

Comunicado 170

Técnico

online

ISSN 1808-9984
Junho, 2017
Petrolina, PE



Clonagem in vitro de tamareira (*Phoenix dactylifera* L.)

Juliana Martins Ribeiro¹
Silvio Lopes Teixeira²

Introdução

A tamareira (*Phoenix dactylifera*, L.) é uma palmeira produtora de frutos comestíveis, originária do Mediterrâneo, sendo cultivada em vários países do Oriente Médio, além de Índia, Paquistão, Estados Unidos, México e outros, seja como alimento de subsistência, seja com finalidade industrial. Na agricultura de subsistência, os frutos são colhidos maduros, reunidos em pequenos lotes, prensados manualmente, secos ao sol e armazenados domesticamente para consumo durante o ano.

Para a utilização industrial, os cachos são colhidos antes do completo amadurecimento dos frutos, submetidos a condições controladas de amadurecimento e embalados para a comercialização, sendo exportados para diversos países.

A tâmara é um fruto nutritivo por conter proteínas, açúcares, sais minerais, vitaminas, fibras,

potássio, ferro e cálcio. É considerada um alimento energético, sendo ideal para desportistas e crianças. Os frutos podem ser consumidos ao natural ou na confecção de diversos produtos, como farinha, geleia, doces, licores, vinho e outros.

Cultivares

A tamareira apresenta um grande número de cultivares, algumas delas exploradas mais restritivamente em certos países, enquanto outras se dispersam mais amplamente entre os países produtores. São reunidas em três grupos diferentes, de acordo com as características dos frutos, ou seja: tâmaras moles, semissecas e secas.

As tâmaras moles, como o próprio nome indica, apresentam polpa macia, suculenta, baixo teor de açúcares e pouca fibra. São tâmaras de qualidade elevada, sabor agradável, apropriadas para o consumo in natura, embora não se conservem por muito tempo. As tâmaras secas são pouco

¹Bióloga, D.Sc. em Produção Vegetal, pesquisadora da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

²Engenheiro-agronomo, D.Sc. em Botânica, professor aposentado da Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ.

sucedentas, ricas em fibras, com alto teor de açúcares, não sendo ideais para consumo ao natural, embora seu sabor possa ser melhorado após estarem maduras, por meio de hidratação em ambiente rico em vapor d'água. São melhores para a conservação e uso como alimento de subsistência, sendo usadas como matéria prima para a confecção de diversos tipos de alimentos. As tâmaras semissécas apresentam características intermediárias, mas com qualidade elevada, podendo ser também consumidas ao natural ou processadas.

Dentre as cultivares produtoras de tâmaras moles, destacam-se a Khadrawi, Halawi e Zaghloul; dentre as produtoras de tâmaras semissécas estão a Deglet Noor e Amri; e entre as produtoras de tâmaras secas pode-se citar a Sakkoti.

Potencial da espécie para o Nordeste brasileiro

Há cerca de 30 anos, a Embrapa Semiárido iniciou um trabalho para a introdução da tamareira na região de Petrolina, PE, onde as condições de clima e solo, com precipitação média anual de 455 mm, insolação média anual de 11 horas/dia e temperatura média anual de 23,6 °C se mostraram adequadas à espécie, que inicia a produção aos 2-2,5 anos de idade, com duas datas de colheita (abril - maio, e dezembro - janeiro - fevereiro), com produtividade variando entre 70 kg e 180 kg de frutos por planta/ano, dependendo dos cuidados culturais.

Na região de origem da espécie, o início de produção acontece aos 4-8 anos, sendo obtida apenas uma safra por ano. Além disso, naquelas condições há necessidade de se fazer a polinização artificial e muito trabalhosa, o que não acontece nas condições do Nordeste.

Considerando-se uma produtividade mínima anual de 70 kg por planta, nas condições de cultivo de subsistência, com baixo nível de tecnologia, 36 plantas produziriam o suficiente para alimentar uma família de 5 pessoas (cerca de 1.000 g por pessoa/dia). Parte da produção poderia ser consumida e parte vendida, para a aquisição de outros víveres que venham a servir de complemento na alimentação. E isso plantando-se o pomar uma única

vez e tendo, como único trabalho, a colheita anual dos frutos, já que a planta é bastante rústica, não exigindo cuidados especiais.

Pensando na produção com finalidade industrial, com uso de tecnologia adequada, a espécie tem potencial para produzir 180 toneladas de frutos por ano, de um produto altamente valorizado no mercado. O Brasil importa toda a tâmara consumida no país e o produto tem grande demanda pelo mercado internacional.

Técnicas de propagação

A tamareira pode se propagar por três formas: por semente, por separação de rebentos ou por técnicas in vitro, denominadas de cultura de tecidos vegetais. A propagação por semente não é normalmente utilizada para a formação de pomares por causa da grande variabilidade genética constatada na espécie. Essa forma de propagação dificilmente resulta em plantas com características iguais às da planta matriz, quanto à qualidade dos frutos, produtividade, características dos cachos, arquitetura da copa, precocidade no início da produção, além de outras.

A propagação por separação de rebentos garante que as plantas originadas reproduzam exatamente as características genéticas da planta matriz, mas é uma técnica muito trabalhosa, que já foi muito utilizada, por não existir, então, outra maneira melhor. Além disso, não pode ser empregada para a propagação de plantas adultas, que já não produzem rebentos. Com o desenvolvimento mais recentemente das técnicas de clonagem em laboratório, ou cultura in vitro, essa metodologia passou a ser a alternativa ideal. Mesmo que ainda não seja utilizada no Brasil, e que ainda necessite de aprimoramento, já vem sendo utilizada em alguns países, para algumas cultivares.

Clonagem in vitro da tamareira adulta

Atualmente, a clonagem da tamareira in vitro é feita por meio da técnica de embriogênese somática, a partir de tecidos do ápice caulinar de rebentos, ou de tecidos da inflorescência. Sempre que possível, deve-se dar preferência à cultura de tecidos de ápices caulinares de rebentos, porque estes

explantes respondem mais facilmente ao estímulo in vitro do que os tecidos de inflorescência, e pelo fato desta técnica ser empregada em escala comercial em vários países para a micropopulação da tamareira. Todavia, o protocolo que utiliza tecidos de inflorescência já permite sua utilização com sucesso para a propagação de algumas cultivares de tamareira. O Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Semiárido vem pesquisando essa técnica. A seguir, são apresentados os passos que constituem a base da embriogênese somática empregada para a tamareira.

Escolha da matriz

A matriz deve apresentar as características ideais para a espécie (Figura 1), como: folhas arqueadas e bem separadas; cachos com pedúnculos longos, deixando a região dos frutos abaixo das folhas mais baixas; frutos com as características próprias do tipo desejado (mole, seco, ou semisseco). Outras características podem ser selecionadas, de acordo com o objetivo de uso.



Figura 1. Matriz ideal para coleta de espatas.

Coleta das espatas

Espatas são as estruturas que surgem nas axilas das folhas na ocasião do florescimento, constituídas por um envoltório fibroso, dentro do qual se encontra a inflorescência, ou seja, a estrutura que constituirá o cacho. A inflorescência é ramificada e sobre as ramificações, denominadas racimos, se formam as flores.

As espatas devem estar fechadas, preferencialmente, até 20 cm de comprimento (Figura 2). Sua remoção deve ser cuidadosa, sem cortes que possam deixar o seu interior à mostra.



Figura 2. Espata fechada extraída de tamareira (*Phoenix dactylifera*, L.).

Desinfestação das espatas e preparo dos explantes

Após a condução das espatas à sala de limpeza do laboratório:

- 1) Lavar as espatas com água corrente, esfregando-as com esponja limpa, embebida em detergente.
- 2) Esfregá-las novamente com esponja limpa, embebida em água sanitária a 2,0-2,5 % de cloro ativo, adicionada de 2-3 mL de álcool 92 °GL.
- 3) Molhar as espatas com álcool 92 °GL e flambá-las (operação dispensável, mas que ajuda na desinfestação).
- 4) Na capela de fluxo laminar, abrir a espata longitudinalmente com dois cortes laterais, com bisturi ou outro instrumento cortante bem afiado e limpo, evitando-se, ao máximo, tocar nos tecidos da inflorescência. A partir deste ponto todas as operações devem ser conduzidas sob condições de assepsia absoluta.
- 5) Levantar o envoltório da espata cuidadosamente e cortar os rácimos pela base (ramificações

da inflorescência contendo os botões florais) individualmente, e colocá-los dentro de um becker ou outro recipiente semelhante (de preferência autoclavado previamente) de tamanho suficiente para não deixar parte dos rácimos acima da superfície da boca do becker. Se necessário, os rácimos podem ser subdivididos em segmentos de tamanho compatível com a altura do becker.

- 6) Cobrir os rácimos com solução hidroclorada a 0,5-1,0% de cloro ativo (água sanitária diluída), adicionada de 1-2 mL de álcool a 70%, ou 1 gota de Tween 20/100 mL de solução.
- 7) Cobrir o becker com papel alumínio ou filme plástico e manter por 15 minutos, agitando-o ligeiramente por algumas vezes.
- 8) Escorrer cuidadosamente a solução hidroclorada e preencher o becker com água autoclavada. Depois de agitar cuidadosamente o becker por 2-3 vezes, eliminar a água. Repetir essa operação por mais duas vezes.
- 9) Seccionar os rácimos em segmentos contendo de dois a cinco botões florais e colocá-los horizontalmente sobre o meio de cultura semissólido (meio de indução), de modo a ficarem com todas as partes em contato com o meio de cultura.

Composição dos meios de cultura

1) Meio de indução – é o meio de cultura inicial, destinado a induzir a formação do calo embriogênico (calo granular). É constituído pelos sais de MS, adicionados de (por litro de solução): 0,5 mg de ácido nicotínico, 0,1 mg de piridoxina.HCl, 0,1 mg de tiamina.HCl, 40 mg de sulfato de adenina, 100 mg de i-inositol, 100 mg de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxyacético), 3 mg de 2iP (λ - λ -dimetilalilaminopurina), 30 g sacarose, 5,5 g de ágar e 3 g de carvão ativado, pH 5,7 \pm 0,1.

2) Meio de multiplicação – destinado a estimular a multiplicação dos grânulos (próembriões). É constituído pelos sais de MS, adicionados de (por litro de solução): 0,5 mg de ácido nicotínico, 0,1 mg de piridoxina.HCl, 0,1 mg de tiamina.HCl, 40 mg de sulfato de adenina, 100 mg de i-inositol, 10 mg de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxyacético), 3 mg de 2iP (λ - λ -dimetilalilaminopurina), 30 g sacarose, 5,5 g de ágar, 3 g de carvão ativado, pH 5,7 \pm 0,1.

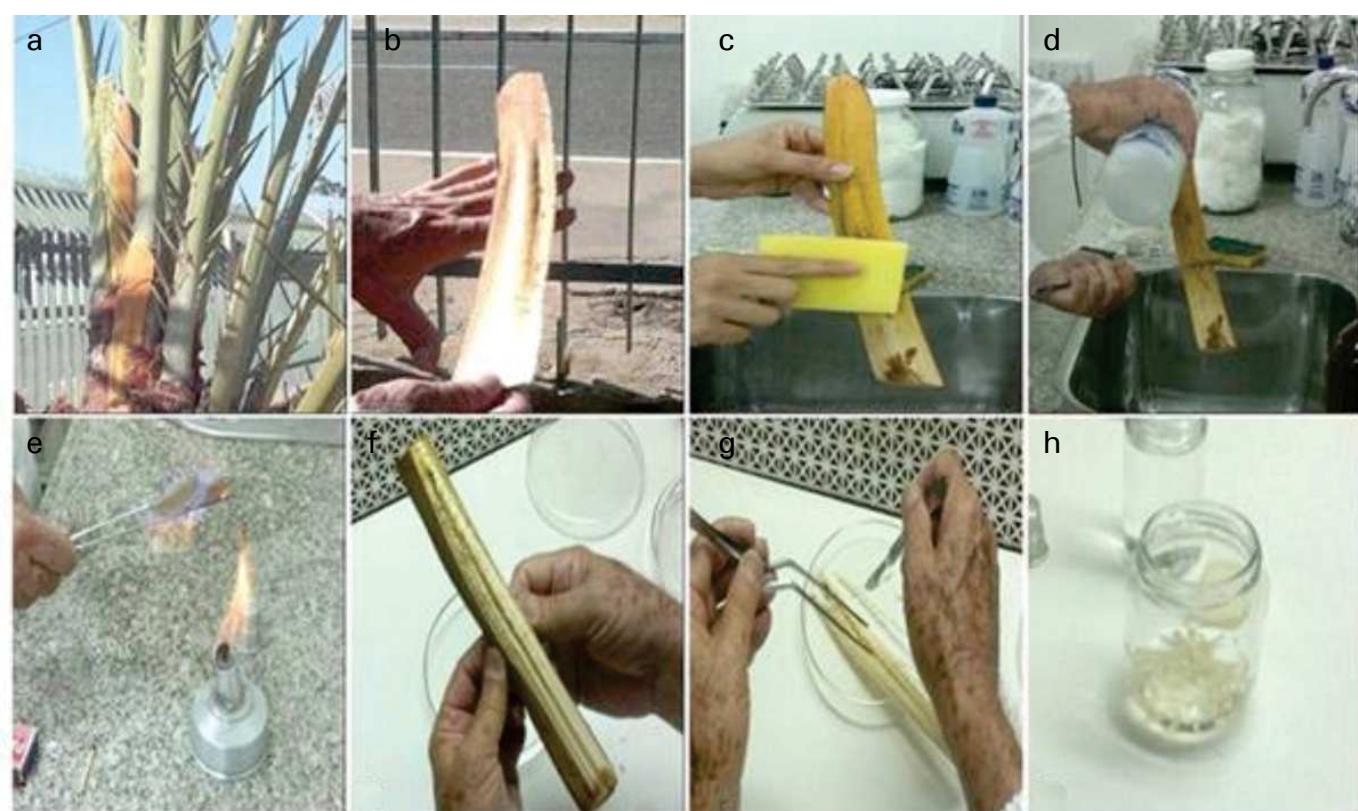


Figura 3. Algumas etapas envolvidas na obtenção de explantes de inflorescências de tamareira (*Phoenix dactylifera* L.): a, b) coleta da espata; c, d, e) desinfestação da espata antes da entrada na capela de fluxo laminar; f, g, h) retirada dos rácimos do interior da espata e desinfestação dos mesmos em solução de hipoclorito de sódio 0,5% (interior da capela de fluxo laminar).

3) Meio de germinação – destinado a estimular a formação dos embriões somáticos a partir dos grânulos (ou proembriões) que constituem o calo embriogênico. É constituído pelos sais de MS reduzidos à metade de sua formulação original, adicionado de (por litro de solução): 0,5 mg de ácido nicotínico, 0,1 mg de piridoxina.HCl, 0,1 mg de tiamina.HCl, 40 mg de sulfato de adenina, 100 mg de i-inositol, 30 g sacarose, 5,5 g de ágar, 3 g de carvão ativado, pH 5,7 \pm 0,1, sem reguladores de crescimento.

4) Meio de enraizamento – destinado a induzir o enraizamento mais vigoroso dos embriões. É constituído por 3/4 dos sais de MS, adicionados de (por litro de solução): 0,5mg de ácido nicotínico, 0,1 mg de piridoxina.HCl, 0,1 mg de tiamina.HCl, 40 mg de sulfato de adenina, 100 mg de i-inositol, 0,002g/L de glicina, 30 g sacarose, 5,5 g de ágar, 2 g de carvão ativado, 1 mg de ANA (ácido λ -naftalenoacético) e pH 5,7 \pm 0,1.

Os meios de cultura devem ser dispensados à base de 25 mL de meio por tubo de ensaio de 25 mm x 150 mm, cobertos com tampas de polipropileno. Em seguida, autoclavados por 15-20 minutos, a 121 °C e 1,05 atm.

Condução das culturas

1) Após a inoculação dos explantes no meio de indução, os tubos de ensaio devem ser mantidos em sala de crescimento, no escuro, com temperatura de 26 \pm 2 °C.

2) Recultivar as culturas (segmentos de inflorescência) a cada 20 dias em novo meio de cultura, com a mesma composição do meio de indução, e mantê-las nas condições ambientais anteriores, até o início da formação do calo embriogênico (calo granular), o que deve acontecer a partir de 6-8 meses (Figuras 4a e 4b).

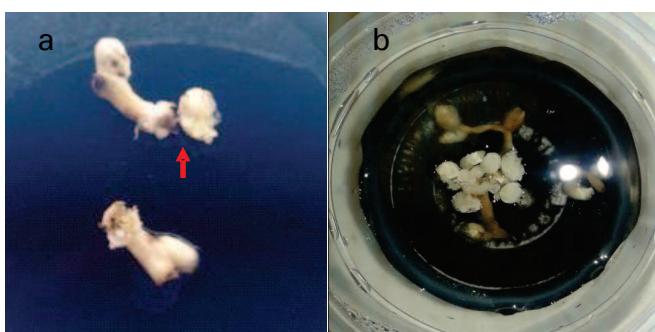


Figura 4. Formação de calo embriogênico, em tecidos de segmentos de inflorescência de *Phoenix dactylifera*, em meio de indução. a) Início da formação dos grânulos (proembriões) na superfície exposta, no segmento de inflorescência, após a abscisão do botão floral; b) multiplicação dos proembriões formando o calo embriogênico.

3) Após o início da formação do calo embriogênico (Figura 4b), transferir porções do mesmo, a cada 20 dias, para o meio de multiplicação, ainda no escuro, objetivando a multiplicação dos grânulos (Figura 5). As transferências para novos meios de cultura podem ser realizadas sucessivamente, não sendo recomendável, porém, ultrapassar cinco.



Figura 5. Porções do calo embriogênico de *Phoenix dactylifera*, em meio de multiplicação

Foto: Juliana Martins Ribeiro

4) Transferir porções do calo embriogênico, do meio de multiplicação, para meio de germinação, objetivando a conversão dos proembriões em embriões. Embriões < 3 mm deverão ser transferidos para novo meio de multiplicação, para crescimento adicional (Figura 6a). Os embriões > 3 mm de comprimento deverão ser transferidos para o meio de enraizamento (Figura 6b).

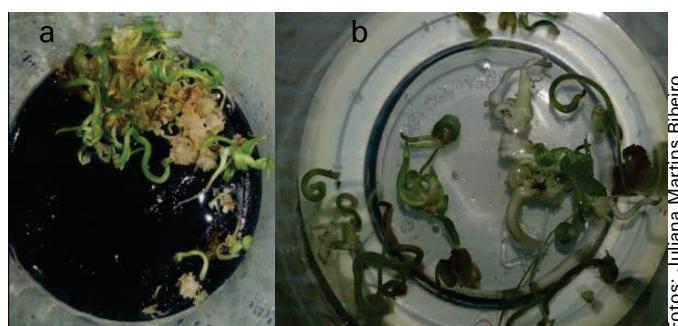


Figura 6. a) Calo embriogênico (de cor bege) de *Phoenix dactylifera*, se multiplicando e formando novos embriões (de cor verde) e b) embriões > 3 mm de comprimento.

Foto: Juliana Martins Ribeiro

5) Quando as plântulas estiverem com \pm 10 cm de altura e bem enraizadas (Figura 7), devem ser transferidas para recipientes contendo substrato adequado, mantendo-os sob telado, com nebulização.



Foto: Juliana Martins Ribeiro

Figura 7. Plântulas de *Phoenix dactylifera*, regeneradas a partir de tecidos de inflorescência, em meio de enraizamento, no ponto de serem transferidas para as condições *ex vitro*.

As plantas de tamareira regeneradas a partir de tecidos de inflorescência (Figura 7) estão sendo submetidas a testes de multiplicação e enraizamento no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Semiárido.

As diferentes cultivares de tamareira respondem diferentemente ao estímulo *in vitro* e podem precisar de modificações no protocolo descrito, principalmente quanto às concentrações dos reagentes e ao balanço de fitorreguladores. Como o protocolo apresentado neste trabalho foi desenvolvido a partir de explantes obtidos de plantas resultantes da germinação de sementes obtidas por polinização aberta, portanto com grande variabilidade genética entre elas, é possível que o protocolo necessite dessas modificações.

Todavia, os fitorreguladores mais usados para induzir a formação de calo embriogênico, tanto para explantes provenientes de ápices caulinares, quanto para tecidos de inflorescência jovem, são a auxina 2,4-D, na concentração de 100 mg/L, e a citocinina 2iP, na concentração de 3 mg/L. Em geral, as diferentes cultivares desta espécie respondem bem à presença desses dois fitorreguladores, com essa finalidade.

Após a formação dos proembriões, a germinação deles acontece, em geral, na ausência completa de fitorreguladores, ou então em presença de pequena quantidade de uma citocinina (benzilaminopurina, 2iP).

Quanto ao enraizamento, embora os embriões já devam possuir raízes, esse órgão deixa de se formar em muitos deles, ou então o sistema radicular formado é pouco vigoroso. Assim, quando os embriões atingem comprimento > 3 mm, normalmente são transferidos para um meio de enraizamento, contendo ou não carvão ativado e uma quantidade mínima (0,1-1,0 mg/L) de uma auxina (ácido α-naftalenocártico – ANA), para estimular a formação de um sistema radicular mais vigoroso, o que melhora a sobrevivência e o crescimento das plântulas, quando transferidas para as condições *ex vitro*. Portanto, sempre que houver necessidade, sugere-se conduzir testes com auxinas e carvão ativado.

A pesquisa com a clonagem *in vitro* de tamareira está em andamento no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Semiárido e vem mostrando que a imersão dos explantes primários (segmentos de inflorescência), totalmente no meio de cultura semissólido, evita a oxidação dos mesmos, estimula a formação de raízes e de embriões e antecipa a resposta dos tecidos da tamareira para 2,5-3 meses, em vez dos 6-8 meses na técnica convencional (Figuras 8a e 8b).



(Fotos: Juliana Martins Ribeiro).

Figura 8. a) Segmentos de inflorescência, mostrando a parte imersa no meio de cultura sem oxidação, e a parte acima da superfície do meio de cultura totalmente oxidada, aos 6-8 meses; b) raízes se formando na parte da inflorescência imersa no meio de cultura.

**Comunicado
Técnico, 170**

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Semiárido
Endereço: BR 428, km 152, Zona Rural, Cx. Postal 23, 56302-970 Petrolina, PE
Fone: (87) 3866-3600
Fax: (87) 3866-3815
<https://www.embrapa.br/fale-conosco/sac>

1ª edição (2017): Formato digital

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO

**Comitê de
publicações**

Presidente: Flávio de França Souza.
Secretário-Executivo: Lúcia Helena Piedade Kiill.
Membros: Diana Signor Deon, Elder Manuel Moura Rocha, Francislene Angelotti, Gislene Feitosa Brito Gama, José Mauro da Cunha e Castro, Juliana Martins Ribeiro, Mizael Félix da Silva Neto, Pedro Martins Ribeiro Júnior, Roseli Freire de Melo, Tadeu Vinhas Voltolini.

Expediente

Supervisão editorial: Sidinei Anunciação Silva.
Revisão de texto: Sidinei Anunciação Silva.
Tratamento das ilustrações: Nivaldo Torres dos Santos.
Editoração eletrônica: Nivaldo Torres dos Santos.