivo in vitro

### Growing hybrid oil palm seedlings in vitro

**Resumo:** Este trabalho teve como objetivo aplicar técnicas de cultura de tecidos em diferentes híbridos de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) para a conversão in vitro de embriões zigóticos em plântulas para produção de mudas viáveis para serem disponibilizadas no Estado do Pará. O experimento foi realizado na Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA. A metodologia foi a aplicação de práticas assépticas de isolamento embrionário, cultura de embriões, conversão em plântulas e aclimação destas. Dezesete híbridos foram submetidos a desinfestação e assepsia, com posterior inoculação nos meios de cultura MS, ½ MS, Y3 e ½ Y3. Os frascos inoculados foram dispostos em sala de cultivo sob fotoperíodo de 16 h luz dia<sup>-1</sup>, com intensidade luminosa de 25 μmol s<sup>-1</sup> e temperatura de 25 ± 3 °C. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado em fatorial 3 x 4. Após avaliação da germinação e crescimento dos embriões, quanto à oxidação os genótipos CN 470, nos tratamentos MS e 1/2 Y3 não apresentaram oxidação, e esta apresentou-se mais adequada para o desenvolvimento do comprimento de raiz. Quanto ao genótipo indicado para a conversão de embriões zigóticos de híbridos de dendezeiro em plântulas viáveis à aclimação, em extrato de vermiculita e solução nutritiva, o CN 514 em meio Y3 foi o mais viável. Aos três meses foi possível a conversão de embriões de híbridos de dendezeiro até a formação de plântulas.

**Abstract:** This study aimed to apply the techniques of tissue culture to different hybrids of oil palm (*Elaeisguineensis*Jacq.) in order to convert in vitro cultures of zygotic embryos into viable seedlings to be made available in the Brazilian State of Pará. The experiment was carried out at EmbrapaAmazônia Oriental, Belém and involved the practical application of aseptic isolation of embryonic, embryo cultures, conversion into plantlets and acclimatization of these. Seventeen hybrids were subjected to disinfection and sterilization with subsequent inoculation in MS, ½ MS, ½ Y3 and Y3. Inoculated vials were placed in the culture room under a photoperiod of 16 h of daylight with light intensity of 25 μmol s<sup>-1</sup> and temperature of 25 ± 3 °C. The experimental design was completely randomized using a 3x4 factorial. After evaluation of germination and growth of embryos and the oxidation of CN 470 genotypes, the treatments and 1/2 Y3 MS showed no signs of oxidation and the latter proved to be the most suitable for the development of root length. It was observed that the genotype best suited for the conversion of zygotic embryos of hybrid oil palm seedlings into plants viable for oil extraction acclimatized to vermiculite and nutrient solution was 514 CN Y3. It was possible to convert oil palm hybrid embryos from the age of three months up until the formation of plantlets.

## 1 Introdução

Na região amazônica, ocorre o caiaué (*Elaeis oleifera*), ou dendê nativo, que se estende às zonas tropicais do norte da América do Sul e na América Central. Esta espécie produz pouco óleo, mas tem sido importante na hibridação com *E. guineensis*, na obtenção de cruzamentos resistentes a determinadas doenças (VEIGA, 2005). No entanto, o agro-negócio do dendê movimenta cifras da ordem de US\$ 9 bilhões/ano, gerando mais de 250.000 empregos diretos, só na zona rural Agriannual (2008), o que denota a importância desta cultura para a Amazônia.

No Brasil, apenas no Estado do Pará estão concentrados aproximadamente 85% do agronegócio, representando, assim, a principal matriz para produção nacional de óleo de palma, cuja produção desponta entre 4.400 e 6.600 litros por ha ano<sup>-1</sup>, valores considerados altos em áreas de produção familiar, tornando-se viáveis quando se trabalha com projetos de assentamento e dos seringueiros, de tal forma que possam gerar empregos diretos e indiretos nestas regiões (VALOIS, 1997).

No Estado do Pará, o dendezeiro representa a principal matriz energética para produção de óleo vegetal, além de possuir maior produção por produtores familiares. Outra opção de aproveitamento do dendê está no biodiesel, cuja base de produção é o óleo vegetal oriundo da mamona, algodão, soja, girassol, canola, babaçu, pequi, milho, entre outras oleaginosas, e o próprio dendê. O biodiesel é uma nova alternativa econômica desejável, por se tratar de um combustível absolutamente renovável e menos agressivo ao meio ambiente (VALOIS, 1997).

Mesmo com tantas aplicabilidades viáveis e sustentáveis ao plantio de dendê, vale ressaltar a limitação de expansão da cultura proporcionada pelas infestações acentuadas de pragas e de doenças (MEDEIROS; SANO, 2008). Este entrave pode ser sanado com alternativas de melhoramento genético para a obtenção de híbridos interespecíficos (caiaué x dendezeiro), mesmo apresentando produção de biomassa 20% menor que o dendezeiro (BARCELOS, 2005).

Esta alternativa poderá ser a única forma de viabilizar a manutenção da espécie nas áreas afetadas por doenças como o amarelecimento fatal (AF), pois a ampla variabilidade presente na espécie americana permite que se possa programar a obtenção de híbridos, sua avaliação e seleção em campo.

Portanto, a técnica do cultivo *in vitro* permitirá o resgate de embriões de cruzamentos intra e interespecíficos, além da geração de variabilidade genética por mutações induzidas e a seleção precoce de material dentro dos programas de melhoramento genético da cultura, conforme Ledo et al. (2002), além do aumento da taxa de formação de plântula dos híbridos interespecíficos, num percentual germinativo de hibridização de *E. guineensis* e *E. oleifera*, entre 25% e 30%, segundo Chia (2009).

O objetivo deste trabalho foi aplicar técnicas de cultura de tecidos em diferentes híbridos de dendezeiro para a conversão “*in vitro*” de embriões zigóticos em plântulas para produção de mudas viáveis.

## 2 Material e Métodos

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia e Recursos Genéticos da Embrapa Amazônia Oriental, utilizando-se sementes de híbridos de dendezeiro provenientes do banco de germoplasma do Programa de Melhoramento Genético de Dendê da Embrapa Amazônia Ocidental- Amazonas.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com arranjo fatorial com três híbridos e quatro meios de cultura, totalizando 12 tratamentos com nove repetições cada, sendo um frasco por repetição, com três embriões por frasco.

As sementes dos 17 híbridos utilizados (CN 470, CN 514, CN 353, CN 535, CN 540, CN 883, CN 830, CM 834, CN 871, CM 609, CM 680, CM 543, CM 230, SM 673, CM 460, CM 235 e CM 798) foram inicialmente lavadas em água corrente com detergente neutro, e imersas no fungicida Derosal 0,2%, por 20 min. Após desinfestação, as sementes foram quebradas manualmente, com o auxílio de um martelo, para a retirada do tegumento e, posteriormente, desinfetadas em câmara de fluxo laminar, através de imersão em álcool etílico a 70%, por um minuto, em solução de NaClO a 2,5%, por 20 min sob agitação, lavadas cinco vezes e imersas por vinte e quatro horas em água destilada e autoclavadas. Após esse período, os embriões foram excisados e inoculados em frascos de 300 mL, contendo 40 mL dos meios de cultura MS (MURASHIGUE; SKOOG, 1962) e Y3 (EEUWENS, 1976), completo e com metade de sais (MS, ½ MS, Y3 e ½ Y3), suplementado com 0,2 % de carvão ativado, 0,2% de sacarose, 0,17 g L<sup>-1</sup> de tampão fosfato monobásico de sódio, sendo solidificado com 0,7% de ágar e pH

ajustado para 5,8.

Os frascos contendo os embriões inoculados foram levados para a sala de crescimento no escuro, durante quatro semanas. Após esse período, os frascos foram transferidos para a sala de cultivo, sob fotoperíodo de 16 h luz dia<sup>-1</sup>, com intensidade de luz de 25 μmol s<sup>-1</sup> cm<sup>-2</sup> e temperatura de 25 ± 3 °C.

Foram avaliadas as porcentagens de germinação, contaminação e oxidação, duas vezes semanalmente, durante 12 semanas. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, com comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

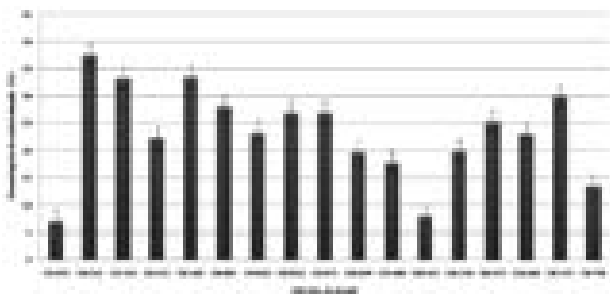
**Tabela 1-** Resumo da análise de variância para germinação (GER), oxidação (OXI) e contaminação (CONT) dos híbridos CN 514, CM 353 e CN 470 de dendê, submetidos a diferentes meios de cultura. Embrapa, Belém-PA, 2010.

Fonte de variação	Valores de F			
	GL	GER	OXI	CONT
Híbrido	2	50,9**	6,4**	12,6**
Meio de Cultura	3	26,2**	2,6 <sup>NS</sup>	3,6*
Híbrido x Meio	6	24,3**	6,3**	5,4**
Resíduo	96	354,9	414,1	792,1
C.V.	-	38,15	188,4	124,9
Média Geral	-	49,4	10,8	22,5

\*, \*\* e <sup>NS</sup> - Significativos a 0,05 e 0,01 de probabilidade e não significativo, respectivamente, pelo teste F.

### 3 Resultados e Discussão

Os tratamentos com o híbrido CN 470 não apresentaram oxidação; no entanto, no híbrido CN 353, seguido pelos CN 514 e CN 540, observaram-se as maiores porcentagens de oxidação (Figura 2). A não ocorrência de oxidação no híbrido CN 470 sugere que há diferença entre os híbridos quanto à exsudação de compostos fenólicos, que são os responsáveis pelo combate ao envelhecimento celular (radicais livres); portanto, são responsáveis pela atividade antioxidante de diversos vegetais.

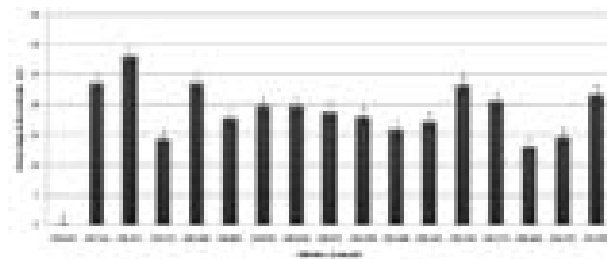


**Figura 1** – Média das porcentagens de contaminação de embriões zigóticos de híbridos de dendeeiro inoculados *in vitro* em diferentes meios de cultura.

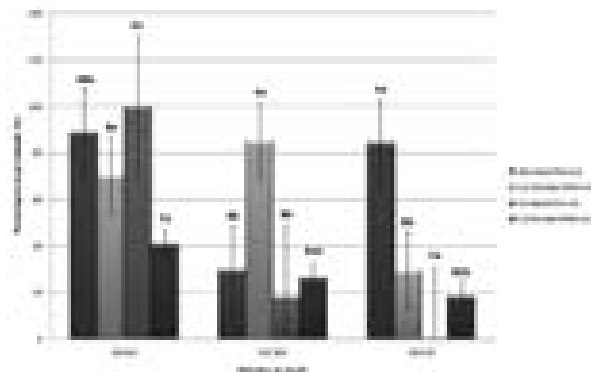
A resposta obtida com o híbrido CN 470, em que não ocorreu oxidação, demonstra que há diferença entre os genótipos quanto à exsudação de compostos fenólicos e, conseqüentemente, do fenômeno da oxidação.

Cavalcante (2001), trabalhando com a viabilidade de pólen *in vivo* e *in vitro* em genótipos de açaieiro (*Euterpe oleraceae*), demonstrou a ausência de oxidação em genótipos inoculados, utilizando a concentração de 0,2% de carvão ativado com solução de Baker em meio de cultura. Dessa forma, mostra-se a eficácia do carvão ativado como agente anti-oxidante, que, segundo Teixeira (1993), apresenta cargas residuais capazes de adsorver substâncias fenólicas ou seus produtos de oxidação, as quinonas, evitando com isso o desencadeamento do processo oxidativo *in vitro*.

Os embriões que não sofreram processos de oxidação e de contaminação (Figura 2) desencadearam o processo de germinação, que oscilou entre 0 e 100% (Figura 3), dependendo do tratamento. Contudo, a maior porcentagem de germinação ocorreu com o híbrido CN 514 e foram em ordem decrescente, enquanto o genótipo CN 353 obteve o melhor resultado no tratamento 1/2 MS, seguido dos tratamentos 1/2 Y3 e MS (Figura 2).



**Figura 2** – Média das porcentagens de oxidação de embriões zigóticos de híbridos de dendeeiro em diferentes meios de cultura.



**Figura 3** - Média\* das porcentagens de germinação de embriões zigóticos de híbridos de dendeeiro inoculados *in vitro* em diferentes meios de cultura. Letras maiúsculas e minúsculas comparam os híbridos (CN 514, CM 353 e CN 470), quando relacionados com os três meios de cultura estudados.

O híbrido CN 470, com o tratamento MS obteve o melhor resultado, quando comparado com os outros tratamentos avaliados, sendo que neste tratamento a percentagem de germinação foi de 85,18%, muito acima dos outros meios de cultura referentes ao mesmo híbrido. Por outro lado, no híbrido CN 470 os tratamentos que obtiveram os menores resultados foram o 1/2 MS e 1/2 Y3, não apresentando no tratamento Y3 germinação de nenhuma planta (Figura 3).

Estes resultados estão de acordo com Alves (2007), em seus estudos com embriões zigóticos de dendezeiro, em que as menores taxas de germinação ocorreram no meio de cultura composto por Y3 suplementado com 0,17 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> g L<sup>-1</sup>.

Tomlinsom (1960) e Lorenzi (1996) evidenciam em embriões zigóticos de *E. guineensis*, o tipo pisífera de dendê, cujo desenvolvimento foi rápido, em plântulas, quando cultivado em meio contendo carvão ativado adicionado aos meios MS e Y3 e suas respectivas metades.

Segundo Fantini Junior e Graça (1990), a superioridade genética de um híbrido para uma determinada característica pode ser revelada quando esse híbrido é cultivado em determinados meios nutritivos associadas com o NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,17g L<sup>-1</sup>, ou seja, a resposta de explantes em um sistema de cultura de tecidos, depende do genótipo do material colocado em cultura. Este trabalho condiz com o de Handley (1995), que mostrou resposta a um determinado sistema de cultura de células dependente do genótipo.

Portanto, os três genótipos que germinaram demonstraram a superioridade genética perante os demais genótipos inoculados, caracterizando a interação genótipo-ambiente.

#### 4 Conclusões

Os tratamentos MS e 1/2Y3 não apresentaram oxidação no híbrido CN 470 em nenhum dos tratamentos avaliados. Este mesmo híbrido não apresentou nenhum processo de contaminação em nenhum dos tratamentos.

O híbrido mais indicado para a obtenção de plântulas de híbridos de dendezeiro pela propagação *in vitro* foi o CN 514.

Aos três meses foi possível a conversão de embriões de híbridos de dendezeiro até a formação de plântulas.

#### Referências

- AGRIANUAL. *Anuário da Agricultura Brasileira*. São Paulo: Fnp Consultoria e Comércio, 2008, p.46-47.
- ALVES, S.A.O. *Resgate de embriões in vitro de híbridos de dendezeiro*. 2007, 60f. Dissertação (Mestrado em Biologia Tropical). Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, 2007.
- AMBLARD, P.; NOIRET, J.M.; KOUMÉ, B.; POITIER, F.; ADON, B. Performances comparées des hybrides sinterespécifiques set du matériel commercial *E. guineensis*. *OCL*, v.2, n.5, p.335-340, 1995.
- BARCELOS, E.; NUNES, C.D.M.; CUNHA, R.N.V. da. Melhoramento genético e produção de sementes comerciais de dendezeiro. In: VIEGAS, I.J.; MÜLLER, A.A. *A cultura do dendezeiro na Amazônia brasileira*. Belém: Embrapa Amazônia Oriental. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2005. p.145-174.
- CAVALCANTE, A. da S.L. *Resposta morfo genética in vitro de acaizeiro (Euterpe oleracea Mart.) e de cupuaçuzeiro (Theobroma grandiflorum (Wild. ex Spreng.) Schum.)*, 2001. 124f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2001.
- CHIA, GILSON SANCHEZ; R.L. VIEIRA; R.N.V. CUNHA; R.N.C ROCHA. Germinação in vitro de pólen de híbridos interespecíficos entre o caiaué e o dendezeiro. *Ciência Rural, Santa Maria*, v. 39, n.5., 2009.
- EEUWENS, C.J. Mineral requirements for growth and callus initiation on tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera*) and cultured in vitro. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 36, p. 23-28, 1976.
- FANTINI JUNIOR, M.; GRAÇA, M.E.C. Propagação in vitro de *Eucalyptus saligna*. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 6., Campos do Jordão. *Anais...*, 1990 São Paulo: Sociedade Brasileira de Silvicultura, p.373-378.
- INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS. *Taxas de desflorestamento obtidas por classificação de 207 imagens*, 2004.
- LEDO, A.S.; LAMEIRA, O.A.; BENBADIS, A.K.; MENEZES, I.C.; OLIVEIRA, M.S.P.; MEDEIROS-FILHO, S. Somatic embryogenesis from zygotic embryos of *Euterpe oleracea* Mart. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.24, p.601-603, 2002.
- LORENZI, H. (Coord.). *Palmeiras no Brasil: exóticas e nativas*. Nova Odessa: Plantarum, 1996. 303p.
- MEDEIROS, J.S.; SANO, E. Análise multitemporal de imagens digitais do Landsat TM na detecção de áreas afetadas por ataques de lagartas (*Sibine fusca*) na cultura de dendê (*Elaeis guineensis*). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE SENSORIAMENTO REMOTO, 5. Natal, 11-15 outubro, 1988. *Anais...* São José dos Campos: Inpe, 2008.
- MULLER, A. A. *Curso sobre a cultura do dendezeiro (Elaeis guineensis jacq)*. Belém, 1992. 55p. MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised médium for rapid growth and

bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, v.15, p.473-497, 1962.

OOI, S.C.; SILVA, E.B.; MÜLLER, A.A.E.; NASCIMENTO, J. Oil palm genetic resources – native *E. oleifera*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 16, n.3, p.385-395, 1981.

SURRE, C.; ZILLER, R. *La palmera de aceite*. 2 ed. Rio de Janeiro, 1969, 264p. (Editorial Blume, Collection Agriculture Tropical).

TEIXEIRA, J.B.; SÖNDAHL, M.R.; KIRBY, E.G. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of oil palm. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v.34, p.227-233, 2003.

TOMLINSON, P.B. Essays on the morphology of palms; germination and seedlings. *Principes*, v.4, n.2, p. 56-61, 1960.

TRINDADE, H.M. *O anel vermelho do dendezeiro e do coqueiro*. Belém: Embrapa-CPATU, 1995. 17p. (Embrapa-CPATU. Documentos, 60).

VALOIS, A.C.C. *Comunicado técnico da cultura do dendê na Amazônia*, 1997. 7p.

VAN SLOBBE, W.G. *Amarelecimento fatal: final report*. Belém: Denpasa, 1991. 100p.

VEIGA JÚNIOR, A.S. *Políticas públicas na agroindústria do dendê na visão do produtor*. Belém, 2005. 24p.