

Indução de Dihaplóides em Acessos de Coqueiro Anão Verde do Brasil

*Isabella Cícera Dias Miranda¹, Sara Dayan da Silva Oliveira²,
Leandro Eugenio Cardamone Diniz³*

Resumo

O coqueiro é uma monocotiledônea presente em mais de 90 países sendo uma árvore de porte alto, pode chegar a 30 metros. Cultivada em sua maioria em ambiente costeiro de praia apresenta número diploide $2n = 32$ cromossomos. Possui apenas duas variedades, entre as quais destacam-se socioeconomicamente e agroindustrialmente a 'Typica' que é a variedade gigante e a 'Nana', ou variedade Anã. Como apoio aos programas de melhoramento de uma espécie perene, o desenvolvimento de di-haplóides mostra um caminho promissor na obtenção de plantas homozigotas. A busca por metodologias eficientes na produção de plantas haploides tem despertado interesse para aplicação e estudos no melhoramento genético vegetal. Essa haploidização ocorre espontaneamente, porém em uma frequência extremamente baixa. Sendo possível através da indução, resultar numa planta duplo haploide por meio de métodos utilizados pela técnica de cultura de tecidos. Em virtude de não estarmos conseguindo transformar geneticamente as bananeiras, decidimos alterar o projeto. Com isso, o intuito desta atividade foi o de iniciar os trabalhos com a indução de androgênese em anteras de coqueiros, com a finalidade de obtenção de plantas duplo haploides de coqueiro.

Palavras-chave: androgênese, coco, cultura in vitro, dihaplóide.

¹ Graduanda em Ciências Biológicas, Universidade Tiradentes (UNIT), Aracaju, SE, belladias10@gmail.com.

² Graduanda em Ciências Biológicas, Universidade Tiradentes (UNIT), Aracaju, SE, sara.dayan.oliveira@gmail.com.

³ Biólogo, doutor em Genética e Melhoramento, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, leandro.diniz@embrapa.br.

Introdução

Cocos nucifera L. (Arecaceae) é uma monocotiledônea presente em mais de 90 países (PERERA, 2008), sendo uma árvore de porte alto, pode chegar a 30 metros. Cultivada em sua maioria em ambiente costeiro de praia (FONSECA, 2009), apresenta número diploide $2n = 32$ cromossomos. Possuem algumas variedades, entre as quais destacam-se socioeconomicamente e agroindustrialmente a 'Typica' que é variedade gigante e 'Nana', variedade Anã (ARAGÃO et al., 2002, citado por BENASSI, 2007).

O método moderno de melhoramento de plantas depende da disponibilidade do material genético. Onde o desenvolvimento de di-haplóides mostra um caminho promissor na obtenção de plantas homozigotas (FORSTER et al. 2007, citado por BAL, 2012). A busca por metodologias eficientes na produção de plantas haploides tem despertado interesse para aplicação e estudos no melhoramento genético vegetal (SANTOS, 2002). Onde Segundo Germaná, 2011, essa haploidização ocorre espontaneamente, porém em uma frequência baixa. Sendo possível através da indução, resultar numa planta duplo haploide por meio de métodos utilizados pela técnica de cultura de tecidos. Onde Perera (2010) elucidou que quando se trata de visar estratégias eficientes, a cultura de tecidos tem um enorme potencial para produção de linhagens homozigotas.

De acordo com Perera (2008), a dificuldade referente ao melhoramento genético do coco é a longa vida útil e a elevada heterozigosidade que torna o trabalho lento, caro e difícil. Porém o desempenho de tal procedimento leva à obtenção de di-haplóides resultando na formação de novas cultivares pelo melhoramento. Mostrando que o processo de auto-fertilização ou retrocruzamento, tem como finalidade conseguir a homozigosidade, processo que pode levar 60 anos para ser desenvolvido quando utilizados os protocolo de métodos convencionais.

A androgênese de acordo com Santos, 2002, é a alteração da formação do pólen para originar plantas haploides, sendo a principal técnica utilizada para o melhoramento vegetal. Segundo Ferreira, 1990, uma alternativa para diminuir o tempo para obtenção linhagens homozigotas é a cultura de anteras ou de micrósporos, sendo baseada no potencial do gameta sexual masculino para geração de plantas haploides, sendo que uma planta haploide tem metade do número de cromossomos.

Material e Métodos

Formação de Di-haplóides

A metodologia para a formação de di-haplóides consistiu no preparo do meio de Eeuwens Y3 (Eeuwens, 1976) com modificações (FERNANDO e GARAGE, 2000; KARUNARATNE et al. 1985), meio basal líquido utilizado como meio de cultura padrão para a indução de androgênese no decorrer dos experimentos.

De acordo com Perera et. al. (2008), o meio foi suplementado com 100 μ M de 2,4D e 9% (p/v) de sacarose e pH ajustado para 5,8 após a adição de 0,1% (p/v) de carvão ativado (ácido BDH lavado) e os meios foram auto clavados a aproximadamente 121°C durante 20 minutos. O meio foi vertido em placas de petri descartáveis e armazenado em geladeira. A inflorescência utilizada foi da folha nove, as anteras de flores masculinas de plantas adultas do BAG de Coco (coqueiro GBrPF e coqueiro AVeJ) foram excisadas e anteras foram inoculadas em cada placa, sendo postas sob temperatura ambiente e no escuro.

Após abertura da inflorescência e retirada da ráquis, a mesma foi fechada com fita durex para evitar exposição ao ambiente. As anteras foram excisadas e inoculadas em placa de petri (descartável) com o meio Y3 líquido (Eeuwens, 1976) sem assepsia, e foram vedadas como papel filme, sendo armazenadas na sala de crescimento no escuro, sendo feito o acompanhamento do material. Foi preparado um meio Y3 líquido (Eeuwens, 1976) auto clavado e vertido em 48 placas de petri descartáveis que foram vedadas com papel filme e colocadas na geladeira para posterior inoculação, além do acompanhamento das anteras que foram inoculadas anteriormente e da inflorescência utilizada.

No procedimento com assepsia, ocorreu a desinfecção das ráquis com álcool 70% e três lavagens com água estéril e a excisão das anteras, sendo inoculadas 10 anteras em cada placa petri (descartável), num total de 26 placas, que continha o meio Y3, preparado anteriormente, foram vedadas e armazenadas no escuro a temperatura ambiente.

Placas com Pré-tratamento

As flores masculinas foram submetidas à assepsia com álcool 70% e três lavagens com água estéril. Foi retirado um total de 480 anteras e dispostas em grupos de 20 em papel filtro, e estes armazenados em 24 saquinhos de papel alumínio, ambos auto clavados, sendo submetidas ao pré-tratamento de calor a

38°C ou frio a 4°C e, respectivamente, inoculadas em 1, 4, 7, 14 dias.

Na primeira inoculação as anteras foram retiradas de três saquinhos de cada tratamento e dispostas em duas placas de petri com meio Y3, contendo dez anteras em cada placa. Seis placas para ambos os tratamentos. E assim, vedadas e postas à temperatura ambiente no escuro.

Nas inoculações seguintes, em 4, 7 e 14 dias, repetiu-se o mesmo procedimento anterior. Acompanhamento das placas com e sem assepsia, observação da primeira inoculação com o pré-tratamento e retirar as placas contaminadas armazenadas no escuro, sendo observado que as anteras da BOD 38° apresentavam aparência bastante ressecada e de oxidação.

Resultados e Discussão

Em virtude deste problema, tivemos que alterar a programação do trabalho. Sendo assim os resultados abaixo foram obtidos com avaliação de outro trabalho: Aplicação de técnicas biotecnológicas para o desenvolvimento de linhagens di-haplóides de um acesso de coqueiro (*Cocos nucifera* L.) que visa a obtenção de plantas dihaploides.

Na Figura 1, podemos ver de forma esquemática, as diferentes etapas e análises do trabalho. Primeiramente a inflorescência da folha 8 foi coletada e aberta no Laboratório de Cultura de tecidos (Figura 1A). Em seguida, as ráquis foram selecionadas, e as anteras separadas em fluxo laminar, para evitar contaminação (Figura 1B). Estas anteras foram submetidas a pré tratamentos distintos, 4°C e 28°C por intervalos de dias diferentes (Figura 1C). Após os pré-tratamentos, todas as anteras foram inoculadas em meio líquido contendo carvão ativo para reduzir a oxidação do material (Figuras 1D e 1E). E colocadas no escuro a uma temperatura média de 28°C por 3 meses, com avaliações semanais quanto a contaminação e desenvolvimento do material (Figura 1F). E por fim, a cada análise, visualizávamos as diferentes etapas do processo a fim de entender o desenvolvimento ou indução da androgênese (Figura 1G). A etapa de indução de androgênese leva de 3 a 6 meses, por isso avaliações quinzenais estão sendo feitas neste estágio.

Fotos: Sara Dayan da Silva Oliveira

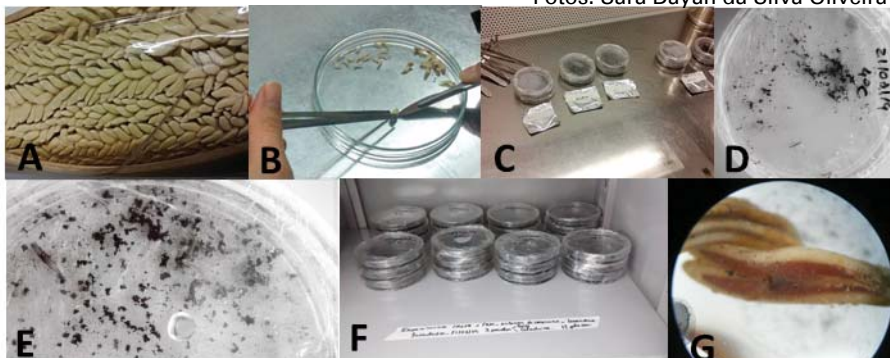


Figura 1. Diferentes etapas do processo de produção de duplohaplóides. (A) Inflorescência. (B) Separação das ráquis. (C) Placas preparadas para os diferentes pré-tratamentos. (D) Placa de petri com meio de cultivo com carvão ativado e as anteras. (E). Vista aproximadas do meio de cultura com as anteras na placa de petri. (F) Local onde as placas foram incubadas no escuro. (G) Avaliação em lupa para acompanhar o desenvolvimento da antera.

Conclusões

Originalmente o projeto seria sobre Transformação genética de banana. No entanto, esta etapa de transformação genética não foi executada devido a contaminações sucessivas das células em suspensão utilizadas neste trabalho. Poderíamos efetuar a transformação, mas não poderíamos levar este material a campo e por isso foram autoclavadas antes de serem transformadas. Temos os clones prontos para serem utilizados mas não pudemos seguir os procedimentos por questões de biossegurança. Com isso, não foram obtidas plantas transformadas de banana com nenhum dos promotores clonados.

Para o trabalho com obtenção de dihaploides em coco, o trabalho esta em andamento e devera iniciar o processo de regeneração a partir de setembro (6 meses após a inoculação). Por hora o que temos é o processo de retirada dos materiais que contaminaram e avaliações do desenvolvimento.

Referências

BAL, U; SHARIATPANAH, M. E.; CASTRO, A. J.; EMERY, D; CLÉMENT, C; DEHESTANI-ARDAKAN, M; MOZAFFAR, K; TOURAEV, A. Pseudo-embryogenic Structures in Anther and Isolated Microspore Cultures in vitro: a Cautionary Guide. Checa. **Journal of Genetics & Plant Breeding**, v. 48, p. 51-60, 2012.

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, 2007.

EEUWENS, C. J. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palm (*Cocos nucifera*) cultured in vitro. **Physiol Plant**, v. 36, p. 23-28, 1976.

FERNANDO, S. C.; GAMAGE, C. K. A. Abscisic acid induced somatic embryogenesis in immature embryo explants of coconut (*Cocos nucifera* L.). **Plant Science**, v. 151, p. 193-198, 2000.

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, 1998, v. 1. p. 32-35.

FONSECA, A. M; BIZERRA, A. M.C; SOUZA, J. S. N; MONTE, F. J. Q; OLIVEIRA, M. C. F; MATTOS, M. C; CORDELL, G. A; FILHO, R. B.; LEMOS, T. L. G. Constituintes e atividade antioxidante de duas variedades de água de coco (*Cocos nucifera* L.). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1, 2009.

GERMANA, M. A. Anther culture for haploid and doubled haploid production. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, 2011.

KARUNARATNE, S.; KURUKULAARACHCHI, C.; GAMAGE, C. A report on the culture of embryos of dwarf coconut, *Cocos nucifera* L. var. nana, in vitro. **Cocos**, v. 3, p. 1-8, 1985.

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**, 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, 2001.