



EFEITO DE AUXINAS NA MORFOLOGIA DIFERENCIAL DE CALOS OBTIDOS DE PLÚMULAS DURANTE A INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM *Cocos nucifera* L.

EFFECT OF AUXINS ON DIFFERENTIAL MORPHOLOGY OF CALLI OBTAINED FROM PLUMULES DURING THE SOMATIC EMBRYOGENESIS INDUCTION IN *Cocos nucifera* L.

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. ²Apresentador do trabalho. ³Pós-doutoranda da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, CEP 70770-917, Brasília, DF, Brasil. inaemarie@hotmail.com. ⁴Professora da Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, CEP 70910-900, Brasília, DF, Brasil. suelimariagomes@gmail.com. ⁵Pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, CEP 70770-917, Brasília, DF, Brasil. jonny.pereira@embrapa.br.

INTRODUÇÃO

Cocos nucifera L. (coqueiro) é uma palmeira de significativa importância econômica mundial, em função da sua multiplicidade de usos, com destaque para o uso alimentício. No entanto, a propagação sexuada não está sendo suficiente para atender a demanda crescente por mudas dessa espécie que, em última análise, têm comprometido a produção e longevidade dos coqueiros (SÁENZ-CARBONELL et al., 2016).

Por apresentar longo ciclo de vida, alto grau de polinização cruzada, produção de apenas uma semente por fruto (BANDUPRIYA; FERNANDO; VIDHANAARACHCHIL, 2016) e lenta taxa de multiplicação por sementes (BETT; MWEU; NYENDE, 2019), o melhoramento convencional dessa espécie é considerado difícil (BANDUPRIYA; FERNANDO; VIDHANAARACHCHIL, 2016) e caro (BETT; MWEU; NYENDE, 2019).

Nesse sentido, métodos alternativos e eficientes de propagação devem ser considerados visando não somente subsidiar programas de melhoramento genético, mas também a produção de mudas de genótipos selecionados em larga-escala da espécie. Todavia, *C. nucifera* exibe apenas meristemas apicais, e, portanto, não são conhecidos métodos de propagação vegetativa convencionais para espécie. Nesse sentido, as técnicas de cultivo *in vitro*, em especial a embriogênese somática, é uma alternativa para propagação de genótipos de coqueiro de alto rendimento e livres de doenças. Contudo, essa espécie é considerada recalcitrante (SÁENZ-CARBONELL et al., 2016; BETT; MWEU; NYENDE, 2019), o que exige constantes investigações dos diferentes fatores que influenciam suas respostas *in vitro*, como os reguladores de crescimento utilizados.

Com este trabalho, objetivou-se avaliar o efeito de auxinas na morfologia diferencial de calos obtidos de plúmulas durante a indução da embriogênese somática em *Cocos nucifera* L.

MATERIAIS E MÉTODOS



A inducao de calos visando a embriogese somatica foi conduzida a partir de plumulas extraidas de embrioes zigoticos de *Cocos nucifera* (Figura 1A-C) oriundos da Fazenda Experimental da Embrapa Tabuleiros Costeiros, localizada no municipio de Itaporanga D'Ajuda, Sergipe, Brasil.

O experimento foi conduzido no Laboratorio de Cultura de Tecidos Vegetais 2 (LCT2) da Embrapa Recursos Geneticos e Biotecnologia, em Brasilia, Distrito Federal, Brasil. No LCT2, os embrioes zigoticos foram manipulados no interior de uma camera de fluxo laminar utilizando-se um estereomicroscopio. Para a excisao das plumulas foram utilizadas pinças, papel filtro e bisturis previamente esterilizados. Apes a excisao, as plumulas foram inoculadas imediatamente em meio de cultura Y3 (EEUWENS, 1976), com Fe-EDTA e vitaminas mantidas conforme a concentracao original do meio de cultura de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). Adicionalmente, os meios foram suplementados com 30 g/L de sacarose, 2,5 g/L de carvao ativado, 2,5 g/L de Phytigel e 600 µM das auxinas acido 4-amino-3,5,6-tricloropicolinico (Picloram) ou acido 2,4-diclorofenoxiacetico (2,4-D). O pH dos meios foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$ antes da adicao do agente gelificante. Os meios foram esterilizados por autoclavagem por 20 minutos a 121 °C e 1,5 atm de pressao.

As plumulas permaneceram por 120 dias nos meios supracitados, com subcultivos realizados mensalmente. As avaliacoes com relacao aos percentuais de explantes oxidados, de explantes com formacao de calo e do tipo de calo obtido (compacto globular ou semifriavel) foram realizadas aos 120 dias de cultivo. Os explantes foram cultivados em placas de *Petri* (15 x 90 mm), com aproximadamente 25 mL de meio de cultura por placa e armazenadas em sala de crescimento escura, a $25^\circ \pm 2^\circ$ C.

Adotou-se delineamento inteiramente casualizado, com dois tratamentos (2,4-D e Picloram), com 10 repeticoes cada e com cinco plumulas por repeticao. O conjunto de dados obtido foi submetido a analise de variancia (ANOVA) pelo teste F e as medias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nivel de 5% de significancia, por meio do software estatistico R.

RESULTADOS E DISCUSSAO

Aos 30 dias de cultivo observou-se a formacao das primeiras formacoes calogênicas (Figura 1D) que evoluiram para estruturas translucidas compactas aos 60 dias (Figura 1E, F). Calos mais proeminentes foram notados apes 120 dias de cultivo, com dois padroes morfologicos bem distintos: calos com uma textura semifriavel, caracterizados morfologicamente como estruturas diminutas esfericas com coloracao branca ou amarela (Figura 1G, H), e calos compactos globulares com superficie lisa, brilhante e translucida, similar ao observado aos 60 dias de cultivo (Figura 1H).

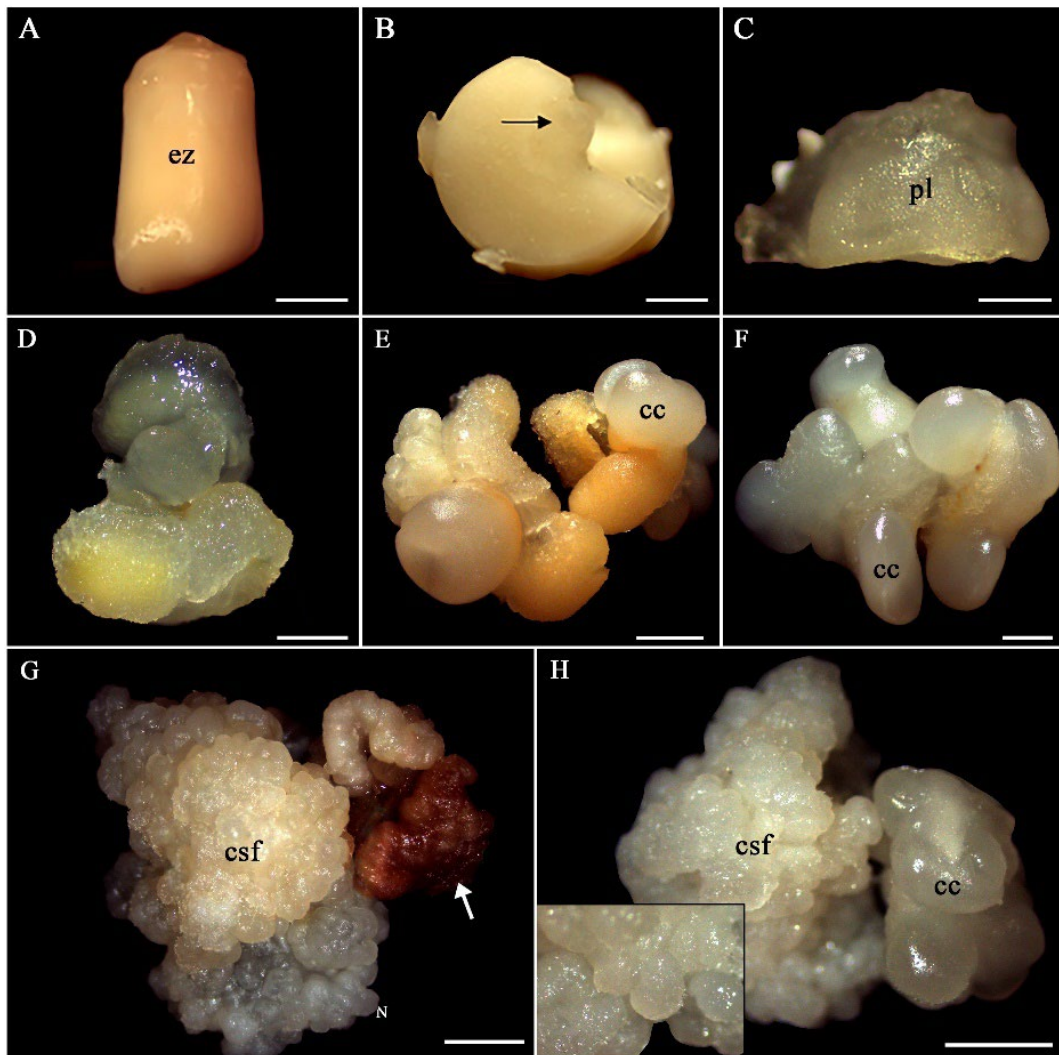


FIGURA 1 - Calos de *Cocos nucifera* obtidos a partir de plúmulas cultivadas em diferentes auxinas visando à embriogênese somática. A. Embrião zigótico. B: Localização da plúmula (seta). C: Plúmula extraída. D: Calo sobre plúmula cultivada em meio com 2,4-D, após 30 dias de cultivo. E, F: Calos sobre plúmulas cultivadas em meio com Picloram, após 60 dias de cultivo. G: Calo semifriável oriundo de plúmula cultivada em meio com 2,4-D; notar oxidação (seta). H: Calos semifriável e compacto oriundos de plúmula cultivada em meio com Picloram. Abreviações: (cc) calo compacto; (csf) calo semifriável; (ez) embrião zigótico e (pl) plúmula. Escalas: A, E, G, H: 2 mm; B, D, F: 1 mm e C: 0,5 mm.

Com relação ao percentual de formação de calos, após 120 dias de cultivo não foram constatadas diferenças significativas entre as auxinas testadas, com valor médio de 88% (Figura 2). Esse valor é superior ao reportado por Hornung (1995) e Fernando et al. (2003), também ao utilizarem plúmulas de *C. nucifera*. Contudo, quanto à taxa de oxidação, verificou-se que a auxina 2,4-D proporcionou maior percentual de oxidação dos explantes (60%), comparativamente à auxina Picloram (14,5%) (Figura 1G e 2). Essa alta taxa de oxidação ocasionada pelo 2,4-D não foi um fator limitante à obtenção de calos.

O 2,4-D é a auxina mais comumente utilizada para indução de calos visando à embriogênese somática em *C. nucifera* (SÁENZ et al., 2006; SANDOVAL-CANCINO et al., 2016; BETT; MWEU;



NYENDE, 2019). Em paralelo, a auxina Picloram foi utilizada para inducao da androgenese na especie, sem resultados positivos (PERERA et al., 2009).

Salienta-se que plúmulas cultivadas em meio suplementado com 2,4-D apresentaram somente calos semifriáveis (Figura 1G e 2), ao passo que plúmulas cultivadas em meio com Picloram apresentaram tanto calos semifriáveis, quanto calos compactos globulares translúcidos (Figura 1H e 2), com destaque em frequencia para esse último calo.

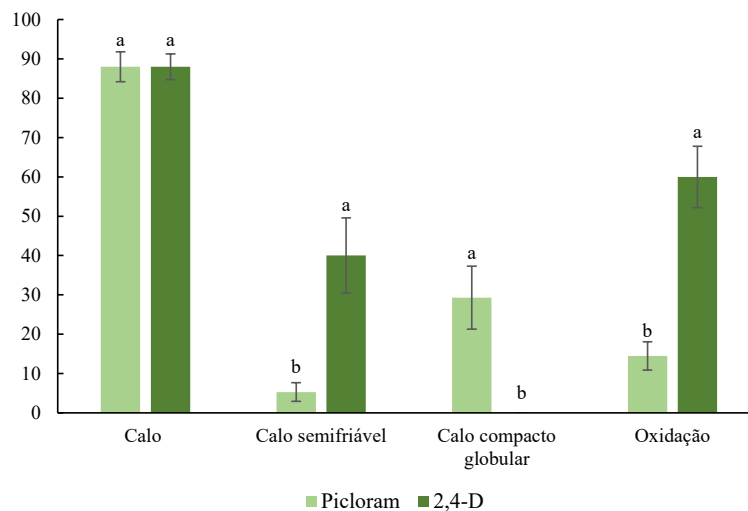


FIGURA 2 - Efeito de diferentes auxinas (2,4-D e Picloram) nos percentuais de oxidação dos explantes e de formação de diferentes tipos de calos (semifriável e compacto globular), a partir de plúmulas de *Cocos nucifera* visando à embriogênese somática. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de significância. Barras representam o erro padrão.

Os calos compactos obtidos assemelham-se àqueles classificados como embriogênicos por Sáenz et al. (2006), também oriundos de plúmulas de *C. nucifera*. Calos caracterizados como friáveis foram previamente descritos na espécie por Branton e Blake (1983), a partir de inflorescências jovens. Apesar dos calos compactos serem considerados embriogênicos (SÁENZ et al., 2006), conforme Kong et al. (2020), calos com natureza “dura” são considerados inadequados para o estabelecimento de suspensões celulares em *C. nucifera*, visando o incremento da taxa de multiplicação de plantas. Isso é um importante aspecto a ser considerado, uma vez que, a maioria dos protocolos de embriogênese somática disponíveis para essa espécie apresenta baixa eficiência. Logo, é crucial o desenvolvimento de estratégias relacionadas à multiplicação eficiente de calos embriogênicos.

CONCLUSÕES

Diante dos resultados, conclui-se que plúmulas de *C. nucifera* são explantes responsivos ao cultivo *in vitro* sob altas concentrações de auxinas, independentemente da auxina utilizada. Para fins de



multiplicação de calos, recomenda-se o uso da auxina ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), por proporcionar a formação de calos com maior friabilidade, o que favorece a multiplicação posterior.

REFERÊNCIAS

- 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.
- BRANTON, R. L.; BLAKE, J. Development of organized structures in callus derived from explants of *Cocos nucifera* L. **Annals of Botany**, United Kingdom, v. 52, p. 673-678, 1983.
- 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.
- 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, Developpement**, France, v. 2, p. 38-41, 1995.
- KONG, E. Y. Y.; BIDDLE, J.; FOALE, M.; ADKINS, S. W. Cell suspension culture: A potential in vitro culture method for clonal propagation of coconut plantlets via somatic embryogenesis. **Industrial Crops and Products**, Netherlands, v. 147, p. 1-19, 2020.
- 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.; 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.
- 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.