

ORGANOGENESE DIRETA DE *Phoenix dactylifera* L. VIA PECÍOLO COTILEDONAR¹

Najara Maria de Sena Costa² e Magdi Ahmed Ibrahim Aloufa³

ABSTRACT

DIRECT ORGANOGENESIS IN *Phoenix dactylifera* L.
THROUGH COTILEDONAR PETIOLE

There is much interest with respect to the success of the application of tissue culture for propagation of palm family members. Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) is originary from the Middle East, where climate is hot and dry, and due to its botanical characteristics constitutes a good option for cultivation of adapted fruits to Brazilian Northeast. This study had as objective to test 6-Benzilaminopurine (BAP) and indole-3-acetic acid (IAA) growth regulators for date palm micropropagation by direct organogenesis, using Khadrawy cultivar. Cotyledonar petioles were inoculated in MS medium supplemented with four combinations of IAA and BAP, on equal concentrations (0 mg.L⁻¹, 0.5 mg.L⁻¹, 1.0 mg.L⁻¹ and 2.0 mg.L⁻¹). The hormonal concentrations used did not propitiate the multiple buds, but showed relative efficiency in aerial parts and primary roots differentiation, contributing for *in vitro* conservation strategies of this species.

KEY WORDS: date palm, regeneration, growth regulators.

RESUMO

Existe hoje bastante interesse com respeito ao sucesso da aplicação da cultura de tecidos para propagação de membros da família das palmeiras. A tamareira (*Phoenix dactylifera* L.) é uma planta originária do Oriente Médio, cujo clima é quente e árido, e devido aos seus caracteres botânicos constitui-se numa boa opção para a cultura de frutas adaptadas ao Nordeste brasileiro. Este trabalho teve como objetivo testar os hormônios ácido indolacético (IAA) e 6-benzilaminopurina (BAP) com a finalidade de micropropagar a tamareira por organogênese direta, utilizando a cultivar Khadrawy. Pecíolos cotiledonares foram inoculados em meio MS suplementado com quatro combinações de BAP e IAA, em iguais concentrações (0 mg.L⁻¹, 0,5 mg.L⁻¹, 1,0 mg.L⁻¹ e 2,0 mg.L⁻¹). As concentrações hormonais utilizadas não propiciaram a formação de brotos, mas mostraram-se relativamente eficientes na diferenciação das partes aérea e radicular, contribuindo para estratégias de conservação *in vitro* da espécie.

PALAVRAS-CHAVE: tamareira, regeneração, reguladores vegetais.

INTRODUÇÃO

A tamareira (*Phoenix dactylifera* L.) é uma palmeira de ampla utilização, originária do Oriente Médio, que produz frutos comestíveis altamente nutritivos. É comercialmente explorada em muitas regiões tropicais e subtropicais do mundo, especialmente por países do norte da África, Oriente Médio e Ásia oriental (Nunes *et al.* 1989).

A tamareira é uma cultura que além de apresentar ótima adaptabilidade à região dos trópicos, apresenta ainda certas particularidades como: bom

desenvolvimento em terrenos arenosos, salinizados e alta luminosidade. Quando a umidade no solo não é satisfatória, ocorre o aprofundamento de suas raízes para atingir a água das camadas mais profundas do solo. Estas características tornam a tamareira uma excelente opção para o Nordeste brasileiro.

Essa espécie pode ser propagada por sementes, rebentos e por cultivo *in vitro*. Deve-se lembrar que plantas obtidas por sementes apresentam variabilidade genética, devido à segregação e a recombinação de genes que ocorrem durante a reprodução sexual (Sumianah *et al.* 1984). A propagação por rebentos

1. Trabalho recebido em nov./2005 e aceito para publicação em nov./2006 (registro nº 664).

2. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). Caixa Postal 1524. CEP 59072-970 Lagoa Nova, Natal, RN. E-mail: najara_cb@yahoo.com.br

3. Departamento de Botânica, Ecologia e Zoologia, Centro de Biociências, UFRN. Natal, RN. E-mail: magdi-aloufa@bol.com.br

possibilita a preservação dos caracteres da planta-mãe (Nunes *et al.* 1989), mas, por vezes, torna-se um método inviável devido à baixa quantidade de rebentos produzidos pela palmeira. Assim, a cultura de tecidos aparece como uma ferramenta que torna possível propagar grandes quantidades de plantas de alta fidelidade genética.

A micropropagação é uma importante tecnologia para a multiplicação de diversas espécies de plantas lenhosas (Fidelis 1998). Segundo Alves *et al.* (2004), 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 frequentemente dependente da espécie da planta e do tipo de tecido utilizado na cultura.

O uso de técnicas *in vitro* para estudos morfo-genéticos e para micropropagação em palmeiras neotropicais tem aumentado significativamente. Isso, especialmente em espécies com alto interesse econômico tais como *P. dactylifera*, *Elaeis guineensis* e *Cocos nucifera* (Guerra & Handro 1988, Tisserat 1979).

Este trabalho teve como objetivo testar o efeito dos reguladores de crescimento IAA (ácido 3-indolacético) e BAP (6-benzilaminopurina), com a finalidade de micropropagar a tamareira, cultivar Khadrawy, por meio da multiplicação de brotos por organogênese direta.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Departamento de Botânica, Ecologia e Zoologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). As sementes de tamareira, cultivar Khadrawy, foram coletadas em 2004, em Bebedouro-PE, e fornecidas pela Embrapa Semi-Árido, situada em Petrolina-PE.

Após o isolamento, pecíolos cotiledonares com 3,0 cm a 4,0 cm e aproximadamente 28 dias de idade, excisados a partir de sementes germinadas *in vitro*, foram inoculados na posição vertical, em meio de Murashige & Skoog (1962), com sais e vitaminas. O meio foi suplementado ainda com 30 g.L⁻¹ de sacarose e 0,1 g.L⁻¹ de mio-inositol. Foram estabelecidas quatro combinações hormonais da auxina ácido indolacético (IAA) e da citocinina 6-benzilaminopurina (BAP), em iguais concentrações (0 mg.L⁻¹, 0,5 mg.L⁻¹, 1,0 mg.L⁻¹ e 2,0 mg.L⁻¹), definindo-se os tratamentos, identificados por T0 (testemunha), T1, T2 e T3.

O pH do meio foi ajustado em 5,8 e o meio solidificado com 7 g.L⁻¹ de ágar, previamente à autoclavagem dos meios a 121°C durante vinte minutos. Distribuíram-se alíquotas de 50 mL de meio de cultura em frascos de 300 mL de capacidade. Foram utilizados de seis a dez unidades experimentais (cada unidade experimental apresenta um único explante inoculado em cada frasco contendo meio de cultura) para cada tratamento.

No total foram efetuados três subcultivos, em meios de mesma composição, para todos os tratamentos. Os subcultivos eram realizados a cada trinta dias, ocasião em que ocorriam as pesagens dos pecíolos cotiledonares. Os demais critérios citados eram observados diariamente. As culturas foram mantidas em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16/8 horas (claro/escuro), temperatura de 26 ± 2°C e intensidade luminosa de 20 μmol.m⁻².s⁻¹.

As características avaliadas foram: formação de parte aérea, de raiz primária e de raízes laterais; espessamento do pecíolo; peso fresco dos explantes; e número médio de folhas. A análise estatística dos dados seguiu o delineamento experimental inteiramente casualizado, com aplicação de análise de variância e teste F a 5% de significância, para as variáveis peso fresco dos explantes e número médio de folhas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As concentrações dos reguladores vegetais IAA e BAP utilizadas neste estudo não propiciaram a formação de brotos, mas mostraram-se relativamente eficientes na diferenciação de parte aérea e raízes (Figura 1).

Aos doze dias de cultura, os pecíolos cotiledonares apresentaram esverdeamento de leve a moderado. Isso ocorreu em 16,6% dos explantes de T1 (0,5 mg.L⁻¹ de IAA e 0,5 mg.L⁻¹ de BAP), em 50% de T2 (1,0 mg.L⁻¹ de IAA e 1,0 mg.L⁻¹ de BAP) e em 55,5% de T3 (2,0 mg.L⁻¹ de IAA e 2,0 mg.L⁻¹ de BAP). Registrou-se o espessamento (região "inchada" do explante devido acentuada divisão celular) do pecíolo cotiledonar na região do explante que se encontrava em contato com o meio de cultura. Não houve espessamento nos explantes do meio sem suplementação dos reguladores (Figura 1).

O início da diferenciação de raiz primária foi identificado aos 32 dias de cultura, especialmente nos explantes do meio suplementado com 2,0 mg.L⁻¹ de IAA e 2,0 mg.L⁻¹ de BAP; destes, 77,7% apre-

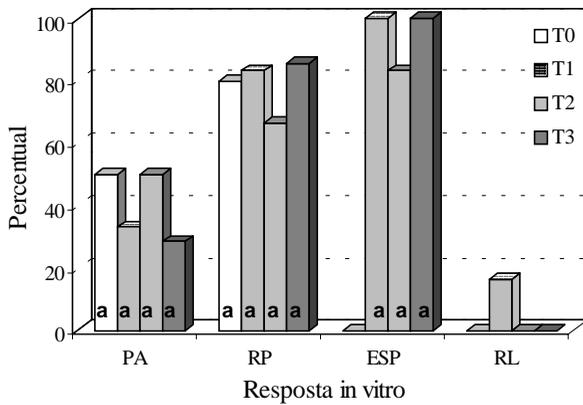


Figura 1. Taxa de formação de parte aérea (PA), raiz primária (RP), espessamento (ESP) e raízes laterais (RL) para os diferentes tratamentos (T0: meio MS sem reguladores vegetais; T1: MS + 0,5 mg.L⁻¹ de IAA e 0,5 mg.L⁻¹ de BAP; T2: MS + 1,0 mg.L⁻¹ de IAA e 1,0 mg.L⁻¹ de BAP; T3: MS + 2,0 mg.L⁻¹ de IAA e 2,0 mg.L⁻¹ de BAP), administrados na cultura de pecíolo cotiledonar de tamareira, aos noventa dias de cultura. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si, segundo teste F (5% de probabilidade).

sentaram a formação desta estrutura. Aos quarenta dias de cultura, quando havia pronunciado esverdeamento dos explantes, verificou-se a emergência do folíolo através de uma fenda no pecíolo (muitas vezes na região do espessamento ou logo acima dele), em 33,3%, 16,6% e 28,5% dos explantes correspondentes a T1, T2 e T3, respectivamente.

No caso dos explantes do meio de cultura sem os bioreguladores (T0), o primeiro registro de diferenciação de parte aérea ocorreu apenas 72 dias após a inoculação. O desenvolvimento de raiz primária também aconteceu mais tardiamente em T0, comparado aos outros tratamentos. Isso ocorreu por volta do septagésimo dia de cultura, em 20% dos pecíolos cotiledonares.

Sharma *et al.* (1980) constataram que, dentro de seis semanas, embriões zigóticos de tamareira dão origem a plântulas, resultado semelhante ao verificado neste trabalho, em que as primeiras plântulas foram obtidas a partir do quadragésimo dia de cultura.

Ao completar noventa dias de cultura, os percentuais para formação de parte aérea, raiz primária, raízes laterais e espessamento foram registrados conforme pode se observar na Figura 1. Foi observado nos explantes submetidos a todos os tratamentos, excetuando-se T0, o espessamento do pecíolo cotiledonar próximo à região radicular, sendo que em T1 e T3 a totalidade dos explantes demonstrou essa modificação. O meio sem reguladores vegetais (T0) e as concentrações utilizadas no tratamento T2 (1,0 mg.L⁻¹ de IAA e 1,0 mg.L⁻¹ de BAP) propiciaram a maior diferenciação de parte aérea (50%), e as

concentrações correspondentes a T3 (2,0 mg.L⁻¹ de IAA e 2,0 mg.L⁻¹ de BAP) propiciaram a maior formação de raiz primária. Essas taxas, entretanto, não diferiram significativamente das obtidas nos demais tratamentos. Raízes laterais foram observadas em apenas 16,6% do tratamento T1.

Ledo *et al.* (2001), com o objetivo de estabelecer protocolo para a produção de plantas *in vitro* a partir da conversão de embriões zigóticos de açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.), verificaram que a concentração de 2,68 µM de NAA (ácido naftalenoacético), combinada com 1,55 µM ou 2,22 µM de BAP, promoveu o melhor crescimento da parte aérea das plântulas. Frota *et al.* (2004) observaram que as melhores combinações e concentrações dos reguladores vegetais, adicionadas ao meio MS, para indução e crescimento de brotos de *Opuntia ficus-indica*, foram: 2,0 mg.L⁻¹ de BAP + 0,25 mg.L⁻¹ de IAA; e 0,5 mg.L⁻¹ de BAP + 0,25 mg.L⁻¹ de IAA. Na presente pesquisa, contudo, a combinação de BAP, nestas concentrações, com doses mais elevadas de IAA não foram adequadas para obtenção de brotos de tamareira.

Debiasi *et al.* (2004) relatam que o meio de cultura MS sem suplementação com reguladores, e MS + 1,0 mg.L⁻¹ de BAP + 1,0 mg.L⁻¹ de IAA são igualmente eficientes para indução de brotos de gengibre. Os mesmos tratamentos, neste trabalho, não induziram a formação de brotos, mas propiciaram a formação de 50% de plântulas com parte aérea e raiz primária. Este fato corrobora os resultados de Silva (2002), que observou serem os meios de cultura sem bioreguladores os mais efetivos para a obtenção de plântulas mais completas de coqueiro (*Cocos nucifera*), via cultura de embriões.

O número médio de folhas obtidas e o peso fresco médio dos explantes, por tratamento, são expostos na Tabela 1. As maiores médias para ambos atributos corresponderam ao tratamento sem reguladores vegetais e às concentrações 1,0 mg.L⁻¹ de IAA e 1,0 mg.L⁻¹ de BAP. Porém, os valores obtidos mostraram que as médias não diferem significativamente entre si (teste F a 5% de probabilidade).

O índice de contaminação na cultura foi elevado, como também foram os níveis de oxidação. Vinte por cento do total de frascos da cultura apresentaram contaminação de origem exógena. O tratamento T1 foi o que apresentou a maior taxa, com 30% de explantes contaminados.

Os explantes foram ainda bastante afetados por oxidação. Cerca de 74% dos pecíolos registraram

Tabela 1. Número médio de folhas (NMF) e peso fresco médio dos explantes (PFM), em gramas, por tratamento, na cultura de pecíolo cotiledonar de tamareira, aos noventa dias de cultura.

Variável	Tratamentos ¹			
	T0	T1	T2	T3
NMF	1,0 A ²	0,3 A	1,0 A	0,3 A
PFM(g)	0,165 a	0,162 a	0,172 a	0,150 a

¹- T0: MS sem reguladores vegetais; T1: MS + 0,5 mg.L⁻¹ de IAA e 0,5 mg.L⁻¹ de BAP; T2: MS + 1,0 mg.L⁻¹ de IAA e 1,0 mg.L⁻¹ de BAP; T3: MS + 2,0 mg.L⁻¹ de IAA e 2,0 mg.L⁻¹ de BAP.

²- Médias seguidas de letras iguais, na linha, não diferem entre si, pelo teste F, a 5% de probabilidade (letras maiúsculas são usadas para comparar médias de NMF e letras minúsculas para comparar as médias de PFM).

alto nível de oxidação na região do espessamento do pecíolo cotiledonar, prejudicando o desenvolvimento da raiz e acarretando o seu atrofiamento.

Aloufa & Oliveira (1989), em estudo sobre a cultura de pecíolo cotiledonar de *P. dactylifera* L. cv. Zaglool, relataram resultados semelhantes aos obtidos no presente trabalho. Nessa pesquisa os pecíolos cotiledonares, cultivados em meio MS (Murashige & Skoog 1962), adicionado de 1,0 mg.L⁻¹ de IAA e mesma concentração de BAP, também desenvolveram espessamentos de coloração marfim ou castanha. Segundo os autores, o crescimento dos explantes foi impedido após três semanas de cultura devido à oxidação pronunciada dos explantes. Porém, os resultados apresentados na presente pesquisa demonstraram que o escurecimento dos explantes na cultura de pecíolo cotiledonar da cultivar Khadrawy não impediu a manutenção da cultura por tempo prolongado.

CONCLUSÃO

As concentrações de reguladores vegetais avaliadas não propiciaram a formação de brotos, mas mostraram-se eficientes na diferenciação de parte aérea e raízes, com destaque para os meios de cultura MS sem suplementação de reguladores e MS + 1,0 mg.L⁻¹ de BAP + 1,0 mg.L⁻¹ de IAA. Isso credencia estes meios de cultura para a regeneração e a conservação *in vitro* de tamareira cv. Kradrawy.

REFERÊNCIAS

Aloufa, M. A. I. & L. M. A. Oliveira. 1989. *In vitro* embryo culture of date palm. p.15-18. In Congresso de Ciências da UFRN, 1. Natal, Rio Grande do Norte. Anais. 260 p.

Alves, E. C. S. C., A. Xavier & W. C. Otoni. 2004. 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, 28 (5): 643-653.

Debiasi, C., F. Feltrin & F. de C. Micheluzzi. 2004. Micropropagação de gengibre (*Zingiber officinale*). Revista Brasileira de Agrociência, 10 (1): 61-65.

Fidelis, I. 1998. Micropropagação de *Brosimum guadichaudii* Tréc. (Mama-cadela): uma espécie considerada medicinal. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Lavras. Lavras, Minas Gerais. 102 p.

Frota, H. M., M. S. de S. Carneiro, R. M. L. Zárata, F. de A. P. Campos & M. J. A. P. 2004. Efeitos do BAP e do AIA na indução e no crescimento *in vitro* de brotos de dez clones de palma forrageira. Revista Ciência Agronômica, 35 (n. esp.): 279 - 283.

Guerra, M. P. & W. Handro. 1988. Somatic embryogenesis and plant regeneration in embryo cultures of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae). Plant Cell Reports, 7 (7): 550-552.

Ledo, A. da S., O. A. Lameira, A. K Benbadis, I. C. de Menezes, C. A. da S. Ledo & M. do S. P. Oliveira. 2001. Cultura *in vitro* de embriões zigóticos de açaizeiro. Revista Brasileira de Fruticultura, 23 (3): 468-472.

Murashige, T. & F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15 (3): 473-497.

Nunes, R. F. de M., M. A. de Queiroz & C. M. M. de S. Silva. 1989. Instruções para produção de mudas e plantio da tamareira. Embrapa – CPATSA, Petrolina, PE. 36 p. (Circular técnica 21)

Sharma, D. R.; R. Kumari & J. B. Chowdhury. 1980. *In vitro* culture of female date palm (*Phoenix dactylifera* L.) tissues. Euphytica, 29 (1): 169-174.

Silva, V. dos S. 2002. Regeneração *in vitro* de embriões de *Cocos nucifera* L. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, São Paulo. 72 p.

Sumianah, G. H. M., Y. M. Makki & T. G. Rumney. 1984. Changes of three cultivars of date palm seed during germination. Date Palm Journal, 3 (21): 395-397.

Tisserat, B. 1979. Propagation of date-palm (*Phoenix dactylifera* L.) *in vitro*. Journal Experimental Botany, 30 (119): 1275-1283.