



INICIAÇÃO DE CALOS EM PLÚMULAS DE *Cocos nucifera* L. VISANDO À EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

CALLI INITIATION IN PLUMULES OF *Cocos nucifera* L. AIMING AT SOMATIC EMBRYOGENESIS

Giuliano Carvalho Frugeri¹; Inaê Mariê de Araújo Silva²; Sueli Maria Gomes³; Jonny Everson Scherwinski-Pereira⁴

¹Doutorando da Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, CEP 70910-900, Brasília, DF, Brasil. giulianofrugeri@gmail.com. [Apresentador do trabalho](#). ²Pós-doutoranda da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, CEP 70770-917, Brasília, DF, Brasil. inaemarie@hotmail.com. ³Professora da Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, CEP 70910-900, Brasília, DF, Brasil. suelimariagomes@gmail.com. ⁴Pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, CEP 70770-917, Brasília, DF, Brasil. jonny.pereira@embrapa.br.

INTRODUÇÃO

A palmeira *Cocos nucifera* (coqueiro) é uma planta versátil, da qual cerca de 100 produtos ou bioprodutos podem ser explorados (SÁENZ-CARBONELL et al., 2016; LÉDO et al., 2019). A propagação sexuada é a principal via para multiplicação dessa espécie (LÉDO et al., 2019). No entanto, além desta via ser de baixo rendimento para atender a rápida e crescente demanda por mudas, a formação de plantas a partir de sementes sem identidade genética apresenta a inconveniência de reproduzir materiais com alta variabilidade e pouco resistente a pragas, geralmente ocasionando baixa produtividade em campo (ARELLANO; OROPEZA, 2008; SÁENZ-CARBONELL et al., 2016). Como consequência, plantações de baixa produtividade, uso de material sem melhoramento e de práticas culturais marginais têm ameaçado a indústria de *C. nucifera* (BANDUPRIYA; FERNANDO; VIDHANAARACHCHIL, 2016).

Logo, o desenvolvimento de métodos eficientes de propagação é crucial. Todavia, não são conhecidos métodos de propagação vegetativa convencionais para espécie. Nesse sentido, as técnicas de cultivo *in vitro* surgem como uma alternativa para propagação de genótipos elites de coqueiros, com destaque para a rota da embriogênese somática. Segundo Samosir, Godwin e Adkins (1999), essa técnica configura-se como potencial para acelerar o melhoramento genético convencional de *C. nucifera* por propagação clonal.

Dentre os explantes passíveis de serem utilizados na propagação de coqueiros, as plúmulas são consideradas os mais utilizados (HORNUNG, 1995). Apesar de tratar-se de material embrionário e de origem sexuada, essa característica pode ser contornada mediante o uso de plúmulas oriundas de progênies obtidas por polinização controlada de genótipos elites (SÁENZ-CARBONELL et al., 2016). Salienta-se ainda que essa palmeira é considerada recalcitrante (VERDEIL et al., 1994), o que exige contínuos estudos dos diferentes fatores que influenciam suas respostas *in vitro*.

Nesse contexto, o presente trabalho objetivou avaliar a iniciação de calos em plúmulas de *Cocos nucifera* visando a embriogênese somática, a partir de diferentes concentrações do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e da presença de carvão ativado.



MATERIAIS E MÉTODOS

A indução de calos visando à embriogênese somática foi conduzida a partir de plúmulas extraídas de embriões zigóticos de *Cocos nucifera* (Figura 1A, B), provenientes da Fazenda Experimental da Embrapa Tabuleiros Costeiros, localizada no município de Itaporanga D'Ajuda, Sergipe, Brasil. O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais 2 (LCT2) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Brasília, Distrito Federal, Brasil.

Os embriões zigóticos foram manipulados no interior de uma câmara de fluxo laminar, com auxílio de estereomicroscópio. Após a excisão, as plúmulas foram inoculadas imediatamente em meio de cultura Y3 (EEUWENS, 1976), com Fe-EDTA e vitaminas mantidas de acordo com a concentração original do meio de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). Os meios foram suplementados com 30 g/L de sacarose e diferentes concentrações de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D): 450 μM ou 600 μM em meio suplementado com 2,5 g/L de carvão ativado e 13,56 μM ou 20,12 μM em meio desprovido de carvão ativado. O pH dos meios foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$ antes da adição do agente gelificante (2,5 g/L de Phytigel) e para a esterilização, os meios foram autoclavados por 20 minutos à 121 °C e 1,5 atm de pressão.

As plúmulas permaneceram por 120 dias no meio de indução de calos, com subcultivos realizados mensalmente. Após esse período, avaliaram-se os percentuais de explantes oxidados e de explantes com formação de calo. Os explantes avaliados como oxidados foram aqueles que apresentaram todo o tecido escurecido. Os explantes foram cultivados em placas de *Petri* (15 x 90 mm), com aproximadamente 25 mL de meio de cultura por placa, que foram seladas com policloreto de polivinila (PVC) transparente e armazenadas em sala de crescimento escura, à $25^\circ \pm 2^\circ\text{C}$.

O experimento foi montado em delineamento estatístico inteiramente casualizado, considerando quatro tratamentos referentes às diferentes concentrações de auxina. Cada tratamento foi composto por cinco repetições, com cinco plúmulas cada. O conjunto de dados obtido foi submetido à análise de variância (ANOVA) pelo teste F e, quando significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância, por meio do software estatístico R.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Independentemente do tratamento testado, a auxina 2,4-D proporcionou a formação de calos já aos 30 dias de cultivo, os quais tornaram-se mais visíveis aos 60 dias (Figura 1C). Aos 120 dias em meios com carvão ativado, observaram-se calos semifriáveis, caracterizados como estruturas esféricas diminutas com coloração branca ou amarela (Figura 1D). Conforme as análises estatísticas, os tratamentos não diferiram entre si em relação ao percentual de calos formados, com valor médio de 95% (Tabela 1).

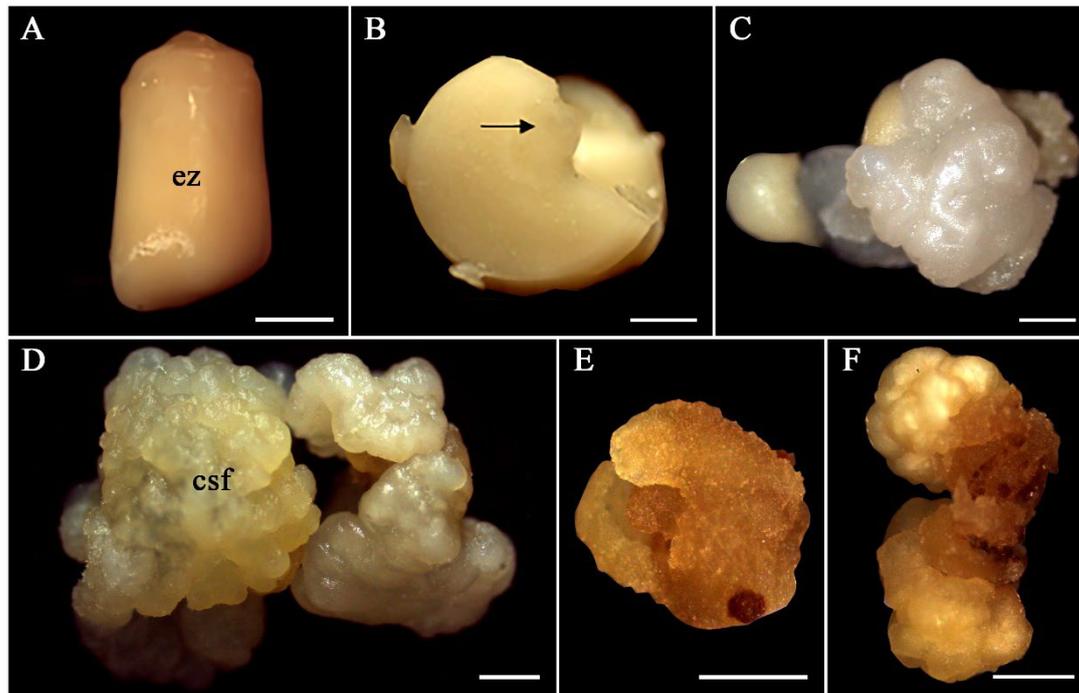


FIGURA 1 – Iniciação de calos a partir de plúmulas de *Cocos nucifera*. A. Embrião zigótico. B: Localização da plúmula (seta). C: Início de formação de calo sobre a plúmula. D: Calo semifriável oriundo de plúmula cultivada em meio com ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e carvão ativado. E, F: Explantes escurecidos cultivados em meio com 2,4-D desprovido de carvão ativado. Abreviações: (csf) calo semifriável e (ez) embrião zigótico. Escalas: A, C: 2 mm e B, D-F: 1 mm.

O bom desempenho do 2,4-D na indução de calos visando à embriogênese somática de *C. nucifera* tem sido comumente relatado na literatura (KARUNARATNE; PERIYAPPERUMA, 1989; VERDEIL et al., 1994; FERNANDO et al., 2003; SÁENZ et al., 2006; SANDOVAL-CANCINO et al., 2016; BETT; MWEU; NYENDE, 2019), com concentrações variando em função do explante utilizado, dos cultivares estudados (NGUYEN et al., 2015) e da presença ou não de carvão ativado. O uso de outras auxinas, como o ácido 1-naftalenoacético (ANA), ácido indol-3-acético (AIA) (KARUNARATNE; PERIYAPPERUMA, 1989) e ácido 4-amino-3, 5, 6-tricloropicolínico (Picloram) (PERERA et al., 2009), não tem provido bons resultados.

TABELA 1 – Influência de diferentes concentrações do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e da presença (+) ou ausência (-) de carvão ativado na indução de calos a partir de plúmulas de *Cocos nucifera*

2,4-D Concentrações (μM)	Carvão ativado Presença/ausência (g.L^{-1})	Calo (%)	Oxidação (%)
13,57	(-)	100 \pm 0,0a	100 \pm 0,0
20,36	(-)	100 \pm 0,0a	100 \pm 0,0
450	(+)	92,0 \pm 8,0a	0,0 \pm 0,0
600	(+)	88,0 \pm 12,0a	0,0 \pm 0,0
MÉDIA		95,0	50

Letras minúsculas iguais indicam ausência de diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de significância. Barras representam o erro padrão.



Já com relação à taxa de oxidação, verificou-se ausência de oxidação em explantes cultivados em meios com alta concentração de auxinas, porém suplementados com carvão ativado (Figura 1D e Tabela 1). Por outro lado, explantes cultivados em meios suplementados com baixa concentração de auxina e ausência de carvão ativado oxidaram (Figura 1E, F e Tabela 1), o que inviabilizou o desenvolvimento posterior. Assim, apesar da ocorrência de 100% de calogênese em plúmulas cultivadas em meio sem carvão (Tabela 1), os calos formados apresentaram evolução defeituosa para poderem serem usados em etapas posteriores do processo (Figura 1E, F).

Esses resultados confirmam a importância do uso de carvão ativado para a prevenção do escurecimento dos explantes, considerado uma problemática na micropropagação de *C. nucifera* (BANDUPRIYA; FERNANDO; VIDHANAARACHCHIL, 2016). O carvão ativado adsorve fenóis e outros compostos inibitórios do crescimento (PERERA et al., 2007), embora isso também ocorra com os reguladores de crescimento, como as auxinas, o que torna as condições de cultivo indefinidas e, geralmente, exige que as concentrações dos reguladores de crescimento utilizados sejam aumentados (BANDUPRIYA; FERNANDO; VIDHANAARACHCHIL, 2016). Em protocolos de embriogênese somática dessa palmeira, as concentrações utilizadas variam entre 0,1 e 0,3 % (NGUYEN et al., 2015) e, de acordo com Perera et al. (2007), a combinação adequada entre a auxina 2,4-D e o carvão ativado é considerada um fator crítico para a indução de calos.

CONCLUSÕES

Pode-se concluir que, nas condições de estudo, o tratamento 450 µM de 2,4-D com 2,5 g/L de carvão ativado é o mais indicado para indução de calos em plúmulas de *C. nucifera* visando à embriogênese somática.

REFERÊNCIAS

- ARELLANO, J.; OROPEZA, C. Lethal yellowing. In: OROPEZA, C.; HOWARD, F. W.; ASHBURNER, G. R. (Eds.) **Lethal yellowing research and practical aspects**. Netherlands: Springer, 1995. p. 1-15.
- BANDUPRIYA, H. D. D.; FERNANDO, S. C.; VIDHANAARACHCHIL, Y. R. M. Micropropagation and androgenesis in coconut: an assessment of Sri Lanka implication. **COCOS**, Sri Lanka, v. 22, p. 31-47, 2016.
- BETT, C. C.; MWEU, C. M.; NYENDE, A. B. *In vitro* regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L) through indirect somatic embryogenesis in Kenya. **African Journal of Biotechnology**, Nigeria, v. 18, n. 32, p.1113-1122, 2019.
- EEUWENS, C. J. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants Excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera*) and cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, Denmark, v. 36, p. 23-28, 1976.



- LÉDO, A. S.; PASSOS, E. E. M.; FONTES, H. R.; FERREIRA, J. M. S.; TALAMINI, V.; VENDRAME, W. A. Advances in Coconut palm propagation. **Revista de Fruticultura**, Jaboticabal, Brasil, v. 41, n. 2, p. 1-14, 2019.
- FERNANDO, S. C.; VERDEIL, J. L.; HOCHER, V.; WEERAKOON, L. K.; HIRIMBUREGAMA, K. Histological analysis of plant regeneration from plumule explants of *Cocos nucifera*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 72, p. 281-284, 2003.
- HORNUNG, R. Micropropagation of *Cocos nucifera* L. from plumular tissue excised from mature zygotic embryos. **Plantations, Recherche, Développement**, France, v. 2, p. 38-41, 1995.
- KARUNARATNE, S.; PERIYAPPERUMA, K. Culture of immature embryos of coconut, *Cocos nucifera* L: callus proliferation and somatic embryogenesis. **Plant Science**, v. 62, p. 247- 253, 1989.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Denmark, v. 15, 473-497, 1962.
- PERERA, P. I. P.; HOCHER, V.; VERDEIL, J.-L.; DOULBEAU, S.; YAKANDAWALA, D. M. D.; WEERAKOON L. K. Unfertilized ovary: a novel explant for coconut (*Cocos nucifera* L.) somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**, Alemanha, v. 26, p. 21-28, 2007.
- PERERA, P. I. P.; YAKANDAWALA, D. M. Y.; HOCHER, V.; VERDEIL, J.-L.; WEERAKOON, L. X. Effect of growth regulators on microspore embryogenesis in coconut anthers. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 96, p. 171-180, 2009.
- SÁENZ-CARBONELL, L.; MONTERO-CORTÉS, M.; PÉREZ-NUÑEZ, T.; AZPEITIA-MORALES, A.; ANDRADE-TORRES, A.; CÓRDOVA-LARA, I.; CHAN-RODRÍGUEZ, J. L.; SANDOVAL-CANCINO, G.; RIVERA-SOLIS, G.; OROPEZA-SALÍN, C. Somatic Embryogenesis in *Cocos nucifera* L. In: LOYOLA-VARGAS, V. M.; OCHOA-ALEJO, N. (Eds.). **Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications**. Cham: Springer, 2016. p. 297-318.
- SÁENZ, L.; AZPEITIA, A.; CHUC-ARMENDARIZ, B.; CHAN, J. L.; VERDEIL, J.-L.; HOCHER, V.; OROPEZA, C. morphological and histological changes during somatic embryo formation from coconut plumule explants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, England, v. 42, p. 19-25, 2006.
- SAMOSIR, Y. M. S.; GODWIN, I. D.; ADKINS, S. W. The use of osmotically active agents and abscisic acid can optimise the maturation of coconut somatic embryos. In: OROPEZA, C.; VERDEIL, J. L.; ASHBURNER, G. R.; CARDEÑA, R.; SANTAMARÍA, J. M. (Eds.) **Current Advances in Coconut Biotechnology**. Netherlands: Springer, 1999. p. 341-354.
- SANDOVAL-CANCINO, G.; SÁENZ, L.; CHAN, J. L.; OROPEZA, C. Improved formation of embryogenic callus from coconut immature inflorescence explants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, England, v. 52, n. 4, p. 367-378, 2016.
- VERDEIL, J. L.; HUET, C.; GROSDÉMANGE, F.; BUFFARD-MOREL, J. Plant regeneration from cultured immature inflorescences of coconut (*Cocos nucifera* L.): evidence for somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**, Germany, v. 13, p. 218-221, 1994.