

# Ensaio de duplicação cromossômica em anteras de coqueiro-anão para obtenção de plantas di-haplóides

*Sara Dayan da Silva Oliveira<sup>1</sup>, Isabella Cícera Dias Miranda<sup>2</sup>, Aparecida Gomes de Araújo<sup>3</sup>, Caroline Araújo Machado<sup>4</sup>, Leandro Eugenio Cardamone Diniz<sup>5</sup>*

## Resumo

Dentre todos os 90 países em que a cultura do coqueiro é extremamente importante o Brasil é o maior produtor de coco verde sendo a água do fruto o principal produto do coqueiro no cenário comercial. O coqueiro possui uma alta taxa de heterozigiosidade e tempo de vida muito longo, por isso, a cultura de tecidos é utilizada como ferramenta para a produção de linhagens homozigotas a partir da tecnologia de produção de di-haplóides, visando reduzir o ciclo de avaliação do coqueiro que é em média de doze anos para um ou dois anos através de metodologias validadas. O procedimento foi feito a partir da retirada das flores masculinas contidas em inflorescência do coqueiro anão, assepsia em hipoclorito de sódio a 6% e álcool etílico 70%, excisão das anteras e inoculação em placas de Petri contendo meio padrão Eeuwens Y3 com modificações, sendo armazenadas no laboratório em ausência de luz. Análises periódicas das anteras em lupa e microscópio relataram a oxidação fenólica e o desenvolvimento de uma massa calosa na superfície das mesmas.

**Palavras-chave:** anteras, coqueiro, di-haplóide, duplicação.

<sup>1</sup> Graduanda em Ciências Biológicas pela Universidade Tiradentes (UNIT), estagiária da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>2</sup> Graduanda em Ciências Biológicas pela Universidade Tiradentes (UNIT), estagiária da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

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

<sup>4</sup> Bióloga, doutoranda em Agricultura e Biodiversidade, bolsista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>5</sup> Biólogo, doutor em Genética e Melhoramento, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

## Introdução

A cultura do coqueiro está presente em mais de 90 países, sendo sua produção largamente distribuída na América Latina, Ásia, África e algumas regiões do Pacífico. É, portanto, extremamente importante dentro do cenário da produção comercial tanto do fruto em si, como fonte de matéria prima para o desenvolvimento de outros alimentos (SIQUEIRA, 2002). O Brasil é o maior produtor mundial de coco verde e a produção é principalmente destinada ao consumo da água do fruto, sendo o Nordeste o principal produtor (NETO, 2011).

*Cocos nucifera* L. é uma monocotiledônea diploide com 32 cromossomos. A 'Typica' ou gigante e a 'Nana' ou anã são as únicas duas variedades que existem e apresenta grande destaque socioeconômico e agroindustrial (ARAGÃO, 2002; BENASSI, 2007). Quando se trata das cultivares gigantes, que são alógamas e apresentam uma grande variação, sua longa vida útil e alta heterozigiosidade tornam-se problemas a serem revolidos (PERERA, 2008). O grande aumento da expansão da industrialização gera conseqüentemente o aumento da produção, especialmente do coqueiro anão que é produzido em larga escala visando à comercialização da água de coco (NETO, 2011, SIQUEIRA, 2002). A fim de solucionar tais problemas e outros como resistência a insetos e tolerância à seca, algumas metodologias eficientes na produção de plantas estão sendo elaboradas e a cultura de tecidos torna-se uma ferramenta com enorme potencial para a produção de linhagens homozigotas (BIBERSON, 1985; SANTOS, 2002; ARAGÃO, 2004).

A cultura de tecidos é vista como uma técnica alternativa para a diminuição da heterozigiosidade (PERERA, 2010) e também para a redução do ciclo de avaliação do coqueiro que é em média de doze para um ou dois anos, por meio de uma metodologia validada, a partir da tecnologia de produção de di-haplóides (PERERA et al., 2008). Este é um processo veiculado através da cultura de anteras ou micrósporos, que é baseada no potencial do gameta sexual masculino em gerar plantas haploides, uma forma para diminuir o tempo na obtenção de linhagens homozigotas (FERREIRA, 1990).

De acordo com Santos (2002) a androgênese é a modificação da formação do pólen para originar plantas haplóides, sendo esta a principal técnica utilizada

para o melhoramento vegetal. A propagação *in vitro* permite o desenvolvimento de mudas com material genético superior, bem como a propagação em massa de plantas, fundamental para o melhoramento do coqueiro. Com isso, o intuito desse trabalho foi induzir plantas duplo-haploides a partir de aplicações biotecnológicas dentro da cultura de tecidos através da androgênese, desenvolvendo protocolos que promovessem o melhoramento genético do coqueiro no Estado de Sergipe.

## Material e Métodos

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 autoclavado por 20 minutos a uma temperatura de  $121 \pm 1^\circ\text{C}$  e pressão de 1,05 atm, vertido em placas de Petri em câmara de fluxo laminar e armazenado em ausência de luz.

### Abertura da inflorescência

A inflorescência da folha oito do coqueiro anão foi coletada nas plantas da bordadura do Banco Ativo de Germoplasma no Campo Experimental de Itaporanga e armazenada por 24 h no laboratório de cultura de tecido. Após este período houve processo de desinfestação com álcool 70% em toda a superfície da espada e em seguida a abertura forçada da mesma para a seleção das flores masculinas que foram submetidas à etapa seguinte.

### Assepsia

Todo o procedimento asséptico aconteceu dentro da câmara de fluxo laminar seguindo protocolo estabelecido a partir da imersão das flores masculinas em álcool 70% durante três minutos; em seguida, imersão em uma solução de hipoclorito de sódio a 6%, ambos sob agitação, e finalizando com três lavagens em água destilada autoclavada.

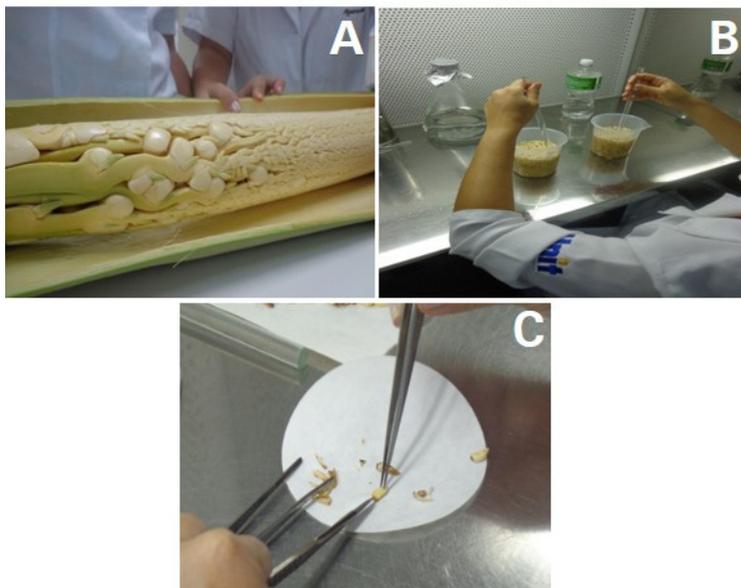
### Excisão, inoculação e armazenamento

As flores masculinas foram abertas individualmente e as anteras excisadas e inoculadas em placas de Petri que continham o meio Y3. Sendo elas dispostas em grupos de nove anteras por placa. Após o processo de inoculação, armazenaram-se as placas na sala de crescimento, na ausência de luz a uma temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Avaliações quinzenais foram realizadas através de observação em microscópio estereoscópico e a olho nu, como forma de monitoramento da 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 e 1C representam respectivamente, a sequência utilizada para a abertura forçada da inflorescência, seguida da assepsia das flores masculinas selecionadas em câmara de fluxo laminar e a excisão das anteras a partir de flores masculinas em ambiente asséptico.



Fotos: Isabella Cícera Dias Miranda

**Figura 1.** Sequência utilizada para a retirada das anteras da inflorescência do coqueiro anão. A) Inflorescência após abertura forçada; B) Assepsia na câmara de fluxo laminar; e C) Excisão das anteras em câmara de fluxo laminar.

No decorrer das análises realizadas durante o desenvolvimento do trabalho, observou-se a oxidação fenólica das anteras (Figura 2), processo que também ocorre constantemente em outras espécies e é descrito na literatura (MELO, 2001; ALVES, 2010).



**Figura 2.** Anteras após 45 dias após inoculação.

Nas avaliações realizadas após 120 dias, observou-se uma grande quantidade de anteras com o desenvolvimento de uma massa calosa (Figura 3) em sua extremidade superior.



**Figura 3.** Antera apresentando massa calosa em sua superfície.

## Conclusão

Diante das observações realizadas no decorrer do experimento observamos que houve oxidação das anteras a partir de 45 dias após inoculação em meio de cultura. A formação de massa calosa iniciou aos 120 dias de cultivo *in vitro*.

## Agradecimentos

À Embrapa Tabuleiros Costeiros, à pesquisadora Semíramis R. R. Ramos pela cessão do material vegetal e ao CNPq pela concessão da bolsa de iniciação científica.

## Referências

- ALVES, C.; OLIVEIRA, J. R.; REIS, É. S.; CORRÊA, R. M.; SOUZA J.; SILVA, J. C. de O.; PAULA, J. C. R.; RODRIGUES, L. H. F.; SOUZA, M. A. de S.; MENDONÇA, M. R. de. A cultura de Tecidos na Agricultura. In: JORNADA CIENTÍFICA, 1., FIPA DO CEFET, 6., Bambuí, 2010. **Anais...** Bambuí, 2010.
- ARAGÃO, W. M.; COSTA, A. S. da; SANTOS, H. C. A. C; PEDROSO, G. T. Florescimento, produção e composição morfológica de frutos de cultivares de coqueiro. **Agrotropica**, v. 14, p. 151-158, 2004.
- BENASSI, A. C; RUGGIERO, C; MARTINS, A. B. G; SILVA, J. A. A. Caracterização biométrica de frutos de coqueiro *Cocos nucifera* L. variedade anã-verde, em diferentes estádios de desenvolvimento. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, n. 2, ago.2007.
- BIBERSON, O; MALOSU, D.; CALVEZ, C. The coconut development project in Vanuatu. **Oleagineux**, v. 40, p. 311-321, 1985.
- FERREIRA, M. E; CALDAS, L. S; PEREIRA, E.A. **Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1990. p. 32-35. v. 2.

MELO, B. et al. Diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e desenvolvimento das plântulas na cultura in vitro de embriões da guarirrobeira (*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, p. 1301-1306, 2001.

NETO, M. F; HOLANDA, J. S; DIAS, N. S; GHEYI, H. R; FOLEGATTI, M. V. Crescimento e produção de coqueiro anão verde fertigado com nitrogênio e potássio. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 15, n. 7, 2011.

PERERA, P. I. P; Hocher, V.; VERDEIL J.L; BANDUPRIYA, H. D. D; YAKANDAWALA, D. M. D; WEERAKOON, L.K. Androgenic potential in coconut (*Cocos nucifera* L.). **Plant Cell Tiss Organ Cult**, jan. 2008.

PERERA, P. I. P; YAKANDAWALA, D. M. D; VERDEIL, J. L.; HOCHER, V; WEERAKOON L. K. Morphological aspects of coconut anther culture derived Structures. **Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka**, 2010.

SANTOS, E. K; ZANETTINI.M. H. B. Androgênese: uma rota alternativa no desenvolvimento do pólen. **Ciência Rural**, v. 32, n. 1, fev. 2002.

SIQUEIRA, L. A.; ARAGÃO, W. M.; TUPINAMBÁ, E. A. **A introdução do coqueiro no Brasil**: importância histórica e agrônômica. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2002. 24 p. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Documentos, 47).