Comunicado Técnico 72
ISSN 1517-3887
Dezembro, 2009
Manaus, AM

Indução de Calli Embriogênicos em Embriões Zigóticos Híbridos de Caiaué e Dendezeiro

Paula Cristina da Silva Angelo[1]
Larissa Alexandra Cardoso Moraes[2]
Nelcimar Reis Sousa[3]
Ricardo Lopes[4]
Raimundo Nonato Vieira da Cunha[4]

A híbridação entre o caiaué (*Elaeis oleifera* (Kunth) Cortés) e o dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) tem como objetivo obter híbridos tão produtivos quanto o dendezeiro, mas que também apresentem as características do caiaué, como: resistência a pragas e doenças, principalmente à anomalia denominada amarelecimento-fatal, e crescimento vertical do tronco reduzido. O programa de melhoramento avalia tanto híbridos F_1 como gerações de retrocruzamentos, RC_1 e RC_2 (BARCELOS et al., 2000; CUNHA et al., 2005).

A clonagem é essencial para o programa de melhoramento de híbridos interespecíficos, tanto para multiplicação do material destinado à realização de ensaios clonais como para plantios comerciais. Por se tratarem de plantas alógamas, os híbridos F_1 apresentam grande variabilidade dentro dos cruzamentos, por isso, embora os melhores cruzamentos possam ser identificados e reproduzidos por sementes, a seleção e a clonagem de indivíduos proporcionam ganhos genéticos muito mais elevados. A seleção de plantas RC_1 e RC_2 também demanda a clonagem para multiplicação do material selecionado. Na fase de avaliação, a clonagem permite multiplicar a progênie F_1 e de retrocruzamentos, para instalação de ensaios com repetições dos genótipos e de locais, proporcionando maior eficiência e representatividade de ambientes no processo de seleção.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a aptidão de embriões zigóticos imaturos de híbridos interespecíficos entre caiaué e dendezeiro para geração in vitro de embriões somáticos.

Material e Métodos

Material vegetal

O trabalho foi desenvolvido com progênies de três cruzamentos interespecíficos, que utilizaram como genitores femininos plantas de caiaué selecionadas no Banco de Germoplasma da Embrapa Amazônia Ocidental (CUNHA et al., 2007) e como genitores masculinos, plantas de dendezeiro do tipo *pisifera* utilizadas no programa de produção de sementes comerciais. As progênies SJ 165 (B34-55-12 x RU 39P), SJ 163 (B34-54-18 x RU 49P) e SJ 162 (B34-55-18 x RU 49P) foram identificadas pelos números I, II e III, respectivamente. Os cruzamentos foram realizados no Campo Experimental do Rio Urubu, no Município de Rio Preto da Eva, AM, e os frutos foram coletados aos 100 dias após a polinização.

[1]Bióloga, D.Sc. em Ciências Biológicas/Genética, pesquisadora da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM, paula.angelo@cpaa.embrapa.br
[2]Engenheira agrônoma, M.Sc. em Fisiologia Vegetal, pesquisadora da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM, larissa.moraes@cpaa.embrapa.br
[3]Engenheira agrônoma, D.Sc. em Melhoramento Vegetal, pesquisadora da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM, nelcimar.sousa@cpaa.embrapa.br
[4]Engenheiro agrônomo, D.Sc. em Genética e Melhoramento, pesquisador da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM, ricardo.lopes@cpaa.embrapa.br; raimundo.cunha@cpaa.embrapa.br

Embrapa

Assepsia

Os frutos colhidos foram despolpados, e, no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Amazônia Ocidental, as amêndoas foram desinfestadas em água sanitária a 50%, lavadas em detergente e enxaguadas em água destilada e autoclavada. Os embriões foram retirados por secção do endosperma, no ponto de emergência da radícula e da plúmula. Em câmera de fluxo laminar, passaram por assepsia com água sanitária a 5% e por três enxágues consecutivos em água destilada autoclavada.

Cultivo in vitro

Para indução da formação de *calli* em tecidos dos embriões zigóticos imaturos, foi utilizado o procedimento descrito por Teixeira et al. (1993) para híbridos intraespecíficos *tenera* (*E. guineensis dura* x *pisifera*), com exceção de que foram utilizados sais de Murashige & Skoog (1962) e 170 mg L^{-1} de $NaH_2PO_4.H_2O$ (Murashige et al. apud George et al., 1988). Os embriões foram cultivados em placas de Petri (10 embriões por placa) até a metade do segundo mês e, em seguida, transferidos para frascos com 8 cm de diâmetro (cinco *calli* por frasco).

Histologia

No sexto mês de cultivo, *calli* da progênie II, escolhidos aleatoriamente, foram fixados em FAA (etanol 50%, ácido acético 5% e formaldeído 10%) e desidratados em série de etanol; imersos em butanol terciário, por três vezes, com trocas a cada 20 minutos, e em butanol:clorofórmio (3:1). Em seguida, foram imersos em parafina a 35 °C Ĕ 40 °C, nos primeiros três dias, e a 58 °C Ĕ 60 °C nos dois dias seguintes e montados em bloco para a realização dos cortes em micrótomo. Os cortes foram desparafinados com xilol, reidratados em série de etanol e corados com safranina. Algumas preparações foram novamente submetidas à reidratação em etanol, coradas com "fast green", lavadas em isopropanol, etanol absoluto e xilol e montadas em bálsamo do Canadá, para observação em microscópio óptico.

Coleta de dados e análise estatística

Foram avaliados o número de embriões que geraram *calli* e o número de embriões que germinaram, apesar de cultivados em meio para indução de calogênese. A diferença entre a proporção de embriões apresentando *calli* e germinados (condições não exclusivas), aos dois e aos quatro meses de cultivo, nas três progênies, foi submetida ao teste Z (Sigma Stat v 2.0). O peso de 15 *calli* por progênie foi tomado a partir do sexto mês em cultivo. A contagem de embriões e *calli* contaminados foi realizada.

Resultados e Discussão

O desenvolvimento simultâneo dos *calli* e de parte aérea e mais raramente de radícula (Tabela 1) ocorreu para uma parte dos embriões imaturos cultivados, e houve diferença significativa entre as progênies quanto a essa característica. Isso foi observado para um número maior de embriões da progênie I (P □ 0,05) do que nas outras duas progênies, desde o primeiro mês de cultivo. Aos quatro meses, o número de embriões das progênies II e III em que ocorreu o desenvolvimento de órgãos, principalmente plúmulas, aumentou, mas a significância da diferença com relação à progênie I foi mantida. Os *calli* foram, independentemente da progênie, induzidos no polo oposto ao da emergência da parte aérea e continuaram a se desenvolver concomitantemente ao alongamento da plúmula. Resultados similares foram observados para embriões híbridos intraespecíficos *tenera* com 77, 91 e 114 a 193 dias após a polinização (TEIXEIRA et al., 1993).

Tabela 1. Número de embriões zigóticos imaturos pertencentes a três progênies F_1 de *E. oleifera* x *E. guineensis* que apresentaram *calli* e desenvolvimento de órgãos, quando cultivados in vitro, em meio para indução (EMBRAPA AMAZÔNIA OCIDENTAL, 2006).

Progênies[1]	Apresentando *calli*	Apresentando *calli* e órgãos simultaneamente	Total
Um mês de cultivo			
I	72	23	73
II	97	7	99
III	99	8	99
Quatro meses de cultivo			
I	50	31	52
II	97	26	97
III	89	24	89

[1] I: SJ 165 (B34-55-12 x RU 39P), II: SJ 163 (B34-54-18 x RU 49P) e III: SJ 162 (B34-55-18 x RU 49P).

Observou-se que os *calli* das três progênies cresceram ao longo de todo o período de avaliação. O período de proliferação mais rápida ocorreu durante os primeiros meses de cultivo e não foi acompanhado por tomadas de peso. A partir do sexto mês, o ganho de peso indicou que os *calli* estavam ativos (Fig. 1), mas proliferavam muito lentamente. Os embriões da progênie I, além de apresentarem tendência maior para a germinação (Tabela 1), geraram os menores *calli*. Além disso, os *calli* das progênies II e III dobraram de peso ao longo das avaliações, o que não foi verificado para os calli da progênies I.

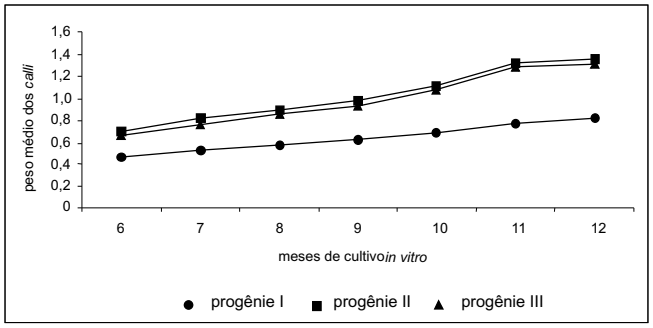

Fig. 1. Peso médio (g) de 15 *calli* oriundos de embriões pertencentes a cada uma das progênies I, II e III de híbridos de *E. oleifera x E. guineensis.* O peso foi tomado a partir do sexto mês de cultivo em meio para indução de *calli*.

A análise histológica de secções de *calli* cultivados por seis meses revelou características de *calli* embriogênicos, como a organização de estruturas de proliferação globulares (Fig. 2, eg), tendendo à individualização. Essas estruturas eram, muito provavelmente, pré-embriões somáticos (KANCHANAPOOM e DOMYOAS, 1999; SCHWENDIMAN et al., 1988). A atividade mitótica (Fig. 2, m), indicada pelo acúmulo de células menores e mais densas e coradas, concentrou-se nas bordas dessas estruturas, e, no centro de alguns dos glóbulos, verificou-se a diferenciação de elementos de vaso (Fig. 2, ev). Nessas estruturas globulares havia, aparentemente, potencial para individualização, organização do feixe vascular, de polos apical e radicular e desenvolvimento de embriões somáticos.

Leve oxidação foi observada ao longo dos noves meses em que os *calli* foram cultivados, o que resultou em coloração amarelada. Setores relativamente friáveis, e também o desenvolvimento de estruturas claras e densas (Fig. 3A, setas pretas), foram observados em *calli* de embriões das três progênies, especialmente naqueles da progênie II, que também foram os que apresentaram maior peso médio.

Teixeira et al. (1993) registraram que, sobre *calli* primários globulares oriundos de embriões zigóticos de híbridos intraespecíficos de *E. guineensis* (*tenera*) com 100 dias, desenvolveram-se, a partir do nono mês de cultivo em meio de indução, setores diferenciados, friáveis, compostos de células redondas e pequenas, crescendo em pequenos grumos. A diferenciação de embriões normais ocorreu a partir desses setores, quando isolados e transferidos para meio de regeneração. Embriões zigóticos com 100 dias, híbridos de dendezeiro e caiaué, foram selecionados como explantes para a realização dos experimentos aqui relatados, com o objetivo de reproduzir os resultados alcançados para os *tenera*, e descritos acima. No entanto, setores como os descritos acima, friáveis e altamente embriogênicos, não foram observados sobre os *calli* de híbridos interespecíficos. Ainda assim, tendo em vista que os *calli* obtidos eram embriogênicos (Fig. 2), embora compactos e nodulares, foram cultivados em meio de regeneração (TEIXEIRA et al., 1993) por dois meses e depois em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) sem reguladores do crescimento.

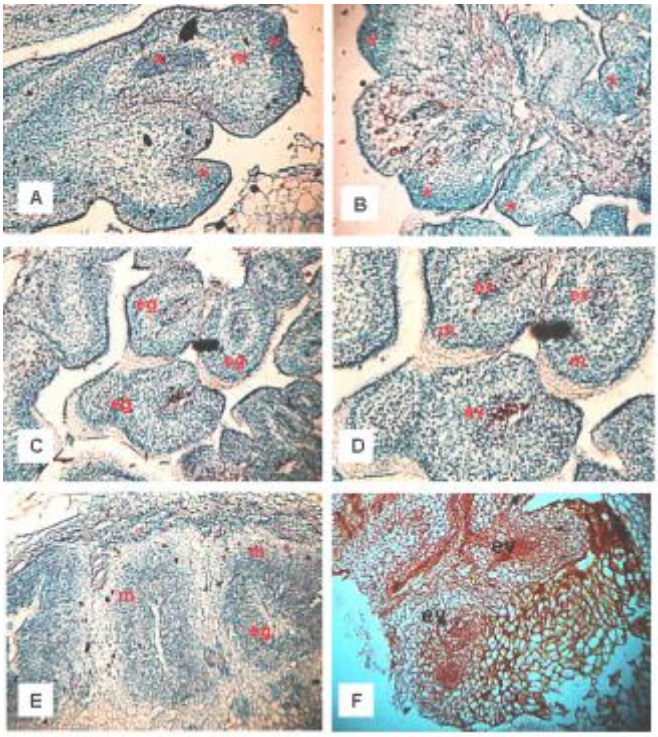

Fig. 2. Preparações citológicas de *calli* formados em embriões zigóticos híbridos de *E. oleifera x E. guineensis*, observados ao microscópio óptico e fotografados por câmera digital. **A**: corte longitudinal, aumento de 16 X, **m** indica atividade mitótica, mais precisamente localizada nos pontos indicados por *. **B**: corte transversal, aumento 16 X, desenvolvimento de elementos de vaso (**ev**), mais precisamente localizado nos pontos indicados por *. **C**: corte transversal, aumento 25 X, individualização de estruturas globulares (**eg**) e **D:** o mesmo corte em aumento de 63 X, com indicação de zonas de atividade mitótica (**m**) e desenvolvimento de elementos de vaso (**ev**). **E**: corte transversal, da base do núcleo de proliferação de um *callus* embriogênico, com estruturas globulares (**eg**) menos individualizadas e zonas de atividade mitótica intensa indicadas por **m**, aumento de 42,5 X. **F**: evidenciação de elementos de vaso (**ev**), no centro das estruturas globulares

Nesta última condição, quando também ocorreu aceleração do ganho de peso (Fig. 1) em alguns *calli,* houve o alongamento de estruturas similares a embriões (Fig. 3A e 3C, seta branca) e plúmulas (Fig. 3B e D) mal formados, onde anteriormente estavam localizadas as estruturas globulares, com células densas e coloração branca opaca, identificadas também pela análise histológica (Fig. 2).

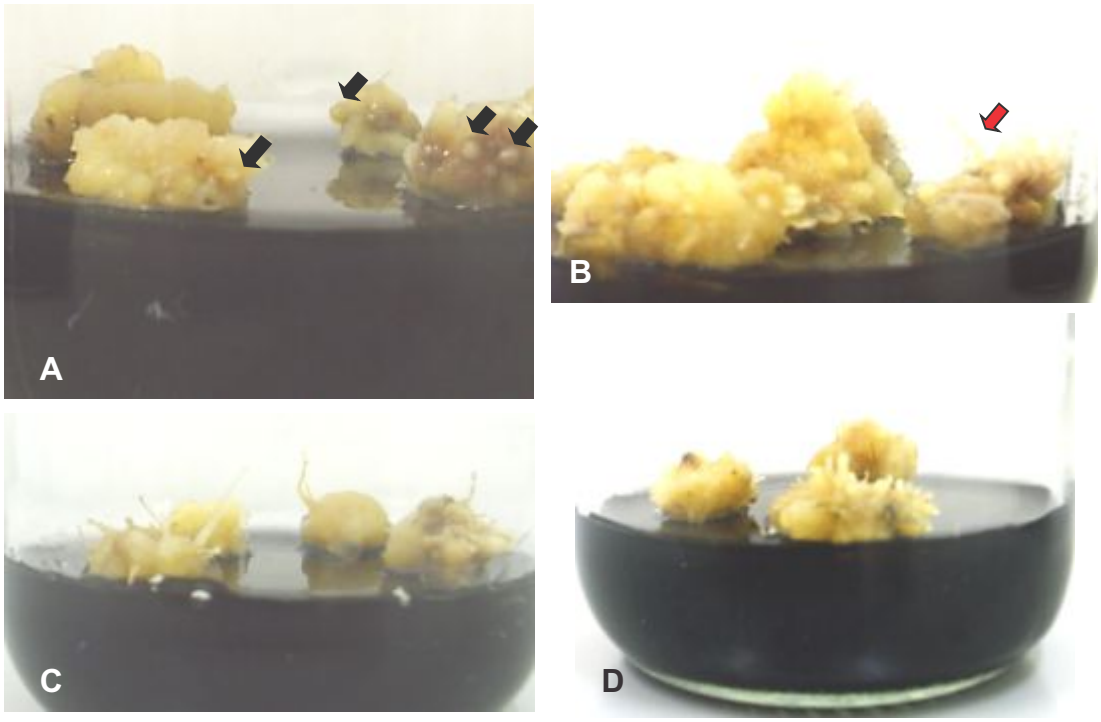

Fig. 3. *Calli* embriogênicos desenvolvidos a partir de embriões somáticos híbridos de *E. oleifera x E. guineensis.* **A**: as setas pretas indicam estruturas globulares (pré-embriões) que não se tornaram individualizados do restante do *callus*. **B**: seta vermelha indica embrião mal-formado não individualizado, em processo de alongamento. **C** e **D**: desenvolvimento de embriões mal formados e estruturas similares a plúmulas sobre *calli* embriogênicos.

Teixeira et al. (1993) registram ainda que a concentração muito alta de auxina fornecida no meio de indução (500 □M de 2,4D) foi a causa da desorganização do polo radicular dos embriões *tenera*, resultando na formação de *calli*. Uma vez que, neste trabalho, alguns embriões híbridos interespecíficos desenvolveram raízes além de *calli*, pode ser que ajustes na concentração de 2,4-D propiciem melhores resultados nos próximos experimentos com esses híbridos. A realização de experimentos com embriões coletados em outros estádios de desenvolvimento também poderá ser útil.

Conclusões

- *Calli* embriogênicos compactos e nodulares foram induzidos em embriões zigóticos de híbridos interespecíficos entre o caiaué e o dendezeiro.
- Houve variabilidade na resposta de embriões zigóticos cultivados em meio de indução e multiplicação de *calli*.

Agradecimentos

Ao CNPq, pelo suporte financeiro através do processo no. 401078/04-3. Aos Srs. Nelson Lourenço da Silva, Raimundo Oliveira do Nascimento e Raimundo César Pereira de Moraes, pela manipulação cuidadosa das sementes e dos embriões, até o momento de inoculação in vitro. A: Hilma Alessandra Rodrigues do Couto, Karina Pryscilla de Araújo Bichara e Rosimar Souza Carvalho, funcionárias do Laboratório de Biotecnologia Vegetal, pela condução dos experimentos, e a Sérgio Araújo da Silva, do Laboratório de Fisiologia Vegetal, pelo preparo das lâminas para microscopia.

Referências

BARCELOS, E.; NUNES, C. D. M.; CUNHA, R. N. V. da. Melhoramento genético e produção de sementes comerciais de dendezeiro. In: VIÉGAS, I. J.; MÜLLER, A. A. **A cultura do dendezeiro na Amazônia brasileira**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental; Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2000. p. 145-174.

CUNHA, R.N.V. et al. Produção de híbridos interespecíficos entre o caiaué (*Elaeis oleifera* (Kunt) Cortés) e o dendezeiro (*E. guineensis* Jacq.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL, 2., 2005, Varginha. **Biodiesel**: combustível ecológico. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2005. p. 292-297.

CUNHA, R. N. V. et al. Produção de cachos de caiaué da Amazônia brasileira. In: CONGRESSO NACIONAL DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2007, São Lorenço. **Anais...** Lavras: Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas, 2007.

GEORGE, E. F.; PUTTOCK, D. J. M.; GEORGE, H. J. **Plant media culture**: formulations and uses. Edington, England: Exegetics, 1988. v. 1. p. 309.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

SCHWENDIMAN, J.; PANNETIER, C.; MICHAUX-FERRIERE, N. Histology of somatic embryogenesis from leaf explants of the oil palm *Elaeis guineensis*. **Annals of Botany**, v. 62, p. 43-52, 1988.

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, 1993.

KANCHANAPOOM, K.; DOMYOAS, P. The origin and development of embryoids in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq) embryo culture. **Science (Asia)**, v. 28, p.195-202, 1999.

Comunicado Técnico, 72

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Amazônia Ocidental
Endereço: Rodovia AM 010, Km 29 - Estrada Manaus/Itacoatiara
Fone: (92) 3303-7800
Fax: (92) 3303-7820
http://www.cpaa.embrapa.br

1ª edição
1ª impressão (2009): 300 exemplares

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

BRASIL UM PAÍS DE TODOS GOVERNO FEDERAL

Comitê de Publicações

Presidente: *Celso Paulo de Azevedo*
Secretária: *Gleise Maria Teles de Oliveira*
Membros: *Aparecida das Graças Claret de Souza, José Ricardo Pupo Gonçalves, Lucinda Carneiro Garcia, Luis Antonio Kioshi Inoue, Maria Augusta Abtibol Brito, Maria Perpétua Beleza Pereira, Paulo César Teixeira, Raimundo Nonato Vieira da Cunha, Ricardo Lopes, Ronaldo Ribeiro de Morais.*

Expediente

Revisão de texto: *Maria Perpétua Beleza Pereira*
Normalização bibliográfica: *Maria Augusta Abtibol Brito*
Editoração eletrônica: *Gleise Maria Teles de Oliveira*