

Indução da duplicação cromossômica em anteras para obtenção de plantas di-haplóides de acessos de coqueiro-anão

Isabella Cicera Dias Miranda¹, Sara Dayan da Silva Oliveira², Aparecida Gomes de Araujo³, Caroline de Araújo Machado⁴, Annie Carolina Araújo⁵, Leandro Eugenio Cardamone Diniz⁶

Resumo

A espécie *Cocos nucifera* L., conhecida popularmente como coqueiro, é uma planta que apresenta característica tropical. Apresenta duas variedades de destaque, *Typica* (var. Gigante) e *Nana* (var. Anã), sendo o Brasil o quarto maior produtor mundial. A busca por estratégias para a produção de plantas duplo-haplóides tem se tornado vantajosa para os programas de melhoramento genético vegetal e de biotecnologia, com auxílio de tecnologias que propiciam a redução do tempo para obtenção de plantas homozigóticas. O uso de antimitóticos que induzem a duplicação em células vegetais, como a colchicina que agem interrompendo a despolimerização das fibras mitóticas. Assim, esse trabalho tem como objetivo induzir a duplicação cromossômica em anteras de coqueiro utilizando diferentes concentrações de colchicina. Com a excisão das anteras em câmara de fluxo laminar e procedimento de assepsia, as anteras foram imersas nas diferentes concentrações de colchicina (0; 250; 500 e 1000 mg/L) e armazenadas na temperatura de 8° C em BOD por um período de 24h e 48h. No término do período foram transferidas para placas estéreis descartáveis contendo o meio padrão Eeuwens Y3 com modificações suplementado com 9% de sacarose, 0,1% carvão ativado, 0,7% de ágar e pH ajustado para 5,8,

Graduanda em Biologia, estagiária da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

²Graduanda em Biologia, estagiária da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

³Engenheira-agrônoma, pós-doutora em Agronomia, bolsista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

⁴Bióloga, doutoranda em Agricultura e biodiversidade, bolsista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

⁵Engenheira-florestal, mestranda em Agricultura e Biodiversidade, bolsista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

⁶Biólogo, doutor em Genética e Melhoramento, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

e auto clavado por 20 minutos e armazenado na ausência de luz. Portanto, diante das observações realizadas no decorrer do experimento foi possível verificar que a oxidação afeta consideravelmente a resposta do explante in vitro de maneira negativa e altas concentrações de colchicina elevam o escurecimento do material.

Palavras-chave: anteras, *Cocos nucifera* L., colchicina, duplicação cromossômica.

Introdução

A espécie *Cocos nucifera* L., conhecida popularmente como coqueiro, é uma planta que apresenta característica tropical, com um alto desempenho em condições climáticas favoráveis, com latitudes 20° N e 20° S (PASSOS, 1998). As variedades mais importantes são Typica (var. Gigante) e Nana (var. Anã). O Brasil é o quarto produtor mundial de coqueiro com 257 mil ha de área colhida desempenhando alta produtividade (MARTINS et al., 2013). O coqueiro anão apresenta o crescimento vegetativo lento, precoce, e sua produção têm início entre dois a três anos após o plantio. Atinge de 10 até 12 m de altura, e apresenta uma vida útil de 30 a 40 anos. Caracteriza-se por caule tipo estipe delgado e folhas numerosas, com uma produtividade de frutos pequenos de 150 a 200 frutos/planta/ano (ARAGÃO, 2002).

A inflorescência é paniculada, axilar, revestida por brácteas longas denominadas de espata. Em torno de três a quatro meses a espata completa seu desenvolvimento quando se abre e libera a inflorescência que apresenta um pedúnculo, espigas e flores. As flores masculinas e femininas do coqueiro anão possuem o ciclo de amadurecimento próximo, sendo assim ocorre a autofecundação (PASSOS, 1997 citado por SARRO, 2004).

A estratégia de produção de plantas dupla haplóides tem se tornada vantajosa para os programas de melhoramento genético vegetal e de biotecnologia (ISLAM, 2010). Com o potencial para o desenvolvimento de plantas homocigotas a partir de uma planta diplóide. A planta haplóide que apresenta metade do número de cromossomos da espécie pode ser desenvolvida in vivo com o pólen irradiado; a partir da polinização do pólen estéril; tratamento com choques térmicos; hibridização distante e in vitro com a oosfera não fecundada

e pela cultura de anteras e ou grãos de pólen (SANTANA, 2001). Todas essas tecnologias propiciam a redução do tempo para obtenção de plantas homozigotas, que se mostram com potencial de regeneração das linhagens haploide ou duplo-haploide (MILANI, 2005).

A técnica de cultura de anteras é uma ferramenta primordial para o desenvolvimento de linhagens homozigóticas, onde se utiliza o meio de cultura adequado, a partir da inoculação de uma substância nutritiva que irá ocasionar a formação de calos ou embrioides, e logo regenerar plantas haploides ou duplo-haploides (PIERRE, 2011). O uso de antimitóticos é uma das alternativas mais utilizadas para duplicação cromossômica em diversas cultivares. O agente mais utilizado em pesquisa é a colchicina, um alcalóide com alta toxicidade (RODRIGUES, 2010) sendo utilizada para induzir a duplicação cromossômica em células vegetais (LATADO, 2007). Essa substância desempenha a ação de ligar-se a uma proteína que forma as fibras do fuso mitótico, sua ação impede a despolimerização, ou seja, suspende a organização das fibras e inativas as que já estão formadas (GUERRA, 1989 citado por RODRIGUES, 2010).

Segundo Allard (1971) apud Amaral (2013) os agentes antimitóticos agem em células de tecidos meristemáticos em divisão, inibindo durante a metáfase a formação do fuso acromático. Desse modo, os cromossomos após terem sido duplicados, não se movimentam para os polos das células, por que não há segregação na anáfase, devido à ausência de fuso mitótico, e nem ocorre à citocinese (divisão citoplasmática). Com a formação da membrana nuclear, a célula fica com o dobro do número de cromossomos que possuía no início do ciclo. Para RODRIGUES (2010) o processo da seleção da cultivar, a variação da concentração, o tempo de exposição e a maneira de como aplicar o antimitótico são pontos de importância para o sucesso da duplicação cromossômica. Sendo assim, o trabalho tem como objetivo induzir a duplicação cromossômica em anteras de coqueiro utilizando diferentes concentrações de colchicina.

Material e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos, e a inflorescência utilizada foi proveniente do BAG de coco da Embrapa Tabuleiros Costeiros localizada no campo experimental de Itaporanga d'Ajuda, SE. O meio padrão utilizado foi o Eeuwens Y3 com modificações (KARUNARATNE et al., 1985; FERNANDO; GARAGE, 2000) suplementado com 9% de sacarose, 0,1% carvão ativado, 0,7% de ágar e pH ajustado para 5,8, e auto clavado por 20 minutos a uma temperatura de $121 \pm 1^\circ\text{C}$ e pressão de 1,05 atm, vertido em placas descartáveis em câmara de fluxo laminar e armazenado na ausência de luz.

Solução estoque de colchicina

O preparo da solução estoque ocorreu em capela de exaustão, sendo dissolvida 260 mg de colchicina em água destilada, numa solução total de 130 mL. A partir da solução estoque foram elaborados os tratamentos nas concentrações de 0; 250; 500 e 1000 mg/L, essas soluções foram armazenadas em tubos de Falcon previamente autoclavados, e em seguida armazenados a 8°C na BOD.

Tratamento com colchicina

A partir da abertura forçada da inflorescência da folha oito do coqueiro anão, as flores masculinas foram selecionadas e posteriormente submetidas ao procedimento de assepsia realizado na câmara de fluxo laminar, a partir da imersão em álcool 70% por três minutos; seguido por cinco minutos em uma solução de hipoclorito de sódio a 6%, ambos sob agitação finalizando com tríplex lavagem em água destilada auto clavada. Após desinfestação, ocorreu a excisão das anteras utilizadas em todos os tratamentos.

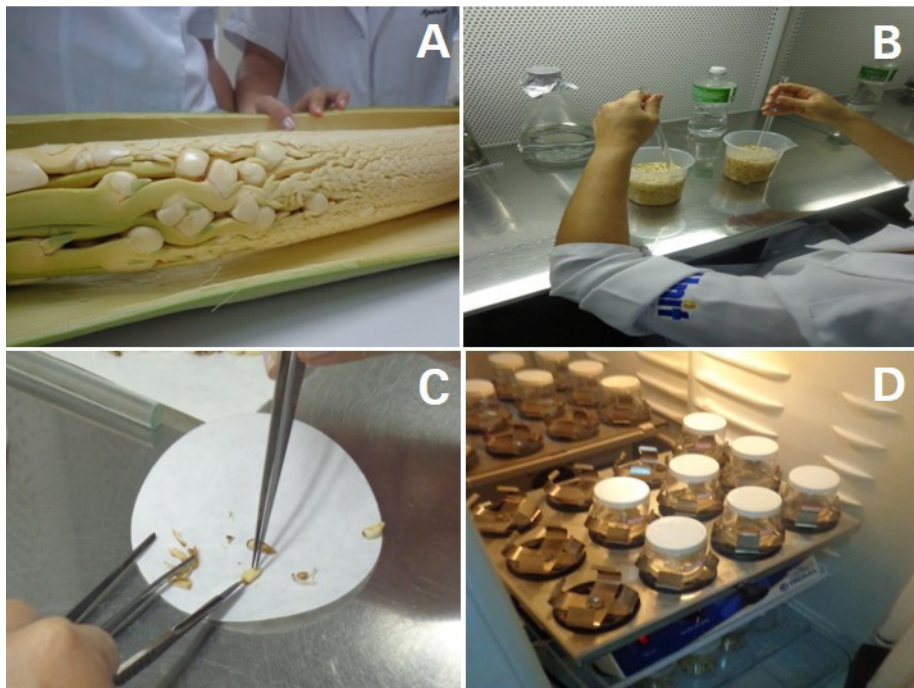
As anteras foram imersas nas concentrações de colchicina (0; 250; 500 e 1000 mg/L) e armazenadas à temperatura de 8°C em BOD por um período de 24h e 48h. Ao fim de cada período, as anteras foram retiradas da solução e inoculadas no meio Y3. As placas foram incubadas em sala de crescimento em ausência da luz.

O delineamento foi inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 2x4, sendo dois tempos de imersão em solução e quatro concentrações de colchicina. Para cada tratamento (concentração) utilizou-se cinco placas

contendo oito anteras cada uma, totalizando 40 anteras/ tratamento. Ocorreram avaliações quinzenais por meio de observação a olho nu e em microscópio estereoscópico (lupa) como forma de monitoramento para observar a presença de estrutura/massa calosa na antera; seu desenvolvimento e porcentagem de contaminação. Todas essas informações foram documentadas com anotações e registro em fotos.

Resultados e Discussão

As Figuras 1A, 1B, 1C, 1D mostram a sequência utilizada para o tratamento inicial da inflorescência até o tratamento com colchicina. Na Figura 1A podemos ver a inflorescência após abertura forçada, na Figura 1B a assepsia das flores masculinas selecionadas em câmara de fluxo laminar, na Figura 1C vemos a excisão das anteras a partir de flores masculinas em ambiente asséptico. Finalizando com a imersão em diferentes concentrações 0, 250, 500 e 1000 mg/L de colchicina e levadas à BOD a 8° C sob agitação (Figura 1D).



Fotos: Isabella Cícera Dias Miranda

Figura 1. Sequência utilizada para o tratamento inicial da inflorescência até o tratamento com colchicina. A) Inflorescência após abertura forçada; B) Assepsia na câmara de fluxo laminar; C) Excisão das anteras em câmara de fluxo laminar; e D) Anteras imersas na diferentes concentrações de colchicina.

Após 24h e 48h, as anteras imersas em cada concentração foram retiradas da solução de colchicina e inoculadas em placas descartáveis contendo o meio Y3 (Figura 2A), sendo dispostas em sala de crescimento em ausência de luz.

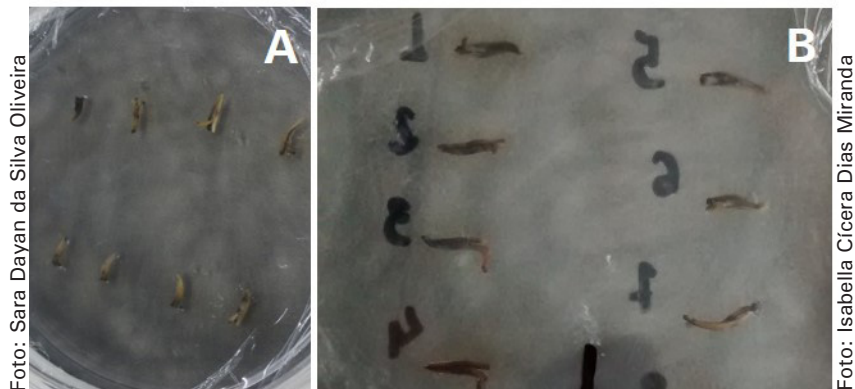


Figura 2. A) Placa contendo anteras provenientes da imersão em colchicina durante 24h. B) Placa contendo anteras com início de oxidação.

No período de 30 dias observou-se o escurecimento das anteras devido à oxidação (Figura 2B), processo que também é citado na literatura para outras espécies com café (*Coffea arabica* L.) estudado por CERQUEIRA, 2014.

Da primeira à terceira avaliação ainda em relação à oxidação, observou-se pelo método comparativo o grau de escurecimento das anteras inoculadas provenientes das diferentes concentrações, nos períodos de 24h (Figura 3) e 48h (Figura 4).

Fotos: Isabella Cícera Dias Miranda

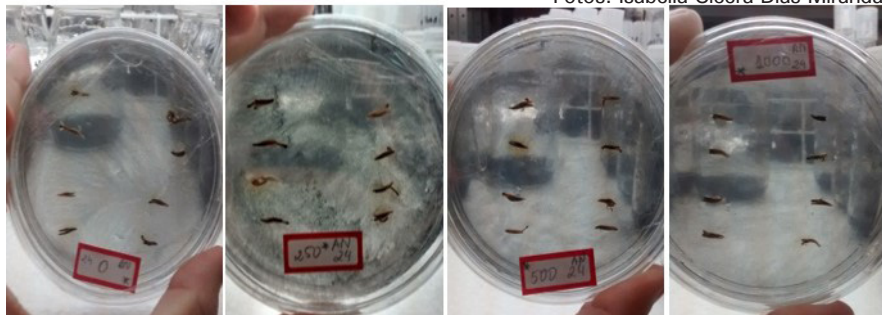


Figura 3. Placas do tratamento de 24h. Da esquerda para a direita 0; 250; 500 e 1000 mg/L.

Fotos: Isabella Cícera Dias Miranda

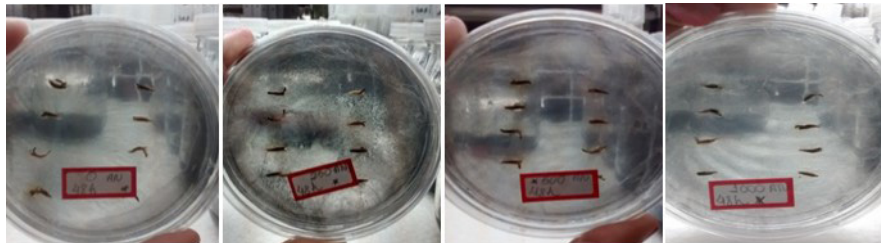


Figura 4. Placas do tratamento de 48h. Da esquerda para a direita 0; 250; 500 e 1000 mg/L.

A partir dessas observações visuais foi possível identificar que a concentração de 1000 mg/L de colchicina após imersão por 24h e 48h respectivamente (Figura 5), pode ter influenciado no maior grau de escurecimento das anteras, ou seja, na sua oxidação.

Fotos: Isabella Cícera Dias Miranda

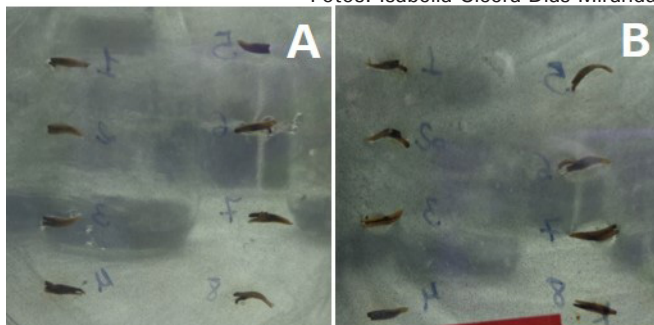


Figura 5. A) Anteras com imersão por 24 horas; B) Anteras com imersão por 48h. Placas com 30 dias de experimento.

Em torno de 75 dias verificou-se a presença de gotículas de água sobre a epiderme das anteras, o que pode ser entendido como um processo natural de desidratação do explante (Figura 6A). Nas últimas avaliações pôde ser observado um grande número de anteras que apresentaram o crescimento de uma estrutura carnosa em sua extremidade (Figura 6B).

Fotos: Sara Dayan Oliveira e Isabella Cícera Dias Miranda

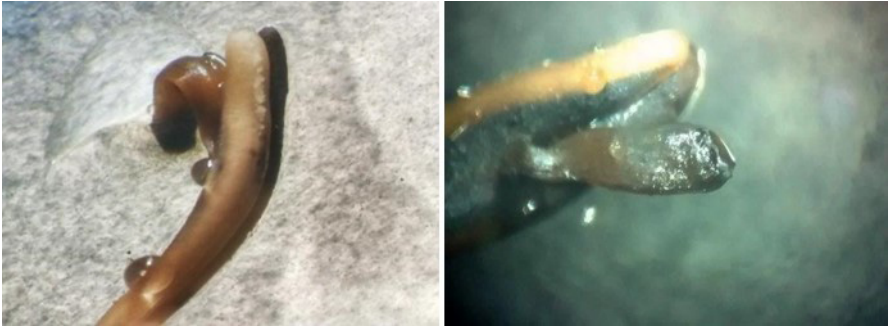


Figura 6. Estruturas carnosas da antera.

Conclusões

Diante das observações realizadas no decorrer do experimento, a oxidação afeta consideravelmente a resposta do explante in vitro de maneira negativa. Altas concentrações de colchicina elevam o escurecimento do material.

Agradecimentos

À Embrapa Tabuleiros Costeiros, à pesquisadora Semíramis Rabelo Ramalho Ramos pela cessão do material vegetal e à Fapitec pela concessão da bolsa de iniciação científica.

Referências

ARAGÃO, W. M. Cultivares de coqueiro. In: FONTES, H. R.; FERREIRA, J. M. S.; SIQUEIRA, L.A. (Org.). **A Cultura do coqueiro**. Brasília, DF: Embrapa, 2002. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Sistema de Produção, 01).

AMARAL, C. M. **Caracterização morfoagronômica e citogenética de bananeiras autotetraploides obtidas mediante duplicação de cromossomos**. 2013. 9 f. Dissertação (Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Federal do Recôncavo Baiano, Cruz das Almas.

CERQUEIRA, G; MACIEL, A. L. R.; AZEVEDO, J. B; MOREIRA, R. A; FIGUEIREDO, F. C. Desinfestação de explantes foliares de café arábica (*Coffea arabica* L.) para estabelecimento in vitro. In: JORNADA CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA, 6., SIMPÓSIO DE PÓS-GRADUAÇÃO DO IFSULDEMINAS, 3., 2014, Pouso Alegre, MG. **Anais...** Pouso Alegre, 2014.

ISLAM, S. M. S. The effect of colchicine pretreatment on isolated microspore culture of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Australian Journal of Crop Science**, v. 4, n. 9, p. 660-665, 2010.

LATADO, R. R; YALY, M. C; CARVALHO, C. R; MACHADO, M. A. Plantas autotetraplóides de citros sob tratamento in vitro com colchicina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 10, out. 2007.

MILANI, M; CARVALHO, J. M. F. C. **Utilização de Cultura de anteras no melhoramento de plantas**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2005. p. 11.

MARTINS, C. R.; JESUS JUNIOR, L. A. de. **Produção e comercialização de coco no Brasil frente ao comércio internacional: panorama 2014**. Aracaju, SE: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2014. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Documentos, 184).

PASSOS, E. E. M. Ecofisiologia do coqueiro. In: FERREIRA, J. M. S.; WARWICK, D. R. N.; SIQUEIRA, L. A. **A cultura do coqueiro no Brasil**. 2. ed. rev. e ampl. Brasília: Embrapa- SPI, 1998. p. 57-71.

PIERRE, P. M. O; DAVIDE, L. M. C; COUTO, E. G. O; SILVA, T. N; RAMALHO, M. A. P; SANTOS, J. B. Duplo-haploides: estratégias para obtenção e importância no melhoramento genético do milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 10, n. 1, p. 1-16, 2011.

RODRIGUES, F. A. **Antimitóticos na indução de tetraplóides em bananeira**. 2010. 68 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, 2010.

SANTANA, J. R. F; PAIVA, R; SANTIAGO, E. J. A; PAIVA, P. D. O; PAIVA, L. V. **Técnicas de estabelecimento in vitro**. UFLA/FAEPE, 2001. p. 41 - 42.

SARRO, F. B; CROCOMO, W. B; FERREIRA, J. M. S. Aspectos da biologia e morfologia da broca do pedúnculo floral do coqueiro, *Homalinotus coriaceus* (Gyllenhal) (Coleoptera: Curculionidae). **Neotropical Entomology**, v. 33, n. 1, 2004.