

Notas Científicas

Tolerância de sementes de dendezeiro à criopreservação

Julcécia Camillo⁽¹⁾, Zanderluce Gomes Luis⁽¹⁾ e Jonny Everson Scherwinski-Pereira⁽¹⁾

⁽¹⁾Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Avenida W5 Norte (final), CEP 70770-900 Brasília, DF. E-mail: julceia@gmail.com, zanbio@hotmail.com, jonny@cenargen.embrapa.br

Resumo – O objetivo deste trabalho foi avaliar a tolerância de sementes de dendezeiro (*Elaeis guineensis*) à criopreservação. Cinco genótipos – CM589, C7201, C2528, C2001, C2501 – foram avaliados quanto à exposição ao nitrogênio líquido por sete dias. Os tratamentos foram repetidos três vezes e cada repetição foi formada por dez sementes. Cortes anatômicos foram realizados para comparação do efeito dos tratamentos nos embriões durante a germinação. A exposição ao nitrogênio líquido acelerou a germinação das sementes do genótipo CM589 e aumentou o potencial de germinação das sementes do genótipo C2528. A exposição ao nitrogênio líquido não teve efeito no genótipo C2501 e reduziu a germinação das sementes do genótipo C7201. A exposição ao nitrogênio líquido não interferiu na diferenciação e no desenvolvimento dos tecidos embrionários durante a germinação.

Termos para indexação: *Elaeis guineensis*, germinação, micropropagação.

Oil palm seeds tolerance to cryopreservation

Abstract – The aim of this work was to evaluate the oil palm (*Elaeis guineensis*) seed tolerance to cryopreservation. Five genotypes (CM589, C7201, C2528, C2001, and C2501) were evaluated with or without exposure to liquid nitrogen for seven days. Treatments were replicated three times with ten seeds per replicate. Serial anatomical cuts were made to compare the effect of treatments on zygotic embryos. For CM589 and C2528, the exposition to liquid nitrogen accelerated and increased seed germination, respectively. For C2501, liquid nitrogen had no effect. For C7201, liquid nitrogen reduced seed germination (90.7%) compared to the check (100%). Anatomically, the liquid nitrogen did not interfere with embryonic tissue differentiation or development during germination.

Index terms: *Elaeis guineensis*, germination, micropropagation.

Na busca de patamares mais elevados de quantidade de óleo produzida por hectare, têm-se pesquisado espécies potenciais como, por exemplo, o dendê, cujo rendimento pode atingir 6 t ha⁻¹ de óleo, o que corresponde a dez vezes a produção de óleo da soja, fato que caracteriza o dendê como a espécie de maior produtividade de óleo vegetal do mundo. Ele ainda tem a vantagem de poder ser explorado por um período aproximado de 25 anos (Miragaya, 2005). Em razão desse potencial, programas de melhoramento dessa espécie têm sido implementados, com ênfase na introdução, seleção, clonagem e melhoramento genético de materiais com características agrônômicas de interesse. Embora o cultivo restrinja-se quase que exclusivamente à espécie *Elaeis guineensis*, originária do continente africano, a espécie *E. oleifera*, originária do continente americano, conhecida no Brasil como Caiaué, tem sido incorporada nos programas de

melhoramento genético. Apresenta importantes características como: porte baixo, óleo de boa qualidade e resistência a doenças, inclusive ao amarelecimento fatal, que é o maior problema de cultivos na América, e à fusariose, que é o maior problema de cultivos da África (Bergamin Filho et al., 1998).

Nos anos 80, a Embrapa e o Institut de Recherches pour les Huiles et Oleagineux (IRHO), da França, implantaram extensivas coleções de germoplasma de Caiaué e *E. guineensis* na Bacia Amazônica, o que constitui valiosa fonte de material genético (Barcelos, 1998; Moretzsohn et al., 2002). A manutenção dessas coleções em campo é dispendiosa, e o desenvolvimento de novas formas de conservação desse material é de fundamental importância para se evitar perdas.

Sementes de dendê são classificadas como intermediárias, quanto ao comportamento no armazenamento, fato que dificulta sua conservação por técnicas

convencionais, geralmente a temperaturas subzero (-20°C) (Ellis et al., 1991). A criopreservação pode ser uma alternativa, uma vez que permite conservar material por longos períodos em temperaturas extremamente baixas (-196°C). As principais vantagens de se armazenar material vegetal em nitrogênio líquido são o baixo custo de armazenamento – por não necessitar de sistema de refrigeração –, a longevidade da conservação e o espaço físico reduzido. Por isso, estudos relacionados à conservação e à germinação de sementes dessa espécie são essenciais, para a disponibilização de germoplasmas para os programas de melhoramento genético e para o desenvolvimento de tecnologias favoráveis à produção e à exploração comercial da cultura.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade da conservação de germoplasma de dendezeiro em nitrogênio líquido.

Sementes de cinco genótipos de dendezeiro – CM589, C7201, C2001, C2528 e C2501 – da Área Experimental da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM, foram divididas em dois sublotes: testemunha, não expostas ao nitrogênio líquido, e sementes imersas em nitrogênio líquido. As sementes foram acondicionadas em sacos aluminizados trifoliados e expostas ao nitrogênio líquido por meio do congelamento rápido, por um período de sete dias. O descongelamento foi feito em temperatura ambiente ($25\pm 3^{\circ}\text{C}$), por 12 horas. Em seguida, o tegumento das sementes foi removido de forma manual, separando-se as amêndoas. Os embriões zigóticos foram extraídos e inoculados, individualmente, em tubos de ensaio para germinação. O meio de cultura utilizado para a germinação foi o MS (Murashige & Skoog, 1962), a 50% da concentração de sais, acrescido de 2 mg L^{-1} de ácido pantotênico, 3% de sacarose e 0,25% de Phytigel (Merck). O pH do meio foi ajustado para $5,7\pm 0,1$ antes da autoclavagem, que foi realizada por 15 min, sob temperatura de 121°C e pressão de 1,3 atm. Os embriões acondicionados em tubos de ensaio de $25\times 150\text{ mm}$ foram mantidos no escuro até o início da formação da plúmula – 1 a 2 cm de comprimento –, sendo em seguida expostos à luz branca em sala de crescimento com temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, intensidade luminosa de $30\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas. Foram realizadas avaliações semanais a partir do 14º dia, considerando-se inicialmente como germinados apenas os embriões

com bainha foliar desenvolvida. Devido ao limitado número de sementes disponíveis, cada tratamento foi repetido três vezes, e cada repetição foi formada por dez sementes. Para avaliar possíveis alterações anatômicas ocorridas durante a imersão em nitrogênio líquido, embriões zigóticos desse tratamento foram anatomicamente comparados com embriões do tratamento testemunha, após o início da germinação. Para tanto, embriões zigóticos com cerca de 14 dias de cultivo *in vitro* foram imersos em solução fixadora composta de glutaraldeído (2,5%), paraformaldeído (4%) e tampão cacodilato de sódio (0,05 M, pH 7,1), por 24 horas, sob vácuo, e lavados três vezes no mesmo tampão. Subsequentemente, as amostras foram desidratadas em uma série alcoólica crescente, infiltradas e incluídas em historresina (Leica). Cortes seriados longitudinais e transversais (7 e $10\text{ }\mu\text{m}$) foram obtidos em micrótomo rotatório, corados com azul de Toluidina e montados com Entellan. Os resultados foram registrados em fotomicroscópio Zeiss, modelo Axioskop, acoplado a um sistema digital de captura de imagens (Software ImagePro 4.0).

De maneira geral, os dados de germinação mostraram diferenças significativas entre os tratamentos para os genótipos CM589, C2528 e C7201 (Tabela 1). Nos dois primeiros, as diferenças começaram a ser observadas a partir do 21º dia de cultivo, em que a imersão das sementes em nitrogênio líquido aumentou o potencial de germinação dos embriões zigóticos. No 28º dia essa melhora na germinação manteve-se, mas somente no genótipo C2528. Neste período de avaliação, a imersão de sementes de dendezeiro em nitrogênio líquido foi afetada somente no genótipo C7201. Neste caso, apesar de as sementes expostas ao nitrogênio líquido terem apresentado uma taxa de germinação em torno de 90%, este número foi significativamente inferior ao observado no tratamento testemunha, que foi de 100%. Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos nos demais genótipos (Tabela 1).

Entre os genótipos, verificou-se que, de maneira geral, as menores taxas de germinação foram observadas no C2528 e no C2501. Neste último, as diferenças em relação aos demais genótipos foram observadas já a partir do 21º dia de cultivo, especialmente quando as sementes foram expostas ao nitrogênio líquido, embora no 28º dia a diferença entre os tratamentos tenha desaparecido. Engelmann et al. (1995), ao trabalhar

com criopreservação de sementes de dendezeiro desprovidas de seu tegumento, obtiveram taxas de germinação de até 65% das sementes criopreservadas, após 1 hora de exposição ao nitrogênio líquido e rápida reidratação dos embriões zigóticos, antes da germinação *in vitro*. Além do fator genótipo e da característica da semente, a baixa taxa de germinação obtida por esses autores pode estar relacionada à rápida reidratação realizada logo após o tratamento, o que pode ocasionar substanciais modificações metabólicas nos embriões, com a mobilização de carboidratos e lipídeos, além de poder influenciar negativamente a síntese de proteínas. No entanto, dependendo do momento da reidratação, ela pode ser altamente desejável, uma vez que pode haver degradação de amido, que é abundante na semente de dendê. Isto permite rápido aumento na concentração de açúcares solúveis, que podem ser determinantes na aquisição da tolerância à dessecação, seja pela substituição da água das membranas celulares ou por induzir a vitrificação intracelular em temperatura ambiente (Ellis et al., 1991; Engelmann et al., 1995).

O estudo anatômico comparativo dos embriões revelou que o tratamento com imersão em nitrogênio líquido não interferiu na diferenciação e no desenvolvimento de tecidos embrionários durante a germinação (Figura 1). Verificou-se que o desenvolvimento inicial do embrião ocorreu a partir do sétimo dia da inoculação *in vitro*. Neste estágio, observou-se que a região distal do embrião, denominada haustório, ou o verdadeiro cotilédone das palmeiras (Figura 1 A e B), está conectada ao

embrião através de feixes vasculares (Figura 1 A), com a função de dissolver e absorver o endosperma, para promover a germinação e o desenvolvimento inicial do embrião. O meristema apical do caule é o primeiro a se desenvolver com a plúmula, que conta inicialmente com quatro primórdios foliares diferenciados, em que os dois primeiros permanecem apenas no estágio de bainha. As bainhas são as primeiras estruturas a emergir, e sinalizam o início da germinação. Durante a germinação, o meristema radicular se reorganiza e suas células ficam dispostas em fileiras (Figura 1 C) para, posteriormente, formar o eixo central da radícula (Figura 1 D). A protusão da raiz primária ocorre após a emergência das primeiras folhas verdadeiras, e o seu deslocamento se dá em direção contrária à plúmula, que por sua vez, com a radícula, desenvolve-se perpendicularmente ao eixo do cotilédone. Neste trabalho, plântulas que apresentaram eofilos e raízes primárias bem desenvolvidas foram observadas aos 90 dias e, ao final de sete meses de avaliação do crescimento, a incidência de plantas anormais não foi constatada. É, portanto, possível criopreservar germoplasma de dendezeiro a partir de sementes com tegumento, sem a necessidade do uso de crioprotetores.

A exposição das sementes a temperaturas subzero na presença do tegumento oferece uma proteção maior, uma vez que reduz significativamente os danos causados ao embrião por contaminações externas e os danos decorrentes da manipulação e exposição à temperatura extrema.

Tabela 1. Germinação *in vitro* de embriões zigóticos excisados de sementes de cinco genótipos de dendezeiro (fator A), submetidos (+NL) ou não (TEST) ao tratamento de criopreservação em nitrogênio líquido (fator B), aos 14, 21 e 28 dias de cultivo⁽¹⁾.

| Genótipo | Germinação (%) | | | | | | | | |
|--------------|---------------------|--------|-------|---------|---------|--------|---------------------|---------|--------|
| | 14 dias | | | 21 dias | | | 28 dias | | |
| | TEST | +NL | Média | TEST | +NL | Média | TEST | +NL | Média |
| CM589 | 81,1aA | 97,6aA | 89,3a | 86,0aB | 100,0aA | 93,0a | 97,6abA | 100,0aA | 98,8a |
| C7201 | 81,1aA | 80,0aA | 80,5a | 81,1aA | 80,0abA | 80,5ab | 100,0aA | 90,7abB | 95,3a |
| C2001 | 53,3aA | 60,6aA | 56,9a | 67,7aA | 80,0abA | 73,8ab | 100,0aA | 97,6abA | 98,8a |
| C2528 | 60,6aA | 94,9aA | 77,7a | 67,1aB | 100,0aA | 83,5ab | 73,8bB | 100,0aA | 86,9ab |
| C2501 | 60,6aA | 53,3aA | 56,9a | 73,8aA | 67,1bA | 70,4b | 73,8bA | 73,8bA | 73,8b |
| Médias (AxB) | 67,3A | 77,3A | - | 75,1B | 85,4A | - | 89,0A | 92,4A | - |
| F (A): | 2,255 ^{ns} | | | 3,626* | | | 8,417** | | |
| F (B): | 1,834 ^{ns} | | | 7,707* | | | 0,592 ^{ns} | | |
| F (AxB): | 0,829 ^{ns} | | | 2,863* | | | 5,993** | | |
| CV (%) | 28,4 | | | 17,8 | | | 12,1 | | |

⁽¹⁾Médias seguidas de mesma letra, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

^{ns}Não-significativo. * e **Significativo a 5 e 1% de probabilidade, pelo teste F.

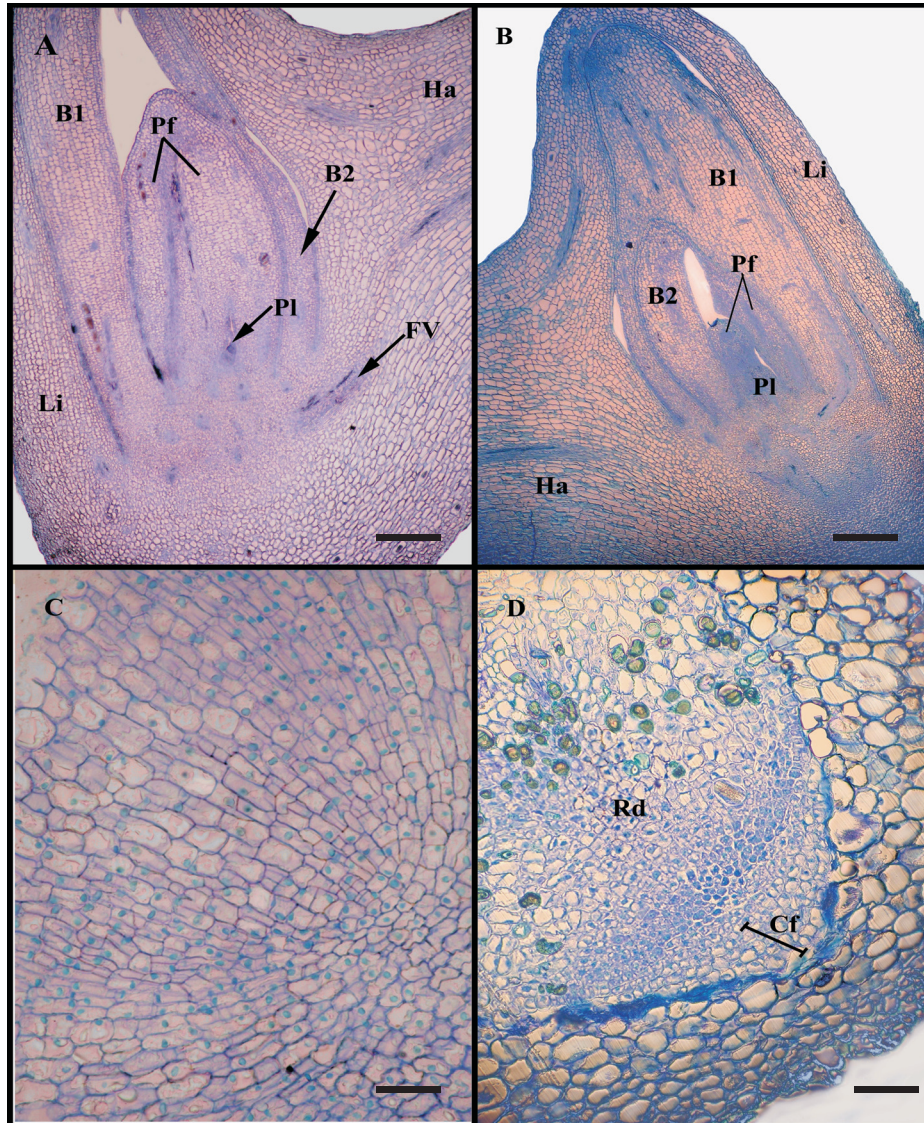


Figura 1. Secção longitudinal (A e B) e do sistema radicular (C e D) de embriões zigóticos de *Elaeis* sp. excisados de sementes criopreservadas, aos oito dias após a inoculação in vitro. A, embrião zigótico do tratamento testemunha; B, embrião zigótico exposto ao nitrogênio líquido; C, organização do meristema radicular; D, radícula com coifa diferenciada. Pl, plúmula; Pf, primórdios foliares; B1, primeira bainha; B2, segunda bainha; Li, lígula; Ha, haustório; FV, feixe vascular. Barras: A e B, 200 µm; C, 50 µm; D, 100 µm.

Agradecimentos

À Embrapa Amazônia Ocidental, pelo fornecimento das sementes; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo apoio financeiro e bolsas concedidas.

Referências

BARCELOS, E. Étude de la diversité génétique du genre *Elaeis* (*E. oleifera* Kunth Cortés et *E. guineensis* Jacq.) par marqueurs moléculaires (RFLP et AFLP). 1998. 136p. Tese (Doutorado) - Université de Montpellier, Montpellier.

- BERGAMIN FILHO, A.; AMORIN I.; LARANJEIRA, F.F.; BERGER, R.D.; HAU, B. Análise temporal do amarelecimento fatal do dendezeiro como ferramenta para elucidar sua etiologia. **Fitopatologia Brasileira**, v.23, p.391-396, 1998.
- ELLIS, R.H.; HONG, T.D.; ROBERTS, E.H.; SOETISNA, U. Seed storage behavior in *Elaeis guineensis*. **Seed Science Research**, v.1, p.99-104, 1991.
- ENGELMANN, F.; CHABRILLANGE, N.; DUSSERT, S.; DUVAL, Y. Cryopreservation of zygotic and kernels of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq). **Seed Science Research**, v.5, p.81-86, 1995.
- MIRAGAYA, J.C.G. Biodiesel: tendências no mundo e no Brasil. **Informe Agropecuário**, v.26, p.7-13, 2005.
- MORETZSOHN, M.C.; FERREIRA, M.A.; AMARAL, Z.P.S.; COELHO, P.J.A.; GRATTAPAGLIA, D.; FERREIRA M.E. Genetic diversity of Brazilian oil palm (*Elaeis oleifera* H.B.K.) germplasm collected in the Amazon forest. **Euphytica**, v.124, p.35-45, 2002.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

Recebido em 18 de setembro de 2008 e aprovado em 30 de janeiro de 2009