



# AVALIAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE HÍBRIDOS INTERESPECÍFICO DE PALMA DE ÓLEO SUBMETIDOS A DIFERENTES MEIOS DE MATURAÇÃO E GERMINAÇÃO

## EVALUATION OF SOMATIC EMBRYOS OF INTERSPECIFIC OIL PALM HYBRIDS SUBJECTED TO DIFFERENT MATURATION AND GERMINATION MEDIA

Joane dos Santos Neves<sup>1</sup>; Thauan Martins Lelis<sup>2</sup>; Rennan Oliveira Meira<sup>3</sup>; Inaê Mariê de Araújo Silva-Cardoso<sup>4</sup>; Jonny Everson Scherwinski-Pereira<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Bolsista FAPDF na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica, PqEB, Av. W5 Norte (final) – Brasília, DF – CEP, 70770-917. e-mail: [joaneneves\\_07@hotmail.com](mailto:joaneneves_07@hotmail.com)

<sup>2</sup>Universidade de Brasília - UnB, Campus Universitário Darcy Ribeiro – Brasília, DF – CEP 70910-90, e-mail: [thauanlelis98@gmail.com](mailto:thauanlelis98@gmail.com)

<sup>3</sup>Bolsista FAPDF na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica, PqEB, Av. W5 Norte (final) – Brasília, DF – CEP, 70770-917. e-mail: [rennan.meira@hotmail.com](mailto:rennan.meira@hotmail.com)

<sup>4</sup>Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica, PqEB, Av. W5 Norte (final) – Brasília, DF – CEP, 70770-917. e-mail: [inaemariefloresta@gmail.com](mailto:inaemariefloresta@gmail.com)

<sup>5</sup>Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica, PqEB, Av. W5 Norte (final) – Brasília, DF – CEP, 70770-917. e-mail: [jonny.pereira@embrapa.br](mailto:jonny.pereira@embrapa.br)

## INTRODUÇÃO

A palma de óleo ou dendezeiro (*Elaeis* spp.) é uma espécie de palmeira que ocorre em regiões tropicais úmidas da África, Ásia e América (MUKHERJEE; SOVACOOOL, 2014). Há uma alta demanda mundial por suas mudas, uma vez que a área plantada com palma de óleo geralmente precisa ser renovada a cada 25 anos, com uma rotatividade média de replantio de 4% ao ano (CORLEY; TINKER, 2016) e estimativa da necessidade de 100 milhões de mudas a cada ano (CUI et al., 2020).

A técnica de embriogênese somática garante a uniformidade e padrão das mudas produzidas, por preservar as características agrônomicas de plantas de interesse, com pesquisas, no cenário atual, concentrando-se principalmente nas etapas de maturação e germinação dos embriões somáticos, por serem etapas críticas do processo (MAZRI et al., 2019). A etapa de maturação é determinante da qualidade do embrião somático, pois nela ocorre a expansão, diferenciação e acúmulo de substância de reserva do embrião, sendo fundamental para a germinação bem-sucedida dos embriões somáticos (STASOLLA; YEUNG, 2003; MISHRA et al., 2012).

Para otimização da maturação dos embriões somáticos e consequente incremento da qualidade das plantas resultantes, diferentes trabalhos têm focado na manipulação de meios de cultura quanto aos tipos e concentrações de reguladores de crescimento e agentes osmóticos, como açúcares e Polietilenoglicol (PEG) (AHMADI et al., 2014; MEZIANI et al., 2016; MASRI et al., 2017). Desse modo, o trabalho teve por objetivo avaliar a maturação e germinação de embriões somáticos de um



híbrido interespecífico de *Elaeis oleifera* x *E. guineensis* (B351733), utilizando diferentes agentes osmóticos e diferentes concentrações.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos 2 (LCT-2), da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. O material utilizado para realização deste trabalho foram *clusters* (agrupamentos) de embriões somáticos, resultantes da embriogênese somática a partir de folhas imaturas (palmito) de plantas de um híbrido interespecífico de *Elaeis oleifera* x *E. guineensis* (B351733).

Para a realização da fase de maturação, os embriões somáticos foram transferidos em estágio de desenvolvimento similar ao torpedo, dispostos de forma agregada (*clusters* com cerca de 20 embriões somáticos por agregado), para os meios de cultura semissólido em tubos de ensaio com 10 mL de meio cada tubo, composto pelos sais de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e 2,3 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel (Sigma, St. Louis, MO), com diferentes composições de agentes osmóticos: Tratamento 1 (T1), 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose + 0 g.L<sup>-1</sup> de Polietilenoglicol (PEG); Tratamento 2 (T2), 45 g.L<sup>-1</sup> de sacarose + 0 g.L<sup>-1</sup> de PEG; Tratamento 3 (T3), 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose + 30 g.L<sup>-1</sup> de PEG; Tratamento 4 (T4), 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose + 45 g.L<sup>-1</sup> de PEG; Tratamento 5 (T5), 45 g.L<sup>-1</sup> de sacarose + 30 g.L<sup>-1</sup> de PEG; e Tratamento 6 (T6), 45 g.L<sup>-1</sup> de sacarose + 45 g.L<sup>-1</sup> de PEG. O pH dos meios de cultura foi ajustado para 5,8±1,0 antes da esterilização, realizada por autoclavagem a 121 °C durante 20 minutos, a 1,5 atm de pressão. Os *clusters* foram mantidos nos meios de maturação por 30 dias, em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas de luz e luminosidade de 100 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, a 25±2°C.

Posteriormente a esse período, os embriões somáticos foram transferidos para o meio de pré-germinação semissólido, em tubos de ensaio com 10 mL de meio cada tubo, composto pelos sais de MS, 0,25 g.L<sup>-1</sup> de caseína, 0,25 g.L<sup>-1</sup> de cisteína, 0,25 g.L<sup>-1</sup> de arginina, 0,25 g.L<sup>-1</sup> de asparagina, 2,5 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado e 2,3 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel (Sigma, St. Louis, MO). O pH do meio de cultura e as condições de armazenamento foram ajustadas como descrito anteriormente.

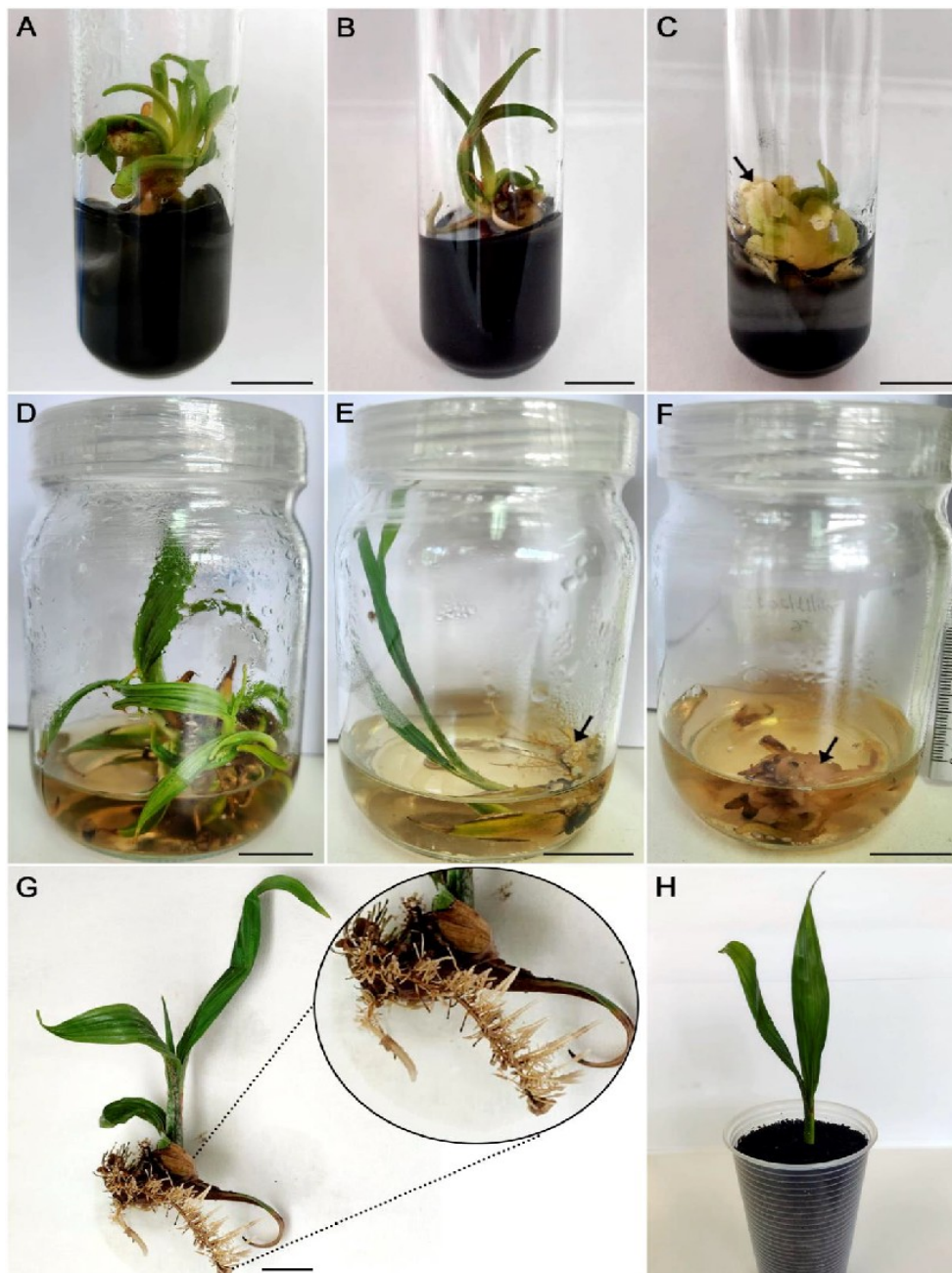
Os *clusters* de embriões esverdeados (critério para a maturação/germinação) foram transferidos mensalmente para meio de germinação líquido, composto por sais de MS, 0,25 g.L<sup>-1</sup> de caseína, 0,25 g.L<sup>-1</sup> de asparagina, 0,25 g.L<sup>-1</sup> de arginina, 0,25 g.L<sup>-1</sup> de cisteína, 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 1 mg.L<sup>-1</sup> de ácido giberélico (AG<sub>3</sub>), acomodados em frascos de vidros com aproximadamente 250 mL de meio por frasco. O pH, a esterilização do meio de cultura e as condições de armazenamento foram ajustadas como descrito anteriormente.

Após três meses de cultivo, avaliaram-se os percentuais de emissão de parte aérea e de enraizamento por *cluster*. O conjunto de dados obtido foi submetido à análise de variância (ANOVA) e, quando significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância ( $p \leq 0,05$ ), por meio do software estatístico R.

As plantas resultantes da fase germinação em meio líquido foram retiradas dos seus frascos de cultivo e transferidas para copos descartáveis de 300 mL de capacidade preenchidos com substrato comercial Bioplant®. Após o plantio, as mudas foram pré-aclimatizadas em câmaras tipo BOD (Percival, modelo I-30NL) a  $25\pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 12 horas e radiação luminosa de  $20\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

De modo geral, observaram-se alguns embriões somáticos com coloração branca e alguns poucos já esverdeados (Fig. 1C), sobretudo oriundos do tratamento 2 com  $45\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de sacarose, que ao final da avaliação, proporcionou 60% de germinação, considerando a emissão de parte aérea. Notou-se ainda, a presença de alguns embriões vitrificados em meios com PEG (Fig. 1F).





**Figura 1.** Caracterização morfológica da germinação de embriões somáticos de palma de óleo (Genótipo B35-1733) oriundos de diferentes tratamentos de maturação. **A, B.** Regeneração de plantas. **C.** Plantas em *cluster* com 60 dias em meio de germinação e após 30 dias em meio de maturação suplementado com 45 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. **D, E.** Plantas isoladas após 60 dias em meio de germinação e 60 dias em meio de maturação suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose + 30 g.L<sup>-1</sup> de PEG. **F.** *Clusters* com embriões somáticos vitrificados (seta) e com áreas escurecidas após 90 dias em meio de maturação suplementado com 45 g.L<sup>-1</sup> de sacarose + 45 g.L<sup>-1</sup> de PEG. **G.** Plantas com parte aérea e sistema radicular bem desenvolvidos oriundas do meio com 45 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. **H.** Plantas aclimatizadas Barras: A-C = 1 cm e D-F = 2 cm.

Ao longo do período de avaliação, verificou-se que uma parcela dos embriões somáticos adquiriu coloração esverdeada, concomitantemente ao alongamento expressivo, acompanhado da emissão do meristema caulinar (Fig. 1B).

Após 30 dias em meio de germinação, observou-se o desenvolvimento da parte aérea e raiz, com plantas completas obtidas (Fig. 1A). Verificou-se um efeito das concentrações sobre o número de embriões germinados, com alguns tratamentos proporcionando a individualização das plantas (Fig. 1B). O número de embriões germinados diminuiu com o aumento das concentrações de PEG, os quais apresentaram embriões com sinais de vitrificação e escurecidos (Fig. 1F).

Divergindo dos resultados obtidos aqui, Oliveira et al. (2022) relataram, em seus estudos com jabuticaba (*Plinia cauliflora* Mart.), que não houve diferença nos resultados alcançados nos meios de cultura suplementados com PEG, seja para oxidação ou para sobrevivência. Também foi relatado por Bajpai et al. (2016), ao utilizarem PEG para maturação de embriões somáticos de goiabeira (*Psidium guajava*), a obtenção de um número considerável de embriões somáticos cotiledonares.

A maior emissão de parte aérea foi proporcionada pelo tratamento de maturação com 45 g.L<sup>-1</sup> de sacarose (T2), com valor médio de 4 plantas por recipiente. Já com relação ao enraizamento, não se verificou diferença entre os tratamentos de maturação.

Durante a fase de aclimatização, período crítico no qual as plantas cultivadas *in vitro* são suscetíveis à perda de umidade e à murcha ao serem transferidas para condições *ex vitro*, foi possível estabelecer com sucesso as plantas. Após a completa formação *in vitro* (Fig. 1G), somente as plantas inteiras, incluindo raiz e parte aérea, foram transplantadas, resultando em uma elevada taxa de sobrevivência das plantas aclimatizadas (Fig. 1H).

## CONCLUSÃO

As concentrações de PEG utilizadas nas condições experimentais resultaram em embriões hiperhídricos e oxidados, com baixas taxas de germinação e enraizamento em palma de óleo (Genótipo B35-1733). Dentre os tratamentos avaliados, o uso de 45 g.L<sup>-1</sup> de sacarose destacou-se como o mais eficaz, promovendo o maior número de plantas germinadas.

## AGRADECIMENTO

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF), pelo auxílio concedido ao projeto.



## REFERÊNCIAS

AHMADI, B.; SHARIATPANAHI, M. E.; SILVA, J. A. T. Efficient induction of microspore embryogenesis using abscísico acid, jasmonic acid and salicylic acid in *Brassica napus* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 116, n. 3, p. 343-351, 2014.

BAJPAI, A., KALIM, S., CHANDRA, R., & KAMLE, M. Recurrent somatic embryogenesis and plantlet regeneration in *Psidium guajava* L. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 59, n. único, p. 1-11, 2016.

CORLEY, R. H. V.; TINKER, P. H. B. **Diseases of the oil palm**. The Oil Palm, 5th edition. Chichester: Wiley Blackwell, 2016. p. 399-437

CUI, J.; LAMADE, E.; TCHERKEZ, G. Seed Germination in Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.): A Review of Metabolic Pathways and Control Mechanisms. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 12, p. 4227, 2020.

MAZRI, M. A.; BELKOURA, I.; MEZIANI, R.; MOKHLES, B.; NOUR, S. Somatic embryogenesis from bud and leaf explants of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. 'Najda'. **3 Biotech**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2017.

MAZRI, M. A.; MEZIANI, R.; BELKOURA, I.; ELMAATAOUI, S.; MOKHLESS, B.; NOUR, S. Maturation and germination of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) somatic embryos. **Notulae Scientia Biologicae**, v. 11, n. 1, p. 86-93, 2019.

MEZIANI, R.; JAITI, F.; MAZRI, M. A.; HASSANI, A.; BEN, S.; ALEM, C. Organogenesis of *Phoenix dactylifera* L. cv. 'Mejhoul': Influences of natural and synthetic compounds on tissue browning, and analysis of protein concentrations and peroxidase activity in explants. **Scientia Horticulturae**, v. 204, n. único, p. 145-152, 2016.

MISHRA, S.; SANYAL, I.; AMLA, D. V. Changes in protein pattern during different developmental stages of somatic embryos in chickpea. **Biologia Plantarum**, v. 56, n. 4, p. 613-619, 2012.

MUKHERJEE, I.; SOVACOOOL, B. K. Palm oil-based biofuels and sustainability in southeast Asia: A review of Indonesia, Malaysia, and Thailand. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 37, n. único, p.1-12, 2014.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiology Plantarum**, v. 15, n. único, p. 473-497, 1962.

OLIVEIRA, F. L. R.; SANT'ANNA-SANTOS, B. F.; FRAGA, H. P.; DEGENHARDT, J.; QUOIRIN. Embryogenic cultures and somatic embryos development from mature seeds of jaboticaba (*Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 94, n. 1, p. e20201073, 2022.

STASOLLA, C.; YEUNG, E. C. Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. **Plant Cell and Tissue Organ Culture**, v. 74, n.1, p. 15-35, 2003.