

**Anatomia foliar comparativa e otimização de etapas da embriogênese  
somática em *Cocos nucifera* L. (Arecaceae)**

**Departamento de Botânica**

**Universidade de Brasília**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Departamento de Botânica**  
**Programa de Pós-Graduação em**  
**Botânica**

**Anatomia foliar comparativa e otimização de etapas da embriogênese  
somática em *Cocos nucifera* L. (Arecaceae)**

**Tese apresentada ao  
Departamento de Botânica do  
Instituto de Ciências Biológicas da  
Universidade de Brasília para a  
obtenção de título de Doutor em  
Botânica.**

**Giuliano Carvalho Frugeri**

**Orientador: Dr. Jonny Everson Scherwinski-Pereira**

**Co-orientadora: Professora Dra. Sueli Maria Gomes**

**BRASÍLIA-DF**

**Dezembro-2022**

**Dr. Jonny Everson Scherwinski Pereira**

Presidente da comissão examinadora

**Comissão Examinadora**

**Dr. (a) Cristiane Silva Ferreira**

Membro interno ao Programa/PPG BOT

**Dr. (a) Zanderluce Gomes Luis**

Membro Externo à Instituição/Universidade  
Federal do Sul e Sudeste do Pará (UFESSPA)

**Dr. (a) Frederico Henrique da Silva  
Costa**

Membro Externo à Instituição/Universidade  
Federal do Acre (UFAC)

**Dr. (a) Paulo Cesar Poeta Fermino  
Junio**

(Suplente)/Universidade Federal de Santa  
Catarina (UFSC)

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, seu Hélio e Dona Maria Ely. A força de vocês me inspirou e continua a me inspirar em muitos momentos na minha vida.

A minha esposa Rejane pela companhia, força e incentivo em todos os momentos. Ao meu filho Lucas que ao nascer trouxe uma alegria que encheu meu coração.

A minha tia Francisca e seu companheiro Gilberto que me receberam durante tantos anos permitindo que eu concluísse essa etapa acadêmica sendo uma benção em minha vida.

Aos colegas de laboratório, Paulo, Hugo, Jaqueline, Jénifer, Tatiane, Fernanda, Jéssica, Renan, Alex que me ensinaram tanto sobre cultura de tecidos. Ao colega André Pinedo que tanto ajudou nas várias técnicas e cortes anatômicos. Ao André por toda a ajuda e paciência no preparo dos meios e no ensinamento das técnicas para manuseio dos equipamentos.

Gostaria de dedicar um parágrafo a Gabriela, Inaê e Zanderluce. Vocês foram fundamentais para essa transformação. A amizade e os ensinamentos que vocês me ofereceram eu levo com muito carinho.

Ao meu orientador, Jonny Everson Scherwinki Pereira, por me receber em seu laboratório. Sua confiança e respeito permitiu que eu me tornasse um doutor em Botânica.

A minha co orientadora, professora Sueli Gomes pelos ensinamentos sobre anatomia vegetal. Nossas conversas mudaram para melhor a forma como eu trabalho em sala de aula.

A Embrapa Cenargen, Embrapa Tabuleiros Costeiros, a Universidade de Brasília e ao Instituto Federal Goiano campus Morrinhos, instituições que permitiram que esse trabalho fosse realizado.

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

<b>μM</b>	Micromolar
<b>Atm</b>	Atmosfera
<b>BAG</b>	Banco Ativo de Germoplasma
<b>°C</b>	Grau Celsius
<b>2,4-D</b>	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
<b><i>et al.</i></b>	Expressão latina que significa “e outros”.
<b>EZ</b>	Embrião zigótico
<b>FAA</b>	Formaldeído, ácido acético glacial e álcool etílico
<b>g</b>	Grama (unidade de medida de massa).
<b>h</b>	Hora (unidade de tempo)
<b>L</b>	Litro (unidade de medida de volume)
<b>mg</b>	Miligramas (unidade de medida de massa)
<b>mL</b>	Mililitro (unidade de medida de volume)
<b>MS</b>	Meio de cultura formulado por Murashige e Skoog (1962)
<b>Picloram</b>	Ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico
<b>Y3</b>	Meio formulado por Eeuwens (1976)
<b>μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup></b>	Densidade de fluxo de fótons

## INDICE DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

**Figura 1.** Secções transversais dos segmentos foliares de *Cocos nucifera* var. *nana* Griff. **A.** Visão geral: padrão vascular com a sequência PQTQTQTSQTQTQTQP. **B.** Bordo foliar com feixes vasculares marginais e canais secretores (setas). **C.** Feixe vascular de primeira ordem com metaxilema central (MX) e floema (F) abaxial com grupos de células condutoras separados por fibras. **D.** Axila foliar com 3 camadas hipodérmicas adaxiais e 3 camadas de células buliformes abaxiais. Escalas: A= 500µm, B= 200µm, C-D= 50µm.....36

**Figura 2.** Epiderme abaxial da folha de *Cocos nucifera* (A-B, D: preparado paradérmico; C, E: secções transversais). **A, B, C, D, E.** Var. *nana*. **A, B, C, D, E.** Var. *typica*. **A-B.** Epiderme abaxial da var. *nana* (A), com tricoma (estrela), e da var. *typica* (B). **C.** Estômato com cristas externas e internas nas células-guarda e subsidiárias (setas). **D.** Complexo estomático paracítico. **E.** Tricoma pluricelular em depressão. Escalas: A, B= 50µm; C-D= 20µm; E= 50µm. ....38

**Figura 3.** Secções transversais dos segmentos foliares de *Cocos nucifera* var. *typica* Nar. **A-B.** Visão geral (B= detalhe de A): mesofilo dorsiventral gradativo e padrão vascular com a sequência: PQTQTQTSQTQTQTSQTQTQTSQTQTQP. **C.** Bordo foliar com feixes vasculares marginais e canais secretores (setas). **D.** Feixe vascular de primeira ordem com metaxilema central (MX) e floema (F) abaxial com grupos de células condutoras separados por fibras; notar estômato com cristas nas células-guarda e subsidiárias e a câmara subestomática. **E.** Axila foliar com 2 camadas hipodérmicas. ....40

**Figura 4.** Face abaxial dos segmentos foliares das variedades de *Cocos nucifera*, após desidratação por 2h. **A.** Var. *nana*: nervuras de menor calibre pouco conspícuas. **B.** Var. *typica*: nervuras de menor calibre bem evidentes. Escala: A=B=500µm. ....42

### CAPITULO II

**Figura 1:** Aspectos gerais desde o transporte à excisão do embrião zigótico de *Cocos nucifera*, var. Anão Verde do Brasil de Jiqui (AVeJ) para retirada da plúmula. **A:** chegada dos embriões no laboratório de cultura de tecidos. **B:** tubos contendo o embrião em meio MS. **C e D:** embrião preparado para a excisão. **E:** sete indicando posição da plúmula no embrião. **F:** plúmula excisada. ....62

**Figura 2:** Calos embriogênicos oriundos da etapa de indução em meio de cultura sólido Y3 (Eeuwens 1976) com diferentes colorações. **A:** Calo com coloração branca; **B:** Calo com coloração bege amarelada. Escala: 2 mm. ....66

**Figura 3:** Diferentes respostas morfológicas de plúmulas de *Cocos nucifera* em meio de indução de calo suplementando com diferentes auxinas visando à embriogênese somática. (A-D) Calos em meio de indução suplementado com ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) aos 30, 60, 90 e 120 dias de cultivo, respectivamente; (E-H) Calos em meio de indução. ....72

**Figura 4:** Efeito de diferentes auxinas (ácido 2,4-diclorofenoxiacético - 2,4-D e ácido 4-amino-3, 5, 6-tricloropicolínico - 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. ....73

**Figura 5:** Efeito de diferentes auxinas (ácido 2,4-diclorofenoxiacético - 2,4-D e ácido 4-amino-3, 5, 6-tricloropicolínico - Picloram) no comprimento de calos oriundos de plúmulas de *Cocos nucifera*. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de significância. Barras representam o erro padrão. ....74

**Figura 6:** Alterações morfológicas ocorridas durante o desenvolvimento de calos embriogênicos induzidos a partir de plúmulas de *Cocos nucifera*. Inicialmente aos 15 dias a plúmula excisada em contato com o meio de indução começa a responder ao estímulo do regulador entumecendo. Aos 30 dias é possível observar estruturas translúcidas (ET) sendo formadas. Tempo de cultura T15-T90 de 15 a 90 dias. Abreviações: (ET) estruturas translúcidas e (EE) estruturas embrionárias. Escalas: T15-T90: 2 mm. ....76

**Figura 7:** Influência do tempo de armazenamento (1, 2, 3, 15, 25 e 35 dias) do embrião zigótico, fornecedor de plúmulas utilizadas como explantes para indução de calos de *Cocos nucifera*, sobre o tamanho dos calos obtidos. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Barras representam o erro padrão. ....78

**Figura 8:** Iniciação de calos a partir de plúmulas de *Cocos nucifera*. A: Início de formação de calo sobre a plúmula. B: Calo semifriável oriundo de plúmula cultivada em meio com ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e carvão ativado. C, D: Explantes escurecidos cultivados em meio com 2,4-D desprovido de carvão ativado. Abreviação: (csf) calo semifriável. Escalas: A: 2 mm; B, C e D: 1 mm. ....79

**Figura 9:** Influência das diferentes concentrações (450, 600, 13,56 e 20,12  $\mu$ M) do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) no comprimento dos calos obtidos de *C. nucifera* após 120 dias em meio de cultura. Os valores citados referem-se à média  $\pm$  erro padrão. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de significância. ....81

**Figura 10:** Efeito da coloração do explante (amarelo e branco) na multiplicação de calos de *Cocos nucifera* em meio sólido. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de significância. Os valores citados referem-se à média  $\pm$  erro padrão. ....83

**Figura 11:** Efeito do tamanho do explante na multiplicação dos calos de *Cocos nucifera* em meio sólido. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de significância. Os valores citados referem-se à média  $\pm$  erro padrão. ....84

**Figura 12:** Aspectos dos calos semifriáveis de *Cocos nucifera* transferidos do meio sólido de indução para o meio líquido de multiplicação. A: Calos utilizados como

explantes na etapa de multiplicação. B: Calos em meio de cultura líquido. C: Calo com pigmentação amarronzada oriundo do meio líquido. D: Estruturas globulares embriogênicas desenvolvidas em meio de multiplicação líquido após 40 dias de cultivo em meio semissólido. E: Fragmentos oriundos da etapa de multiplicação em meio líquido após 90 dias de cultivo em meio semissólido. ....88

**Figura 13:** Aspecto geral dos explantes de *Cocos nucifera* em meio de cultivo visando à diferenciação de embriões somáticos. A: Aspecto do explante após 30 dias em meio de cultura; notar áreas com pigmentação esverdeada. B e C: Aspecto dos explantes após 90 dias. B: explantes inoculados em meio Y3 acrescido com 2,4-D e BAP. C: Explantes inoculados em meio MS desprovido de regulador de crescimento. Seta: formação de tecido semelhante a haustório; Escalas: A: 2 mm; B e C: 5mm. ....90

**Figura 14:** Efeito de diferentes meios de cultivo sobre o aumento da massa embriogênica do calo e sobre os percentuais de oxidação e de calos com coloração verde de *Cocos nucifera*. Os valores citados referem-se à média  $\pm$  erro padrão. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos. Abreviações: MS (Murashige e Skoog 1962), Y3 (Eeuwens, 1976) e BAP (6-Benzilaminopurina). ....91

**Figura 15:** Desenvolvimento em diferentes frascos (tubo de ensaio e RITA®) durante a etapa de diferenciação de plantas de *Cocos nucifera*. ....92

**Figura 16:** Calos de *Cocos nucifera* selecionados para a regeneração em diferentes recipientes. A: Aspecto dos calos compacto selecionados. B: Calos transferidos para tubos de ensaio contendo meio com regulador BAP; C: Calo após 120 dias em meio semissólido em tubo de ensaio (estrela: parte oxidada; seta: formação de estrutura alongada); Calos. D, E e F: Calos transferidos para frascos RITA® apresentando diferentes respostas. D: plântulas apenas com raízes após 120 dias em meio de cultura líquido; E: calos oxidados que não responderam ao tratamento em meio de cultura líquido; F: Planta de *C. nucifera* obtida por embriogênese somática apresentando anormalidade na formação da parte aérea. Escala: 1 cm. ....93

**Figura 17:** Diferentes respostas morfológicas na etapa de diferenciação a partir de diferentes calos (fragmentos formados por até 5 protuberâncias esféricas ou fragmentos com 5 a 10 protuberâncias esféricas - *clusters*) de *C. nucifera*; A- C: fragmentos com até 5 protuberâncias esféricas e D-F: *clusters*. A: Fragmento que não respondeu ao tratamento com regulador BAP. B: Fragmento responsivo com formação de massa compacta e com pigmentação esverdeada. C: Fragmento responsivo com formação de massa compacta semelhante a haustório (seta) e raiz primária com pequenas estruturas secundárias (seta). D: *Cluster* que não respondeu ao tratamento com regulador BAP. E: Formação de massa compacta (seta) em parte da estrutura do calo inicial sem pigmentação. F: Formação de massa compacta esverdeada cobrindo todo calo inicial. Escala: 1 cm. ....95

**Figura 18:** Comparação entre os tipos de isolamento das estruturas globulares (isolados e cluster) durante a etapa de regeneração. ....96



**Figura 19:** Desenvolvimento dos calos embriogênicos a partir de plúmulas do embrião de *Cocos nucifera*, var. Anão Verde do Brasil de Jiqui (AVeJ), **A e B:** Início do desenvolvimento das plúmulas após 60 dias em meio de cultura com 2,4-D e Picloram, respectivamente (seta-estrutura translúcidas); **C:** Secção anatômica de calo após 120 dias em meio com 2,4-D (setas-nódulo meristemático *NM*, estrela - protoderme *Pd*); **D:** Secção anatômica de calo após 150 dias em meio com Picloram (setas-nódulo meristemático *NM*, estrela - protoderme *PD*). .....98

**Figura 20:** Desenvolvimento de estruturas embriogênicas a partir de explantes inoculados em meio líquido oriundas de plúmulas de *Cocos nucifera*, var. Anão Verde do Brasil de Jiqui (AVeJ), **A e C:** explantes com 2,4-D e Picloram, respectivamente; **B:** Secção anatômica de calo induzido com regulador 2,4-D, após 90 dias em meio líquido de multiplicação (setas-nódulo meristemático *NM*, estrela - protoderme *Pd*); **D:** Secção anatômica de calo induzido com regulador Picloram, após 90 dias em meio líquido de multiplicação (setas-nódulo meristemático *NM*, estrela - protoderme *PD*); **E:** células meristemáticas da região do nódulo meristemático; **F:** Secção anatômica de calo induzido com regulador 2,4-D evidenciando uma estrutura embriogênicas (setas-nódulo meristemático *NM*, células vasculares-*CV*); **G:** Secção anatômica de calo induzido com regulador Picloram evidenciando três estruturas embriogênicas isoladas por células meristemáticas dispostas em círculos. ....99

**Figura 21:** Desenvolvimento de estruturas embriogênicas a partir de explantes inoculados **A e C:** Secção anatômica transversal de uma estrutura embriogênica globular formado em meio de cultura contendo BAP e 2,4-D após 60 dias de cultivo; **B e D:** Secção anatômica transversal de uma estrutura embriogênicas globular formado em meio de cultura contendo BAP e Picloram após 30 dias de cultivo. Escala: **A, B e D:** 0,2mm; **C:** 0,05mm. ....100

## ÍNDICE DE TABELAS

### INTRODUÇÃO

**Tabela 1:** Características fenológicas e potencial de produção de *Cocos nucifera* das variedades *nana*, *typica* e híbrida. ....11

### CAPÍTULO I

**Tabela 1.** Caráteres anatômicos quantitativos foliares de *Cocos nucifera* variedades *nana* e *typica*. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de significância .....41

### CAPITULO II

**Tabela 1.** Composição dos diferentes meios de cultura e períodos de cultivo (semanas) usados na etapa de indução do processo de embriogênese somática de *Cocos nucifera* a partir de plúmulas .....65

**Tabela 2.** Composição dos diferentes meios de cultura e períodos de cultivo (semanas) usados na etapa de multiplicação dos processos de embriogênese somática de *Cocos nucifera* a partir de plúmulas .....67

**Tabela 3.** Composição dos diferentes meios de cultura e períodos de cultivo (semanas) usados na etapa de diferenciação dos processos de embriogênese somática de *Cocos nucifera* a partir de plúmulas .....70

**Tabela 4.** Influência do tempo de armazenamento do embrião zigótico, fornecedor de plúmulas utilizadas como explantes em *Cocos nucifera*, sobre os percentuais de formação, viabilidade e oxidação de calos .....77

**Tabela 5.** 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* .....80

**Tabela 6:** Influência do tempo (dias) em diferentes meios de cultura líquidos, MS e Y3, na produção de estruturas globulares (EG) por fragmento (frag) durante a etapa de multiplicação em meio líquido .....85

**Tabela 7:** Influência do tempo (dias) em diferentes meios de cultura líquidos, MS e Y3 para a produção de estruturas globulares (EG) por fragmento (frag). .....86

## **SUMÁRIO**

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b>	<b>5</b>
<b>OBJETIVO GERAL</b>	<b>8</b>
<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>9</b>
<b>ASPECTOS GERAIS DE <i>COCOS NUCIFERA</i></b>	<b>9</b>
<b>A CULTURA DE COCO</b>	<b>12</b>
<b>PROPAGAÇÃO DO COQUEIRO</b>	<b>14</b>
<b>A IMPORTÂNCIA DA ANATOMIA NA CARACTERIZAÇÃO DE TAXONÔMICA</b>	<b>16</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>18</b>
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>30</b>
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>31</b>
<b>AMOSTRAGEM</b>	<b>31</b>
<b>PREPARAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO.</b>	<b>32</b>
<b>ANÁLISE ANATÔMICA.</b>	<b>32</b>
<b>SÍMBOLOS E LETRAS PARA A REPRESENTAÇÃO DOS FEIXES VASCULARES</b>	<b>33</b>
<b>3. RESULTADOS</b>	<b>34</b>
<b>4. DISCUSSÃO</b>	<b>42</b>
<b>5. CONCLUSÃO</b>	<b>47</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>48</b>
<b>CAPÍTULO II</b>	

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>58</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>60</b>
<b>A. MATERIAL VEGETAL</b>	<b>60</b>
<b>B. INDUÇÃO DE CALOS</b>	<b>61</b>
<i>i.</i> Influência de diferentes auxinas na indução de calos a partir de plúmulas	62
<i>ii.</i> Influência do tempo de armazenamento do embrião zigótico, fonte de plúmulas, na indução de calos	63
<i>iii.</i> Influência de diferentes concentrações de 2,4-D na indução de calos	64
<b>C. MULTIPLICAÇÃO DE CALOS</b>	<b>65</b>
<i>i.</i> Influência do tamanho e da cor do calo na eficiência da multiplicação em meio sólido	65
<i>ii.</i> Influência do cultivo em diferentes meios de cultivo líquido (MS e Y3) na multiplicação de calos	67
<b>D. DIFERENCIAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS</b>	<b>68</b>
<i>i.</i> Influência de diferentes meios de cultivo na diferenciação de embriões somáticos	68
<i>ii.</i> Efeito do recipiente de cultivo na diferenciação de embriões somáticos	69
<i>iii.</i> Influência do tamanho do calo na diferenciação de embriões somáticos	69
<b>E. ANÁLISE HISTOLÓGICA</b>	<b>70</b>
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>72</b>
<b>A. INDUÇÃO DE CALOS</b>	<b>72</b>
<i>i.</i> Influência de diferentes auxinas na indução de calos a partir de plúmulas	72
<i>ii.</i> Influência do tempo de armazenamento do embrião zigótico, fonte de plúmulas, na indução de calos	75
<i>iii.</i> Influência de diferentes concentrações de 2,4-D na indução de calos	78

<b>B. MULTIPLICAÇÃO DE CALOS</b>	<b>82</b>
iv.    Influência do tamanho e da cor do calo na eficiência da multiplicação em meio sólido	82
v.    Influência do cultivo em diferentes meios de cultivo líquido (MS e Y3) na multiplicação de calos	84
<b>C. DIFERENCIAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS</b>	<b>88</b>
vi.    Influência de diferentes meios de cultivo na diferenciação de embriões somáticos	88
vii.   Efeito do recipiente de cultivo na diferenciação de embriões somáticos	91
viii.  Influência do tamanho do calo na diferenciação de embriões somáticos	94
<b>D. CARACTERIZAÇÃO MORFOANATÔMICA DOS CALOS</b>	<b>97</b>
<b>4. CONCLUSÕES</b>	<b>101</b>
<b>INDUÇÃO</b>	<b>101</b>
<b>MULTIPLICAÇÃO</b>	<b>101</b>
<b>DIFERENCIAÇÃO</b>	<b>101</b>
<b>5. REFERÊNCIAS</b>	<b>103</b>

# **Anatomia foliar comparativa e otimização de etapas da embriogênese somática em *Cocos nucifera* L. (Arecaceae)**

## **RESUMO**

*Cocos nucifera* é uma palmeira importante para a economia de países tropicais, sendo usada principalmente como alimento. Esta espécie possui duas variedades que são exploradas comercialmente no Brasil. São elas as variedades *nana* e *typica*, que são distinguíveis na fase reprodutiva. O plantio em grande parte ocorre por mudas originadas de cruzamento entre variedades com caracteres desejáveis. Os pomares existentes sofrem com a exposição à parasitas que prejudicam a produção podendo levar a morte dos indivíduos. Com material cedido pelo Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Tabuleiro Costeiros, esse trabalho teve como objetivo identificar diferenças entre as variedades *nana* e *typica* além de otimizar o protocolo para a embriogênese somática da variedade Anão Verde do Brasil de Jiqui (AVeJ). Inicialmente foram realizados cortes transversais e preparados paradermicos de cada variedade. Os resultados revelaram que existem diferenças entre as variedades estudadas como exemplo a espessura da cutícula-parede celular, densidade estomática, diâmetro do metaxilema e espessura do mesofilo. A principal diferença está na disposição dos feixes vasculares. A organização dos feixes vasculares foi representada por uma fórmula vascular. Essa característica pode ser útil para distinguir *C. nucifera* ao nível de variedades, auxiliando na taxonomia destas plantas a nível de variedade. Posteriormente procurou estabelecer estratégias para o desenvolvimento de um protocolo para a otimização da clonagem de coqueiro da variedade Anão Verde do Brasil de Jiqui (AVeJ). Foram utilizadas plúmulas como explantes para a etapa de indução de calos. Foram avaliados diversos fatores como o efeito das auxinas 2,4-D e Picloram, a avaliação da capacidade de formação de calos em razão do período de armazenamento das plúmulas excisadas e o efeito de diferentes concentrações de regulador 2,4-D em meio de cultura com e sem carvão ativado na formação de calos semifriáveis. Na etapa de multiplicação, estruturas embriogênicas dos calos obtidos foram transferidas para frascos contendo meio líquido sob agitação. Foram analisados o efeito da coloração inicial dos calos (amarelo e branco), e o tamanho do explante inoculado sobre a multiplicação (filetado e fragmentado). Verificou-se que fragmentos de menor tamanho do explante foram mais responsivos apresentando diferença estatística. A influência do meio de cultivo para essa etapa foi testada não havendo diferenças entre os meios de cultivo utilizados durante um período mínimo de

30 dias de cultivo. Durante a etapa de diferenciação foram obtidos embriões somáticos fusionados e plantas com aspecto anômalo foram observadas em calos provenientes da indução em meio de cultura contendo Picloram inoculadas em frascos tipo RITA®.

Palavras chave: BAG, *Cocos nucifera*, fórmula vascular, meio líquido, taxonomia.



# **Comparative leaf anatomy and optimization of somatic embryogenesis steps in *Cocos nucifera* L. (Arecaceae)**

## **SUMMARY**

*Cocos nucifera* is an important palm for the economy of tropical countries, being used mainly as food. This species has two varieties that are commercially exploited in Brazil. They are the *nana* and *typica* varieties, which are distinguishable in the reproductive phase. The planting largely occurs by seedlings originated from crossing between varieties with desirable characters. Existing orchards suffer from exposure to parasites that harm production and can lead to the death of individuals. With material provided by the Active Germplasm Bank (BAG) of Embrapa Tabuleiro Costeiros, this work aimed to identify differences between the *nana* and *typica* varieties, in addition to optimizing the protocol for somatic embryogenesis of the Anão Verde do Brasil variety from Jiqui (AVeJ). Initially, transverse cuts and paradermal preparations of each variety were performed. The results revealed that there are differences between the varieties studied, such as cuticle-cell wall thickness, stomatal density, metaxylem diameter and mesophyll thickness. The main difference is in the disposition of the vascular bundles. The organization of vascular bundles was represented by a vascular formula. This characteristic can be useful to distinguish *C. nucifera* at the variety level, helping in the taxonomy of these plants at the variety level. Subsequently, he sought to establish strategies for the development of a protocol for the optimization of the cloning of coconut trees of the Anão Verde do Brasil variety from Jiqui (AVeJ). Plumules were used as explants for the callus induction step. Several factors were evaluated, such as the effect of 2,4-D auxins and Picloram, the evaluation of callus formation capacity due to the storage period of the excised plumules and the effect of different concentrations of 2,4-D regulator in medium of culture with and without activated charcoal on the formation of semi-friable calluses. In the multiplication step, embryogenic structures of the obtained calli were transferred to flasks containing liquid medium under agitation. The effect of the initial callus color (yellow and white) and the size of the inoculated explant on multiplication (fileted and fragmented) were analyzed. It was verified that mentor explant size fragments were more responsive showing statistical difference. The influence of the culture medium for this step was tested, with no differences between the culture media used during a minimum period of 30 days of cultivation. During the differentiation stage, fused somatic embryos were obtained and plants with anomalous appearance were

observed in calluses from induction in culture medium containing Picloram inoculated in RITA®-type flasks.

Keywords: BAG, *Cocos nucifera*, vascular formula, liquid medium, taxonomy.

## INTRODUÇÃO GERAL

*Cocos nucifera* L. é uma palmeira que pertence à família Arecaceae. A espécie é cultivada em mais de 90 países em diferentes continentes, Américas, África e Ásia, ocupando uma área plantada de mais de 12 milhões de hectares (Batugal *et al.* 2005). Os benefícios de *C. nucifera* têm sido cada vez mais reconhecidos mundialmente, tornando-se um dos alimentos mais atraentes dos últimos anos (Adkins *et al.* 2018). Com amplo potencial de uso em várias áreas, tais como: alimentação humana (Martins e Junior 2014; Kumalasari *et al.* 2020) biomedicina e biotecnologia (Yong *et al.* 2009), na construção civil (Ofuyatan *et al.* 2020), na agricultura (Cosme *et al.* 2018), na fabricação de ração animal (Apraku *et al.* 2017) e de biodiesel (Hoang e Le 2017). Em algumas sociedades a cultura do *C. nucifera* carrega traços estéticos, também dotado de simbolismo e referência cultural por conta de sua grande e variada utilização (Bourdeix e Alexia 2017).

Inicialmente a procura era pelo fruto maduro para extração do endosperma seco conhecido como copra e fibras do fruto, sendo recente a comercialização de frutos imaturos para a retirada do endosperma líquido (Foale e Harries 2011). Dessa forma, a indústria cocoeira vem apresentando um crescimento nos últimos anos incentivando os produtores a plantarem suas áreas com variedades mais produtivas. Por outro lado, mudas de melhor qualidade e protocolos de manejo adequado não são acessíveis aos pequenos produtores. Agricultores locais germinam as sementes em viveiros próprios para manutenção de seus pomares ou jardins plantando mudas com rendimento inferior para abastecer suas comunidades onde as nozes são vendidas para o consumo doméstico (Bourdeix e Alexia 2017).

*Cocos nucifera* apresenta uma ampla distribuição nas regiões intertropicais do mundo (Aragão *et al.* 2002), proporcionando emprego e renda para cerca de 20 milhões de produtores (Adkins *et al.* 2018). O cultivo conta com a vantagem de possibilitar a colheita praticamente o ano inteiro (Holanda *et al.* 2007), nas diferentes condições climáticas na quase totalidade das regiões brasileiras (Passos 2002). As regiões norte e nordeste se destacam das demais pela maior área plantada e produção de copra. Com total de 82,9% de área plantada e 74% de produção, ocupada principalmente por coqueiros da variedade gigante e híbridos. As demais regiões somam apenas 17,1% de área plantada,

predominando o cultivo de coqueiros anões e híbridos, que são mais produtivos que os coqueiros gigantes (Brainer 2018). Entretanto, a produtividade registrada no Brasil ainda é baixa, não sendo suficiente para atender a demanda do mercado nacional (FAOSTAT 2019). Isso tem ocorrido principalmente pelo uso de cultivares não selecionadas, a idade avançada das plantações existentes, o manejo inadequado, além da ocorrência de problemas fitossanitários (Ferreira *et al.* 1998). Para tentar melhorar esse cenário, instituições de pesquisas, como a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), têm desenvolvido pesquisas para obter variedades mais adaptadas e produtivas, além de técnicas biotecnológicas para propagação vegetativa de genótipos com características superiores (Nguyen *et al.* 2015; Adkins *et al.* 2018; Meijaard *et al.* 2020).

A estratégia mais utilizada para conservação de acessos de *C. nucifera* é a *ex situ* por meio de coleções e banco de germoplasma, em virtude do tamanho e a fisiologia da sua semente, pois é uma semente recalcitrante (Ribeiro *et al.* 1995). Nesse tipo de conservação é possível manter a base de dados dos acessos, promover a troca e o amplo uso da variabilidade genética, cuja utilização pode ser imediata ou futura (Dulloo *et al.* 2005; Karun e Niral 2019). A existência de variabilidade genética para apoiar as atividades de conservação e os programas de melhoramento no desenvolvimento de novas variedades é essencial (Dulloo *et al.* 2005). Para a utilização segura desses acessos é importante que seja realizado a caracterização morfológica, genética, agrônômica e botânica, para discriminação e diferenciação dos acessos.

Existem coleções de germoplasma de *C. nucifera* em vários países, estando as principais coleções assim distribuídas: Filipinas (163 acessos), Índia (126 acessos), Indonésia (97 acessos), Costa do Marfim (53 acessos) e Malásia (38 acessos). Existem ainda outras coleções com menor expressão em Papua Nova Guiné, Moçambique, Jamaica e México (Nair *et al.* 1993). Através da conservação *ex situ* usando coleções de germoplasma é possível manter a base de dados dos acessos, promover a troca e o amplo uso da variabilidade genética, cuja utilização pode ser imediata ou futura em programas de melhoramento (Dulloo *et al.* 2005; Karun e Niral 2019).

Para promover a conservação e o melhoramento genético de *C. nucifera*, tornou-se indispensável a formação de coleções de germoplasmas com ampla variabilidade genética (Dulloo *et al.* 2005). Entretanto, para a utilização segura dessas coleções de germoplasma é importante que seja realizado a caracterização e avaliação morfológica, genética, agrônômica e botânica, para discriminação e diferenciação dos acessos.

As variedades botânicas são, *C. nucifera typica* Nar., *nana* Griff. e *aurantica* Liy. (Liyanage 1958; Peries 1996; Ekanayake *et al.* 2010). A variedade *typica* é explorada por ser mais resistente a uma ampla variedade de solo e clima e ter um período produtivo de até 60 anos. A variedade *nana* tem maior capacidade de produção de nozes por área plantada quando plantadas em solo fértil e com chuvas bem distribuídas e um período produtivo de até 40 anos. A variedade *aurantica* sofre com a escassez de água, são muito susceptíveis a pragas e doenças e possui um período de produção que não ultrapassa 40 anos (Liyanage 1958; Fontes *et al.* 2002; Ekanayake *et al.* 2010).

A diferença entre *C. nucifera* variedades *typica* Nar., e *nana* Griff., se baseia principalmente na estatura do vegetal (Liyanage 1958; IPGRI 1995; Fontes *et al.* 2002; Siqueira *et al.* 2002). As variedades divergem em caracteres morfológicos como comprimento do caule e folhas e quanto ao modo de reprodução, como polinização e maturação dos órgãos reprodutivos (Siqueira *et al.* 2002; Foale 2005). As diferenças estruturais nessas variedades em nível de tecidos não são descritas. Desta forma, pode-se dizer que ainda existe um déficit significativo de conhecimento a nível anatômico para discriminar as variedades supracitadas.

O conhecimento sobre a anatomia de *C. nucifera* é importante pois pode melhorar a compreensão de trabalhos relacionados à taxonomia e à agronomia, como por exemplo na interação coqueiro-patógenos foliares (Araújo *et al.* 2013; Eden-Green e Mpunami, 2005). Além disso, a caracterização anatômica ao diferenciar acessos de *C. nucifera*, pode auxiliar os trabalhos de melhoramento genético (Passos e Passos, 2003) e as estratégias de conservação da espécie (Castro *et al.* 1997; Corrêa *et al.* 2008; Noblick, 2013; Basso e Barbero, 2015).

Os acessos de *C. nucifera* podem ser conservados *ex situ*, através de um banco de germoplasma *in vivo* (no campo) ou *in vitro* (no laboratório), por meio de crescimento lento ou de criopreservação. Para conservação de germoplasma *in vitro* via criopreservação podem ser utilizadas técnicas de propagação via embriogênese somática. Esta técnica é utilizada para a propagação vegetativa de acessos com características superiores em um tempo reduzido, quando comparado aos métodos tradicionais (Assy Bah 1992; Malaurie *et al.* 2006).

A propagação em massa de plantas elite de *C. nucifera*, utilizando a técnica de cultivo *in vitro* via embriogênese somática, surge como uma alternativa para produzir plantas mais uniformes, livres de fitopatógenos e em uma velocidade maior do que os métodos convencionais (Ree e Guerra 2015; Sandoval-Cancino *et al.* 2016). A

embriogênese somática é um processo de propagação de plantas, onde células somáticas desenvolvem-se por meio de diferentes estádios embriogênicos, dando origem a uma planta geneticamente idêntica, sem que ocorra fusão de gametas (Williams e Maheswaran 1986; Von Arnold *et al.* 2002; Wang *et al.* 2020). A técnica é considerada a principal via de regeneração *in vitro* de *C. nucifera* (Bandupriya *et al.* 2016), com protocolos já relatados na literatura para essa espécie (Chan *et al.* 1998; Morales, 2003; Pérez-Núñez *et al.* 2006; Bett *et al.* 2019).

Embora protocolos de embriogênese somática para o cultivo *in vitro* de *C. nucifera* tenham sido melhorados ao longo dos últimos anos (Chan *et al.* 1998; Morales 2003; Pérez-Núñez *et al.* 2006), os protocolos são ainda dúbios, pouco reproduzíveis e, portanto, limitados quanto à reprodução comercial, especialmente pela baixa eficiência quanto ao número de plantas obtidas para serem disponibilizadas ao setor produtivo. Esses fatores tornam a técnica desafiadora e com necessidades urgentes de otimização. Estudos com algumas palmeiras demonstram que calos cultivados em meio líquido apresentam respostas superiores aos inoculados em meio semissólido (Etienne e Berthouly 2002; Steinmacher *et al.* 2011; Monteiro *et al.* 2018). Nesse sentido, protocolos que utilizam meios líquidos, praticamente inexistentes em *C. nucifera*, associados a biorreatores, podem impulsionar a adoção da embriogênese somática para a reprodução rápida de variedades de interesse (Kong *et al.* 2020).

## **OBJETIVO GERAL**

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi comparar a anatomia e micromorfologia das folhas de diferentes acessos de germoplasma de *C. nucifera* das variedades *typica* Nar. e *nana* Griff, a fim de verificar possíveis diferenças anatômicas que auxiliam numa melhor compreensão taxonômica, que favoreça o melhoramento genético e a conservação de *C. nucifera*. Além da caracterização anatômica, o trabalho também objetivou desenvolver um protocolo para a embriogênese somática em *C. nucifera*, var. Anão Verde do Brasil de Jiqui (AVeJ), com ênfase ao uso de meio líquido em diferentes etapas do processo. Esse protocolo além de subsidiar estratégias de conservação de germoplasma via criopreservação, irá acelerar as etapas de melhoramento genético, especialmente em razão do lento crescimento de *C. nucifera* em métodos

tradicionais (Pereira *et al.* 2007), proporcionando a propagação em larga escala de acessos com características superiores.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### Aspectos gerais de *Cocos nucifera*

O coqueiro (*Cocos nucifera*) pertence à família botânica das *Arecaceae* com distribuição predominante pantropical, incluindo cerca de 200 gêneros, sendo 43 deles encontrados em território brasileiro (Lorenzi *et al.* 2010). Acredita-se que *C. nucifera* tenha se originado no sudeste da Ásia, com registros da sua existência datados de aproximadamente 3 mil anos (Fuller 2007). Registros históricos dos séculos XIV-XVI indicam que os navegadores Austronésios disseminaram a espécie da costa sudeste da Ásia até a África Oriental (Allibert 2008). Posteriormente, as introduziram nas ilhas de Cabo Verde e São Tomé e Príncipe, na costa atlântica da África, chegando às Américas devido às navegações de portugueses e espanhóis, sendo utilizada como fonte de alimento e líquido pelos tripulantes das embarcações durante as viagens marítimas (Harries 1978). Recebe várias denominações ao redor do mundo e pode ser chamado de “niu” pelos polinésios, “nyior” pelos malásios e indonésios, “nyiog” pelos filipinos, “coco” pelos europeus de língua não inglesa e língua latina e coconut pelos de língua inglesa.

A espécie exibe caule lenhoso, cilíndrico, do tipo estipe, com uma gema terminal no ápice, que é responsável pelo crescimento da parte aérea do vegetal (Lorenzi *et al.* 2010). O seu sistema radicular é fasciculado (Passos e Passos 2003; Holanda *et al.* 2007). As folhas são pecioladas, simples, pinatipartidas ou pinatipalmadas (Lorenzi *et al.* 2010), com limbo rígido (Passos e Passos 2003; Holanda *et al.* 2007). As inflorescências são do tipo panícula, protegidas por uma espata, com flores pouco vistosas e geralmente unissexuadas, com frutos tipo drupa (Souza e Lorenzi 2008). As sementes exibem o endocarpo marcado com três pontuações dispostas em triângulo, com a função de permitir a passagem do embrião durante a germinação (Lorenzi *et al.* 2010). Segundo Tomlinson *et al.* (2011) a característica que difere *C. nucifera* das demais palmeiras é o tamanho das flores femininas e do fruto sendo o último adaptado a dispersão pela água por longas distâncias. As variedades e formas do *C. nucifera* foram descritas por diferentes pesquisadores ao redor do mundo. Liyanage (1958) descreve a primeira classificação sistemática de coco no Sri Lanka baseada principalmente na estatura e no comportamento reprodutivo de *C. nucifera*. As três variedades descritas foram *typica*, *nana* e *aurantiaca*.

Dentro das variedades são identificados vários morfotipos com características morfológicas específicas que permite distinguir populações de coqueiros (Liyanage 1958; Peries 1996; Ekanayake *et al.* 2010). Diferentes morfotipos são provenientes de populações naturais como “Gon Thambili” e “Ran Thambili” encontrados no Sri Lanka (Solangi *et al.* 2010; Marasinghe *et al.* 2019), “San Ramon” encontrados nas Filipinas (Jayasinghe e Hewajulige 2021) ou introduzidos em países pelo mundo como exemplo “Anão vermelho de Camarões”, “Anão vermelho da Malásia”, “Anão amarelo da Malásia”, “Anão verde de Jiqui”, “Gigante da Praia do Forte”, “Gigante de Pacatuba”, “Gigante de Jiqui” e “Gigante de Merepe” no Brasil (Ribeiro *et al.* 1999; Jucá *et al.* 2002; Loiola *et al.* 2008), “niu kafã” e “niu vai” no México (Zizumbo-Villarreal e Piñero 1998; Granados-Sánchez e López-Ríos 2002).

As variedades de *C. nucifera* cultivadas no Brasil são duas: variedade *typica* Nar. (coqueiro gigante), e variedade *nana* Griff. (coqueiro anão) (Siqueira *et al.* 2002). A variedade gigante é polinizada predominantemente de forma cruzada por insetos (Conceição *et al.* 2004; Muniz *et al.* 2020), florescendo entre 6 e 8 anos após o plantio. Essa variedade é mais tolerante a solos e climas diversos, atinge altura média de 18 metros e com período de produção de 60 anos. Já a variedade coqueiro anão é predominantemente autopolinizada, florescendo entre 3 a 4 anos após o plantio. Adicionalmente, é mais susceptível a pragas, doenças e seca, atinge altura média de 10 metros e possui período de produção de 40 anos (Liyanage 1958; Aragão 2002; Siqueira *et al.* 2002). Plantas obtidas pelo cruzamento entre as variedades *typica* e *nana* são chamadas de híbridos intervarietais. A variedade híbrida apresenta vantagens com relação aos parentais como maior e melhor qualidade da água e da copra, fibras com textura com potencial para indústria (Aragão 2002) além de apresentar resistência a pragas (Whitehead 1968; Baudouin *et al.* 2008; Koffi *et al.* 2016).

*Cocos nucifera* é uma palmeira onde todas as suas partes podem ser aproveitadas. Os frutos podem ser comercializados verdes, para o consumo do endosperma líquido (água de coco), ou maduros, para a produção de óleo, leite de coco e do endosperma ralado (Martins e Junior 2014). A água do coco possui potencial para exploração na indústria biomédica e biotecnológica por possuir auxinas, citocininas, zeatinas, giberelinas, ácidos inorgânicos e vitaminas (Yong *et al.* 2009), além de apresentar efeitos antioxidantes, cardioprotetores e imunoestimuladores (Debmandal e Mandal 2011). O endosperma do coco maduro desidratado possui alto valor nutricional, rico em fibra alimentar e proteína, e pode ser usado em uma ampla gama de produtos alimentícios



(Kumalasari *et al.* 2020). O óleo de coco é utilizado na alimentação humana, além possuir um sabor suave, odor agradável e fácil digestão (Granados-Sánchez e López-Ríos 2002), apresentando potencial medicinal (Joshi *et al.* 2020). O óleo de coco atua como antibiótico natural, ajudando a modular a imunidade. Isso porque os metabólitos do óleo de coco liberam ácido láurico e monolaurina, conhecidos como agentes antimicrobianos (Joshi *et al.* 2020). Além do potencial alimentício e medicinal, o óleo de coco apresenta potencial para uso na fabricação de biodiesel (Hoang e Le 2017), e na fabricação de alimentos para aquicultura trazendo redução de custo e maior qualidades em comparação com outros óleos (Apraku *et al.* 2017).

**Tabela 1:** Características fenológicas e potencial de produção de *Cocos nucifera* das variedades *nana*, *typica* e híbrida.

CARACTERÍSTICAS	ANÃO	HÍBRID O	GIGANT E
<b>SUSCEPTÍVEL A PRAGAS E SECA</b>	+	-	-
<b>ALTURA</b>	10 m	18-20 m	18-20 m
<b>PRODUÇÃO DE FRUTOS (FRUTOS/PLANTA/ANO)</b>	150-200	130-150	60-80
<b>PERÍODO PRODUTIVO (ANOS)</b>	40	50-60	60
<b>PESO DO FRUTO (G)</b>	900	1200	1400
<b>PESO DO NOZ (G)</b>	550	700	800
<b>NÚMERO DE FRUTOS/ANO</b>	150-200	200-250	120-150
<b>VOLUME PRODUZIDO DE ENDOSPERMA LÍQUIDO/ANO</b>	10.000-12.000 L/ha	10.000-12.000 L/ha	5.000-7.000 L/ha
<b>COPRA PRODUZIDA/ANO</b>	8 ton/ha	8,5-9,5 ton/ha	3,5-5 ton/ha
<b>PERÍODO DE GERMINAÇÃO DA SEMENTE</b>	40-60 dias	70-90 dias	100-150 dias

Fonte: Fontes *et al.* 2002; Martins e Junior 2014. Símbolos: (+) susceptível, (-) não susceptível.

Outro produto explorado é a casca do coco ou fibra. A casca apresenta potencial médico-farmacêutico, sendo utilizada contra inflamação urogenital, amenorreia, diabetes e diarreia, assim como o chá das raízes, para dores no estômago, e a água, para o tratamento de doenças renais (Lima *et al.* 2015). A fibra também pode ser utilizada como

adubo, na complementação de macronutrientes na agricultura em plantações de melão (Cosme *et al.* 2018), pimenta-de-caiena (Bustami *et al.* 2019) e pimentão (Camposeco-Montejo *et al.* 2018) por exemplo, melhorando significativamente a produtividade. Além dessas utilizações a fibra, tem sido utilizado na indústria de construção civil como reforço em massa de concreto e blocos no solo (Danso 2017), o pó da casca (Leman *et al.* 2017) e tiras do caule de coco (Ofuyatan *et al.* 2020). A utilização desses materiais na construção civil tem ganhado atenção nos últimos anos, pois proporciona um caráter econômico, ecológico e renovável (Ofuyatan *et al.* 2020). A seiva da inflorescência de *C. nucifera* é usada para a produção do vinho, vinagre, álcool, xarope ou açúcar (Ysidor *et al.* 2017). De acordo Hebbbar *et al.* (2020) a seiva da inflorescência de coco contém vários constituintes bioquímicos importantes para a saúde, como compostos fenólicos, flavonóides e vitamina A.

*Cocos nucifera* contribui diretamente com a renda de cerca de 20 milhões de pequenos agricultores, sendo uma das palmeiras mais valorizadas do mundo. Com isso, cultivares especiais de coco, que possuem endosperma ou uma água saborosa, estão atraindo considerável atenção em muitos países (Adkins *et al.* 2018).

## **A cultura de coco**

Cultivado em mais de 90 países, estima-se que a área plantada no mundo seja superior a 12 milhões de hectares, sendo a maior parte nos trópicos, com uma produção de mais de 60 milhões de toneladas de frutos concentrados principalmente na Ásia. Os maiores produtores são Indonésia destaca-se como maior produtor seguido por Filipinas e Índia (FAOSTAT 2019).

Desde 2010, a área plantada vem aumentando de forma ascendente no mundo, porém a produção de frutos não acompanha esse crescimento (FAOSTAT 2019), por ser suscetível às mudanças de mercado devido ao interesse em outros óleos, desastres naturais como vendavais, secas, doenças e pragas, as quais afetam a produção e geram prejuízos.

Em 1992, foi criado a International Coconut Genetic Resources Network (COGENT) pelo International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI) composto por 38 países produtores de coco distribuídos pela Ásia, África, América Latina e Caribe (Batugal e Rao Ramanatha, 2005), com a função de buscar soluções para as demandas e problemas enfrentados pelos produtores em várias partes do mundo. Estes países mantêm um banco internacional de genótipos de coco que atuam em conjunto somando esforços

para a pesquisa dessa espécie. O Brasil encontra-se incluído neste seletivo grupo e as atividades são desenvolvidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA).

O cultivo do coco no Brasil iniciou-se na Bahia e espalhou-se pelo litoral nordestino e pelos estados do Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e São Paulo (Martins e Junior 2014). A região nordeste é a maior produtora de coco no país com uma área plantada com mais de 225 mil hectares (IBGE 2017), produzindo mais de 2 milhões de toneladas de frutos. O Brasil ocupa o quinto lugar na produção mundial (FAOSTAT, 2019). Em 1990 o país ocupava apenas a 10ª posição no ranking mundial (Martins e Junior 2014).

O Brasil se destaca mundialmente na produção de coco posicionando-se entre os maiores produtores (FAOSTAT, 2019) sendo o maior produtor da América Latina (Martins e Junior 2014). Porém, não é suficiente para atender a demanda do mercado nacional, havendo necessidade de importações, principalmente da Indonésia e Filipinas, considerados os maiores produtores mundiais. Isso gera interferências no mercado nacional e desestimula pequenos produtores (Martins e Junior 2014). Como estratégia para estimular a produção nacional e pequenos produtores, o Brasil desenvolve atividades de capacitação e projetos de pesquisa desenvolvidos pela EMBRAPA. Esses projetos têm como objetivo o desenvolvimento de um programa nacional de conservação, manutenção da diversidade das diferentes populações de coqueiro, além de permitir o acesso e troca de germoplasma (COCOAGENT 2019).

Encontrando condições favoráveis, o *C. nucifera* tem capacidade de produção durante todo o ano (Holanda *et al.* 2007). Além do aspecto econômico observado, as plantações de coqueiro trazem avanços sociais e ambientais quando são exploradas de forma sustentável por comunidades litorâneas ou associadas a áreas fragilizadas de ecossistemas (Martins e Junior 2014) ou como agroflorestas (Baliton *et al.* 2017). O coqueiral pode estar associado com outras culturas, desde que sejam observados os espaçamentos entre eles (Debmandal e Mandal 2011). Essa técnica é usada por pequenos produtores, principalmente nos primeiros anos, quando não há a produção de frutos do coco e a passagem de luz é maior (Fontes *et al.* 2002). No Brasil, o plantio pode estar associado às culturas de subsistência como milho, mandioca e feijão, ou com a criação de animais (Fontes *et al.* 2002).

O coqueiro é uma planta que se desenvolve melhor em temperaturas médias, próximas a 27°C, com umidade acima de 60%, pluviosidade mensal acima de 130 mm,

luminosidade acima de 120h/mês e ventos fracos a moderados (Passos 2002). A produção de mudas por produtores brasileiros inicia-se com a seleção de matrizes com características de interesse e livres do ataque de pragas e doenças, com estipe reto, poucas cicatrizes foliares, muitas folhas e uma boa produção de frutos (Fontes *et al.* 2002).

### **Propagação do coqueiro**

O coqueiro propaga-se pela germinação de suas sementes, onde o caule desenvolve apenas um meristema apical, sem a propagação por divisão de touceiras (Lorenzi 2004). Assim, o principal método de multiplicação de *C. nucifera* é a produção de mudas via sementes em viveiros comerciais (Harries 2012), com uma germinação lenta e desuniforme (Meerow e Broschat 2012; Loyola-Vargas 2018). Diante disso, vários autores destacam a necessidade de desenvolver protocolos para a micropropagação de palmeiras, como o coqueiro, em virtude dos métodos tradicionais de melhoramento genético das espécies serem complexos e demorados, especialmente em razão do lento crescimento (Pereira *et al.* 2007), da germinação em palmeiras ser considerada difícil (Lopes *et al.* 2011; Harries 2012) e por não formar touceiras, o que impede o uso de métodos de propagação vegetativa convencional (Lorenzi *et al.* 2010). Nesse contexto, a cultura de tecidos vegetais, especificamente a rota da embriogênese somática, se configura como uma alternativa à propagação ideal para a espécie.

A embriogênese somática é um processo onde uma célula ou conjunto de células competentes, após uma série de mudanças bioquímicas e moleculares, formam um embrião bipolar (Rai *et al.* 2011). Esta técnica tem-se mostrado promissora para a otimização do sistema produtivo e a perpetuação de vegetais (Zimmermann 2010), em especial para espécies de palmeiras, visto que estas plantas não desenvolvem meristemas laterais (Lorenzi 2010).

De fato, existem protocolos de sucesso obtidos para palmeiras por meio da embriogênese somática. Steinmacher *et al.* (2007) produziram novas plantas de pupunha (*Bactris gasipaes*), a partir de calos originados de embriões zigóticos em meio de MS (Murashige e Skoog 1962) suplementado com a auxina Picloram. Scherwinski-Pereira *et al.* (2010), ao combinar carvão ativado e Picloram, em testes realizados com embrião zigótico do açazeiro *Euterpe oleracea*, obtiveram calos viáveis que contribuíram para estudo de propagação da espécie. Moura *et al.* (2009) e Luis e Scherwinski-Pereira (2014) alcançaram sucesso na indução de calos a partir de embriões zigóticos de *Acrocomia*

*aculeata*, tornando-se uma alternativa de propagação da espécie. Dentre outros trabalhos, citam-se a obtenção de embriões somáticos a partir de explantes de folhas de dendezeiro, *Elaeis guineensis*, inoculados em meio MS suplementados com ácido naftalenoacético (ANA) e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (Constantin *et al.* 2015) e de tamareiras, *Phoenix dactylifera* (Linn.) em meio MS suplementado com 2,4-D (Othmani *et al.* 2009; Kurup *et al.* 2014).

O primeiro trabalho com micropropagação em coqueiros foi descrito por Eeuwens (1976), o qual utilizou como explantes, o caule, folhas e inflorescência, com o objetivo de comparar o desenvolvimento dos calos em diferentes meios de cultura. Neste trabalho, o autor combinou uma concentração de micronutrientes e macronutrientes em meio de cultura conhecida como Y3 (Eeuwens 1976). A partir de então, vários outros trabalhos foram desenvolvidos com diferentes explantes visando à micropropagação de *C. nucifera* via embriogênese somática. Dentre os explantes utilizados, citam-se embriões zigóticos (Karunaratne e Periyapperuma 1989), tecidos foliares (Buffard-Morel *et al.* 1992), ovários (Perera *et al.* 2009), anteras (Perera *et al.* 2008) e inflorescências (Sandoval-Cancino *et al.* 2016). Dentre esses explantes, as plúmulas têm sido um dos mais utilizados na clonagem de *C. nucifera* (Hornung 1995; Chan *et al.* 1998; Fernando *et al.* 2003; Pérez-Núñez *et al.* 2006; Sáenz *et al.* 2006; Bhavyashree *et al.* 2016). As plúmulas podem ser consideradas explantes mais eficientes para micropropagação de *C. nucifera* via embriogênese somática. Isso porque explantes menores exibem uma menor taxa de comunicação entre as células, o que proporciona a multiplicação da massa celular (Bettencourt *et al.* 2016). Na escolha de uma variedade para utilização de plúmulas como explantes em processo de embriogênese somática, o *C. nucifera* var. *nana* tem se mostrado viável. Isso porque o coco anão apresenta altas taxas de autofecundação. Já para a variedade de coco gigante e seus híbridos que possuem fertilização cruzada, é indicado outros explantes para o sucesso do processo de embriogênese somática (Ledo *et al.* 2019).

Embora existam estudos que citam a produção de plantas completas de coco por meio da embriogênese somática (Pérez-Núñez *et al.* 2006; Sáenz *et al.* 2010), o processo ainda não é bem compreendido (Fernando *et al.* 2010). Um dos fatores do baixo número de plantas produzidas é a reconhecida recalcitrância de *C. nucifera* às manipulações decorrentes do processo de embriogênese somática, uma vez que a indução de um calo regenerativo não é algo simples (Verdeil *et al.* 1994; Fernando *et al.* 2010; Jayaraj *et al.* 2015; Rajesh *et al.* 2016). Assim, observa-se a formação de tecido do tipo haustório, sugerindo que o processo de embriogênese ocorreu sem a formação de caule e raiz

(Karunaratne e Periyapperuma 1990). Com isso, mais investigações são necessárias para otimização de protocolos de micropropagação de coco via embriogênese somática, o que indica que protocolos eficientes de clonagem em *C. nucifera* ainda estão longe de serem completamente entendidos.

A micropropagação via embriogênese somática também pode ocorrer em meio de cultivo líquido, no interior de frascos com condições ambientais controladas, conhecidos como biorreatores (Etienne e Berthouly 2002; Steinmacher *et al.* 2011). Dois tipos de biorreatores podem ser utilizados, os de imersão contínua e os de imersão temporária no meio de cultivo (Etienne e Berthouly 2002; Teixeira e Cid 2010).

Os biorreatores de imersão temporária são equipamentos semi-automatizados, baseados na utilização de meio de cultivo líquido e recipientes de cultivo relativamente maiores (Teixeira *et al.* 1995; Tarmizi *et al.* 2008). Esse sistema tem sido utilizado com intuito de reduzir a manipulação das culturas, os gastos com agentes gelificantes, o número de frascos envolvidos no processo e, conseqüentemente, os custos das mudas produzidas (Teixeira *et al.* 1995; Tarmizi *et al.* 2008). Pesquisas a respeito do uso de biorreatores para a propagação de genótipos de *C. nucifera* estão ausentes na literatura.

### **A importância da anatomia na caracterização de taxonômica**

A caracterização de germoplasma é necessária para conhecer e diferenciar os acessos. A criação de bancos de germoplasma de palmeiras tem o objetivo de manter e conservar a variabilidade genética, tendo em vista a necessidade de fortalecer as ações de programas de melhoramento genético de palmeiras com grande potencial, como *C. nucifera* (Ramos *et al.* 2015). Nesse sentido, o conhecimento das características anatômicas das palmeiras é importante para a caracterização de germoplasma, pois fornece informações para melhor compreender as interações ecológicas e a taxonomia deste grupo de plantas (Tomlinson *et al.* 2011).

A descrição da anatomia vegetal das palmeiras foi avaliada por Tomlinson (1961) ao observar 250 espécies de 137 gêneros. Nesse estudo, ele verificou que é possível classificar as palmeiras em grupos ao observar um conjunto de características anatômicas que se mostram variáveis tanto na estrutura anatômica interna como na externa das palmeiras (Dransfield *et al.* 2008). Algumas espécies de palmeiras, por exemplo *Sabal mauritiiformis*, *Sabal mexicana* e *Sabal yapa* apresentam feixes vasculares circundados por espessas bainhas de fibras que são visualizadas aos pares. Essa estrutura anatômica

varia entre as palmeiras, e reflete a resistência e flexibilidade dessas plantas (Pérez e Rebollar 2003). Assim como em outras palmeiras, a distribuição dos feixes vasculares tornou-se um fator importante que influencia a classificação de diferentes grupos (Tomlinson, 1961).

Horn *et al.* (2009) ao comparar os gêneros *Dypsis*, *Butia* e *Ceroxylon* observaram que as folhas pinadas, possuíam poucas diferenças na morfologia externa, ao contrário da lâmina foliar que apresentavam grandes diferenças anatômicas quanto a presença e distribuição das fibras, e na simetria da lâmina. Os gêneros *Dypsis* e *Ceroxylon* têm uma simetria dorsiventral, enquanto *Butia* apresenta uma lâmina isobilateral (Horn *et al.* 2009). Essa é uma diferença estrutural importante, porque as folhas isobilaterais, com estômatos e mesófilo em ambas as epidermes das folhas podem aumentar as taxas de fotossíntese em ambientes com muita luz, diferente das folhas dorsiventrals (Smith *et al.* 1997). Essas e outras características anatômicas, relacionadas a epiderme e a hipoderme, formam em conjunto muitas das variações anatômicas mais facilmente perceptíveis nas folhas das palmeiras (Horn *et al.* 2009).

Outra característica anatômica importante são os corpúsculos de sílica. A presença e a forma dos corpos de sílica podem caracterizar espécies, gêneros e famílias, tendo alto valor taxonômico, pois essas estruturas são determinadas geneticamente com pouca influência do ambiente (Moller e Rasmussen 1984). Em *C. nucifera* os corpos de sílica estão associados às células epidérmicas dos segmentos foliares (Araújo *et al.* 2013), e também aos feixes vasculares de flores masculinas e femininas (Guevara e Jáuregui 2008). A presença de corpúsculos de sílica é comum em outras espécies de palmeiras, não só na folha, mais associada a células epidérmicas, no floema dos feixes vasculares, na nervura central e na bainha foliar (Silva e Potiguara 2008).

A cera epicuticular pode ser encontrada em diferentes padrões de deposição em palmeira, sendo útil como um caráter adicional para diferenciação taxonômica entre gêneros (Vianna *et al.* 2017). Outro caráter anatômico importante para a identificação e separação de espécies dentro de gênero de palmeiras é a nervura central (Vianna *et al.* 2017). De acordo com Vianna *et al.* (2017), no gênero *Acrocomia*, embora os tecidos e as estruturas na nervura central sejam similares, o número, tamanho e distribuição destes são diferentes em cada espécie desse gênero.

A localização e a densidade dos estômatos, pode estar associado a penetração de doenças, considerando que estômatos em maior densidade facilitam a inserção de patógenos (Araújo *et al.* 2013), além de auxiliar na diferenciação taxonômica entre as

variedades de *C. nucifera* (Manthriratna e Sambasivam 1974; Solangi *et al.* 2010). Os estômatos podem estar localizados no mesmo nível das demais células circunvizinhas da epiderme, como nos segmentos foliares de *C. nucifera* (Araújo *et al.* 2013), ou abaixo das células epidérmicas, como é observado em outras palmeiras (Henderson 2006).

Apesar de muitas estruturas anatômicas serem úteis para classificação e diferenciação de espécies, a anatomia deve ser tratada com cautela, pois algumas estruturas podem ser influenciadas pelo ambiente (Evert 2006). Por isso que a caracterização morfo-anatômica utiliza um conjunto de estruturas ao diferenciar as variedades, espécies e gêneros dentro do grupo de palmeiras (Tomlinson 1961). A diferenciação entre as variedades de *C. nucifera* é baseada em caracteres morfológicos tais como a estatura do vegetal, cor, peso e formato dos frutos (IPGRI 1995). Estudos sobre as diferenças anatômicas entre as variedades de *C. nucifera* ainda são pouco exploradas.

## REFERÊNCIAS

- Adkins S, Foale M, Biddle J, Nguyen QT (2018) Coconut improvement: tissue culture techniques for the collection, conservation and multiplication of elite germplasm. In: International Coconut Conference and Exhibition, Kerala, 2018. Kelara, India
- Allibert C (2008) Austronesian migration and the establishment of the malagasy civilization: contrasted readings in linguistics, archaeology, genetics and cultural anthropology. *Diogenes* 55:7–16. <https://doi.org/10.1177/0392192108090734>
- Apraku A, Liu L, Ayisi CL (2017) Trends and status of dietary coconut oil in aquaculture feeds. *Rev Fish Sci Aquac* 25:126–132. <https://doi.org/10.1080/23308249.2016.1245275>
- Aragão WM (2002) Cultivares de coqueiro. In: Sistema de produção para a cultura do coqueiro, 1º edição. Embrapa Tabuleiros Costeiros. Sistema de produção, 01, Aracaju-Sergipe, p 63
- Araújo KL, Da Silveira SF, Bianchini E, *et al* (2013) Caracterização anatômica e histoquímica de folíolos de coqueiro. *Rev Bras Ciências Agrar* 8:246–251. <https://doi.org/10.5039/agraria.v8i2a2796>
- Assy Bah B (1992) Use of *in vitro* culture of zygotic embryos for coconut (*Cocos nucifera* L.) genetic resources' collection and preservation
- Baliton RS, Wulandari C, Landicho LD, *et al* (2017) Ecological services of agroforestry landscapes in selected watershed areas in the Philippines and Indonesia. *Biotropia (Bogor)* 24:71–84. <https://doi.org/10.11598/btb.2017.24.1.621>
- Bandupriya HDD, Fernando SC, Vidhanaarachchil YRM (2016) Micropropagation and Androgenesis in coconut: an assessment of Sri Lankan implication. *Cocos* 22:31. <https://doi.org/10.4038/cocos.v22i1.5810>



- Basso KC, Barbero LM (2015) Anatomia foliar de forrageiras e a sua relação com o valor nutritivo. *Veterinária Notícias* 21:1–10
- Batugal P, Rao Ramanatha V (2005) Global coconut conservation strategy. In: Batugal P, V RR, J O (eds) *Coconut Genetic Resources*, cap 03. International Plant Genetic Resources Institute, Serdang, Selangor DE, Malaysia, p 750
- Batugal P, Rao VR, Oliver J (2005) *Coconut Genetic Resources*. International Plant Genetic Resources Institute, Selangor Darul Ehsan, Malaysia
- Baudouin L, Lebrun P, Berger A, *et al* (2008) The Panama tall and the maypan hybrid coconut in Jamaica: Did genetic contamination cause a loss of resistance to Lethal Yellowing? *Euphytica* 161:353–360. <https://doi.org/10.1007/s10681-007-9568-2>
- Bett CC, Mweu CM, Nyende AB (2019) *In vitro* regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L) through indirect somatic embryogenesis in Kenya. *African J Biotechnol* 18:1113–1122. <https://doi.org/10.5897/AJB2019.16867>
- Bettencourt GM de F, Zanella LB, Quoirin MGG, Degenhardt-Goldbach J (2016) Efeito da fonte de carbono na embriogênese somática em *Bactris gasipaes*. *Pesqui Florest Bras* 36:179. <https://doi.org/10.4336/2016.pfb.36.86.809>
- Bhavyashree U, Lakshmi Jayaraj K, Muralikrishna KS, *et al* (2016) Initiation of coconut cell suspension culture from shoot meristem derived embryogenic calli: A preliminary study. *J Phytol* 8:13–16. <https://doi.org/10.19071/jp.2016.v8.2979>
- Bourdeix R, Alexia P (2017) A global strategy for the conservation and use of the coconut genetic resource 2018-2028. Montpellier, France
- Brainer MS de CP (2018) Produção de coco: o Nordeste é destaque nacional. *Cad Setorial ETENE* 3:1–25
- Buffard-Morel J, Verdeil JL, Pannetier C (1992) Embryogênese somática do cocotier (*Cocos nucifera* L.) à partir d'explants foliares: étude histologique. *Can J Bot* 70:735–741. <https://doi.org/10.1139/b92-094>
- Bustami Y, Maimunah S, Syafruddin D, Nur TD (2019) The role of coconut fiber: growth and productivity of Cayenne Pepper. *EurAsian J Biosci Eurasia J Biosci* 13:2153–2158
- Camposeco-Montejo N, Robledo-Torres V, Ramírez-Godina F, *et al* (2018) Response of bell pepper to rootstock and greenhouse cultivation in coconut fiber or soil. *Agronomy* 8:1–12. <https://doi.org/10.3390/agronomy8070111>
- Castro MMDM, Leitão-Filho H de FDFDF, Monteiro WR (1997) Utilização de estruturas secretoras na identificação dos gêneros de Asteraceae de uma vegetação de cerrado. *Rev Bras Botânica* 20:163–174. <https://doi.org/10.1590/S0100-84041997000200007>
- Chan JL, Saénz L, Talavera C, *et al* (1998) Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep* 17:515–521. <https://doi.org/10.1007/s002990050434>
- COCOAGENT (2019) Coconut genetic resources for enhanced livelihoods. In: <http://www.cogentnetwork.org/factsheets/americas/brazil>. Accessed 12 Feb 2019

- Conceição ES, Delabie JHC, Costa Neto A de O (2004) The entomophily of the coconut tree in question: The evaluation of pollen transportation by ants (Hymenoptera: Formicidae) and bees (Hymenoptera: Apoidea) in inflorescence. *Neotrop Entomol* 33:679–683. <https://doi.org/10.1590/s1519-566x2004000600004>
- Constantin M, Nchu WA, Godswill N, *et al* (2015) Induction of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq. var. *Tenera*) callogenesis and somatic embryogenesis from young leaf explants. *J Appl Biol Biotechnol* 4–10. <https://doi.org/10.7324/JABB.2015.3402>
- Corrêa PG, Pimentel RMDM, Cortez JSDA, Xavier HS (2008) Herbivoria e anatomia foliar em plantas tropicais brasileiras. *Ciência e Ensaios* 54–57
- Cosme CR, Silva Dias N da, Silva KMP, *et al* (2018) Growth of melon cultivated in coconut fiber under different concentrations of nutrient solution. *Comun Sci* 9:381–392. <https://doi.org/10.14295/CS.v9i3.2736>
- Danso H (2017) Properties of coconut, oil palm and bagasse fibres: as potential building materials. *Procedia Eng* 200:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2017.07.002>
- Debmandal M, Mandal S (2011) Coconut (*Cocos nucifera* L.: Areaceae): In health promotion and disease prevention. *Asian Pac J Trop Med* 4:241–247. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(11\)60078-3](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(11)60078-3)
- Dransfield J, Uhl NW, Asmussen CB, *et al* (2008) Genera palmarum the evolution and classification of palms, 2a. International Palm Society and The L.H. Bailey Hortorium, Cornell University, Richmond, UK
- Dulloo M, Rao R, Engelmann F, Engels J (2005) Complementary conservation strategy for coconuts. pp 75–90
- Eden-Green SJ, Mpunami AA (2005) Indexing and pathogen characterization. In: Batugal P V., Ramanatha R, Oliver J (eds) *Coconut Genetic Resources*. International Plant Genetic Resources Institute, Selangor Darul Ehsan, Malaysia, pp 371–389
- Eeuwens CJ (1976) Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera*) and cultured *in vitro*. *Physiol Plant* 36:23–28. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1976.tb05022.x>
- Ekanayake GK, Perera SACN, Dassanayake PN, Everard JMDT (2010) Varietal classification of new coconut (*Cocos nucifera* L.) forms identified from southern Sri Lanka. *Cocos* 19:41. <https://doi.org/10.4038/cocos.v19i1.4749>
- Etienne H, Berthouly M (2002) Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 69:215–231. <https://doi.org/10.1023/A:1015668610465>
- Evert RF (2006) *Esau's plant anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function, and development*. John Wiley & Sons
- FAOSTAT (2019) Food and agriculture organization of the united nations. In: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Accessed 24 Nov 2019
- Fernando SC, Verdeil JL, Hocher V, *et al* (2003) Histological analysis of plant regeneration from plumule explants of *Cocos nucifera*. *Plant Cell Tissue Organ Cult*

- Fernando SC, Vidhanaarachchi VRM, Weerakoon LK, Santha ES (2010) What makes clonal propagation of coconut difficult? *Asia-Pacific J Mol Biol Biotechnol* 18:161–163
- Ferreira JMS, Warwick DRN, Siqueira LA (1998) A cultura do coqueiro no Brasil. EMBRAPA-SPI Brasília
- Foale M (2005) An introduction to the coconut palm. In: Batugal Pons VRR, Oliver J (eds) Coconut genetic resources. International plant genetic resources institute – regional office for Asia, the Pacific and Oceania (IPGRI-APO), Serdang, Selangor DE, Malaysia, pp 1–8
- Foale M, Harries H (2011) Farm and forestry production and marketing profile for coconut (*Cocos nucifera*). Honolulu, Hawaii
- Fontes HR, Ferreira JMS, Siqueira LA (2002) Sistema de produção para a cultura do coqueiro, 1a. Embrapa, Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros
- Fuller DQ (2007) Non-human genetics, agricultural origins and historical linguistics in South Asia. *South Asia* 393–443. [https://doi.org/10.1007/1-4020-5562-5\\_18](https://doi.org/10.1007/1-4020-5562-5_18)
- Granados-Sánchez D, López-Ríos GFF (2002) Manejo de la palma de coco (*Cocos nucifera* L.) en México. *Rev Chapingo Ser ciencias For y del Ambient* 8:39–48
- Guevara L, Jáuregui D (2008) Floral anatomy of *Cocos nucifera* L. (Arecaceae, Arecoideae). *Acta Bot Venezuéllica* 31:35–48
- Harries HC (1978) The evolution, dissemination and classification of *Cocos nucifera* L. *Bot Rev* 44:265–319. <https://doi.org/10.1007/BF02957852>
- Harries HC (2012) Germination rate is the significant characteristic determining coconut palm diversity. *AoB Plants* 2012:pls045. <https://doi.org/10.1093/aobpla/pls045>
- Hebbar KB, Arivalagan M, Pavithra KC, et al (2020) Nutritional profiling of coconut (*Cocos nucifera* L.) inflorescence sap collected using novel coco-sap chiller method and its value added products. *J Food Meas Charact* 14:2703–2712. <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00516-y>
- Henderson FM (2006) Morphology and anatomy of palm seedlings. *Bot Rev* 72:273–329. [https://doi.org/10.1663/0006-8101\(2006\)72\[273:MAAOPS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1663/0006-8101(2006)72[273:MAAOPS]2.0.CO;2)
- Hoang AT, Le V Van (2017) The performance of a diesel engine fueled with diesel oil, biodiesel and preheated coconut oil. *Int J Renew Energy Dev* 6:1–7. <https://doi.org/10.14710/ijred.6.1.1-7>
- Holanda JS, Neto MF, Silva RA, et al (2007) Tecnologias para produção intensiva de coco anão verde. EMPARN 40
- Horn JW, Fisher JB, Barry Tomlinson P, et al (2009) Evolution of lamina anatomy in the palm family (Arecaceae). *Am J Bot* 96:1462–1486. <https://doi.org/10.3732/ajb.0800396>
- Hornung R (1995) Initiation of callogenesis in coconut palm (*Cocos nucifera* L.). In: Oropeza C, Howard FW, Ashburner GR (eds) Lethal Yellowing: Research and

- practical aspects. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 203–215
- IBGE (2017) Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. IBGE 30:1–81
- IPGRI (1995) Descriptors for coconut (*Cocos nucifera* L.), First. Overseas Development Administration, Roma, Italy
- Jayaraj KL, Bhavyashree U, Fayas TP, *et al* (2015) Histological studies of cellular differentiation during somatic embryogenesis of coconut plumule-derived calli. J Plant Crop 43:. <https://doi.org/10.19071/jpc.2015.v43.i3.2853>
- Jayasinghe MD, Hewajulige IGN (2021) King coconut - The golden nut of Sri Lanka. Sri Lanka J Food Agric 7:9. <https://doi.org/10.4038/sljfa.v7i1.90>
- Joshi S, Kaushik V, Gode V, Mhaskar S (2020) Coconut Oil and Immunity: What do we really know about it so far? J Assoc Physicians India 68:67–72
- Jucá MP, Gaíva HN, Pereira WE, Mileski A (2002) Comportamento vegetativo de seis cultivares de coqueiro-anão (*Cocos nucifera* L.), em Santo Antônio de Leverger - MT. Rev Bras Frutic 24:463–467. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452002000200036>
- Karun A, Niral V (2019) Coconut Genetic Resources
- Karunaratne S, Periyapperuma K (1989) Culture of immature embryos of coconut, *Cocos nucifera* L. callus proliferation and somatic embryogenesis. Plant Sci 62:247–253
- Karunaratne S, Periyapperuma K (1990) Culture of immature embryos of coconut, *Cocos nucifera* L: Callus proliferation and somatic embryogenesis. Cocos 8:13–22. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(89\)90087-3](https://doi.org/10.1016/0168-9452(89)90087-3)
- Koffi E, Sie R, Koffi Y, *et al* (2016) Morphological Diversity among 18 genitors of vanuatu tall (VTT) Coconut (*Cocos nucifera* L.) Population used in crosses for hybrids resistant to lethal yellowing disease selection at Port-Bouët, Côte d'Ivoire. Greener J Agric Sci 6:134–144. <https://doi.org/10.15580/GJAS.2016.4.020416032>
- Kumalasari ID, Santosa I, Sulistiawati E (2020) Coconut oil production with various roasting temperatures and dried grated Coconut as a by-product. IOP Conf Ser Earth Environ Sci 515:8–14. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/515/1/012026>
- Kong EYY, Biddle J, Foale M, Adkins SW (2020) Cell suspension culture: A potential *in vitro* culture method for clonal propagation of coconut plantlets via somatic embryogenesis. Ind Crops Prod 147:112125. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112125>
- Kurup SS, Aly MAM, Lekshmi G, Tawfik NH (2014) Rapid *in vitro* regeneration of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Kheneizi using tender leaf explant. Emirates J Food Agric 26:539–544. <https://doi.org/10.9755/ejfa.v26i6.18051>
- Ledo A da S, Passos EEM, Fontes HR, *et al* (2019) Advances in Coconut palm propagation. Rev Bras Frutic VO- 41 1–14. <https://doi.org/10.1590/0100-29452019159>
- Leman AS, Shahidan S, Nasir AJ, *et al* (2017) Properties of concrete containing coconut shell powder (CSP) as a filler. IOP Conf Ser Mater Sci Eng 271:. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/271/1/012006>

- Lima EBC, Sousa CNS, Meneses LN, *et al* (2015) *Cocos nucifera* (L.) (Arecaceae): A phytochemical and pharmacological review. *Brazilian J Med Biol Res* 48:953–964. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20154773>
- Liyanage D V (1958) Varieties and forms of the coconut palm grown in Ceylon. *Ceylon Coconut Q* 9:1–10
- Loiola CM, Aragão WM, Mann RS, Viégas PRA (2008) Seleção de cultivares de coqueiro (*Cocos nucifera* L.) com menor comprimento do estipe. *Aracaju-Sergipe*
- Lopes PSN, Aquino CF, Magalhães HM, Brandão-Júnior DDS (2011) Tratamentos físicos e químicos para superação de dormência em sementes de *Butia capitata* (Martius) Beccari. *Pesqui Agropecuária Trop* 41:120–125. <https://doi.org/10.5216/pat.v41i1.8388>
- Lorenzi H (2004) *Árvore brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*, 6a. Nova Odessa, São Paulo
- Lorenzi H, Kahn F, Noblick LR, Ferreira E (2010) *Flora brasileira Lorenzi: Arecaceae (palmeiras)*. Instituto Plantarum, Nova Odessa, São Paulo
- Loyola-Vargas VM (2018) *Plant cell culture protocols*, Fourth Edi. Springer New York, Hertfordshire, Hatfield
- Luis ZG, Scherwinski-Pereira JE. (2014) An improved protocol for somatic embryogenesis and plant regeneration in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from mature zygotic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 118: 485–496.
- Malaurie B, Dharshani Bandupriya HD, C. FS, Verdeil J-L (2006) Optimisation du procédé de cryoconservation de la plumule de cocotier. *Les ressources génétiques des ressources Partag 6ème Colloq Natl BRG* 6:449–468
- Manthirratna MAPP, Sambasivam S (1974) Stomatal density in varieties and forms of the coconut. *Ceylon Cocon* 25:105–108
- Marasinghe SSK, Marikkar JMN, Yalagama C, *et al* (2019) Comparison of inter-varietal differences in chemical composition and nutritional properties of coconut testa hour. *J Natl Sci Found Sri Lanka* 47:349–356. <https://doi.org/10.4038/jnsfsr.v47i3.8699>
- Martins CR, Junior LA de J (2014) Produção e comercialização de coco no Brasil frente ao comércio internacional: panorama 2014. *Com Local Publicações da Embrapa Tabuleiros Costeiros* 1:53. <https://doi.org/ISSN 16781953>
- Meerow AW, Broschat TK (2012) *Palm Seed Germination*. IFAS Ext 1–9
- Meijaard E, Abrams JF, Juffe-Bignoli D, *et al* (2020) Coconut oil, conservation and the conscientious consumer. *SSRN Electron J* 30:737–758. <https://doi.org/10.2139/ssrn.3575129>
- Moller JD, Rasmussen H (1984) Stegmata in orchidales: character state distribution and polarity. *Bot J Linn Soc* 89:53–76. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1984.tb01000.x>
- Monteiro TR, Freitas EO, Nogueira GF, Scherwinski-Pereira JE (2018) Assessing the

- influence of subcultures and liquid medium during somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *J Hortic Sci Biotechnol* 93:196–203. <https://doi.org/10.1080/14620316.2017.1360156>
- Morales AA (2003) Estudio de diferentes estrategias para promover la embriogénesis somática en cocotero (*Cocos nucifera* L.) a partir de explantes de plúmula. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.
- Moura EF, Motoike SY, Ventrella MC, *et al* (2009) Somatic embryogenesis in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from zygotic embryos. *Sci Hortic (Amsterdam)* 119:447–454. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.08.033>
- Muniz VIM de S, Braga PET, Alves JE (2020) Revista brasileira de meio ambiente frequência de coletores florais do coqueiro (*Cocos nucifera* L.) no litoral do município de Acaraú (Ceará – Brasil). *Rev Bras do Meio Ambient* 8:2–10
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nair MK, Khan HH, Gopalasundaram P, Braskara REVV (1993) Advances in coconut research. *Int Sci* 759
- Nguyen QT, Bandupriya HDDD, López-Villalobos A, *et al* (2015) Tissue culture and associated biotechnological interventions for the improvement of coconut (*Cocos nucifera* L.): a review. *Planta* 242:1059–1076. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2362-9>
- Noblick LR (2013) Leaflet anatomy verifies relationships within *Syagrus* (Arecaceae) and aids in identification. *PhytoKeys* 99:75–99. <https://doi.org/10.3897/phytokeys.26.5436>
- Ofuyatan O, Olowofoyeku A, Adaramaja G, *et al* (2020) Case studies in construction materials potential use of coconut stem as reinforcement in concrete slab. *Case Stud Constr Mater* 13:e00355. <https://doi.org/10.1016/j.cscm.2020.e00355>
- Othmani A, Bayouhd C, Drira N, Trifi M (2009) *In vitro* cloning of date palm phoenix dactylifera L., cv. Deglet bey by using embryogenic suspension and temporary immersion bioreactor (tib). *Biotechnol Biotechnol Equip* 23:1181–1188. <https://doi.org/10.1080/13102818.2009.10817635>
- Passos CD, Passos EEM (2003) Aspectos morfológicos do caule e da folha do coqueiro anão (*Cocos nucifera* L.). EMBRAPA Tabuleiros Costeiros Comun Técnico 1–4
- Passos EEM (2002) Exigências climáticas do coqueiro. In: Fontes HR, Ferreira JMS, Siqueira LA de (eds) Sistema de Produção para a Cultura do coqueiro, 1°. Embrapa, Aracaju-Sergipe, pp 9–10
- Pereira AR, de Carvalho SP, Pasqual M, Santos FC (2007) Embriogênese somática direta em explantes foliares de *Coffea arabica* L. cv. Acaiá Cerrado: Efeito de cinetina e ácido giberélico. *Cienc e Agrotecnologia* 31:332–336
- Perera PIP, Hoher V, Verdeil J-LL, *et al* (2008) Androgenic potential in coconut (*Cocos nucifera* L.). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 92:293–302. <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9337-5>

- Perera PIP, Vidhanaarachchi VRM, Gunathilake TR, *et al* (2009) Effect of plant growth regulators on ovary culture of coconut (*Cocos nucifera* L.). *Plant Cell Rep* 73–81. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9577-z>
- Pérez-Núñez MT, Chan JL, Sáenz L, *et al* (2006) Improved somatic embryogenesis from *Cocos nucifera* (L.) plumule explants. *Vitr Cell Dev Biol - Plant* 42:37–43. <https://doi.org/10.1079/IVP2005722>
- Pérez M, Rebollar S (2003) Anatomy and uses of the mature leaves of three species of *Sabal* (Arecaceae) of the Yucatan Peninsula, Mexico (Spanish). *Rev Biol Trop* 51:333–344
- Peries RRA (1996) The brown dwarf: A recent addition to the varieties and forms of the coconut palm grown in Sri Lanka. *Cocos* 11:79–81
- Rai MK, Shekhawat NS, Harish, *et al* (2011) The role of abscisic acid in plant tissue culture: A review of recent progress. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 106:179–190. <https://doi.org/10.1007/s11240-011-9923-9>
- Rajesh MK, Fayas TP, Naganeeswaran S, *et al* (2016) De novo assembly and characterization of global transcriptome of coconut palm (*Cocos nucifera* L.) embryogenic calli using Illumina paired-end sequencing. *Protoplasma* 253:913–928. <https://doi.org/10.1007/s00709-015-0856-8>
- Ramos SRR, Ferreira JMS, Ledo ADS, *et al* (2015) Banco ativo de germoplasma de coco da Embrapa: histórico, manejo e utilização dos acessos no período de 2012 a 2014. In: Ceará UF do (ed) Anais do II Simpósio da RGV Nordeste. Fortaleza, pp 2014–2015
- Ree JF, Guerra MP (2015) Palm (Arecaceae) somatic embryogenesis. *Vitr Cell Dev Biol - Plant* 51:589–602. <https://doi.org/10.1007/s11627-015-9722-9>
- Ribeiro FE, de Siqueira ER, Siqueira ER, *et al* (1995) Introdução, coleta e conservação de germoplasma de coqueiro no Brasil
- Ribeiro FE, Soares AR, Ramalho MAP (1999) Divergência genética entre populações de coqueiro-gigante-do-Brasil. *Pesqui Agropecuária Bras* 34:1615–1622. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X1999000900012>
- Sáenz L, Azpeitia A, Chuc-Armendariz B, *et al* (2006) Morphological and histological changes during somatic embryo formation from coconut plumule explants. *Vitr Cell Dev Biol - Plant* 42:19–25. <https://doi.org/10.1079/IVP2005728>
- Sáenz L, Herrera-Herrera G, Uicab-Ballote F, *et al* (2010) Influence of form of activated charcoal on embryogenic callus formation in coconut (*Cocos nucifera*). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 100:301–308. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9651-6>
- Sandoval-Cancino G, Sáenz L, Chan JL, Oropeza C (2016) Improved formation of embryogenic callus from coconut immature inflorescence explants. *Vitr Cell Dev Biol - Plant* 52:367–378. <https://doi.org/10.1007/s11627-016-9780-7>
- Scherwinski-Pereira JE, Guedes RS, Fermino PCP, *et al* (2010) Somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm using the thin cell layer technique. *Vitr Cell Dev Biol - Plant* 46:378–385. <https://doi.org/10.1007/s11627-010-9279-6>
- Silva RJF, Potiguara RC de V (2008) Aplicações taxonômicas da anatomia foliar de

- espécies amazônicas de *Oenocarpus* Mart. (Arecaceae). *Acta Bot Brasílica* 22:999–1014. <https://doi.org/10.1590/s0102-33062008000400011>
- Siqueira LA, Aragão WM, Tupinambá EA (2002) Introdução do coqueiro no Brasil. Importância histórica e agrônômica. *EMBRAPA Tabuleiros Costeiros Doc* 47:24
- Smith WK, Vogelmann TC, Lucia EH, *et al* (1997) Leaf Form and Photosynthesis. *Bioscience* 47:785–793. <https://doi.org/10.2307/1313100>
- Solangi AH, Anwar Arain M, Zafar Iqbal M (2010) Stomatal studies of coconut (*Cocos nucifera* L.) varieties at coastal area of Pakistan. *Pakistan J Bot* 42:3015–3021
- Souza VC, Lorenzi H (2008) Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II, 2a edição. Instituto Plantarum, Nova Odessa, São Paulo
- Steinmacher DA, Clement CR, Guerra MP (2007) Somatic embryogenesis from immature peach palm inflorescence explants: Towards development of an efficient protocol. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 89:15–22. <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9207-6>
- Steinmacher DA, Guerra MP, Saare-Surminski K, Lieberei R (2011) A temporary immersion system improves *in vitro* regeneration of peach palm through secondary somatic embryogenesis. *Ann Bot* 108:1463–1475. <https://doi.org/10.1093/aob/mcr033>
- Tarmizi AH, Samsul KR, Zaiton R, Rosli MY (2008) Multiplication of oil palm liquid cultures in bioreactors. *J Oil Palm Res* 44–50
- Teixeira JB, Cid LPB (2010) Biorreatores para a produção de mudas em larga escala. In: Cid LPB (ed) *Cultivo in vitro de Plantas*, 1a edição. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, DF, p 303
- Teixeira JB, Söndahl MR, Nakamura T, Kirby EG (1995) Establishment of oil palm cell suspensions and plant regeneration. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 40:105–111. <https://doi.org/10.1007/BF00037662>
- Tomlinson PB (1961) Anatomy of the monocotyledons. II. Palmae. *Anat monocotyledons II Palmae*
- Tomlinson PB, Horn JW, Fisher JB (2011) *The anatomy of palms: Arecaceae-Palmae*. Oxford University Press New York, New York
- Verdeil JL, Huet C, Grosdemange F, Buffard-Morel J (1994) Plant regeneration from cultured immature inflorescences of coconut (*Cocos nucifera* L.): evidence for somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep* 13:218–221. <https://doi.org/10.1007/BF00239896>
- Vianna SA, Carmelo-Guerreiro SM, Noblick LR, Colombo CA (2017) Leaf anatomy of *Acrocomia* (Arecaceae): an additional contribution to the taxonomic resolution of a genus with great economic potential. *Plant Syst Evol* 303:233–248. <https://doi.org/10.1007/s00606-016-1369-4>
- Von Arnold S, Sabala I, Bozhkov P, *et al* (2002) Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 69:233–249. <https://doi.org/10.1023/a:1015673200621>



- Wang F-X, Shang G-D, Wu L-Y, *et al* (2020) Chromatin accessibility dynamics and a hierarchical transcriptional regulatory network structure for plant somatic embryogenesis. *Dev Cell* 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.07.003>
- Whitehead RA (1968) Selecting and breeding coconut palms (*Cocos nucifera* L.) resistant to lethal yellowing disease. A review of recent work in Jamaica. *Euphytica* 17:81–101. <https://doi.org/10.1007/BF00038969>
- Williams EG, Maheswaran G (1986) Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Ann Bot* 57:443–462. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg002>
- Yong JWH, Ge L, Ng YF, Tan SN (2009) The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. *Molecules* 14:5144–5164. <https://doi.org/10.3390/molecules14125144>
- Ysidor KNG, Jean-Louis KK, Rachel AR, Marius BGH (2017) Variability of sensory acceptance and flavors of the inflorescence sap deriving from four widespread cultivars of Coconut (*Cocos nucifera* L.). *Curr J Appl Sci Technol* 22:1–10. <https://doi.org/10.9734/cjast/2017/33059>
- Zimmermann MJ (2010) Embriogênese Somática. In: Cid LPB (ed) *Cultivo in vitro de Plantas*. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, p 303
- Zizumbo-Villarreal D, Piñero D (1998) Pattern of morphological variation and diversity of *Cocos nucifera* (Arecaceae) in Mexico. *Am J Bot* 85:855–865

## CAPÍTULO I

**Anatomia foliar antecipa a distinção de duas variedades de *Cocos nucifera***

**L. (Areaceae) com fórmula vascular**

Artigo a ser submetido à revista *Annals of Botany*

## RESUMO

*Cocos nucifera* é uma palmeira icônica e importante para a economia de países tropicais, sendo usada como alimento e na produção de bebidas, extração de óleo e fabricação de cosméticos, entre outros. São suas as variedades mais exploradas no Brasil. São elas as variedades *nana* e *typica* que são distinguíveis na fase adulta. O objetivo deste estudo foi identificar as diferenças anatômicas foliares entre estas variedades. Cortes transversais e preparados paradérmicos foram obtidos para os segmentos foliares de 21 indivíduos de cada variedade. Os resultados revelaram que existem diferenças consideráveis entre as variedades estudadas, quanto à espessura do complexo cutícula-parede celular periclinal externa, densidade dos estômatos, espessura do mesofilo, diâmetro do metaxilema e padrão vascular. O mesofilo nas duas variedades apresenta uma variação gradativa no tamanho das células. O padrão na organização dos feixes vasculares foi representado por uma fórmula vascular, onde foi possível perceber diferenças na distribuição dos feixes vasculares entre as variedades *nana* e *typica*. Assim, constatamos que esse padrão vascular pode ser útil para distinguir *C. nucifera* ao nível de variedades, auxiliando na taxonomia destas plantas. Isto pode ajudar a antecipar a identificação das variedades, pois as plantas podem ser distinguidas ainda jovens, antes de sua fase reprodutiva, o que pode ser útil em programas de melhoramento da espécie a partir da produção de híbridos.

Palavras chave: anatomia foliar, coco-da-bahia, fórmula vascular, taxonomia.

## 1. INTRODUÇÃO

*Cocos nucifera* L. é uma palmeira relevante a nível mundial, com área plantada superior a 12 milhões de hectares, produzindo mais de 60 milhões de toneladas de frutos por ano (FAOSTAT 2019). É uma planta icônica e importante para a economia de países tropicais (Tomlinson *et al.* 2011; Martins e Junior 2014). A planta fornece a água de coco, óleo, leite de coco, endosperma ralado (Martins e Junior 2014), bebidas e açúcar de palma (Granados-Sánchez e López-Ríos 2002). Suas estruturas podem auxiliar no tratamento de enfermidades (Yong *et al.* 2009; Debmandal e Mandal 2011; Lima *et al.* 2015), ou servir de matéria prima para a produção de cosméticos, biocombustíveis, resinas e tintas (Granados-Sánchez e López-Ríos 2002).

As duas variedades exploradas economicamente são a *C. nucifera* var. *typica* Nar. e *C. nucifera* var. *nana* Griff., e a principal diferença entre elas é o porte (Santos *et al.* 1996; Foale 2003). Há ainda outras diferenças morfológicas relativas às folhas e caule, ciclo fenológico (Santos *et al.* 1996; Siqueira *et al.* 2002) e tamanho do genoma (Neto *et al.* 2016). Estas variedades também diferem quanto a caracteres de interesse agrônomo, como período de produtividade, quantidade de frutos por safra, tamanho dos frutos e resistência a pragas ou seca (Siqueira *et al.* 2002).

Apesar destas diferenças, a identificação da variedade das plantas ainda em fase vegetativa é difícil, especialmente em plantas jovens. Uma vez que um coqueiro leva em média três anos para começar a se reproduzir (Fontes *et al.* 2002), é praticamente inviável distinguir as duas variedades antes disso.

Estudos anatômicos foliares têm gerado importantes contribuições para a taxonomia das Arecaceae, possibilitando a distinção de gêneros e espécies (Hefler e Longhi-Wagner 2010; Tomlinson *et al.* 2011; Gomes e Borges 2013; Noblick 2013; Pinedo *et al.* 2016; Vianna *et al.* 2017). O primeiro estudo abrangente deste grupo foi feito por Tomlinson (1961). O conhecimento nesta área está bem avançado, mas alguns gêneros da família ainda precisam de melhor abordagem anatômica (Tomlinson *et al.* 2011). Apesar da volumosa produção científica neste tema, a avaliação das variações histológicas intraespecíficas em plantas dessa família não foi localizada.

Dados anatômicos têm possibilitado a melhor compreensão da interação coqueiro-patógenos em *C. nucifera* (Eden-Green e Mpunami 2005; Araújo *et al.*, 2013), sendo úteis como subsídio para os trabalhos de melhoramento genético (Passos e Passos 2003). No

entanto, o conhecimento sobre a anatomia foliar desta espécie ainda tem lacunas, e.g. sobre seu padrão vascular.

Em Poaceae, os feixes vasculares são classificados conforme sua ordem (Ellis 1976). Esta classificação revelou um padrão vascular, onde a sequência da ordem dos feixes condutores repete-se ao longo da folha, o que gerou a proposição de uma fórmula vascular (Gomes e Borges 2013). O padrão e a fórmula vascular já foram aplicados para outras Areaceae (Pinedo *et al.* 2016), mas ainda não foram testados para *C. nucifera*, tampouco foram avaliados a nível intraespecífico entre as monocotiledôneas como um todo.

O objetivo do presente trabalho foi analisar a anatomia foliar das variedades *typica* e *nana* de *C. nucifera*. Buscou-se também verificar se existe um padrão vascular nas folhas destas plantas e se este pode distinguir as variedades analisadas. A possível identificação das variedades das plantas enquanto ainda jovens, antes de sua fase reprodutiva, é um dos objetivos aqui almejados.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### **Amostragem.**

Acessos das variedades *nana* e *typica* de *C. nucifera* foram cedidos pelo Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Tabuleiros Costeiros. Todos os acessos foram plantados entre os anos de 1982 a 1989. Os acessos da variedade *nana* estão localizados no Campo Experimental de Itaporanga D'Ajuda (11° 06' 40 "S e 37° 11 '15"W), a 28 km de Aracaju, cultivados em solo classificado como Neossolo quartzarênico. As plantas estão dispostas em espaçamento de 7,5 × 7,5 × 7,5 m em triângulo equilátero. Os acessos da variedade *typica* estão localizados no Campo Experimental do Betume, município de Ilha das Flores (10°26 05" S e 36°52 21" W), a 140 km de Aracaju, cultivadas em solo classificado como Areia Quartzosa Distrófica. A pluviosidade média para as duas áreas de cultivo varia entre 1.250 - 1.400 mm anuais, com umidade relativa média de 75%. O clima da região é tropical chuvoso com verão seco, segundo a classificação de Köppen (Peel *et al.* 2007).

Duas exsicatas testemunhas foram coletadas conforme o roteiro de Martins e Filgueiras (2010) e depositadas no Herbário da Universidade de Brasília (acrônimo UB, conforme Thiers 2019), referentes às duas variedades: *C. nucifera* var. *nana*, G.C. *Frugeri* 13 (UB 219055); *C. nucifera* var. *typica*, G.C. *Frugeri* 15 (UB 219056).

Para a caracterização anatômica, três segmentos foliares foram coletados por indivíduos, oriundos de 21 indivíduos da variedade *nana* e 30 indivíduos da variedade *typica*. As amostras com 2 cm<sup>2</sup> foram retiradas da região mediana das folhas e no terço médio dos segmentos foliares entre a 9<sup>a</sup> e 14<sup>a</sup> folha, sendo fixadas em FAA 50 (Johansen 1940) e estocadas em etanol 50%.

#### **Preparação do material botânico.**

Secções transversais das amostras dos segmentos foliares foram obtidas em micrótomo de mesa do tipo Ranvier e clarificadas com hipoclorito de sódio (Kraus e Arduin 1997). Os cortes foram lavados cinco vezes com água destilada, corados com azul de alcian e safranina etanólica 4:1 por ca. 5 minutos (Johansen 1940).

Para a obtenção das preparações paradérmicas, amostras foliares com cerca de 1 cm<sup>2</sup> foram imersas em solução de Franklin 30% (Johansen 1940) por 36 h a 60°C e lavadas em água destilada três vezes. As epidermes foram coradas com safranina etanólica 1% por 1 min (Johansen 1940).

Após a coloração, ambos os cortes transversais e os preparados paradérmicos foram desidratados em gradiente etanólico 50-60-70-80-90-100% e submetidos a gradiente de etanol:acetato de butila 3:1, 1:1, 1:3 (v:v) e acetato de butila puro, produzindo lâminas permanentes lutadas com verniz vitral incolor (Paiva *et al.* 2006).

O registro das imagens foi realizado em fotomicroscópio associado ao microcomputador com sistema de captura de imagens LAS EZ, no Departamento de Botânica da Universidade de Brasília.

#### **Análise anatômica.**

A lista de caracteres analisados nas secções transversais e nas preparações paradérmicas dos segmentos foliares encontra-se no Apêndice 1. A análise da vascularização foliar foi feita a fim de identificar a presença ou não de um padrão vascular e para testar a aplicação da fórmula vascular (FV) conforme proposto por Silva (2011) e adaptações para Arecaceae de Pinedo (2015).

As medições das estruturas celulares foram realizadas com auxílio do programa ImageJ (Rueden *et al.* 2017). Os dados quantitativos foram determinados pela média aritmética simples para cada variedade amostrada. Imagens dos cortes transversais foram utilizadas para as medições da espessura do complexo cutícula-parede periclinal externa adaxial, protoplasto da epiderme adaxial, espessura da epiderme, espessura da hipoderme adaxial, espessura do complexo cutícula-parede periclinal externa abaxial, espessura do

mesofilo e diâmetro do metaxilema. As demais medições foram realizadas a partir de imagens obtidas das preparações paradérmicas: comprimento do ostíolo, largura da célula guarda e densidade dos estômatos por milímetro quadrado.

Para cada parâmetro, foram feitas ao menos três medições, em três segmentos foliares de cada um dos 21 indivíduos utilizados para cada variedade, resultando em no mínimo 189 medições. Os dados obtidos foram submetidos 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.

### **Símbolos e letras para a representação dos feixes vasculares**

P → feixes vasculares de primeira ordem;

S → feixes vasculares de segunda ordem;

T → feixes vasculares de terceira ordem;

Q → feixes vasculares de quarta ordem;

X → qualquer feixe vascular; a ausência de sobrelinhado indica feixe livre adaxialmente; a ausência de sublinhado indica feixe livre abaxialmente.

X → sobrelinhado simples indica feixe semi-travado adaxial;

X → sobrelinhado duplo indica feixe travado adaxial;

X → sublinhado simples indica feixe semi-travado abaxial;

X → sublinhado duplo indica feixe travado abaxial;

X → sobrelinhado e sublinhado indicam feixe semi-travado nas faces adaxial e abaxial;

X → sobrelinhado duplo e sublinhado duplo indicam feixe travado nas faces adaxial e abaxial;

() → bainha completa e a ausência deste símbolo significa que é bainha incompleta;

[] → isolamento de um grupo de feixes com as mesmas características;

{ } → isolamento de mais de um grupo de feixes com as mesmas características;

+ → soma grupos isolados dentro de uma representação e une duas representações diferentes ocorrentes na mesma área;

|\*| → clorênquima radial;

|| → mesofilo homogêneo;

- |−| → mesofilo isolateral;
- |T| → mesofilo dorsiventral;
- |J| → mesofilo dorsiventral gradativo;

### 3. RESULTADOS

#### *Cocos nucifera* L. (Figura 1-2)

**Lâmina foliar** plana, sem ondulações. **Epiderme** uniestratificada, com células comuns poligonais, com contorno reto a levemente curvo em ambas as faces. Folha hipoestomática; **complexo estomático** paracítico, na região intercostal, distribuição irregular ou em fileiras; câmaras subestomáticas presentes; cristas presentes nas faces externa e interna nas células-guarda e nas subsidiárias; células-guarda reniformes e niveladas. **Tricomas** pluricelulares, estrelados e esparsos, em depressões profundas da epiderme abaxial. **Células buliformes** abaxiais, na axila da nervura mediana, com 3-4 camadas, retangulares, a maioria 1,5-6 vezes mais altas que largas. **Hipoderme** adaxial com 2-3 camadas de células retangulares a isodiamétricas, de formato semelhante ou diferente entre a primeira e segunda camadas; hipoderme abaxial às vezes pouco conspícua, com 1 camada de células, altas ou não, secretoras ou não. **Fibras** adaxiais e abaxiais adjuntas ou mergulhadas na hipoderme, em grupos de 3-14 células. **Mesofilo** dorsiventral gradativo, parênquima clorofiliano denso, 5-12 camadas; células 5-12 vezes mais altas que largas na região adaxial, 1-3 vezes mais altas que largas na região abaxial. **Feixes vasculares** colaterais, até quarta ordem, os de terceira e quarta ordens abaixo da metade do mesofilo; os de **primeira ordem** ovais, travados nas duas faces ou travados adaxialmente e semitravados abaxialmente; metaxilema no centro, com 1(-3) elementos de vaso; floema com 1-4 grupos de células condutoras separados por fibras; feixes de menor calibre 13-31 entre dois de primeira ordem, predominantemente livres em ambas as faces ou travados abaxialmente; os de **segunda ordem** elípticos, 1 ou 3 entre os feixes de primeira ordem; os de **terceira ordem** elípticos, alternos aos feixes de primeira e segunda ordens; os de **quarta ordem** circulares, alternos aos de terceira ordem. **Bainha externa** endodérmica, incompleta em todos os feixes vasculares, pouco conspícua nos feixes vasculares de primeira ordem e bem definida nos demais feixes; **extensão da bainha** presente nos feixes de primeira ordem, presente ou não abaxialmente nos feixes de menor calibre, pronunciada ou não; **bainha interna** esclerenquimática, completa nos feixes de primeira e segunda ordens e variável nos de terceira e quarta ordens; fibras com



paredes celulares mais delgadas e lúmens maiores na região adaxial e paredes mais espessas e lúmens menores na região abaxial. **Margem foliar** arredondada ou angulosa, revoluta ou não; 1-2 camadas de colênquima com espessamento total; 3(-4) feixes marginais circulares, elípticos ou ovais, com numerosas fibras de parede grossa abaxiais e com ou sem elementos de condução; canais secretores 1-2, perto ou longe dos feixes marginais.

#### **Chave de identificação das variedades de *Cocos nucifera***

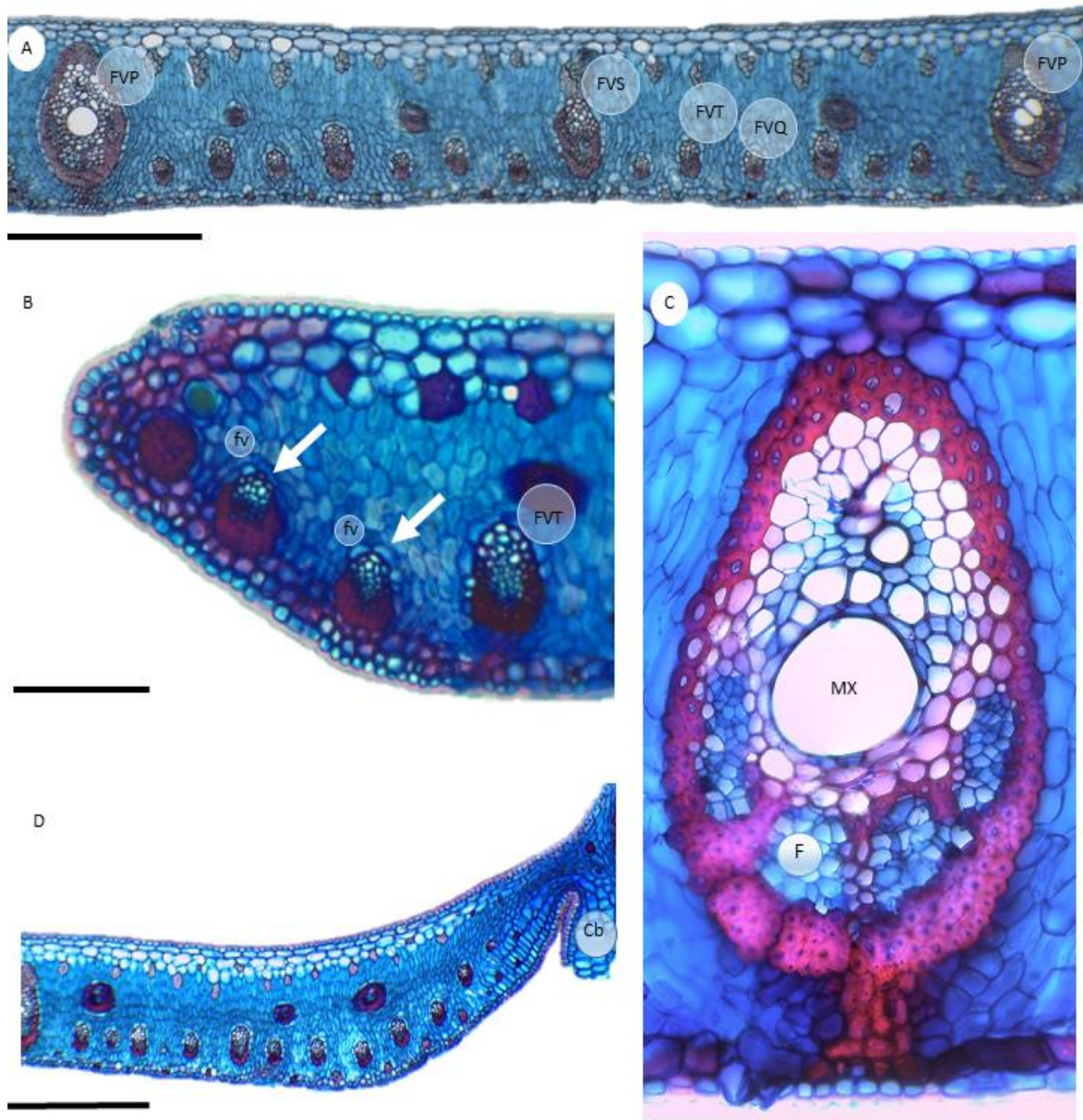
- 1' Células-guarda 38,3µm compr.; células buliformes em 3 camadas; células da segunda camada hipodérmica mais largas que altas; fibras adaxiais adjuntas à hipoderme; mesofilo 408,8µm espessura.; células adaxiais do parênquima clorofiliano 2-3 vezes mais altas que largas; feixes vasculares de menor calibre 13-15 entre dois de primeira ordem, em geral livres em ambas as faces ..... *C. nucifera* var. *nana*
- 1'' Células-guarda 19,4µm compr.; células buliformes em 4-5 camadas; células da segunda camada hipodérmica mais altas que largas; fibras adaxiais mergulhadas na hipoderme; mesofilo 334,6µm espessura.; células adaxiais do parênquima clorofiliano (2)-12 vezes mais altas que largas; feixes vasculares de menor calibre 28-31 entre dois de primeira ordem, em geral livres adaxialmente e travados abaxialmente ..... *C. nucifera* var. *typica*

#### ***Cocos nucifera* L. var. *nana* Griff. (anão)**

(Figuras 1 e 2A)

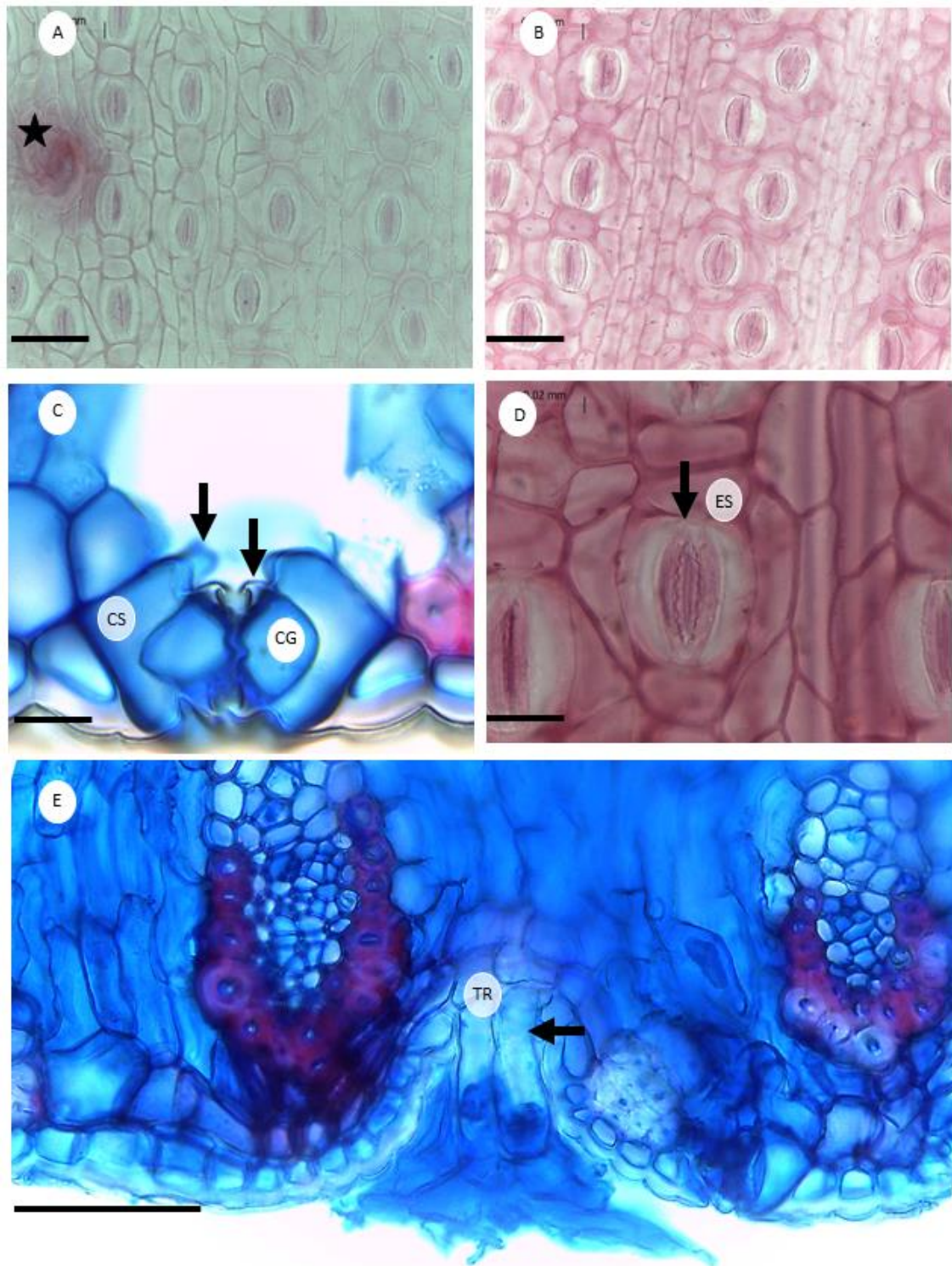
**Lâmina foliar** com epiderme com **complexo cutícula-parede periclinal externa** 6,30µm espess. **Epiderme adaxial** 12,5µm espess. **Complexo estomático** com células-guarda 38,3 x 5,37µm, ostíolo 27,98µm compr., densidade estomática 185,2 **Células buliformes** em 3 camadas, a maioria 2 vezes mais altas que largas. **Hipoderme** adaxial 43,67µm espess., com 2-3 camadas de células, a primeira e a segunda camadas com células semelhantes entre si e predominantemente mais largas que altas; hipoderme abaxial às vezes pouco conspícua, 17,97µm espess., com 1 camada de células mais delgadas que as da face adaxial e a maioria mais largas que altas; **fibras** adaxiais mergulhadas no mesofilo e adjuntas à hipoderme, em grupos de 3-14 células; fibras abaxiais mergulhadas na hipoderme, em grupos de 3-7 células. **Mesofilo** 408,8µm espess.; parênquima clorofiliano com 8-12 camadas, células 2-3 vezes mais altas que

largas nas camadas adaxiais, células (1)-2 vezes mais altas que largas nas camadas abaxiais.



**Figura 1.** Secções transversais dos segmentos foliares de *Cocos nucifera* var. *nana* Griff. **A.** Visão geral: padrão vascular com a sequência PQTQTQTSQTQTQP. **B.** Bordo foliar com feixes vasculares marginais e canais secretores (setas). **C.** Feixe vascular de primeira ordem com metaxilema central (MX) e floema (F) abaxial com grupos de células condutoras separados por fibras. **D.** Axila foliar com 3 camadas hipodérmicas adaxiais e 3 camadas de células buliformes abaxiais. Escalas: A= 500µm, B= 200µm, C-D= 50µm. Legenda: Cb: célula buliforme; F: floema; FVP: feixe vascular de primeira ordem; FVS: feixe vascular de segunda ordem; FVT: feixe vascular de terceira ordem; FVQ: feixe vascular de quarta ordem; MX: metaxilema.

**Feixes vasculares** de primeira ordem com vasos do metaxilema 68,75 $\mu$ m diâm., com extensão abaxial da bainha pouco pronunciada e com fibras de parede delgada; feixes de menor calibre 13-15 entre dois de primeira ordem, em geral livres em ambas as faces; 1 feixe de segunda ordem entre os de primeira ordem; 3 feixes de terceira ordem entre os de segunda ordem; os de quarta ordem alternos aos de terceira ordem.

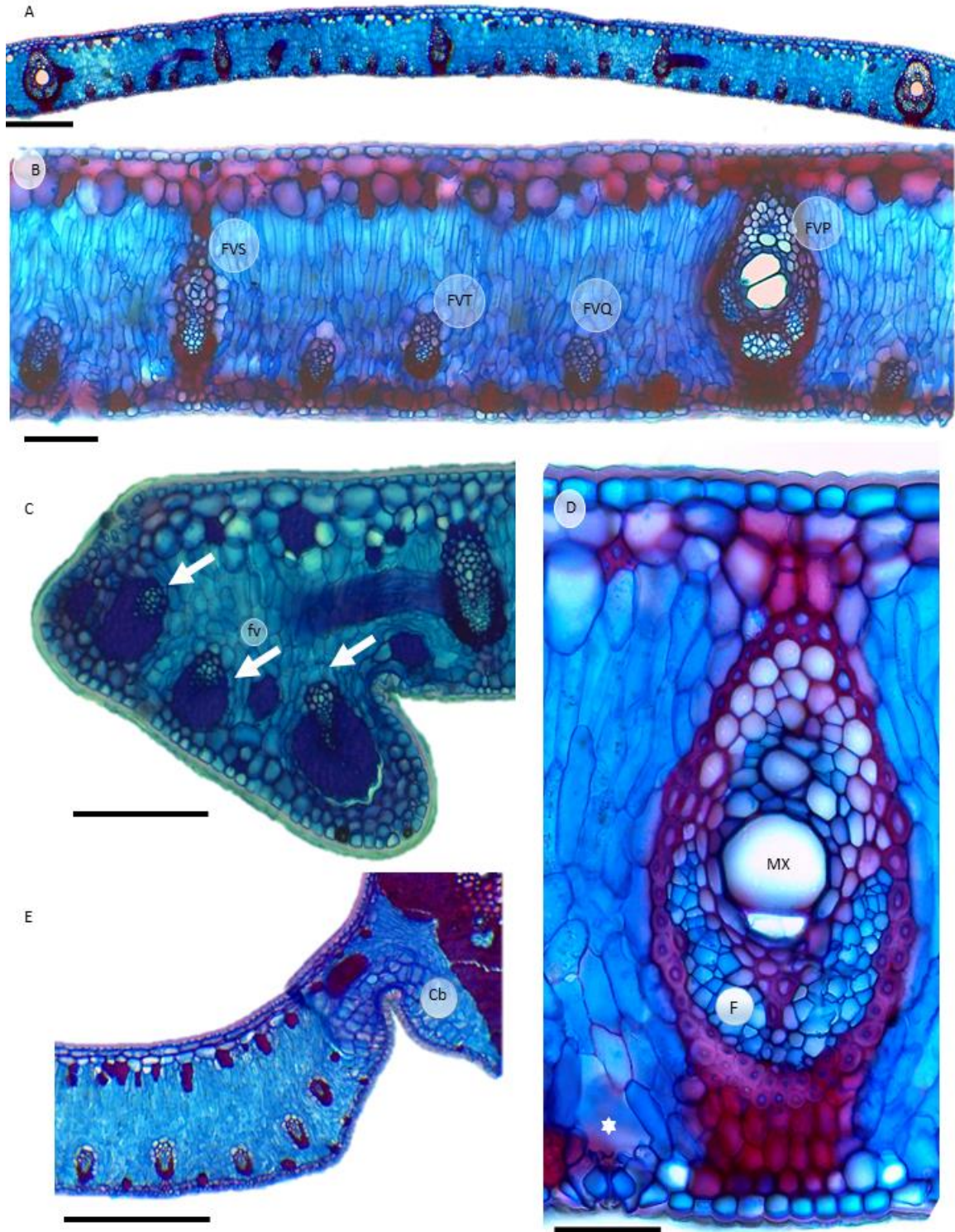


**Figura 2.** Epiderme abaxial da folha de *Cocos nucifera* (A-B, D: preparado paradérmico; C, E: secções transversais). **A, C, D, E.** Var. *nana*. **B, C, D, E.** Var. *typica*. **A-B.** Epiderme abaxial da var. *nana* (A), com tricoma (estrela), e da var. *typica* (B). **C.** Estômato com cristas externas e internas nas células-guarda e subsidiárias (setas). **D.** Complexo estomático paracítico. **E.** Tricoma pluricelular em depressão. Escalas: A, B= 50µm; C-D= 20µm; E= 50µm. Legenda: ES: estômato; CS: célula subsidiária; CG: célula guarda; TR: tricoma.

*Cocos nucifera* L. var. *typica* Nar. (gigante)

(Figura 3)

**Lâmina foliar** com epiderme com **complexo cutícula-parede periclinal externa** cerca de 4,97µm espess. **Epiderme adaxial** 11,8µm espess. **Epiderme abaxial** 11,82µm espess. **Complexo estomático** com células-guarda 19,4 x 6,0µm, ostíolo 7,19µm compr., densidade estomática 154,7. **Células buliformes** em 4-5 camadas, a maioria 2 vezes mais altas que largas. **Hipoderme adaxial** 51,93µm espess. com 2 camadas de células de formato diferente entre si, células predominantemente mais altas que largas na segunda camada; hipoderme abaxial 18,89µm espess., com 1 camada de células de altura semelhante às da face adaxial e em sua maioria mais altas que largas; **fibras** adaxiais e abaxiais mergulhadas na hipoderme, em grupos de 3-11 células adaxiais e de 3-16 células abaxiais. **Mesofilo** 334,6µm espess.; parênquima clorofiliano com 5-6 camadas, células adaxiais (2)-12 vezes mais altas que largas, células 2-3 vezes mais altas que largas nas camadas mais abaxiais. **Feixes vasculares** de primeira ordem com vasos do metaxilema 48,43µm diâm., com extensão abaxial da bainha muito pronunciada e com fibras de parede espessa; feixes de menor calibre 28-31 entre dois de primeira ordem, em geral livres adaxialmente e travados abaxialmente; 3 feixes de segunda ordem entre os de primeira ordem; 3 feixes de terceira ordem entre os de segunda ordem; os de quarta ordem alternos aos de terceira ordem.



**Figura 3.** Secções transversais dos segmentos foliares de *Cocos nucifera* var. *typica* Nar. **A-B.** Visão geral (B= detalhe de A): mesofilo dorsiventral gradativo e padrão vascular com a sequência: PQTQTQTSQTQTQTSQTQTQTSQTQTQ. **C.** Bordo foliar com feixes vasculares marginais e canais secretores (setas). **D.** Feixe vascular de primeira ordem com metaxilema central (MX) e floema (F) abaxial com grupos de células condutoras separados por fibras; notar estômato com cristas nas células-guarda e subsidiárias e a câmara subestomática. **E.** Axila foliar com 2 camadas hipodérmicas adaxiais e 4 camadas de células buliformes abaxiais. Escalas: A= 500µm, B, D= 50µm, C= 200µm. Legenda: Cb: célula buliforme; F: floema; FVP: feixe vascular

de primeira ordem; FVS: feixe vascular de segunda ordem; FVT: feixe vascular de terceira ordem; FVQ: feixe vascular de quarta ordem; MX: metaxilema.

**Tabela 1.** Caráteres anatômicos quantitativos foliares de *Cocos nucifera* variedades *nana* e *typica*. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Caráteres anatômicos	Variedades	
	<i>nana</i> (µm)	<i>typica</i> (µm)
Espessura da cutícula-parede celular adaxial	6,30 a	4,97 b
<b>Espessura da epiderme adaxial</b>	12,53 a	11,82 a
<b>Espessura do protoplasto da epiderme adaxial</b>	8,49 a	8,14 a
Espessura da cutícula-parede celular abaxial	4,73 a	3,88 a
<b>Espessura da epiderme abaxial</b>	12,09 a	11,04 a
Comprimento do ostíolo	28,83 a	28,12 a
Largura da célula guarda	5,37 a	6 a
Densidade estomática	185,2a	154,7b
Espessura da hipoderme adaxial	43,67 a	51,92 a
<b>Espessura da hipoderme abaxial</b>	17,97 a	18,89 a
<b>Espessura do mesofilo</b>	408,88 a	334,62 b
Distância entre feixes de primeira ordem	2.056,76 a	2.422,0 2 a
<b>Diâmetro do metaxilema</b>	68,74 a	48,43 b

As variedades de *C. nucifera* apresentam um padrão vascular, que pode ser expresso sob as duas fórmulas vasculares a seguir.

Fórmula vascular de *C. nucifera* var. *nana* Griff. (anão):

$$|\underline{P}\{QTQTQTQ\}S\{QTQTQTQ\}\underline{P}| |J|$$

Fórmula vascular de *C. nucifera* var. *typica* Nar. (gigante):

$$\left| \underline{P} \{ \underline{QTQTQTQ} \} \underline{S} \{ \underline{QTQTQTQ} \} \underline{S} \{ \underline{QTQTQTQ} \} \underline{S} \{ \underline{QTQTQTQ} \} \underline{P} \right| \text{||}$$

As amostras dos segmentos foliares desidratadas são apresentadas na Figura 4.



**Figura 4.** Face abaxial dos segmentos foliares das variedades de *Cocos nucifera*, após desidratação por 2h. **A.** Var. *nana*: nervuras de menor calibre pouco conspícuas. **B.** Var. *typica*: nervuras de menor calibre bem evidentes. Escala: A=B=500µm.

#### 4. DISCUSSÃO

O presente trabalho é a primeira descrição de variações anatômicas intraespecíficas em *Cocos nucifera* e possivelmente em Arecaceae, considerando que não foram encontrados relatos similares na abrangente literatura anatômica sobre esta família (e.g. Tomlinson 1961; Hefler e Longhi-Wagner 2010; Tomlinson *et al.* 2011; Gomes e Borges 2013; Noblick 2013; Pinedo *et al.* 2016; Vianna *et al.* 2017).

A anatomia foliar de *Cocos nucifera* foi analisada por Araújo *et al.* (2013), mas não foi especificada a variedade descrita. O presente trabalho identificou ao menos 23 diferenças histológicas entre as variedades *nana* e *typica*, que estão entre as mais cultivadas desta espécie (Santos *et al.*, 1996; Siqueira *et al.*, 2002), destacando-se os caracteres: comprimento das células-guarda; número de camadas e formato das células buliformes; altura relativa das células da segunda camada hipodérmica e daquelas do parênquima clorofiliano; inserção ou não das fibras na hipoderme; espessura do mesofilo; número de feixes vasculares de menor calibre entre dois feixes de primeira ordem e se são travados ou não. Outra diferença marcante constatada refere-se ao padrão vascular (vide adiante). Com base nestas características, pode-se inferir que a var. *nana* foi usada no trabalho de Araújo *et al.* (2013).



Em Arecaceae, a epiderme é formada por células dispostas em fileiras longitudinais ao longo dos segmentos foliares, tendo hipoderme nas faces adaxial e abaxial (Tomlinson *et al.* 2011; Noblick 2013). As células epidérmicas comuns têm paredes anticlinais retas em todas as espécies de *Allagoptera* L. (Antunes e Defaveri *et al.* 2015; Pinedo *et al.* 2016) e em espécies de *Butia* Becc. (Sant'Anna-Santos *et al.* 2018), sendo acentuadamente sinuosas em *Mauritia flexuosa* L.f. (Passos e Mendonça, 2006; Guevara *et al.* 2011). Paredes anticlinais sinuosas distinguem a epiderme de *Attalea speciosa* Mart. de outras espécies do gênero (Mata *et al.* 2022). Já em *C. nucifera* estas células se mostraram invariavelmente de contorno reto e não distinguem as variedades.

De modo geral, a epiderme forneceu poucos caracteres para fins taxonômicos no presente estudo. A espessura da epiderme na face adaxial (cortes transversais) não apresentou diferença significativa entre as variedades estudadas (Tabela 1). As folhas são hipoestomáticas em ambas as variedades e não apresentaram diferenças significativas quanto ao comprimento dos ostíolos e largura das células guardas. Um grande número de caracteres epidérmicos é encontrado em outros grupos de monocotiledôneas, como as Poaceae (Ellis 1976; Oliveira *et al.* 2015, 2019; Reis *et al.* 2015; Werllen-Santos *et al.* 2021) e Cyperaceae (Hefler e Longhi-Wagner 2010). Já Arecaceae parece estar longe disto (*e.g.* Pinedo *et al.* 2016; Mata *et al.* 2022) e a variação intraespecífica reduzida na epiderme foliar de *C. nucifera* está dentro do esperado.

A espessura da proteção de cera e o seu desenvolvimento na epiderme estão relacionados com a quantidade de luz e a umidade do ar (Ranasinghe *et al.* 1999). A cutícula epidérmica é a principal barreira contra a perda de água no corpo primário do vegetal (Riederer e Schreiber 2001) e esta estrutura foi significativamente mais espessa na var. *nana* do que na var. *typica* (Tabela 1), o que poderia contribuir para uma maior resistência à seca. Por um lado, a var. *nana* foi reportada como mais sensível às variações de umidade (Liyanage 1958; Aragão 2002; Siqueira *et al.* 2002); por outro lado, há genótipos com maior e menor resistência à seca para as duas variedades (Nainanayake *et al.* 2008; Samarasinghe *et al.* 2022). Estes dados indicam que a cutícula não é o único fator determinante desta característica agrônômica.

Os estômatos estão dispostos em fileiras paralelas em *C. nucifera*, separadas por células comuns (Fig. 3A-B), sendo esta uma característica comum para folhas paralelógramas (Cutter 1969; Evert e Esau 2013). O complexo estomático é responsável pela regulação da transpiração (Abdulrahman e Oladele 2009). Manthriratna e Sambasivam (1974) e Solangi *et al.* (2010) constataram uma maior densidade dos

estômatos na var. *nana* do que na *typica*, o que foi corroborado pelo presente trabalho (Tabela 1). Por outro lado, estes autores consideraram que esta característica não é relevante para distinguir estas variedades (Manthriratna e Sambasivam 1974; Solangi *et al.* 2010). Efetivamente, a contagem estomática demanda muito tempo e requer a obtenção dos preparados paradérmicos.

A produtividade em *C. nucifera* está relacionada a fatores ambientais como a umidade, e a transpiração está relacionada com o resfriamento do dossel, taxas de fotossíntese, produção de flores femininas e queda de frutos imaturos (Nainanayake *et al.* 2008). Isso pode explicar o melhor desempenho da var. *nana* para a produção de frutos (Aragão 2002; Siqueira *et al.* 2002), visto que ela possui melhores valores para espessura do complexo cutícula-parede celular periclinal e densidade estomática.

A densidade estomática em *C. nucifera* pode ter relação com doenças foliares (Pascholati e Dalio 2011), uma vez que o ostíolo dos estômatos pode ser a principal porta de entrada dos fungos nestes órgãos (Vitória *et al.* 2008; Bhuiyan *et al.* 2021).

As células-guarda das palmeiras têm formato reniforme, e encontram-se localizadas ao nível das demais células epidérmicas (Tomlinson *et al.* 2011; Araújo *et al.* 2013; Fig. 3C). Cristas são relatadas em estômatos de espécies de *Allagoptera* (Pinedo *et al.* 2016), *Butia* (Sant'Anna-Santos *et al.* 2018), *Oenocarpus* (Silva e Potiguara 2008) e em *Socratea exorrhiza* (Kikuchi *et al.* 2016). Esta característica não foi descrita para *Cocos*, mas é possível identificá-la em ilustrações (Tomlinson *et al.* 2011, Fig. 79a).

Em geral, as cristas são saliências cuticulares relatadas para as células-guarda (Dilcher 1974). Pinedo *et al.* (2016) descreveram também as cristas nas células subsidiárias. Ambos os tipos de cristas são projeções que criam microcâmaras ao nível da epiderme foliar, onde possivelmente o vapor de água se acumula, diminuindo sua perda pela ação do vento e diminuindo a transpiração.

Abdulrahman e Oladele (2009) apontaram o complexo estomático como paracítico em *C. nucifera*; já Araújo *et al.* (2013) consideraram que seria tetracítico, com células subsidiárias polares em comum entre estômatos vizinhos (células geminadas).

A interpretação desta característica requer a análise dos estômatos em vista frontal (Fig. 2A-B) e em secção transversal (Fig. 2C). De fato, há duas células subsidiárias, e não quatro. Esta controvérsia na literatura possivelmente se deva a que, em vista frontal, as células subsidiárias ficam fora de foco, aparecendo apenas uma parte muito estreita das mesmas. Também a organização das células epidérmicas vizinhas, geralmente em número de quatro, pode sugerir que são subsidiárias; no entanto, elas têm formato e número

inconstantes e são similares a outras células comuns da epiderme. Desta forma, há duas células subsidiárias no complexo estomático em *C. nucifera*, ambas paralelas às células-guarda, pertencendo ao tipo paracítico, conforme os critérios de Dilcher (1974).

Os tipos de tricomas em Arecaceae têm utilidade taxonômica e filogenética (Henderson e Stevenson 2006). As folhas de *Allagoptera* não possuem tricomas (Pinedo *et al.* 2016), enquanto que as de *Oenocarpus* podem apresentar tricomas tectores pluricelulares em ambas as faces (Silva e Potiguara 2008). Em *Mauritia flexuosa*, os tricomas são simples e unicelulares (Passos e Mendonça 2006). Já em *C. nucifera*, os tricomas são exclusivamente abaxiais, com a base formada por 3-4 células (Tomlinson *et al.* 2011; Araújo *et al.* 2013), sendo escassos e sem diferenças entre as variedades aqui analisadas.

Células buliformes em *C. nucifera* encontram-se dispostas em três ou mais camadas com formato retangular, próximas à nervura principal abaxial semelhante ao encontrado em outras Arecaceae (Silva 2006; Gomes e Borges 2013; Pinedo *et al.* 2016). As células buliformes foram também descritas para as famílias Poaceae, Cyperaceae e Juncaceae, sendo elas responsáveis nesses grupos por enrolar as laterais do limbo como mecanismo de resistência ao estresse hídrico (Grigore e Toma 2017) e ao perderem água acabam reduzindo o turgor, o que ocasiona o dobramento da folha (Ellis 1979). De um modo geral as células buliformes nas monocotiledôneas são adaxiais (Oliveira *et al.* 2015), enquanto nas palmeiras são abaxiais (vide Silva e Potiguara 2008; Pinedo *et al.* 2016). Em espécies de *Cyperus* as variações no número de camadas celulares e a ocorrência de grupos de fibras juntos com as células buliformes foram características importantes para separar as espécies (Hefler e Longhi-Wagner 2010). No presente trabalho, o número de camadas das células buliformes e seu formato predominante separou as duas variedades de *C. nucifera*.

Em Arecaceae, a hipoderme está presente nas duas faces foliares, sendo mais desenvolvida adaxialmente (Tomlinson *et al.* 2011). Espécies de *Acrocomia* apresentam uma camada simples hipodérmica, que não possibilita a distinção de suas espécies entre si (Vianna *et al.* 2017). Já *C. nucifera* possui 2-3 camadas hipodérmicas adaxiais, que reúnem caracteres distintivos a nível intraespecífico. Enquanto a var. *nana* tem o formato semelhante destas células adaxiais, que são mais largas que altas, a var. *typica* distingue-se com células mais altas que largas na segunda camada hipodérmica. As células hipodérmicas abaxiais também seguem este padrão.

As fibras subepidérmicas e não vasculares constituem feixes paralelos à nervura principal e são comuns nas folhas das Arecaceae (Guevara *et al.* 2011; Vianna *et al.*

2017), fornecendo suporte mecânico aos tecidos no período de seca (Guevara *et al.* 2011; Tomlinson *et al.* 2011). Em *C. nucifera*, a var. *nana* distinguiu-se por ter os grupos de fibras adjacentes à hipoderme, enquanto a var. *typica* apresenta fibras mergulhadas na hipoderme, sendo este um bom caráter taxonômico intraespecífico. A associação dos feixes de fibras com a hipoderme adaxial é uma característica bastante comum na tribo Cocoseae (Tomlinson *et al.* 2011; Pinedo *et al.* 2016) e que aqui também foi constatada. No entanto, espécies de *Acrocomia* (também desta tribo) apresentam as fibras a diferentes alturas no mesofilo, sem associação com a hipoderme.

Segundo a classificação apresentada por Pinedo *et al.* (2016), o mesofilo foliar apresenta simetria dorsiventral gradativa nas duas variedades de *C. nucifera*. O mesofilo é ca. 21% mais espesso na var. *nana* do que na var. *typica* (Tabela 1). O parênquima clorofiliano é denso, sem espaços intercelulares, exceto nas câmaras subestomáticas (Tomlinson *et al.* 2011; Fig. 1-2). No clorênquima, um bom caráter para a distinção das variedades é a altura relativa das camadas celulares adaxiais e abaxiais, que são acentuadamente mais altas na var. *typica* do que na var. *nana*.

Türpe (1967) classificou os feixes vasculares das Poaceae, em que os de primeira ordem apresentam vasos de metaxilema, enquanto os demais só têm protoxilema, sendo denominados de segunda e terceira ordens conforme seus calibres. Esta classificação foi adotada no presente trabalho, onde se constatou que *C. nucifera* apresenta feixes vasculares de até quarta ordem.

Os vasos de metaxilema nos feixes de primeira ordem são 42% mais largos na var. *nana* do que na var. *typica* (Tabela 1). Vasos mais largos transportam maiores volumes de seiva, mas também estão mais vulneráveis ao embolismo, que se agrava quanto mais alta é a planta, havendo, portanto, uma relação entre diâmetro dos vasos e a altura das plantas (Rosell *et al.* 2017). A altura maior das plantas da var. *typica* pode ter relação com o diâmetro menor de seus vasos no metaxilema.

Nos feixes vasculares de Arecaceae, o floema é abaxial e pode estar dividido em grupos de células condutoras separados por fibras (Henderson 2006; Araújo *et al.* 2013; Santanna-Santos *et al.* 2015; Pinedo *et al.* 2016). O número de grupos celulares no floema não se mostrou distintivo das variedades de *C. nucifera*.

Um número variável de feixes de menor calibre ocorre entre dois feixes de primeira ordem nas folhas das Arecaceae (Guevara *et al.* 2011; Tomlinson *et al.* 2011; Pinedo *et al.* 2016; Vianna *et al.* 2017) e que podem fornecer bons caracteres taxonômicos. Espécies de *Acrocomia* apresentam estes feixes no meio do mesofilo (Vianna *et al.* 2017). Já em

*C. nucifera*, eles são abaxiais, sendo livres na var. *nana* e travados abaxialmente na var. *typica*.

Türpe (1966) distinguiu os feixes vasculares em travados (com extensão lignificada da bainha do feixe vascular ligada à epiderme), semi-travados (com uma fileira de células não lignificadas entre a extensão da bainha e a epiderme) e livres (extensão da bainha do feixe não ligadas à epiderme). Esta classificação foi adaptada para *Arecaceae* (Pinedo *et al.* 2016), tendo em vista que as folhas desta família apresentam hipoderme.

Após a desidratação, os feixes de menor calibre ficam muito mais perceptíveis na face abaxial foliar da var. *typica* que da var. *nana* (Fig. 4). Esta característica macroscópica pode auxiliar na identificação das plantas no campo e pode estar relacionada a que estes feixes são abaxialmente travados na var. *typica*. A desidratação possivelmente revela a presença do esclerênquima que está mais próximo da superfície foliar, em detrimento daquele que está mais afastado.

Um padrão vascular, inicialmente descrito para *Poaceae* (Silva 2011), posteriormente foi constatado em *Allagoptera*, *Arecaceae* (Pinedo *et al.* 2016) e aqui também é reportado para *Cocos*. Este padrão refere-se à sequência dos feixes vasculares de menor calibre entre dois feixes de primeira ordem (P), denominados de segunda (S), terceira (T) e quarta ordens (Q).

A sequência dos feixes no padrão vascular é difícil de ser traduzida nas descrições anatômicas e as torna longas e complexas. Silva (2011) propôs uma fórmula vascular para facilitar o entendimento deste padrão. Esta fórmula foi aplicada aqui (vide Resultados) e constatou-se que as variedades *nana* e *typica* podem ser distinguidas entre si por suas respectivas fórmulas vasculares. Até então, os trabalhos realizados com o intuito de descrever padrões vasculares visaram distinguir espécies, e alcançaram este objetivo com êxito (Silva 2011; Pinedo *et al.* 2016). O presente trabalho é a primeira aplicação da fórmula vascular a nível intraespecífico e esta fórmula se mostrou sintética, fácil de ser interpretada e com grande utilidade taxonômica.

Não foi identificado caráter com utilidade taxonômica infraespecífica relativo à margem foliar.

## 5. CONCLUSÃO

O estudo realizado ressalta a importância das características morfo-anatômicas para distinção entre variedades de *C. nucifera*. Foram observadas diferenças consideráveis que permitem distinguir as variedades estudadas, tanto por meio de caracteres quantitativos como qualitativos.

O padrão vascular foi constatado nas plantas estudadas e a aplicação da fórmula vascular se mostrou viável para traduzir este padrão, possibilitando a distinção das variedades de *C. nucifera*. Tanto o padrão vascular, como a fórmula vascular constituem bons caracteres para uso taxonômico.

Os caracteres histológicos foliares descritos podem ser úteis em programas de melhoramento da espécie, facilitando a identificação das variedades enquanto jovens, antes de sua fase reprodutiva. Eles podem ajudar a antecipar a identificação das variedades, pois as plantas podem ser distinguidas ainda jovens.

A identificação das variedades por meio da visualização dos feixes vasculares nos segmentos foliares desidratados pode ser útil para o produtor, devido à simplicidade da técnica macroscópica, que na verdade revela ao olho as características microscópicas das folhas analisadas.

## REFERÊNCIAS

- Abdulrahman AA, Oladele FA (2009) Stomatal features and humidification potentials of *Borassus aethiopum*, *Oreodoxa regia* and *Cocos nucifera*. African J Plant Sci 3:59–63
- Alves, MV; Estelita, MEM; Wanderley, MGL & Thomas, W.W. 2002. Aplicações taxonômicas da anatomia foliar das espécies brasileiras de *Hypolytrum* Rich. (Cyperaceae). Revista Brasileira de Botânica 25: 1-9.
- Antunes e Defaveri AC, Franca Barros C, do Carmo de Oliveira Arruda R, et al. (2015) *Allagoptera arenaria* (Arecaceae): Leaf anatomy of a palm from the Brazilian shore. Brittonia 67:336–349. <https://doi.org/10.1007/s12228-015-9384-2>
- Aragão WM (2002) Cultivares de coqueiro. In: Sistema de Produção para a Cultura do coqueiro, 1º edição. Embrapa Tabuleiros Costeiros. Sistema de produção, 01, Aracaju-Sergipe, p 63
- Araújo KL, Da Silveira SF, Bianchini E, et al. (2013) Caracterização anatômica e

- histoquímica de folíolos de coqueiro. *Rev Bras Ciências Agrar* 8:246–251.  
<https://doi.org/10.5039/agraria.v8i2a2796>
- Basso KC, Barbero LM (2015) Anatomia foliar de forrageiras e a sua relação com o valor nutritivo. *Veterinária Notícias* 21:1–10
- Bhuiyan MAB, Sultana N, Mahmud NU, *et al.* (2021) Characterization of *Pestalotiopsis* sp. causing gray leaf spot in coconut (*Cocos nucifera* L.) in Bangladesh. *J Basic Microbiol* 61:1085–1097. <https://doi.org/10.1002/jobm.202100253>
- Castro MMDM, Leitão-Filho H de FD, Monteiro WR (1997) Utilização de estruturas secretoras na identificação dos gêneros de Asteraceae de uma vegetação de cerrado. *Rev Bras Botânica* 20:163–174. <https://doi.org/10.1590/S0100-84041997000200007>
- Célia de Oliveira, R., Gomes, S. M., Felipe-Da-Silva, J. G., & Montenegro Valls, J. F. (2019). *Mesosetum filgueirasii* (Poaceae, Arthropogoninae): A new species from the Cerrado Biome, Brazil, and its leaf blade anatomy. *Systematic Botany*, 44(2), 319-323.
- Corrêa PG, Pimentel RMDM, Cortez JSDA, Xavier HS (2008) Herbivoria e anatomia foliar em plantas tropicais brasileiras. *Ciência e Ensaios* 54–57
- Cutler DF (1978) *Applied plant anatomy*. Longman: London & New York
- Cutter EG (1969) *Plant Anatomy: Experiment and Interpretation: Part I: Cells and Tissues*. Edward Arnold
- Debmandal M, Mandal S (2011) Coconut (*Cocos nucifera* L.: Areaceae): In health promotion and disease prevention. *Asian Pac J Trop Med* 4:241–247. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(11\)60078-3](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(11)60078-3)
- Dilcher, D. L. (1974). Approaches to the identification of angiosperm leaf remains. *The botanical review*, 40(1), 1-157.
- Eden-Green SJ, Mpunami AA (2005) Indexing and pathogen characterization. In: Batugal P V., Ramanatha R, Oliver J (eds) *Coconut Genetic Resources*. International Plant Genetic Resources Institute, Selangor Darul Ehsan, Malaysia, pp 371–389
- Ellis RP (1976) A procedure for standardizing comparative leaf anatomy in the Poaceae. I. The leaf-blade as viewed in transverse section. *Bothalia* 12:65–109. <https://doi.org/10.4102/abc.v12i1.1382>
- Ellis, R. P. 1976a. A procedure for standardizing comparative leaf anatomy in the Poaceae I. The leaf-blade as viewed in transverse section. *Bothalia* 12: 65-109.
- Evert RF, Esau K (2013) *Anatomia das Plantas de Esau*, 1a edition. Edgar Blucher Ltd,

São Paulo, SP

- FAOSTAT (2019) Food and Agriculture Organization of the United Nations. In: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Accessed 24 Nov 2019
- Foale M (2003) The coconut odyssey: the bounteous possibilities of the tree of life. Melbourne
- Fontes HR, Ferreira JMS, Siqueira LA (2002) Sistema de produção para a cultura do coqueiro, 1a. Embrapa, Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros
- Gomes SM, Borges JB (2013) Fórmula vascular (FV) na descrição anatômica foliar de *Syagrus glazioviana* (Arecaceae). 64° Congr Nac Botânica 2013
- Gomes SM, Somavilla NSDN, Gomes-Bezerra KM, *et al.* (2009) Anatomia foliar de espécies de Myrtaceae: contribuições à taxonomia e filogenia. Acta Bot Brasílica 23:224–238. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062009000100024>
- Granados-Sánchez D, López-Ríos GFF (2002) Manejo de la palma de coco (*Cocos nucifera* L.) en México. Rev Chapingo Ser ciencias For y del Ambient 8:39–48
- Grigore M-N, Toma C (2017) Bulliform cells. In: Anatomical Adaptations of Halophytes. Springer Cham, pp 325–338
- Guevara LI, Stauffer FW, Jáuregui DJ (2011) Anatomía comparativa de la lámina foliar y sistemática en la subtribu neotropical Mauritiinae (Arecaceae, Calamoideae). Brittonia 63:379–395. <https://doi.org/10.1007/s12228-010-9176-7>
- Hefler SM, Longhi-Wagner HM (2010) A contribuição da anatomia foliar para a taxonomia das espécies de *Cyperus* L. subg. *Cyperus* (Cyperaceae) ocorrentes no sul do Brasil. Acta Bot Brasílica 24:708–717. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062010000300014>
- Hefler, SM, Longhi-Wagner, HM 2010. Contribution of leaf anatomy to the taxonomy *Cyperus* L. subg. *Cyperus* (Cyperaceae) species from southern Brazil. Acta Botanica Brasílica, 24(3):708-717.
- Henderson FM (2006) Morphology and anatomy of palm seedlings. Bot Rev 72:273–329. [https://doi.org/10.1663/0006-8101\(2006\)72\[273:MAAOPS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1663/0006-8101(2006)72[273:MAAOPS]2.0.CO;2)
- Henderson, FM, & Stevenson, D. W. (2006). A phylogenetic study of Arecaceae based on seedling morphological and anatomical data. Aliso: A Journal of Systematic and Floristic Botany, 22(1), 251-264.
- Hickey L, Ash A, Ellis B, *et al.* (1999) Manual of leaf architecture - morphological description and categorization of dicotyledonous and net-veined monocotyledonous



- angiosperms. Leaf Architecture Working Group, Washington, DC
- Johansen DA (1940) Plant microtechnique. McGraw-Hill Book Company, Inc: London; 530p
- Kikuchi TYS, Braga ZV, Potiguara RC de V (2016) Anatomia foliar de *Socratea exorrhiza* (Mart.) H. Wendl. (Arecaceae). *Biota Amaz* 6:73–79. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v6n2p73-79>
- Kraus JE, Arduim M (1997) Manual básico de métodos em morfologia. Rio de Janeiro, UFRRJ.
- Lima EBC, Sousa CNS, Meneses LN, *et al.* (2015) *Cocos nucifera* (L.) (Arecaceae): A phytochemical and pharmacological review. *Brazilian J Med Biol Res* 48:953–964. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20154773>
- Liyanage D V (1958) Varieties and forms of the coconut palm grown in Ceylon. *Ceylon Coconut Q* 9:1–10
- Manthirratna MAPP, Sambasivam S (1974) Stomatal density in varieties and forms of the coconut. *Ceylon Cocon* 25:105–108
- Martens J, Uhl NW, Bailey LH (1980) Methods for the study of leaf anatomy in palms. *Stain Technol* 55:241–246. <https://doi.org/10.3109/10520298009067247>
- Martins CR, Junior LA de J (2014) Produção e comercialização de coco no Brasil frente ao comércio internacional: panorama 2014. *Com Local Publicações da Embrapa Tabuleiros Costeiros* 1:53. [https://doi.org/ISSN\\_16781953](https://doi.org/ISSN_16781953)
- Martins RC, Filgueiras TS (2010) Roteiro morfológico para coleta de palmeiras no Cerrado. *Heringeriana* 4:51–59
- Nainanayake A, Ranasinghe CS, Tennakoon NA (2008) Effects of drip irrigation on canopy and soil temperature, leaf gas exchange, flowering and nut setting of mature coconut (*Cocos nucifera* L.). *J Natl Sci Found Sri Lanka* 36:33–40. <https://doi.org/10.4038/jnsfsr.v36i1.131>
- Neto MF, Pereira TNS, Geronimo IGC, *et al.* (2016) Coconut genome size determined by flow cytometry: Tall versus Dwarf types. *Genet Mol Res* 15:1–9. <https://doi.org/10.4238/gmr.15017470>
- Noblick LR (2013) Leaflet anatomy verifies relationships within *Syagrus* (Arecaceae) and aids in identification. *PhytoKeys* 99:75–99. <https://doi.org/10.3897/phytokeys.26.5436>
- Oliveira R, Valls J, Gomes S, *et al.* (2015) A new species of *Paspalum*, Notata group

- (Poaceae, Paspaleae), from the Cerrado biome, Brazil: description, chromosome number, and leaf blade anatomy. *Phytotaxa* 203:.. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.203.2.5>
- Oliveira, R. C., VALLS, J. F., GOMES, S. M., FAGG, C. W., & POZZOBON, M. T. (2015). A new species of *Paspalum*, Notata group (Poaceae, Paspaleae), from the Cerrado biome, Brazil: description, chromosome number, and leaf blade anatomy. *Phytotaxa*, 203(2), 159-168.
- Paiva JGA De, Fank-de-Carvalho SM, Magalhães MP, Graciano-Ribeiro D (2006) Verniz vitral incolor 500®: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. *Acta Bot Brasílica* 20:257–264. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062006000200002>
- Pascholati SF, Dalio RJD (2011) Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. *Man Fitopatol* 1:593–636
- Passos CD, Passos EEM (2003) Aspectos morfológicos do caule e da folha do coqueiro anão (*Cocos nucifera* L.). EMBRAPA Tabuleiros Costeiros Comun Técnico 1–4
- Passos MAB, Mendonça MS (2006) Epiderme dos segmentos foliares de *Mauritia flexuosa* L. f. (Arecaceae) em três fases de desenvolvimento. *Acta Amaz* 36:431–436. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672006000400005>
- Peel MC, Finlayson BL, McMahon TA. (2007) Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. *Hydrology and Earth System Sciences* 11: 1633–1644.
- Pinedo AS (2015) Anatomia foliar de *Allagoptera Nees* (Arecaceae) como subsídio à taxonomia. Dissertação. Universidade de Brasília – UNB, p. 91
- Pinedo AS, Martins RC, de Oliveira RC, Gomes SM (2016) Leaf anatomy in *Allagoptera* (Arecaceae). *Bot J Linn Soc* 182:361–375. <https://doi.org/10.1111/boj.12439>
- Ranasinghe CS, Weerakoon LK, Liyanage YMH, Mathes DT (1999) Physiological aspects of *in vitro*-grown coconut (*Cocos nucifera*) plants during acclimatization. *Coconut Res. Inst.* 15:46–67
- Reis, P. A., da Silva, A. L. H., da Silva, A. S., Valls, J. F. M., Gomes, S. M., & de Oliveira, R. C. (2015). *Paspalum minutispiculatum* (Poaceae, Panicoideae): A new annual species from Central Brazil. *Systematic botany*, 40(3), 746-754.
- Riederer M, Schreiber L (2001) Protecting against water loss: Analysis of the barrier properties of plant cuticles. *J Exp Bot* 52:2023–2032.

<https://doi.org/10.1093/jexbot/52.363.2023>

- Rosell, J. A., Olson, M. E., & Anfodillo, T. (2017). Scaling of xylem vessel diameter with plant size: causes, predictions, and outstanding questions. *Current Forestry Reports*, 3(1), 46-59.
- Rueden CT, Schindelin J, Hiner MC, *et al.* (2017) ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics* 18:529. <https://doi.org/10.1186/s12859-017-1934-z>
- Sant'Anna-Santos BF, dos Santos SA, Nunes ELP, *et al.* (2018) Does leaf anatomy aid in species identification of *Butia* (Arecaceae)? *AoB Plants* 10:1–15. <https://doi.org/10.1093/aobpla/ply046>
- Santanna-Santos BF, Carvalho Júnior WGO, Amaral VB (2015) *Butia capitata* (Mart.) Becc. lamina anatomy as a tool for taxonomic distinction from *B. odorata* (Barb. Rodr.) Noblick comb. nov (Arecaceae). *An Acad Bras Cienc* 87:71–81. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201520130457>
- Santos GA, Batugal PA, Othman A, *et al.* (1996) Manual on standardized research techniques in coconut breeding. International Plant Genetic Resources Institute
- Silva ALH da (2011) Anatomia do colmo e lâmina foliar de espécies de *Paspalum* L. (Poaceae: Panicoideae: Paniceae): novos caractercarâteres taxonômicos e proposta de uma fórmula vascular para representação dos feixes vasculares da lâmina foliar. Dissertação. Universidade de Brasília. p. 86
- Silva RJF (2006) Anatomia foliar comparada em espécies de *Oenocarpus* Mart. (Arecaceae) de Belém, Pará, Brasil: uma contribuição taxonômica. Universidade Rural da Amazônia
- Silva RJF, Potiguara RC de V (2008) Aplicações taxonômicas da anatomia foliar de espécies amazônicas de *Oenocarpus* Mart. (Arecaceae). *Acta Bot Brasílica* 22:999–1014. <https://doi.org/10.1590/s0102-33062008000400011>
- Siqueira LA, Aragão WM, Tupinambá EA (2002) Introdução do coqueiro no Brasil. Importância histórica e agrônômica. EMBRAPA Tabuleiros Costeiros Doc 47:24
- Solangi AH (2001) Characterization of 20 coconut (*Cocos nucifera* L.) varieties based on leaf Morpho-Physiological markers. Phillipines Universit Los Banos
- Solangi AH, Anwar Arain M, Zafar Iqbal M (2010) Stomatal studies of coconut (*Cocos nucifera* L.) varieties at coastal area of Pakistan. *Pakistan J Bot* 42:3015–3021
- Thiers B (2019) Index Herbariorum: A global directory of public herbaria and associated

staff. New York Bot Gard Virtual Herb

Tomlinson PB (1961) Anatomy of the monocotyledons. II. Palmae. Anat monocotyledons  
II Palmae

Tomlinson PB, Horn JW, Fisher JB (2011) The anatomy of palms: Arecaceae-Palmae.  
Oxford University Press New York, New York

Turpe AM (1966) Histotaxonomía de las especies argentinas del género *Paspalum*. Lilloa  
Rev Botânica

Vianna SA, Carmelo-Guerreiro SM, Noblick LR, Colombo CA (2017) Leaf anatomy of  
*Acrocomia* (Arecaceae): an additional contribution to the taxonomic resolution of a  
genus with great economic potential. Plant Syst Evol 303:233–248.  
<https://doi.org/10.1007/s00606-016-1369-4>

Vitória NS, Bezerra JL, Gramacho KP, Luz EDMN (2008) *Camarotella torrendiella*  
comb. nov. e *C. acrocomiae*: Agentes etiológicos das lixas do coqueiro. Trop Plant  
Pathol 33:295–301. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762008000400006>

Werllen-Santos, M., Gomes, S. M., Zappi, D. C., & de Oliveira, R. C. (2021).  
Circumscription of three annual species of *Paspalum* Plicatula Group (Poaceae:  
Paspaleae) in the light of morphological and chromosomic data. Phytotaxa, 491(4),  
257-270.

Yong JWH, Ge L, Ng YF, Tan SN (2009) The chemical composition and biological  
properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. Molecules 14:5144–5164.  
<https://doi.org/10.3390/molecules14125144>

## CAPÍTULO II

OTIMIZAÇÃO DE ETAPAS DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA A PARTIR  
DE PLÚMULAS DE COQUEIRO (*Cocos nucifera* L.), var. Anão Verde do Brasil de  
Jiqui (AVeJ)

## RESUMO

*Cocos nucifera* L. é uma palmeira com várias aplicações na indústria e larga produção em diferentes países localizados nas regiões mais quentes do planeta. O plantio em grande parte ocorre por mudas originadas de cruzamento entre variedades com caracteres desejáveis. Assim como outras palmeiras, *C. nucifera* possui apenas o crescimento primário de seu meristema apical, não formando perfilhos. Essa característica impede sua multiplicação através de técnicas de propagação vegetativa convencionais. Nesse contexto, a embriogênese somática é uma ferramenta que pode permitir a multiplicação em grande escala de plantas. Com esse objetivo, este trabalho procurou estabelecer estratégias para o desenvolvimento de um protocolo para a clonagem de coqueiro da variedade Anão Verde do Brasil de Jiqui (AVeJ). Para a embriogênese somática foram utilizados como explante plúmulas de embriões zigóticos cedidos pela Embrapa Tabuleiros Costeiros, excisadas de embriões retirados de frutos maduros. Durante a etapa de indução de calos foram avaliados diversos fatores em pelo menos três experimentos: *i*) o efeito das auxinas 2,4-D e Picloram em concentrações de 600µM na formação de calos semifriáveis, onde o regulador de crescimento 2,4-D apresentou resultado superior para a formação de calos semifriáveis; *ii*) Avaliação da capacidade de formação de calos em razão do período de armazenamento das plúmulas excisadas durante 1, 2, 3, 15, 25 e 35 dias, onde não houve diferenças estatísticas quanto a formação e oxidação entre os períodos; *iii*) O efeito de diferentes concentrações de regulador 2,4-D em meio de cultura com e sem carvão ativado na formação de calos semifriáveis, onde embora tenha havido a formação de calos em todas as concentrações testadas, plúmulas inoculadas em meio contendo carvão ativado nas concentrações de 450 e 600µM obtiveram melhores respostas ao final do período de cultivo. Na etapa de multiplicação, estruturas embriogênicas dos calos obtidos foram transferidos para frascos contendo meio líquido sob agitação. Em pelo menos dois experimentos foram analisados o efeito da coloração inicial dos calos (amarelo e branco), e o tamanho do explante inoculado sobre a multiplicação (filetado e fragmentado). Verificou-se que apenas o tamanho do explante apresentou diferenças significativas, com maior formação de novas estruturas para os fragmentos filetados. A influência do meio de cultivo para essa etapa foi testada utilizando-se MS e Y3 em diferentes tempos de cultivo 30-120 dias. Os resultados mostram que não houve diferença entre os meios de cultivo utilizados, sendo 30 dias de cultivo o período mínimo necessário para manutenção dos calos nessa etapa.

Foram obtidos embriões somáticos durante a etapa de diferenciação na sua grande maioria fusionados. Observou-se apenas mudanças na morfologia dos calos inoculados em meio Y3 acrescido de 5  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 300  $\mu\text{M}$  de BAP e  $\frac{1}{2}$  MS sem adição de reguladores. A formação de raízes e parte aérea foi observada em calos provenientes da indução em meio de cultura contendo Picloram e inoculados em frascos tipo RITA®, porém as plantas geradas apresentavam aspecto anômalo. O tamanho do fragmento para essa etapa apresentou relação com o aumento da massa do calo para o conjunto formado com maior quantidade de estruturas esféricas, denominadas de *cluster*.

**Palavras-chave:** *Areaceae*, *Cocos nucifera*, coqueiro, embriogênese somática, plúmula, RITA®

## 1. INTRODUÇÃO

*Cocos nucifera* L. conhecido como árvore da vida, é uma palmeira cultivada em vários países do mundo (FAOSTAT 2019). A espécie é importante para a indústria (Kalil-Filho e Resende 2001; Debmandal e Mandal 2011; Asghar *et al.* 2019; Machado *et al.* 2020) e para populações menos favorecidas, contribuindo no aspecto econômico e ambiental em áreas de ecossistemas degradados (Martins e Junior 2014). Boa parte dos produtos explorados a partir dessa palmeira tem origem no fruto. O endosperma líquido retirado do fruto, ainda verde, é utilizado como bebida e quando maduro é utilizado para produção de óleo, leite ou ralado (Martins e Junior 2014), para a extração de fármacos (Lima *et al.* 2015) e biomoléculas (Yong *et al.* 2009). Adicionalmente, salienta-se a extração potencial de um novo tipo de nanofibras de celulose a partir do seu pedúnculo (Nagarajan *et al.*, 2019) e o uso potencial da seiva oriunda de suas inflorescências para produção de açúcar com propriedades nutricionais e antioxidantes (Asghar *et al.* 2019).

*Cocos nucifera* se reproduz apenas pela germinação de suas sementes (Blake 1990; Foale 2005), já que seu caule não forma touceiras e desenvolve apenas um meristema apical (Lorenzi 2004). Em *C. nucifera*, o fruto e semente são confundidos (Harries 2012). Os frutos possuem sementes grandes que apresentam comportamento recalcitrante e sem período de dormência (Batugal *et al.* 2005). Apesar de ser uma espécie conhecida há tempos pelo homem e cultivado em mais de 90 países (Perera *et al.*, 2009), o seu principal método de multiplicação é a produção de mudas via sementes em viveiros comerciais (Harries 2012), com uma taxa de germinação que difere entre as variedades (Muhammedali e Thomas 2014; Shareefa *et al.* 2014).

Em condições naturais, as palmeiras têm germinação lenta e desuniforme, característica observada em sementes de *C. nucifera* (Meerow e Broschat 2012). Embora a propagação sexuada seja a principal via para multiplicação dessa espécie (Lédo *et al.* 2019), o rendimento dessa rota é insuficiente para atender a demanda crescente por mudas (Solís-Ramos *et al.* 2012), em função da senescência e ocorrência de pragas, como o amarelecimento letal (Harrison e Oropeza 2008), além deste tipo de propagação gerar, na maioria das vezes, plantas em campo de baixa qualidade, em razão do uso de sementes não selecionadas para a produção das mudas e da segregação genética originada deste tipo de matéria, fatores que têm afetado a produção e longevidade dos coqueiros (Koffi *et al.* 2016; Vijay Selvaraj *et al.* 2017; Lédo *et al.* 2019).



Em *C. nucifera* não existem métodos de propagação vegetativa convencional, dada a ausência de crescimento de ramos laterais, característica típica da família *Arecaceae*. Diante disso, as técnicas de cultivo *in vitro* surgem como uma alternativa para propagação de genótipos de *C. nucifera* de alto rendimento e resistentes à doenças (Rajesh *et al.* 2016). Assim, uma vez dominada a técnica, plantas elite de *C. nucifera*, provenientes de programas de melhoramento genético, podem ser clonadas em larga escala a partir de protocolos específicos por embriogênese somática. Tal rota de propagação *in vitro* é caracterizada pelo desenvolvimento de estruturas similares a embriões zigóticos, conhecidas como embriões somáticos, a partir de tecidos que não são originários do processo de fertilização (Williams e Maheswaran 1986; Von Arnold *et al.* 2002; Wang *et al.* 2020). Os embriões somáticos quando formados, germinam e formam plantas geneticamente idênticas às plantas fornecedoras dos explantes iniciais (Silva e Scherwinski-Pereira 2018).

A embriogênese somática é considerada como a principal via de regeneração *in vitro* de *C. nucifera* (Bandupriya *et al.* 2016), com protocolos já desenvolvidos para essa espécie (Chan *et al.* 1998; Hornung e Verdeil 1999; Morales 2003; Pérez-Núñez *et al.* 2006; Bett *et al.* 2019). No entanto, apesar de vários trabalhos relatarem a regeneração de plantas de *C. nucifera in vitro*, ainda há a necessidade de ajustes dos protocolos estabelecidos para o domínio das etapas do processo (Pérez-Núñez *et al.* 2006; Rajesh *et al.* 2016). Além disso, é imperativo que se determine metodologias e condições ideais para a seleção e manutenção de linhagens embriogênicas em ciclos repetitivos de multiplicação, visando o aumento da eficiência do processo, uma vez que é a partir delas que quantidades apreciáveis de propágulos podem ser obtidos e regenerados.

De fato, a etapa de multiplicação parece ser uma das mais importantes em um processo que visa a clonagem em larga escala. Ela ocorre após a fase de indução de calos e se caracteriza pela necessidade de se fazer subcultivos sucessivos dos materiais responsivos (Ree e Guerra 2015; Campos *et al.* 2020). O uso de meios de consistência líquida e o desenvolvimento de cultivos em suspensão podem ser de grande valia neste caso, uma vez que eles permitem maior controle e melhor homogeneidade dos materiais em cultivo, além de possibilitarem que somente as melhores linhagens embriogênicas sejam mantidas em cultivo (Tarnizi *et al.* 2008; Gomes *et al.* 2016; Monteiro *et al.* 2018). A concentração salina utilizada no preparo do meio líquido durante as etapas de inoculação, geralmente são semelhantes àsquelas utilizadas para a cultura de calos em meio semissólido (Bhatia 2015). Adicionalmente, a agitação em um meio de cultura

líquido garante a entrega uniforme dos nutrientes e reguladores de crescimento, sem formar gradientes ao redor dos tecidos dos explantes, apresentando melhor tolerância a toxinas liberadas no meio, além de melhorar as taxas de produção de estruturas embriogênicas, comparando com o meio de cultura semissólido (Kong *et al.*, 2014; Monteiro *et al.*, 2018), e manter uma distribuição celular uniforme em condições ideais para as trocas gasosas.

Sistemas de imersão temporários (TIS), caracterizados por permitir o cultivo semi automatizado ou totalmente automatizado de etapas do processo embriogênico, também podem ser importantes ferramentas para serem incorporados em protocolos de clonagem do coqueiro. Eles se baseiam na capacidade de permitirem ciclos alternados de imersão temporária do tecido vegetal em meio líquido, seguido de drenagem e exposição do tecido vegetal a um ambiente gasoso e de alta umidade (Ziv 2005). Normalmente, o período de imersão é mais curto (alguns minutos) do que o processo de imersão permanente, enquanto o período de exposição alta umidade do ar é prolongado (várias horas) (Georgiev *et al.* 2014). Esses intervalos melhoram a nutrição e oxigenação dos tecidos, devido a renovação adequada do ar e, conseqüentemente, melhor taxa de crescimento e desempenho morfogênico (Etienne e Berthouly 2002; Teixeira e Cid 2010). Assim, os TIS são uma técnica atrativa para o aprimoramento dos protocolos existentes, como também uma plataforma ecológica para a produção em grande escala de biomoléculas importantes (Georgiev *et al.* 2014). Dentre os exemplos de TIS podem ser citados o RITA® (Alvard *et al.* 1993; Teisson e Alvard 1995), usado com sucesso na embriogênese somática de algumas espécies, como *Coffea arabica* (Etienne-Barry *et al.* 1999) e *Elaeis guineensis* (Marbun *et al.* 2015; Gomes *et al.* 2016). Portanto, o aprofundamento das pesquisas nessa área poderá proporcionar, além da redução dos custos, facilidades e aumentos significativos na produção de mudas.

É nesse contexto que este trabalho se insere, com o objetivo de aprimorar protocolo para as etapas iniciais para a multiplicação *in vitro* por embriogênese somática de *C. nucifera*, var. Anão Verde do Brasil de Jiqui (AVeJ), uma variedade anã brasileira de interesse econômico para a produção de água-de-coco e que tem se mostrado tolerante ao amarelecimento letal em áreas dizimadas pelo patógeno.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

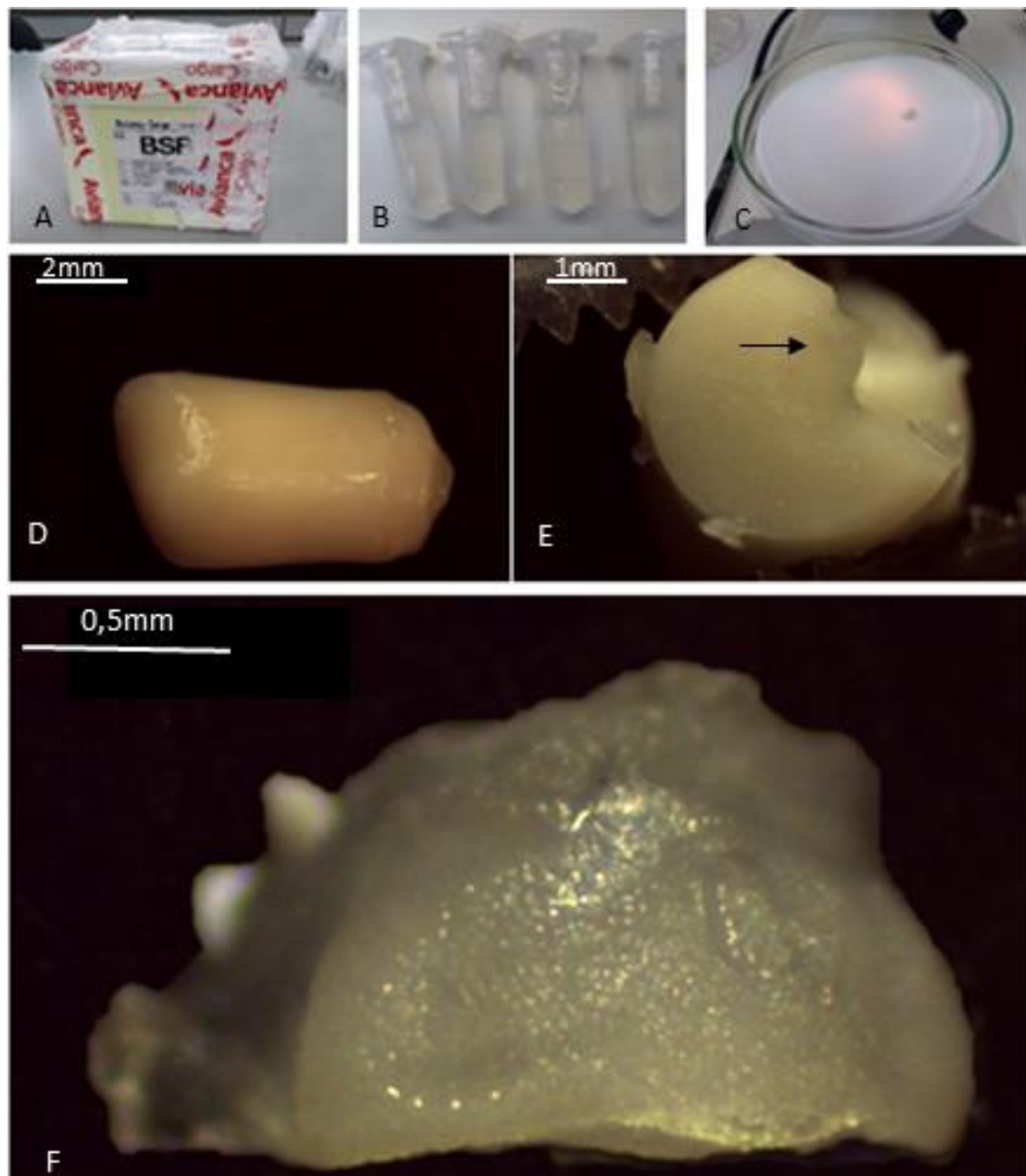
### **a. Material Vegetal**

A indução de calos visando à embriogênese somática foi conduzida a partir de plúmulas extraídas de embriões zigóticos de *C. nucifera*, var. Anão Verde do Brasil de Jiqui (AVeJ), oriundos de frutos maduros coletados na Fazenda Experimental da Embrapa Tabuleiros Costeiros, localizada no município de Itaporanga D'Ajuda, Sergipe, Brasil. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais II (LCT2) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Brasília, Distrito Federal, Brasil. A extração dos embriões foi realizada seguindo os critérios descritos por Cueto *et al.* (2012). Neste trabalho, todos os meios de cultura utilizados foram esterilizados por autoclavagem à 120° C e 1,5 atm de pressão, durante 20 minutos, e o pH ajustado para  $5,8 \pm 0,1$ .

Após a extração, os embriões foram acomodados em saco plástico dentro de caixas de isopor para transporte aéreo (Figura 1A), dentro de *ependorfs* contendo meio de cultura de MS (Murashige e Skoog 1962) sem reguladores de crescimento e sem sacarose (Figura 1B). No LCT2, os embriões zigóticos foram retirados dos *ependorfs*, no interior de uma capela de fluxo laminar (Figura 1C e D), com auxílio de estereomicroscópio. Para a excisão das plúmulas, foram utilizadas pinças, papel filtro e bisturis previamente esterilizados em autoclave em 1,5 atm de pressão, à 120° C durante 20 minutos. Após a excisão, as plúmulas (Figura 1E e F) foram inoculadas imediatamente em meio de cultura.

### **b. Indução de Calos**

Para a indução de calos, as plúmulas foram inoculadas em meio de cultura Y3 (Eeuwens 1976) suplementado com diferentes reguladores de crescimento e/ou concentrações de reguladores e gelificados com 2,5 g/L de Phytigel (Sigma, St Louis, MO), conforme tópicos subsequentes. Todos os meios foram previamente esterilizados em autoclave a 1,5 atm de pressão, à 120° C, durante 20 minutos. O pH foi ajustado para  $5,8 \pm 0,1$  antes da adição do agente gelificante. Os explantes foram cultivados em placas de Petri (15 x 90 mm), com aproximadamente 25 mL de meio de cultura por placa, seladas com policloreto de polivinila (PVC) transparente e armazenadas em sala de crescimento escura, à  $25^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ .



**Figura 1:** Aspectos gerais desde o transporte à excisão do embrião zigótico de *Cocos nucifera*, var. Anão Verde do Brasil de Jiqui (AVeJ) para retirada da plúmula. A: chegada dos embriões no laboratório de cultura de tecidos. B: tubos contendo o embrião em meio MS. C e D: embrião preparado para a excisão. E: seta indicando posição da plúmula no embrião. F: plúmula excisada.

*i. Influência de diferentes auxinas na indução de calos a partir de plúmulas*

Para a indução de calos, em seguida à extração, as plúmulas foram inoculadas em meio de cultura Y3 (Eeuwens 1976). A fonte de Fe-EDTA e vitaminas foi mantida de acordo com a concentração original do meio de MS (Murashige e Skoog 1962). Adicionalmente, os meios foram suplementados com 30 g/L de sacarose, 2,5 g/L de carvão ativado e 600  $\mu$ M das auxinas ácido 4-amino-3, 5, 6-tricloropicolínico (Picloram)

ou ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). A concentração dos reguladores utilizada está de acordo com o protocolo de Pérez-Núñez *et al.*(2006). Os componentes dos meios de cultura utilizados na etapa de indução da embriogênese somática em *C nucifera* podem ser visualizados na Tabela 1.

As plúmulas permaneceram por 120 dias nos meios supracitados, com subcultivos realizados mensalmente. As avaliações com relação aos percentuais de explantes oxidados, de explantes com formação de calo primário e do tipo de calo obtido (compacto globular ou semifriável) foram realizadas aos 120 dias de cultivo. Os explantes avaliados como oxidados foram aqueles que apresentaram todo o tecido escurecido. A porcentagem de explantes oxidados foi obtida através da razão entre a quantidade de explantes oxidados e o número total de explantes por placa, multiplicada por 100. A porcentagem de explantes com calo foi obtida por contagem e calculada da mesma forma supracitada. Adicionalmente, avaliou-se o comprimento dos calos obtidos, considerando-se as extremidades mais distantes, como uma maneira indireta de avaliar o incremento em massa. Para tal, classificou-se da seguinte forma: classe 1 (calos com até 0,5 cm), classe 2 (calos entre 0,6 cm e 1,0 cm), classe 3 (calos com 1,1 a 1,5 cm) e classe 4 (calos com mais de 1,5 cm).

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, considerando dois tratamentos (auxinas Picloram e 2,4-D) e compostos por 10 repetições. Cada repetição foi formada com cinco plúmulas. O conjunto de dados obtido foi submetido à análise de variância (ANOVA) e, quando significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância, por meio do software estatístico R. O experimento foi repetido duas vezes.

*ii. Influência do tempo de armazenamento do embrião zigótico, fonte de plúmulas, na indução de calos*

Para verificar a influência do tempo de armazenamento de embriões zigóticos, fontes das plúmulas utilizadas como explante inicial, na indução de calos, embriões zigóticos foram armazenados em geladeira à 4° C por períodos de 1, 2, 3, 15, 25 e 35 dias e depois excisados, para extração das plúmulas. Imediatamente após a extração, as plúmulas foram inoculadas em meio de indução Y3, conforme o tópico 2.b.i. A auxina indutora utilizada foi o 2,4-D, por ter proporcionado resultados superiores durante a execução do experimento descrito no tópico anterior.

As plúmulas permaneceram por 120 dias no meio de indução, com subcultivos realizados aproximadamente a cada 30 dias. As avaliações com relação aos percentuais de formação de calo viáveis (compactos globulares ou semifriáveis) e de calos oxidados foram realizadas aos 90 dias de cultivo. Avaliou-se também o comprimento dos calos obtidos como forma de indicar o ganho em massa, os quais foram classificados em classes, de acordo com o experimento anterior.

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, considerando seis tratamentos referentes aos tempos de armazenamento dos embriões zigóticos (1, 2, 3, 15, 25 e 35 dias), em por quatro repetições por tratamento. Cada repetição foi formada por cinco plúmulas. O conjunto de dados obtido foi submetido à análise de variância (ANOVA) e, quando significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de significância, por meio do software estatístico R.

### *iii. Influência de diferentes concentrações de 2,4-D na indução de calos*

Neste experimento, avaliou-se a influência na indução de calos a partir de plúmulas inoculadas em meio de cultivo com diferentes concentrações de 2,4-D (regulador de crescimento que proporcionou melhores resultados, conforme item 2.b.i, a saber: 450 µM ou 600 µM em meio Y3 suplementado com 2,5 g/L de carvão ativado e 13,56 µM ou 20,12 µM em meio Y3 desprovido de carvão ativado. Todos os meios foram suplementados com 30 g/L de sacarose.

As plúmulas permaneceram por 120 dias no meio de indução, com subcultivos realizados mensalmente. As avaliações com relação aos percentuais de explantes oxidados e de explantes com formação de calo foram realizadas aos 90 dias de cultivo. Os comprimentos dos calos obtidos também foram mensurados e classificados conforme tópicos anteriores.

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

**Tabela 1.** Composição dos diferentes meios de cultura e períodos de cultivo (semanas) usados na etapa de indução do processo de embriogênese somática de *Cocos nucifera* a partir de plúmulas

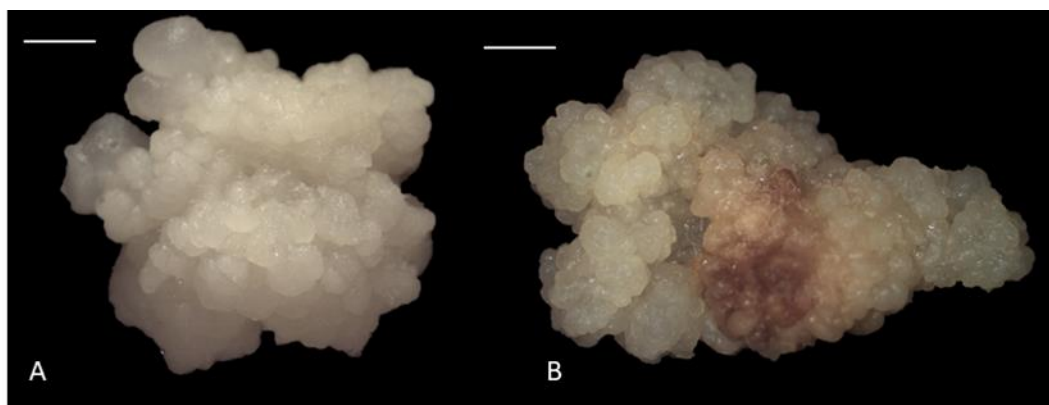
Componentes	Indução de calos (12 semanas)
Meio de cultura	MS e Y3
Vitaminas e FeEDTA	MS
2,4-D ( $\mu\text{M}$ )	13,56, 20,12, 450 e 600
Picloram ( $\mu\text{M}$ )	600
Sacarose (g/L)	30
Phytigel (g/L)	2,5
Carvão ativado (g/L)	2,5

### c. Multiplicação de Calos

Visando à multiplicação de linhagens de calos com potencial embriogênico oriundos das fases de indução anterior, calos foram inoculados em meios de cultivo suplementados com 2,4-D, com ou sem 2,5 g/L de Phytigel® (Sigma). Tais calos foram caracterizados morfológicamente como estruturas esféricas com coloração branca ou amarela e textura semifriável (Figura 2). Diferentes experimentos foram conduzidos em função das características dos explantes utilizados nessa fase, como o número de estruturas esféricas e a cor do calo, conforme descrito nos tópicos a seguir. Adicionalmente, avaliou-se a influência na multiplicação de calos do cultivo prévio em diferentes meios de cultivo líquido (MS e Y3). Os componentes dos meios de cultura utilizados na etapa de multiplicação da embriogênese somática em *C. nucifera* podem ser visualizados na Tabela 2.

#### i. Influência do tamanho e da cor do calo na eficiência da multiplicação em meio sólido

Para realização desse experimento foram isolados diferentes tipos de fragmentos quanto ao tamanho e número de estruturas, a partir dos calos provenientes da fase de indução: a) fragmentos menores formados por 1 a 3 protuberâncias esféricas b) fragmentos maiores com 5 a 10 protuberâncias esféricas, ambos com coloração branca (Figura 2A) ou amarela (Figura 2B). Os agrupamentos foram isolados com auxílio de pinças. Aqueles com maior dificuldade de fragmentação foram seccionados mediante o uso de bisturi. Após a separação, os fragmentos foram transferidos para meio de cultura Y3 suplementado com 600  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, 30 g/L de sacarose, 2,5 g/L de Phytigel e 2,5 g/L de carvão ativado, onde permaneceram por 90 dias, com subcultivos mensais.



**Figura 2:** Calos embriogênicos oriundos da etapa de indução em meio de cultura sólido Y3 (Eeuwens 1976) com diferentes colorações. A: Calo com coloração branca; B: Calo com coloração bege amarelada. Escala: 2 mm.

Os explantes foram cultivados em placas de Petri (15 x 90 mm), com aproximadamente 25 mL de meio de cultura por placa, seladas com PVC transparente e armazenadas em sala de crescimento escura, à  $25^\circ \pm 2^\circ \text{C}$ . Após 90 dias de cultivo, foi avaliada a taxa de multiplicação. Cada placa recebeu 10 fragmentos sem protuberâncias esféricas aparentes que, após o período de cultivo, foram avaliados quanto ao número de estruturas globulares embriogênicas por fragmento formadas durante esse período.

Adotou-se o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial (2 x 2), referentes ao tamanho do fragmento (com 1 a 3 protuberâncias esféricas ou com 5 a 10 protuberâncias esféricas) e cor do fragmento (branca ou amarela), totalizando 4 tratamentos, com oito repetições cada. O conjunto de dados obtido foi submetido à análise de variância (ANOVA) e, quando significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de significância, por meio do software estatístico R.



ii. *Influência do cultivo em diferentes meios de cultivo líquido (MS e Y3) na multiplicação de calos*

Calos semifriáveis oriundos da fase de indução foram selecionados, fragmentados em porções de aproximadamente 0,5 cm<sup>2</sup> e transferidos para frascos tipo Erlenmeyer contendo meio de cultura líquida. Para esse experimento, foram utilizados dois meios de cultura diferentes: MS (Murashige e Skoog 1962) e Y3 (Eeuwens 1976). Ambos os meios foram suplementados com 30 g/L de sacarose, 500 mg/L de glutamina, 100 mg/L de aspargina, 100 mg/L de caseína e 1 mg/L de 2,4-D. Foram preparados 15 frascos para cada meio de cultivo e, a cada 30 dias, calos com potencial embriogênico foram retirados de cada tratamento (30, 60, 90 e 120 dias). Em seguida, os calos foram inoculados em meio de cultivo semissólido Y3 suplementado com os mesmos componentes supracitados, além de 600 µM de 2,4-D e 2,5 g/L de Phytigel. Uma amostra de calos semifriáveis, que não passou por tratamento em meio líquido, foi inoculada diretamente em meio semissólido Y3 a fim de comparar a formação de estruturas embriogênicas.

**Tabela 2.** Composição dos diferentes meios de cultura e períodos de cultivo (semanas) usados na etapa de multiplicação dos processos de embriogênese somática de *Cocos nucifera* a partir de plúmulas

Componentes	Multiplicação de embriões somáticos (12 semanas)
Meio de cultura	MS e Y3
Vitaminas	MS
2,4-D (µM/L)	600 e 300
L-glutamina (mg/L)	500
Aspargina (mg/L)	100
Caseína (mg/L)	100
Sacarose (g/L)	30
Phytigel (g/L)	2,5
Carvão ativado (g/L)	2,5

Durante o pré-tratamento em meio líquido, os explantes foram mantidos em sala de crescimento com luminosidade indireta de  $100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 horas, à  $25^\circ \pm 2^\circ \text{C}$  e sob agitação de 120 rpm. Após transferência para o meio semissólido, os explantes foram mantidos no escuro.

Após 120 dias de cultivo em meio semissólido, avaliaram as taxas de oxidação e multiplicação das estruturas globulares embriogênicas. Adotou-se delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial (2 x 4), considerando duas formulações salinas (MS e Y3) e quatro tempos de cultivo em meio líquido (30, 60, 90 e 120 dias), o que totaliza 8 tratamentos, com 12 repetições cada. Cada fragmento oriundo do meio líquido foi considerado uma repetição. O conjunto de dados obtido foi submetido à análise de variância (ANOVA) e, quando significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de significância, por meio do software estatístico R.

#### **d. Diferenciação de Embriões Somáticos**

##### *i. Influência de diferentes meios de cultivo na diferenciação de embriões somáticos*

Para a execução desse experimento foram selecionados calos com potencial embriogênico provenientes da etapa de multiplicação em meio de MS, conforme descrito no tópico 2.c.ii. Os calos foram selecionados com tamanho de 3-5mm de comprimento, os quais foram inoculados em dois diferentes meios de cultura: T1- Y3 acrescido de  $5 \mu\text{M}$  de 2,4-D,  $300 \mu\text{M}$  de 6-Benzilaminopurina (BAP), 2,5g/L de Phytigel e 2,5g/L de carvão ativado, e; T2- MS com metade da concentração de sais acrescido com 1,5 g/L de carvão ativado e 2,5g/L de Phytigel.

Os calos foram inoculados em frascos tipo Magenta® com 30 ml de meio de cultura, onde permaneceram em sala de crescimento com luminosidade de  $100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 horas, à  $25^\circ \pm 2^\circ \text{C}$ .

Após 90 dias de cultivo foram avaliados o tamanho dos calos, a taxa de oxidação e de explantes com pigmentação esverdeada. O tamanho dos calos foi avaliado observando o aumento de volume durante o período de cultivo. Adotou-se delineamento inteiramente casualizado, com 10 repetições por tratamento e com quatro explantes cada. O conjunto de dados obtido foi submetido à análise de variância (ANOVA) e, quando significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de significância,

por meio do software estatístico R. Os componentes dos meios de cultura utilizados na etapa de diferenciação da embriogênese somática em *C. nucifera* podem ser visualizados na Tabela 3.

*ii. Efeito do recipiente de cultivo na diferenciação de embriões somáticos*

O experimento avaliou a influência de diferentes recipientes na diferenciação de embriões somáticos de *C. nucifera*. Para tanto, calos compactos com coloração branca foram separados, provenientes da indução em meio de cultura Y3 suplementando com 600  $\mu\text{M}$  de Picloram (tópico 2.3.1). Os calos selecionados foram transferidos para meio de cultura Y3 acrescido de 5  $\mu\text{M}$  de Picloram, 300  $\mu\text{M}$  de BAP, 2,5 g/L de Phytigel e 1,5 g/L de carvão ativado, onde permaneceram em sala de crescimento expostos à luz de 100  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 horas, durante 30 dias. Após esse período, eles foram inoculados em dois recipientes diferentes: (T1) biorreator de imersão temporário RITA® com 200 ml de meio de cultura líquido, e (T2) em tubos de ensaio com 20 ml de meio de cultura gelificado com 2,5 g/L de Phytigel. Em ambos os recipientes testados utilizou-se o meio de cultura de MS com metade da concentração de sais, acrescido de 20 g/L de sacarose e 1,5 g/L de carvão ativado.

Os explantes permaneceram por 90 dias em sala de crescimento com luminosidade de 100  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 horas, à  $25^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Após 90 dias de cultivo, avaliou-se o percentual de formação de raízes, de parte aérea e de plantas completas. Adotou-se delineamento inteiramente casualizado, com 10 repetições com 1 explante cada, para o tratamento tubo de ensaio e 10 repetições com 5 explantes cada, para o tratamento biorreator RITA®. O conjunto de dados obtido foi submetido à análise de variância (ANOVA) e, quando significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de significância, por meio do software estatístico R.

*iii. Influência do tamanho do calo na diferenciação de embriões somáticos*

Para realização desse experimento foram isolados dois tipos de fragmentos a partir dos calos provenientes da fase de multiplicação em meio de MS líquido (tópico 2.4): (T1)

fragmentos formados por até 5 protuberâncias esféricas ou (T2) fragmentos com 5 a 10 protuberâncias esféricas (*clusters*). Os agrupamentos foram isolados com auxílio de pinças. Aqueles com maior dificuldade de fragmentação foram seccionados mediante o uso de bisturi. Após a separação, os fragmentos foram transferidos para meio Y3 acrescido de 5  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, 300  $\mu\text{M}$  de BAP, 2,5 g/L de Phytigel e 2,5 g/L de carvão ativado. Os explantes permaneceram em sala de crescimento expostos à luz branca LED durante 60 dias.

**Tabela 3.** Composição dos diferentes meios de cultura e períodos de cultivo (semanas) usados na etapa de diferenciação dos processos de embriogênese somática de *Cocos nucifera* a partir de plúmulas

Componentes	Diferenciação (12 semanas)
Meio de cultura	1/2MS e Y3
Vitaminas	MS
2,4-D ( $\mu\text{M}$ )	5
Picloram ( $\mu\text{M}$ )	5
BAP( $\mu\text{M}$ )	300
Sacarose (g/L)	20 e 30
Phytigel (g/L)	2,5
Carvão ativado (g/L)	1,5 e 2,5

Adotou-se delineamento inteiramente casualizado, com 10 repetições por tratamento. Cada repetição do T1 foi composta por 10 fragmentos por placa e do tratamento T2 por 3 *clusters* por placa. No experimento foram avaliados a oxidação, formação de massa embriogênicas, formação de parte aérea, formação de raízes e a pigmentação. O conjunto de dados obtido foi submetido à análise de variância (ANOVA) e, quando significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de significância, por meio do software estatístico R.

#### e. Análise Histológica

Para as análises em microscopia de luz, as amostras de fragmentos de calos durante as etapas de indução em meio de cultura contendo reguladores de crescimento 2,4-D e Picloram e multiplicação em meio líquido, foram fixadas em solução Karnovsky modificada (Karnovsky 1965), composta por paraformaldeído 4%, glutaraldeído 2,5% e tampão cacodilato de sódio 0,05 M (pH 7,2), durante 24 h, sob vácuo durante a primeira hora. Em seguida, o material foi submetido a três lavagens em cacodilato de sódio a 0,05 M durante 1 h de vácuo. A desidratação ocorreu em gradiente etanólico 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 e 100 %, em período mínimo de 1 h em vácuo para cada concentração.

A infiltração ocorreu inicialmente com mistura de álcool 100% e historesina (Leica®, Heidelberg, Alemanha) na proporção de 1:1 durante 24 h, seguido de duas lavagens em resina pura durante 6 h sendo 1 h em vácuo. Parte da resina foi utilizada para dissolução de 1 g de pó endurecedor para 100 ml de resina (solução A), conforme especificações do fabricante. O material ficou mergulhado nessa solução por aproximadamente 3 h sob vácuo. A polimerização da resina ocorreu com a adição de 1 ml de endurecedor para cada 15 ml de solução A. Nessa etapa, o material foi acomodado em formas de silicone para a secagem em estufa a 60 °C até o endurecimento total, que ocorreu aproximadamente após 36 horas.

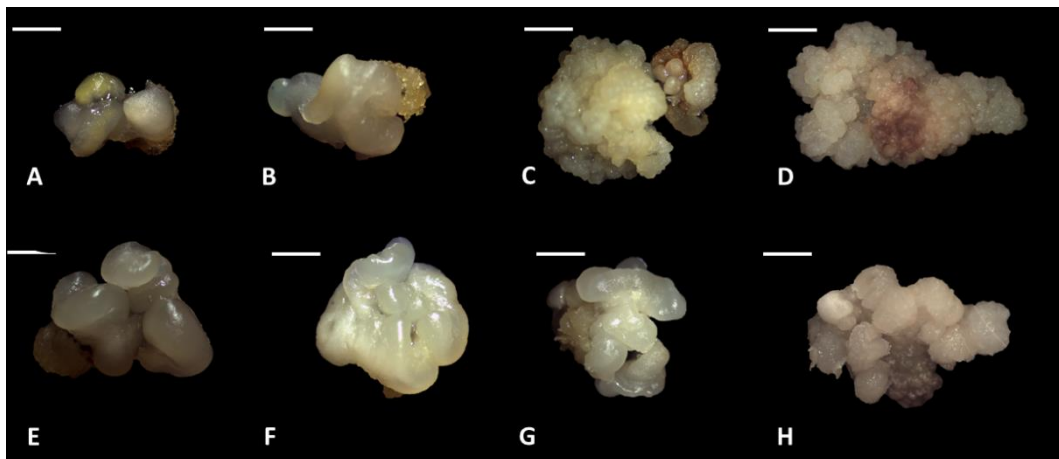
Os fragmentos de explantes incluídos em historesina foram cortados em secções de 5 µm de espessura em micrótomo rotativo de mesa (Leica®), as quais foram distendidas e aderidas às lâminas microscópicas em placa aquecida à 40 °C. Os cortes foram corados com Azul de Toluidina (O'Brien *et al.* 1964) e montados com Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha). A obtenção e análise de imagens foram realizadas via microscópio Leica DM 750 e programa Leica Application Suite EZ.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### a. Indução de Calos

##### i. Influência de diferentes auxinas na indução de calos a partir de plúmulas

Aos 30 dias de cultivo observaram-se as primeiras formações calogênicas (Figura 3A e E), que evoluíram posteriormente para estruturas translúcidas compactas entre 40 e 50 dias (Figura 3B e F). Aos 90 dias foi possível identificar diferenças no padrão morfológico dos calos oriundos de cada auxina testada (Figuras 3C e G). Calos mais proeminentes foram notados após 120 dias de cultivo (Figuras 3D e H), com dois padrões morfológicos distintos: calos compactos globulares com superfície lisa, brilhante e de coloração branca (Figura 3H) e calos com uma textura semifriável, caracterizados morfologicamente como estruturas esféricas diminutas com coloração branca ou amarela (Figura 3D).

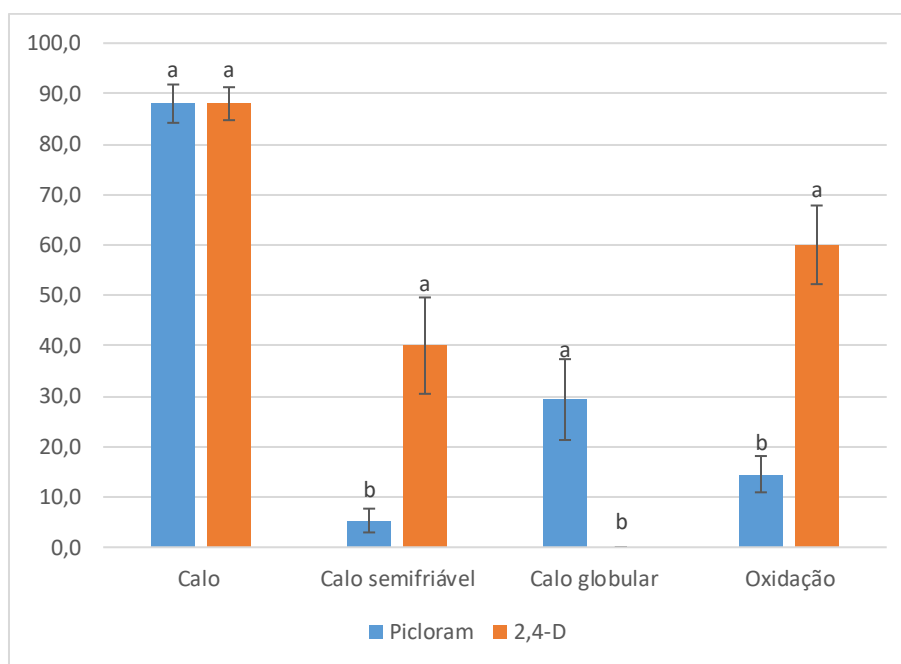


**Figura 3:** Diferentes respostas morfológicas de plúmulas de *Cocos nucifera* em meio de indução de calo suplementando com diferentes auxinas visando à embriogênese somática. (A-D) Calos em meio de indução suplementado com ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) aos 30, 60, 90 e 120 dias de cultivo, respectivamente; (E-H) Calos em meio de indução suplementado com ácido 4-amino-3, 5, 6-tricloropicolínico (Picloram) aos 30, 60, 90 e 120 dias de cultivo, respectivamente.

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 4), valor 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 (60%) comparativamente à auxina Picloram (14,5%) (Figura 4).

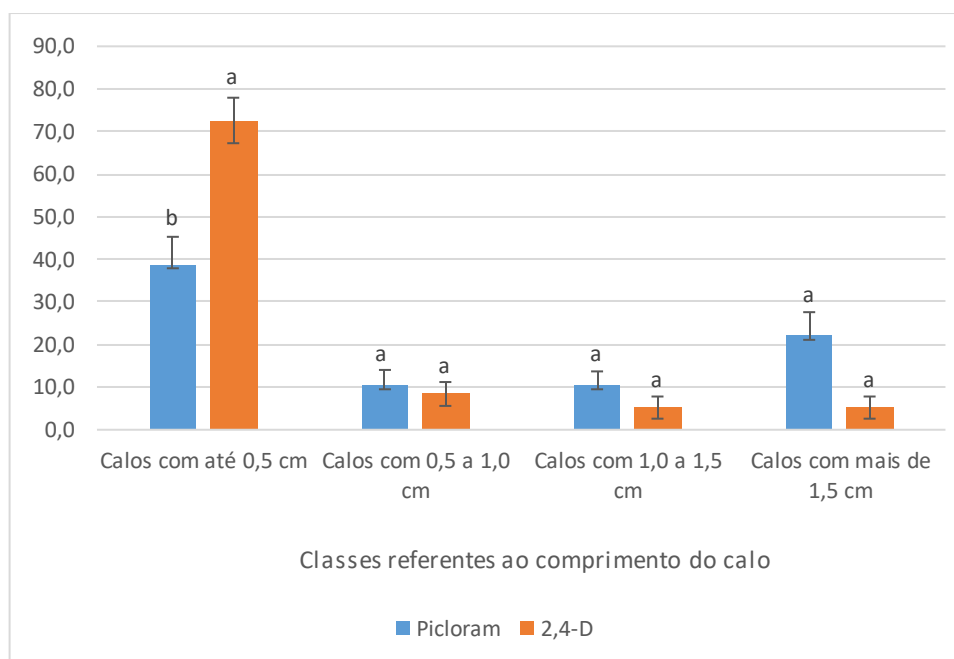
O uso de auxinas como indutoras da calogênese visando à embriogênese somática em palmeiras tem sido recorrente na literatura, inclusive em trabalhos com *Cocos nucifera* (Karunaratne e Periyapperuma 1990; Nguyen *et al.* 2015; Sandoval-Cancino *et al.* 2016), com destaque para o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Em paralelo, outras auxinas, como o ácido 4-amino-3, 5, 6-tricloropicolínico (Picloram) também tem sido usada como indutora da embriogênese somática em palmeiras, como *Bactris gasipaes* (Steinmacher *et al.* 2007b), *Euterpe oleracea* (Scherwinski-Pereira *et al.* 2012) e *Syagrus oleracea* (Osório *et al.* 2013). Picloram também foi utilizada para indução da androgênese na espécie, sem resultados positivos (Perera *et al.*, 2009). Já Bhavyashree *et al.* (2016) reportaram formação de calos embriogênicos de *C. nucifera* a partir de plúmulas cultivadas em meio suplementado com Picloram. Contudo, tais autores ressaltaram a formação posterior de estruturas compactas anormais a partir desses calos.



**Figura 4:** Efeito de diferentes auxinas (ácido 2,4-diclorofenoxiacético - 2,4-D e ácido 4-amino-3, 5, 6-tricloropicolínico - 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.

As plúmulas cultivadas em meio suplementado com 2,4-D apresentaram somente calos semifriáveis (Figuras 3D e 4), ao passo que plúmulas cultivadas em meio suplementado com Picloram apresentaram tanto calos semifriáveis como compactos globulares, com destaque em quantidade para esse último calo (Figuras 3H e 4).

Os calos compactos obtidos assemelham-se àqueles classificados como embriogênicos por Sáenz *et al.* (2006) que também trabalhou com plúmulas de *C. nucifera*. Calos caracterizados como friáveis foram previamente descritos na espécie por Branton e Blake (1983a), 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 desenvolvimento de determinadas estratégias, como o estabelecimento de suspensões celulares. 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, o que sugere uma evidente necessidade de se desenvolver estratégias e otimizar metodologias relacionadas à multiplicação de calos embriogênicos desta espécie.



**Figura 5:** Efeito de diferentes auxinas (ácido 2,4-diclorofenoxiacético - 2,4-D e ácido 4-amino-3, 5, 6-tricloropicolínico - Picloram) no comprimento de calos oriundos de plúmulas de *Cocos nucifera*. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de significância. Barras representam o erro padrão.



Nesse trabalho, embora as duas auxinas tenham proporcionado percentuais semelhantes de produção de calos (Figura 4), a auxina 2,4-D destacou-se na produção de calos caracterizados como semifriáveis (Figura 3C e D). Esses calos foram obtidos mesmo com elevada taxa de oxidação, embora isso pareça não ter sido um fator limitante à obtenção das massas calogênicas semifriáveis, diferentemente do relatado em *B. gasipaes* (Douglas A. Steinmacher *et al.* 2007).

Ambas auxinas proporcionaram percentuais similares de tamanho dos calos obtidos, os quais foram organizados dentro de classes, com exceção para a classe 1 (calos com até 0,5 cm), onde o Picloram se destacou. Em geral, os calos obtidos em ambas auxinas apresentavam predominantemente comprimento de até 0,5 cm de comprimento (Figura 5).

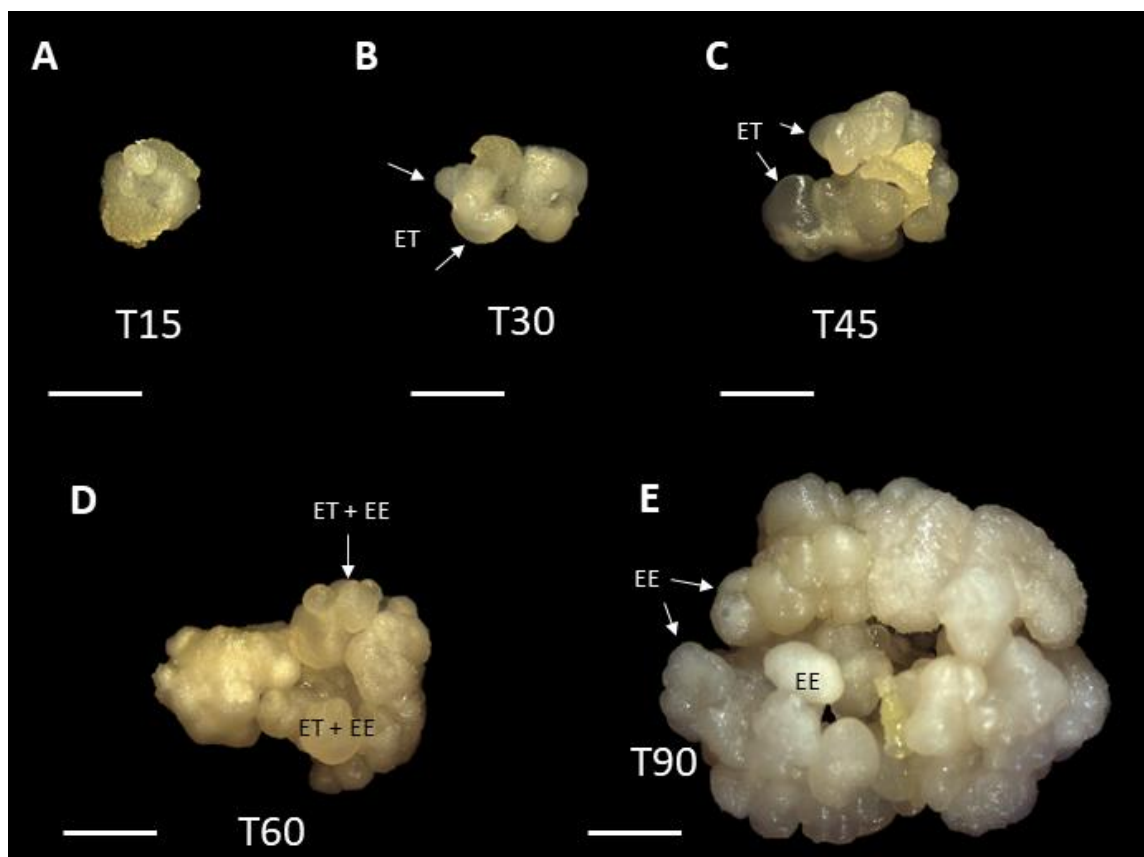
ii. *Influência do tempo de armazenamento do embrião zigótico, fonte de plúmulas, na indução de calos*

Os embriões zigóticos permaneceram com a coloração branca brilhante e com aspecto saudável quando retirados do *ependorfs* após o transporte. Durante a manipulação foi observado intumescimento de alguns embriões zigóticos, possivelmente devido a traumas durante o processo de excisão da semente. Por esse motivo, as plúmulas de embriões com essas características não foram utilizadas. Os embriões apresentavam, imediatamente antes da extração da plúmula, pigmentação amarronzada na porção proximal, assim como descrito nos trabalhos de Sugimura e Murakami (1990).

As respostas morfológicas observadas ao longo do cultivo foram, em geral, semelhantes às descritas no tópico anterior. As plúmulas inoculadas apresentavam a superfície lisa e coloração uniforme branca e translúcida. Aos 15 dias após a inoculação, calos foram observados na superfície da maioria das plúmulas, independentemente do tempo de armazenamento dos embriões zigóticos (Figura 6A). Neste momento, visualizam-se também incrementos de volume e ausência de sinais de oxidação (Figura 6).

Aos 30 dias de cultivo, observou-se a formação de estruturas com superfície lisa e brilhante (Figura 6B), similares às citadas por Pérez-Núñez *et al.* (2006). Aos 45 dias, houve formação de estruturas translúcidas com contornos definidos semelhantes às aquelas referidas como *like-ear* por Pérez-Núñez *et al.* (2006) e Sandoval-Cancino *et al.* (2016) (Figura 6C).

Aos 60 dias em meio de indução, verificou-se a formação de várias estruturas globulares embriogênicas (EE), algumas associadas em menor número a outras estruturas translúcidas (Figura 6D). Aos 90 dias após a inoculação das plúmulas, os calos apresentam maior volume, além de maior número de estruturas globulares embriogênicas, as quais exibiram coloração variando entre branco e amarelo (Figura 6E). Essas estruturas também têm sido consideradas como embriogênicas em vários outros trabalhos na espécie (Pérez-Núñez *et al.* 2006; Montero-Cortés *et al.* 2010; Bhavyashree *et al.* 2016; Sandoval-Cancino *et al.* 2016).



**Figura 6:** Alterações morfológicas ocorridas durante o desenvolvimento de calos embriogênicos induzidos a partir de plúmulas de *Cocos nucifera*. Inicialmente aos 15 dias a plúmula excisada em contato com o meio de indução começa a responder ao estímulo do regulador entumecendo. Aos 30 dias é possível observar estruturas translúcidas (ET) sendo formadas. Tempo de cultura T15-T90 de 15 a 90 dias. Abreviações: (ET) estruturas translúcidas e (EE) estruturas embrionárias. Escalas: T15-T90: 2 mm.

Para as variáveis taxa de formação de calos, viabilidade dos calos e oxidação, considerando os diferentes tempos de inoculação, não foram observadas diferenças estatísticas, com valores médios de 95%, 42,5% e 18,3%, respectivamente (Tabela 4). Conforme os dados obtidos, o tempo de inoculação da plúmula após a chegada dos

embriões zigóticos, considerando um limite de até 35 dias, não é um fator limitante à formação de calos e à viabilidade dos calos formados.

**Tabela 4.** Influência do tempo de armazenamento do embrião zigótico, fornecedor de plúmulas utilizadas como explantes em *Cocos nucifera*, sobre os percentuais de formação, viabilidade e oxidação de calos

Tempo (dias)	Calo (%)	Viabilidade (%)	Oxidação (%)
1	90,0 ± 10,0 a	30,0 ± 17,32 a	5,0 ± 5,0 a
2	100,0 ± 0,0 a	30,0 ± 10,0 a	25,0 ± 5,0 a
3	100,0 ± 0,0 a	30,0 ± 11,55 a	10,0 ± 5,7 a
15	90,0 ± 5,7 a	45,0 ± 9,57 a	15,0 ± 9,6 a
25	90,0 ± 11,5 a	60,0 ± 18,26 a	30,0 ± 19,15 a
35	100,0 ± 0,0 a	60,0 ± 16,33 a	25,0 ± 9,6 a
Média	95,0	42,5	18,3

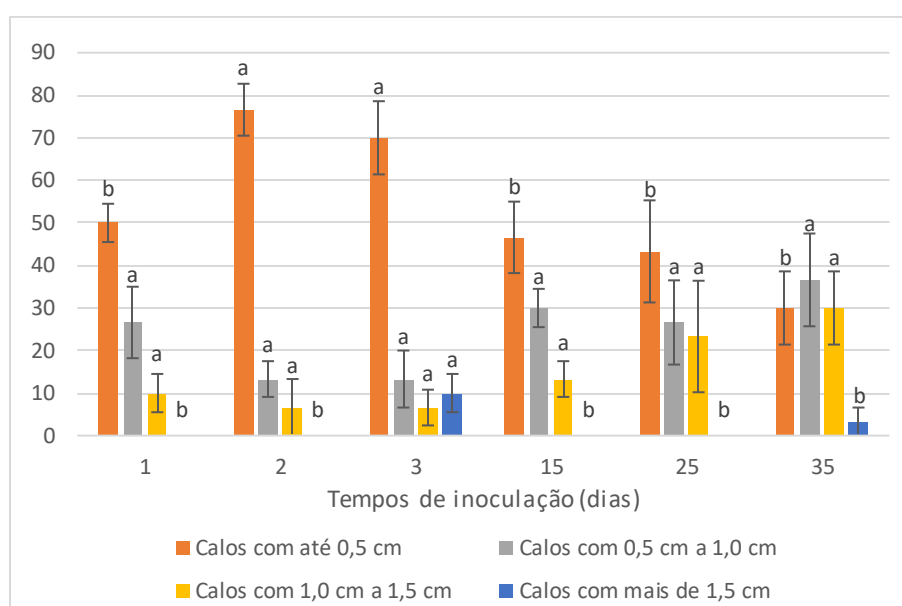
Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Os valores citados referem-se à média ± erro padrão.

Além das variáveis mencionadas acima, avaliou-se o comprimento dos calos obtidos, como um indicativo do incremento em massa calogênica. De acordo com as análises estatísticas, verificaram-se diferenças entre os tempos testados em relação à formação de calos da classe 1 (com até 0,5 cm) e 4 (com mais de 1,5 cm). Maiores percentuais de explantes com calos de até 0,5 cm foram obtidos quando as plúmulas foram extraídas depois de 2 e 3 dias após sua chegada. Já os maiores percentuais de explantes com calos com mais de 1,5 cm, valor médio de 10%, foram obtidos quando as plúmulas foram extraídas após 3 dias após sua chegada (Figura 7).

Desta forma, verificou-se que calos com até 0,5 cm são mais frequentes, independentemente do tempo de inoculação das plúmulas, fato semelhante ao verificado e discutido no tópico 3.1.1. Assim, o tempo de inoculação da plúmula, após a chegada dos embriões zigóticos em laboratório, considerando um limite de até 35 dias, não é um fator limitante à formação de calos e à viabilidade dos calos formados, o que consiste numa evidente vantagem de uso desse tipo de explante. Dentre outras vantagens inerentes ao seu uso, cita-se a alta responsividade calogênica comparada a outros explantes somáticos. Além do mais, as plúmulas são consideradas explantes modelo para o

desenvolvimento de protocolos a partir de outras fontes de explantes (Bandupriya *et al.*, 2016). A utilização de plúmulas de coco anão como explante no processo de embriogênese somática é uma prática interessante considerando que a variedade *nana* apresenta altas taxas de autofecundação (Lédo *et al.* 2019), com resultados promissores obtidos para esse tipo de variedade (Pérez-Núñez *et al.* 2006; Sáenz *et al.* 2010).

Salienta-se, que este é o primeiro trabalho que testou o efeito do tempo de armazenamento dos embriões zigóticos de *C. nucifera*, fornecedores dos explantes iniciais (plúmulas), na responsividade calogênica inicial visando à embriogênese somática.

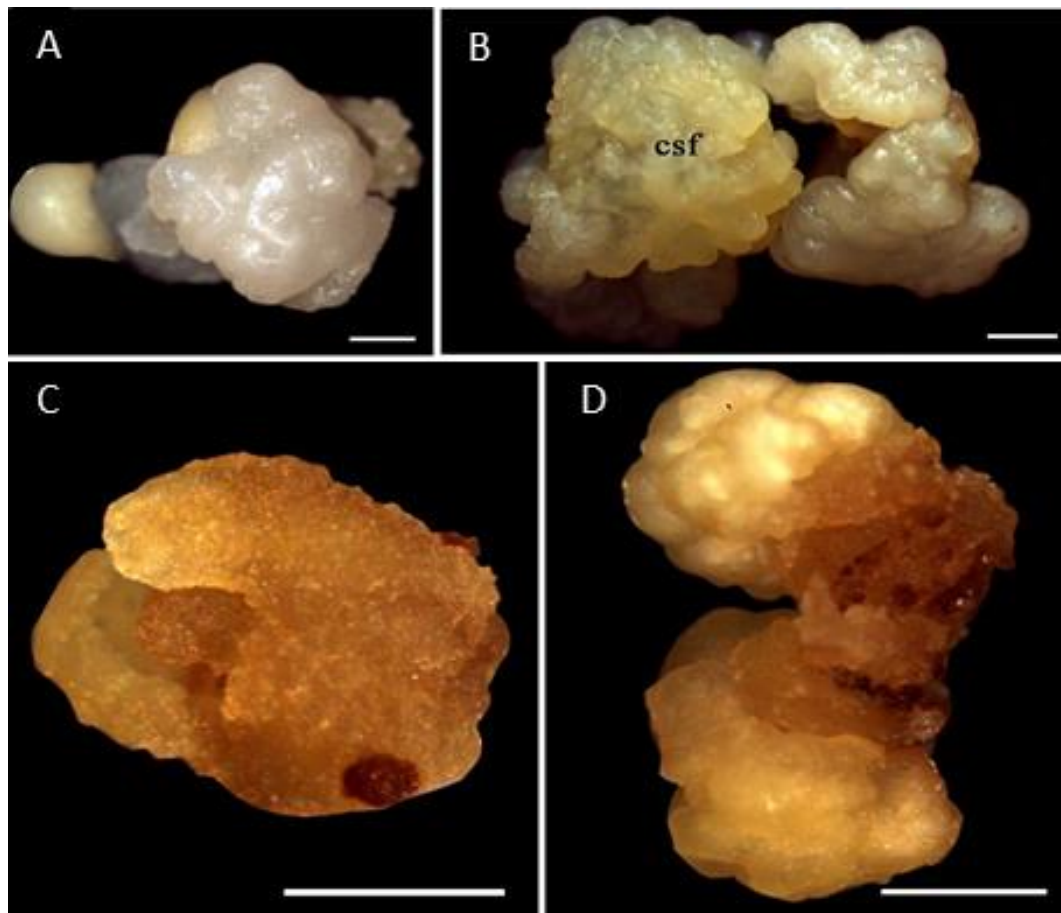


**Figura 7:** Influência do tempo de armazenamento (1, 2, 3, 15, 25 e 35 dias) do embrião zigótico, fornecedor de plúmulas utilizadas como explantes para indução de calos de *Cocos nucifera*, sobre o tamanho dos calos obtidos. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Barras representam o erro padrão.

### iii. Influência de diferentes concentrações de 2,4-D na indução de calos

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 8A). Aos 120 dias em meios com carvão ativado, observaram-se calos semifriáveis (Figura 8B) e globulares compactos. Conforme as análises estatísticas, os

tratamentos não diferiram entre si em relação ao percentual de calos formados, com valor médio de 95% (Tabela 3).



**Figura 8:** Iniciação de calos a partir de plúmulas de *Cocos nucifera*. A: Início de formação de calo sobre a plúmula. B: Calo semifriável oriundo de plúmula cultivada em meio com ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e carvão ativado. C, D: Explantes escurecidos cultivados em meio com 2,4-D desprovido de carvão ativado. Abreviação: (csf) calo semifriável. Escalas: A: 2 mm; B, C e D: 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 *et al.* 2019). As concentrações utilizadas variam 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; Bhavyashree *et al.*, 2016), de maneira geral, não tem provido bons resultados ou então, não são utilizados com frequência.

**Tabela 5.** 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 ( $\mu\text{M}$ )	Carvão ativado Presença/ausência ( $\text{g.L}^{-1}$ )	Calo (%)	Oxidação (%)
13,57	(-)	100 $\pm$ 0,0a	100 $\pm$ 0,0a
20,36	(-)	100 $\pm$ 0,0a	100 $\pm$ 0,0a
450	(+)	92,0 $\pm$ 8,0a	0,0 $\pm$ 0,0b
600	(+)	88,0 $\pm$ 12,0a	0,0 $\pm$ 0,0b
Média		95,0	50

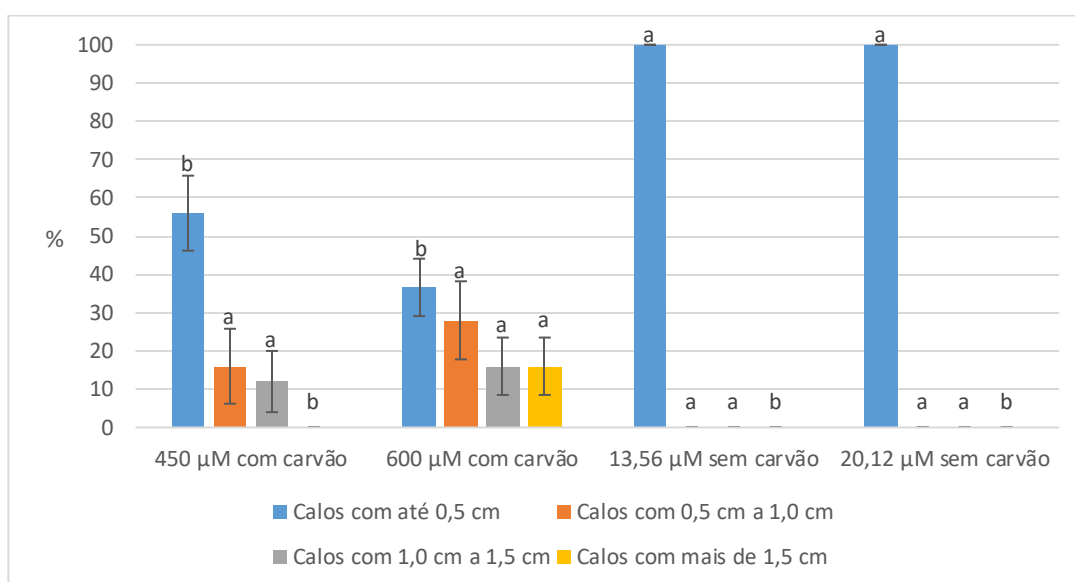
Letras minúsculas iguais indicam ausência de diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de significância. Barras representam o erro padrão.

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 8B). Por outro lado, explantes cultivados em meios suplementados com baixa concentração de auxina e ausência de carvão ativado oxidaram (Figura 8C, D e Tabela 3), o que inviabilizou o desenvolvimento posterior. Assim, apesar da ocorrência de 100% de calogênese em plúmulas cultivadas em meio sem carvão, os calos formados apresentaram evolução defeituosa para poderem serem usados em etapas posteriores do processo (Figura 8C, D).

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). A embriogênese dos tecidos de coco apresenta maior eficiência quando alguma substância adsorvente de compostos fenólicos, como o polivinilpirrolidona (PVP) e carvão ativado é acrescentada ao meio de cultura (Verdeil *et al.* 1999). O carvão ativado tem sido utilizado com sucesso na indução de diferentes tipos de explante, como por exemplo, inflorescência (Perera *et al.* 2008; Sandoval-Cancino *et al.* 2016; Shareefa *et al.* 2019), embriões zigóticos (Fernando e Gamage 2000), plúmulas (Pérez-Núñez *et al.* 2006; Rivera-Solís *et al.* 2018) e fragmentos foliares (Buffard-Morel *et al.* 1992). O uso de antioxidantes, como ácido cítrico e ácido ascórbico, ao meio de cultura Y3 acrescido com

regulador 2,4-D e carvão ativado, mostrou-se eficiente em para a indução de explantes originários de ovários, os quais também podem ser uma alternativa quando se utilizam para a indução de plúmulas (El-Gioushy *et al.* 2020).

O carvão ativado adsorve fenóis e outros compostos, incluindo os possíveis inibitórios do crescimento (Perera *et al.* 2007). No entanto, isso também ocorre com os reguladores de crescimento, como as auxinas, o que torna as condições de cultivo indefinidas e, geralmente, exigem que as concentrações dos reguladores de crescimento utilizados sejam aumentadas (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 fundamental para a indução de calos.



**Figura 9:** Influência das diferentes concentrações (450, 600, 13,56 e 20,12 µM) do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) no comprimento dos calos obtidos de *C. nucifera* após 120 dias em meio de cultura. Os valores citados referem-se à média  $\pm$  erro padrão. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de significância.

De acordo com os resultados, calos de maior comprimento (calos com mais de 1,5 cm) foram somente observados em plúmulas cultivadas em meio suplementado com 600 µM com carvão. Notou-se também que calos com diferentes tamanhos foram visualizados mais distribuídos nos explantes submetidos a altas concentrações de auxina com carvão (450 e 600 µM), ao passo que, calos oriundos de explantes cultivados em meio com baixas

concentrações de auxina sem carvão (13,57 e 20,36  $\mu\text{M}$ ) não ultrapassaram a classe de 0,5 cm (Figura 9).

O crescimento lento e a alta taxa de oxidação nas plúmulas inoculadas em meio sem carvão ativado estão de acordo com os resultados obtidos por Verdeil *et al.* (1999). Esses autores citam que calos obtidos a partir de inflorescências não se desenvolvem em meio de cultura sem adição de substância adsorvente. Embora a taxa de formação de calos tenha sido alta, o volume dos calos obtidos foi menor (Figura 9) e não foram observados calos compactos globulares e/ou calos semifriáveis, ou ainda, a formação de estruturas globulares embriogênicas (Tabela 5).

A indução de calos na ausência de carvão ativado foi eficiente em tratamentos em outras palmeiras como por exemplo, *Acrocomia aculeta* (Moura *et al.* 2010; Luis e Scherwinski-Pereira 2014) e *B. gasipaes* (Heringer *et al.* 2014). Calos obtidos em meio de cultura com altas concentrações de auxinas na presença de carvão ativado tiveram melhor produção de massa calogênica, sendo observado uma disposição para formação de calos considerados potencialmente embriogênicos (calos compactos globulares e/ou calos semifriáveis), fato praticamente ausente nos tratamentos sem carvão ativado.

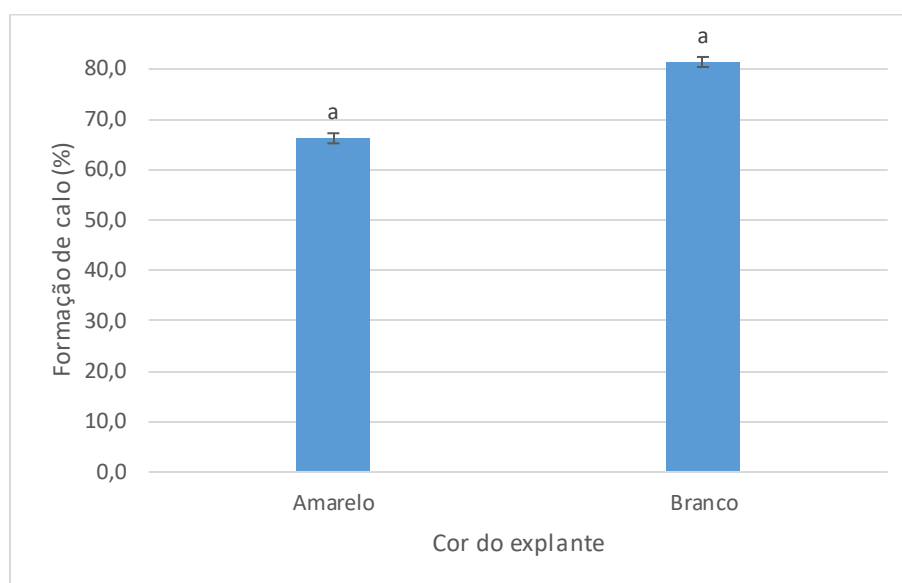
## **b. Multiplicação de Calos**

### *iv. Influência do tamanho e da cor do calo na eficiência da multiplicação em meio sólido*

A interação entre os fatores testados (tamanho do fragmento e cor do fragmento) não foi significativa e, portanto, eles foram avaliados isoladamente. Conforme as análises, não foram verificadas diferenças estatísticas com relação à taxa multiplicação de calos quando se utilizou calos com coloração amarela ou coloração branca, ou seja, a coloração do calo inicial não influenciou a taxa de multiplicação (Figura 10). Já com relação ao tamanho do fragmento, os fragmentos com 1 a 3 protuberâncias esféricas apresentam maior taxa de multiplicação (84,5%) quando comparados àqueles com 5 a 10 protuberâncias (Figura 11). Esse melhor desempenho na multiplicação de calos com dimensões reduzidas pode estar relacionado com o maior contato do explante com os componentes do meio de cultivo, inclusive, com as auxinas indutoras dos processos de divisão, desdiferenciação e rediferenciação celular (Zeng *et al.* 2007). Adicionalmente, enfatiza-se que explantes menores exibem menor comunicação entre as células, o que



favorece a entrada no ciclo de divisão celular (Bettencourt *et al.* 2016) e, consequentemente, a multiplicação da massa celular.

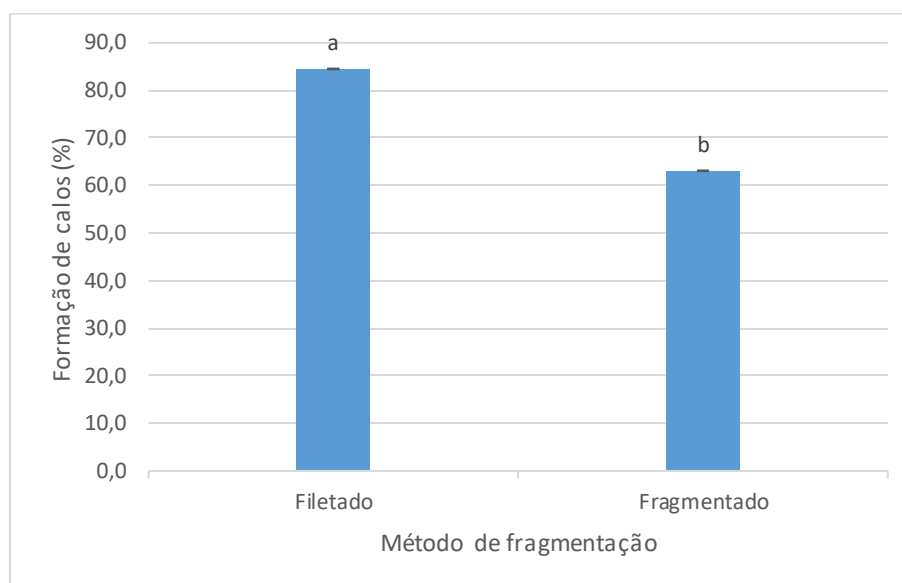


**Figura 10:** Efeito da coloração do explante (amarelo e branco) na multiplicação de calos de *Cocos nucifera* em meio sólido. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de significância. Os valores citados referem-se à média  $\pm$  erro padrão.

A influência do tamanho do calo pode ser um fator de interesse na etapa de multiplicação. Segundo Tran Thanh Van (2003), tecidos submetidos à técnica de *Thin Cell Layer* (TCL) podem gerar uma alta quantidade de embriões somáticos a partir de um pequeno número de células iniciais. O número de células excisadas influencia na organização de um sistema multicelular. Tal organização pode ser perdida em um sistema de fragmentação inicialmente muito reduzido. No gênero *Populus*, Lee-Stadelmann *et al.* (1989) descreveram um aumento de até 25 vezes na formação de estruturas embriogênicas em fragmentos de 5 mm quando comparados a fragmentos de 1 cm. O tamanho dos explantes também foram significativos na formação de calos para a espécie *Garcinia mangostana*, onde explantes formados por metade do limbo foliar obtiveram menor eficiência que explantes formados por fragmentos de 3 mm (Goh *et al.* 1994).

Especificamente, em estudos visando à multiplicação em meio líquido, o tamanho do explante tem sido comumente investigado. Contudo, os resultados são variados a depender da espécie, da etapa do processo de morfogênese e das condições gerais de cultivo. Por exemplo, Monteiro e colaboradores (2011) verificaram que calos com tamanhos superiores a 5 mm de diâmetro favoreceram a diferenciação de embriões

somáticos de *Musa* spp., comparados a calos com 2,5 e 10 mm. Já Tonon, Capuana, & Di Marco (2001) não obtiveram sucesso na morfogênese de *Fraxinus angustifolia* quando foram utilizados calos com dimensões reduzidas. Segundo Boxtel & Berthouly (1996), agregados com 250-1000  $\mu\text{m}$  de diâmetro foram fundamentais para multiplicação de *Coffea* spp., possibilitando absorção ótima de nutrientes do meio e manutenção do potencial embriogênico. Ainda conforme esses autores, agregados inferiores a 100  $\mu\text{m}$  apresentaram problemas com degeneração, durante a etapa de multiplicação.



**Figura 11:** Efeito do tamanho do explante na multiplicação dos calos de *Cocos nucifera* em meio sólido. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de significância. Os valores citados referem-se à média  $\pm$  erro padrão.

v. *Influência do cultivo em diferentes meios de cultivo líquido (MS e Y3) na multiplicação de calos*

Os explantes selecionados para montagem do experimento possuíam coloração clara e estruturas embriogênicas menos individualizadas (Figura 12A). A mudança na coloração indicando início da oxidação foi observada próximo aos 30 dias de cultivo em meio líquido (Figura 12B) para ambos tratamentos, Y3 e MS. A oxidação não ocorreu de forma homogênea com coloração dos explantes variando entre bege claro e marrom (Figura 12C).

Após a transferência dos fragmentos que estavam em meio de cultura líquido de ambas as formulações, MS e Y3 em agitador, para o meio de cultura semissólido Y3 com

600  $\mu$ M de 2,4-D, foi observado aos 30-40 dias a formação de estruturas globulares embriogênicas com superfície lisa e brilhosa, as quais exibiam e nítida individualização (Figura 12D). Aos 90 dias em meio semissólido, foi possível observar o incremento na quantidade dessas estruturas (Figura 12E). Essas estruturas assemelhavam-se àquelas descritas como embriogênicas por Pérez-Núñez *et al.*(2006).

**Tabela 6:** Influência do tempo (dias) em diferentes meios de cultura líquidos, MS e Y3, na produção de estruturas globulares (EG) por fragmento (frag) durante a etapa de multiplicação em meio líquido

Tempo (dias)	Médias (EG/frag)
30 dias	17,8 $\pm$ 4,69 a
60 dias	7,05 $\pm$ 2,23 b
90 dias	18,5 $\pm$ 5,78 a
120 dias	4,6 $\pm$ 1,81 b

Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Os valores citados referem-se à média  $\pm$  erro padrão.

Ao analisar o efeito do tempo de cultivo em meio líquido sobre essa variável, os tempos 30 e 90 dias não apresentaram diferenças estatísticas entre si sendo superiores aos demais (Tabela 6). Dessa forma, para a proliferação de estruturas globulares embriogênicas, pode-se utilizar qualquer uma das formulações salinas testadas, contudo, recomenda-se pelo menos 30 dias de cultivo em meio líquido e subsequente transferência dos calos (fragmentos) para proliferação em meio semissólido. Embora, o tempo de 90 dias não tenha se diferenciado estatisticamente do tempo 30 dias, recomenda-se o menor tempo de cultivo em meio líquido com o objetivo de evitar possíveis problemas com variação somaclonal (Larkin e Scowcroft 1981). Conforme as análises estatísticas com relação aos tratamentos testados durante essa etapa, para a variável número de estruturas globulares embriogênicas/calos, não foram verificadas diferenças entre os meios de cultivo testados (MS e Y3) (Tabela 7).

O valor médio de estruturas globulares embriogênicas produzidas por fragmento em meio Y3 semissólido, que não passaram por meio líquido sob agitação, foi de 6,8 protuberâncias por fragmento. Essa média foi inferior ao tratamento em meio líquido em agitação durante 30 dias com média de 17,8 protuberâncias por fragmento, que é aproximadamente 250% maior quando comparadas. Os resultados sugerem que a

multiplicação em meio líquido sob agitação pode ser uma técnica mais eficiente para a produção de estruturas globulares embriogênicas isoladas entre si. Quando comparado os valores obtidos para o tratamento de 30 dias de multiplicação em meio líquido com os valores para meio semissólido, o meio líquido foi numericamente superior ao meio semissólido e a qualidade das estruturas foi notável. As estruturas globulares embriogênicas que se desenvolveram a partir de fragmentos previamente cultivados em meio líquido apresentaram nitidamente maior individualização comparada aquelas que vieram do meio semissólido. Essa individualização pode favorecer posteriormente a formação de embriões somáticos sem anormalidades, como fusionamento, que prejudicam a conversão embrião somático-planta e reduzem a eficiência do sistema. Algo semelhante foi observado em *E. guineensis* onde a submissão dos calos por 30 dias em meio de cultura líquida não aumentou significativamente a formação de calos embriogênicos, porém a taxa de formação de estruturas embriogênicas foi maior (Monteiro *et al.* 2018).

**Tabela 7:** Influência do tempo (dias) em diferentes meios de cultura líquidos, MS e Y3 para a produção de estruturas globulares (EG) por fragmento (frag).

Meio de multiplicação	Médias (EG/frag)
MS	11,35 ± 1,91 a
Y3	12,77 ± 2,40 a

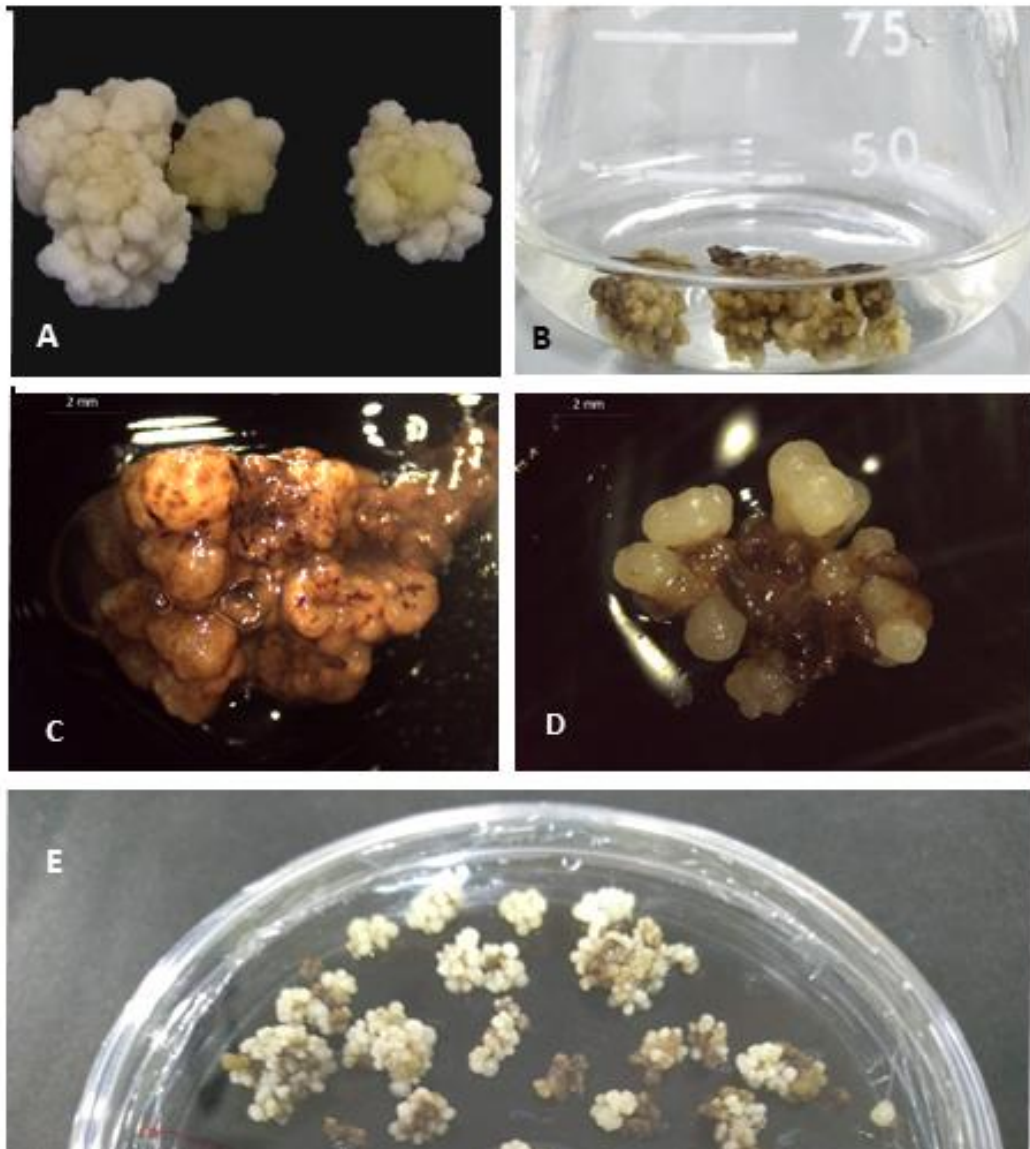
Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Os valores citados referem-se à média ± erro padrão.

As vantagens do meio líquido durante a etapa de multiplicação de calos em relação do meio sólido foram observadas para outras palmeiras. Durante a formação de embriões somáticos em *Phoenix dactilyfera*, tanto para explantes de folhas jovens (Veramendi & Navarro, 1996; Saker *et al.*, 2007) quanto para inflorescências (Fki *et al.* 2003), o meio líquido se mostrou mais eficiente. O desenvolvimento de massa embriogênica de calos fragmentados e inoculados foi 3x maior em meio líquido quando comparado com o desenvolvimento em meio sólido em mesmas condições (Fki *et al.* 2003). O uso de diferentes frascos para a multiplicação de *P. dactilyfera* foi comparado e os autores concluíram que frascos contendo meio líquido sob agitação foram mais eficientes que frascos contendo meio semissólido e biorreatores tipo RITA® (Ibraheem *et al.* 2013). O meio líquido sob agitação em *E. guineensis* proporcionou efeitos significativos

melhorados na multiplicação e desenvolvimento de embriões somáticos com a necessidade de adaptação nas concentrações dos reguladores de crescimento ou no tempo da cultura em alguns genótipos utilizados (Hashim *et al.* 2018; Jain e Gupta 2018; Monteiro *et al.* 2018).

Bhavyashree e colaboradores (2016) em estudos de cultura de células de *C. nucifera*, tentam estabelecer calos com alta competência embriogênica oriundos de meristemas caulinar que foram seccionados, triturados e transferidos para meio líquido de cultura Y3 acrescidos com diferentes concentrações de 2,4-D ou Picloram, aminoácidos e carvão ativado em frascos sob agitação. Os autores observaram que existe um período máximo de crescimento das células em suspensão em meio de cultura líquida que ocorreu próximo a 200 dias de cultivo com melhor resultado para os tratamentos com regulador 2,4-D. Após esse período as células eram inoculadas em meio semissólido Y3 e não foi observado progresso adicional (Bhavyashree *et al.* 2016). Diferente do estudo de Bhavyashree e colaboradores (2016) no presente trabalho foi observado que os fragmentos de calos submetidos ao meio líquido em agitação quando transferidos para meio semissólido Y3 permaneciam com competência para formação de novas estruturas globulares.

A oxidação dos fragmentos celulares observadas nesse estudo contrasta com os resultados obtidos por Teixeira *et al.* (1995) e Monteiro *et al.* (2018) com *E. guineensis*, que não observaram oxidação em culturas de meio líquido. Os autores descrevem a indução de embriões zigóticos em meio MS e Y3 e posterior transferência para meio líquido Y3 para estabelecimento de embriões somáticos, porém não é citado qual meio líquido é mais eficiente. Para *E. guineensis* a adição de uma etapa em meio líquido tem demonstrado significativo incremento de massas embriogênicas (Teixeira *et al.* 1995; Tarmizi *et al.* 2004, 2008; Monteiro *et al.* 2018).



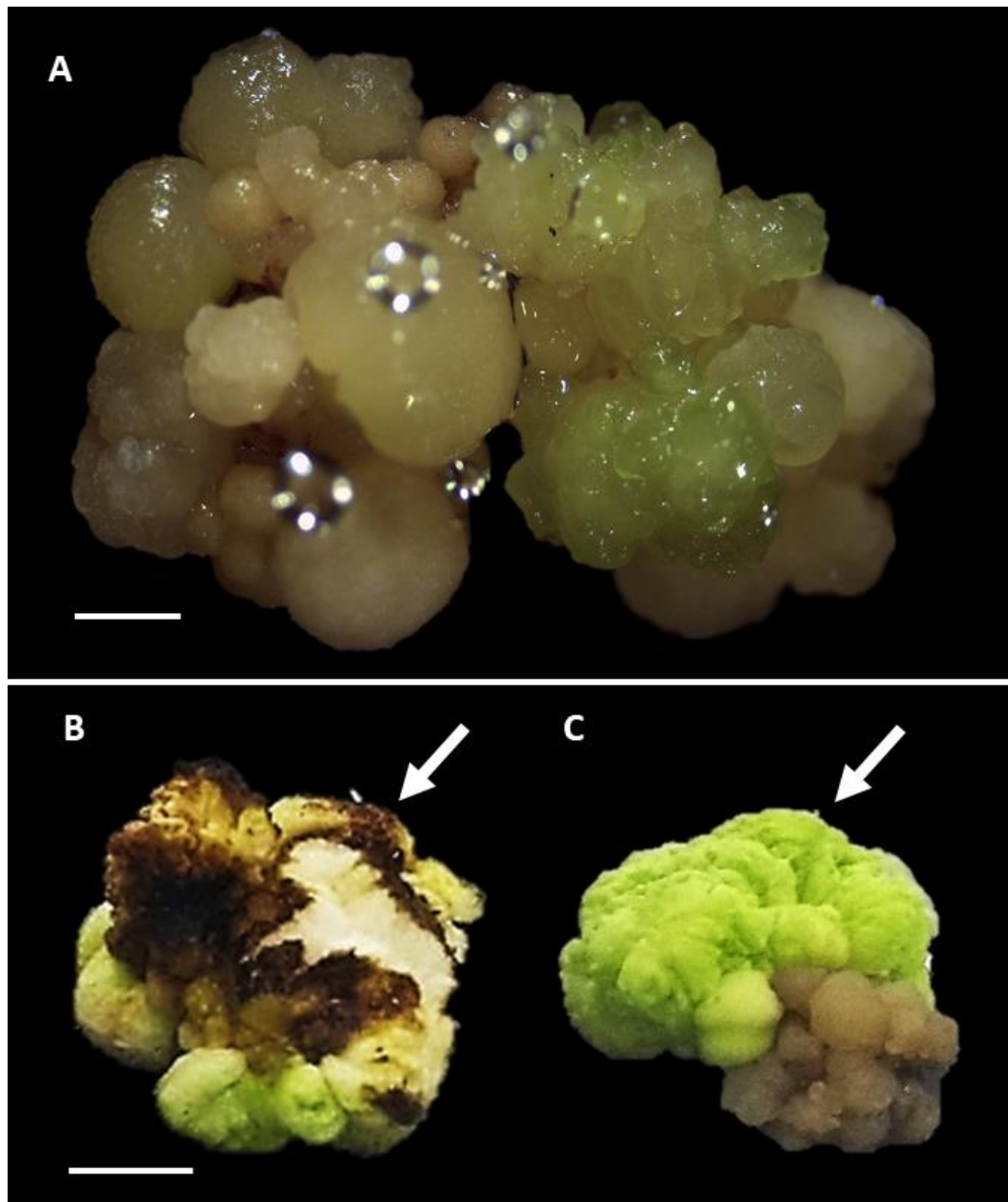
**Figura 12:** Aspectos dos calos semifriáveis de *Cocos nucifera* transferidos do meio sólido de indução para o meio líquido de multiplicação. A: Calos utilizados como explantes na etapa de multiplicação. B: Calos em meio de cultura líquido. C: Calo com pigmentação amarronzada oriundo do meio líquido. D: Estruturas globulares embriogênicas desenvolvidas em meio de multiplicação líquido após 40 dias de cultivo em meio semissólido. E: Fragmentos oriundos da etapa de multiplicação em meio líquido após 90 dias de cultivo em meio semissólido.

### c. Diferenciação de Embriões Somáticos

#### vi. *Influência de diferentes meios de cultivo na diferenciação de embriões somáticos*

Com 30 dias de cultivo em meio de diferenciação de embriões somáticos, independentemente do tratamento utilizado, verificou-se a formação de estruturas esponjosas, semelhantes ao haustório de embriões zigóticos. Aos 40 dias, verificaram-se estruturas embriogênicas com pigmentação esverdeada, sobretudo àquelas submetidas ao tratamento Y3 acrescido com 5  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 300  $\mu\text{M}$  BAP (Figura 13A). Essas estruturas assemelham-se às obtidas por Bett *et al.* (2019). O aumento da massa calogênica em ambos os tratamentos foi observado até os 60 dias de cultivo. Após esse período, o volume permaneceu constante para o tratamento Y3 acrescido com 5  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 300  $\mu\text{M}$  BAP (Figura 13B) e 1/2MS (Figura 13C).

Após 90 dias de cultivo, não foram identificadas diferenças significativas para as variáveis tamanho do calos e percentual de oxidação, entre os dois tratamentos testados (Figura 14), com valores médios de 54,65 e 64%, respectivamente. Contudo, o meio Y3, suplementado com 2,4-D e BAP, proporcionou maior número de calos com coloração esverdeada, com valor médio de 65,6%, diferindo estatisticamente do tratamento com 1/2MS, desprovido de reguladores de crescimento. Vale ressaltar que embora tenham sido constatados aumento da massa embriogênica e mudança de coloração (levemente verde), não se verificou diferenciação de embriões somáticos a partir dos explantes submetidos aos tratamentos testados. A formação de um tecido semelhante ao haustório foi reportada neste experimento em todos os explantes que aumentaram em comprimento. Alguns explantes mantiveram a superfície regular ou romperam a superfície formando uma fissura (Figura 13B e C). Esse comportamento onde os calos embriogênicos deram origem a tecido haustorial ou anormal foi observado por outros autores. Verdeil e colaboradores (1989, 1994) observaram a formação de tecido haustorial durante a diferenciação em meio de cultura com valores reduzidos de auxina, em explantes oriundo de inflorescência de *C. nucifera*. A formação de tecido haustorial em explantes mantidos em meio de cultura com quantidade insuficiente de auxinas foi observado em *E. guineenses* com os explantes aumentando em volume e alterando a coloração branca para amarela (Touchet *et al.* 1991).



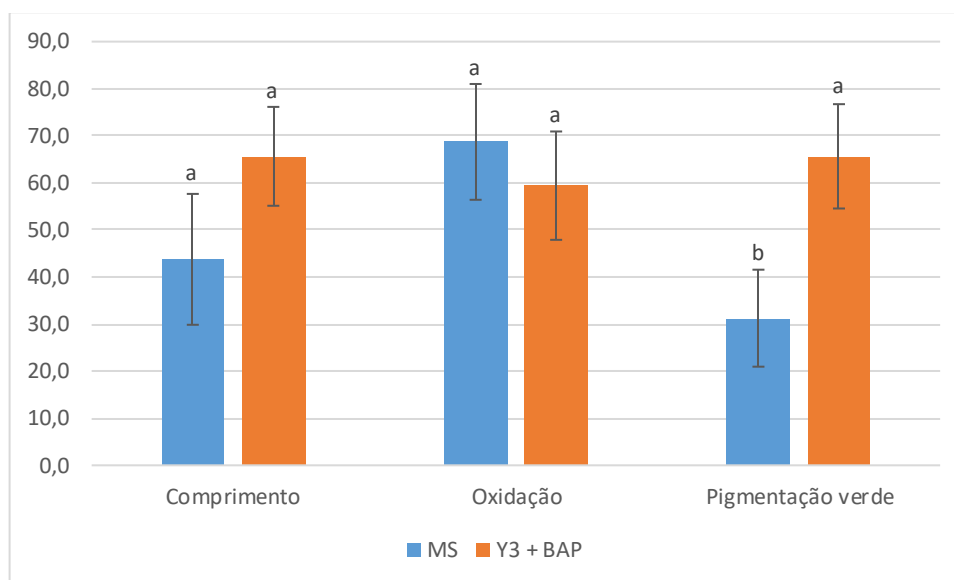
**Figura 13:** Aspecto geral dos explantes de *Cocos nucifera* em meio de cultivo visando à diferenciação de embriões somáticos. A: Aspecto do explante após 30 dias em meio de cultura; notar áreas com pigmentação esverdeada. B e C: Aspecto dos explantes após 90 dias. B: explantes inoculados em meio Y3 acrescido com 2,4-D e BAP. C: Explantes inoculados em meio MS desprovido de regulador de crescimento. Seta: formação de tecido semelhante a haustório; Escalas: A: 2 mm; B e C: 5mm.

A formação de embriões somáticos em *C. nucifera* a partir de calos oriundos do cultivo de plúmulas tem sido relatada por diferentes autores (R Hornung 1995; Chan *et al.* 1998; Fernando *et al.* 2003; Pérez-Núñez *et al.* 2006). De modo geral, a etapa de diferenciação de embriões somáticos tem sido caracterizada pela redução ou retirada da auxina indutora do processo e/ou adição de alguma citocinina, como BAP (Karunaratne



e Periyapperuma 1990; Hornung 1995a; Chan *et al.* 1998), Thidiazuron (TDZ) (Perera *et al.* 2009; Jayaraj *et al.* 2015; Bhavyashree *et al.* 2016) e 2-Isopenteniladenina (2iP) (Branton e Blake 1983a; Perera *et al.* 2008). Apesar do relato da obtenção de embriões somáticos na espécie, nesse experimento isso não foi observado, o que exige otimização futura dessa etapa.

É importante mencionar que o processo de embriogênese somática dessa palmeira tem sido considerado de baixa eficiência e acompanhado por anormalidades (Blake e Hornung 1995; Jayaraj *et al.* 2015). Além do mais, há um consenso na literatura sobre a recalcitrância de *Cocos nucifera* com relação a regeneração *in vitro* (Pérez-Núñez *et al.*, 2006; Jayaraj *et al.* 2015; Bandupriya *et al.*, 2016), o que exige constante manipulação/otimização de protocolos.



**Figura 14:** Efeito de diferentes meios de cultivo sobre o aumento da massa embriogênica do calo e sobre os percentuais de oxidação e de calos com coloração verde de *Cocos nucifera*. Os valores citados referem-se à média  $\pm$  erro padrão. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos. Abreviações: MS (Murashige e Skoog 1962), Y3 (Eeuwens, 1976) e BAP (6-Benzilaminopurina).

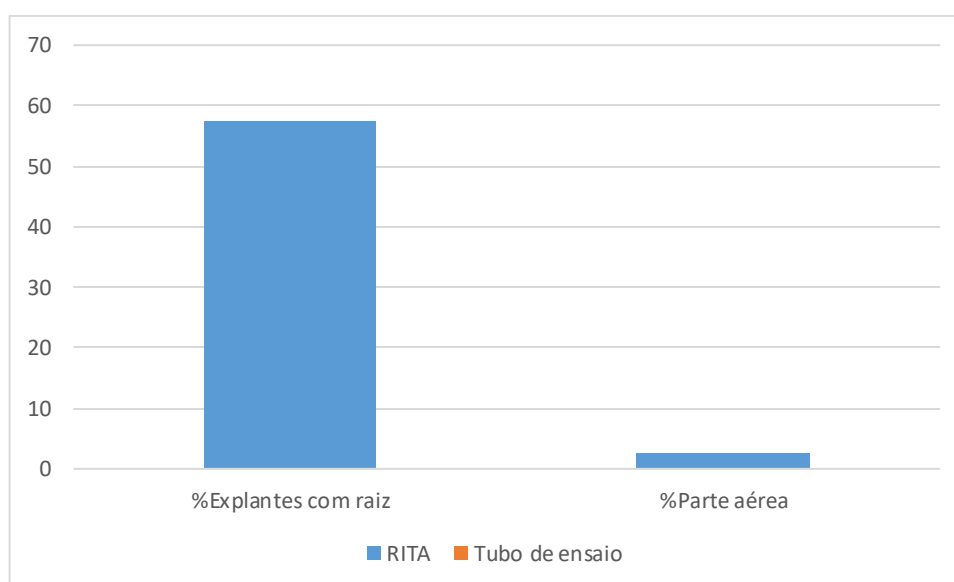
vii. *Efeito do recipiente de cultivo na diferenciação de embriões somáticos*

Os explantes selecionados para o experimento apresentavam superfície branca com estruturas globulares bem visíveis (Figura 16A). Não foi observado diferenciação de

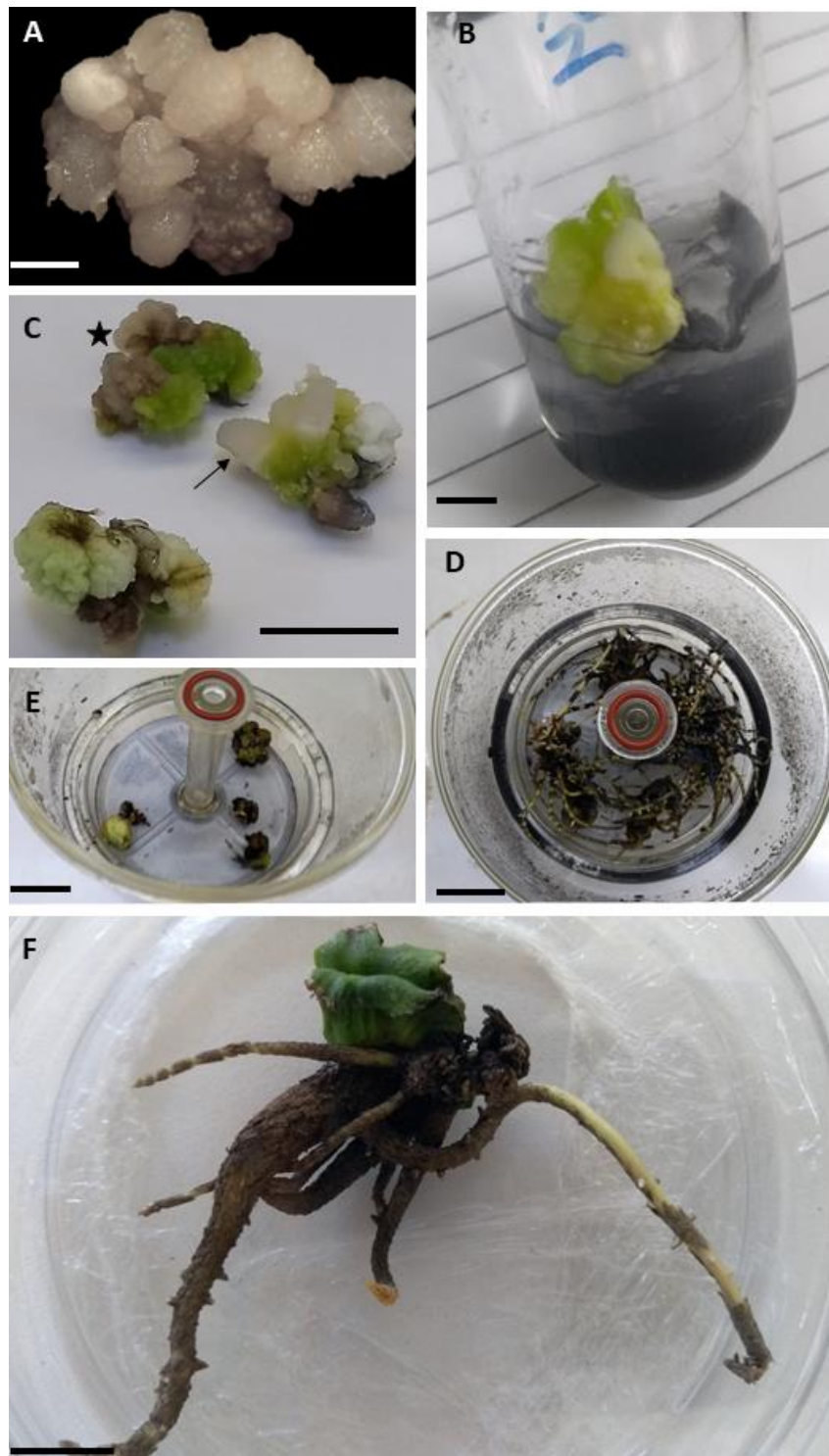
embriões somáticos ou de outras estruturas organizadas a partir de explantes cultivados em tubos de ensaio (Figura 15 e 16B). Em alguns explantes foi observado a formação de estruturas alongadas e partes oxidadas (Figura 16C). Por outro lado, resultados promissores foram observados quando os explantes foram cultivados em biorreatores RITA®, com 57,5% de explantes com formação de raiz (Figura 15 e 16D), 2,5% de explantes com emissão de parte aérea e 2,5% de formação de plantas completas (Figura 15 e 16F). Todavia, ressalta-se que além do baixo número de plantas completas obtidas, estas exibiram sinais de anormalidades, como parte aérea fusionada ou pouco desenvolvida (Figura 16F). A ocorrência dessas anormalidades tem sido recorrente na literatura durante a embriogênese somática de *C. nucifera* (Blake & Hornung, 1995; Hornung, 1995; Pérez-Núñez *et al.*, 2006; Jayaraj *et al.*, 2015; Bhavyashree *et al.*, 2016).

Os explantes oriundos para esse estudo passaram pela etapa de indução em meio de cultura contendo regulador picloram. Embora as características morfológicas não fossem de calos semifriáveis com superfície branca, lisa conforme descrito por outros autores (Chan *et al.* 1998; Pérez-Núñez *et al.* 2006; Sáenz *et al.* 2006) os calos compactos selecionados apresentavam morfologia semelhante aquelas referidas como *like-ear* referidas por Pérez-Núñez *et al.* (2006) e Sandoval-Cancino *et al.* (2016).

Até o momento, os estudos apontam melhores resultados nas etapas iniciais quando os explantes são inoculados em meio de indução contendo regulador 2,4-D.



**Figura 15:** Desenvolvimento em diferentes frascos (tubo de ensaio e RITA®) durante a etapa de diferenciação de plantas de *Cocos nucifera*.



**Figura 16:** Calos de *Cocos nucifera* selecionados para a regeneração em diferentes recipientes. A: Aspecto dos calos compacto selecionados. B: Calos transferidos para tubos de ensaio contendo meio com regulador BAP; C: Calo após 120 dias em meio semissólido em tubo de ensaio (estrela: parte oxidada; seta: formação de estrutura alongada); Calos. D, E e F: Calos transferidos para frascos RITA<sup>®</sup> apresentando diferentes respostas. D: plântulas apenas com raízes após 120 dias em meio de cultura líquido; E: calos oxidados que não responderam ao tratamento em meio de cultura líquido; F: Planta de *C. nucifera* obtida por embriogênese somática apresentando anormalidade na formação da parte aérea. Escala: 1 cm.

Biorreatores são sistemas automatizados onde os explantes são cultivados dentro de um frasco de cultivo e expostos ao meio de cultura por um período programado de tempo. Dentre as vantagens do uso de biorreatores citam-se: melhor nutrição e oxigenação dos tecidos, renovação adequada do ar e, conseqüentemente, melhor taxa de crescimento e desempenho morfogenético (Etienne e Berthouly 2002; Teixeira e Cid 2010). Assim, o recipiente utilizado pode interferir no desenvolvimento de um explante durante as etapas do processo de embriogênese (Silvosa- Millado *et al.* 2020).

Os resultados obtidos nesse estudo demonstram que calos inoculados em sistema de imersão temporária RITA® foram superiores aos inoculados em meio sólido. Esse resultado está de acordo com os estudos de Etienne & Berthouly (2002), que descrevem uma melhor eficiência das técnicas de imersão temporária quando comparadas ao meio sólido. Outros autores também obtiveram resultados apontando melhor eficiência com o uso de biorreatores. Em *Bactris gasipaes*, plantas produzidas por embriogênese somática em biorreator tipo “Twin flasks” transferidas para meio de diferenciação semissólido apresentaram taxa de sobrevivência menos significativa do que plantas de outro tratamento cultivadas em meio líquido em biorreatores. Os autores justificam o resultado positivo ao melhor desenvolvimento de raízes classificando as plantas oriundas do cultivo em “Twin flasks” como fisiologicamente melhores (Steinmacher *et al.* 2011). Em experimentos comparando biorreatores de imersão temporária e meio semissólido para *E. guineensis*, foi constatado que o alongamento de embriões somáticos e o acúmulo de biomassa fresca foi superior estatisticamente em frascos RITA® foi superior a 10x aos tratamentos em meio semissólido e 2x ao número de plantas regeneradas (Gomes *et al.* 2016).

#### viii. *Influência do tamanho do calo na diferenciação de embriões somáticos*

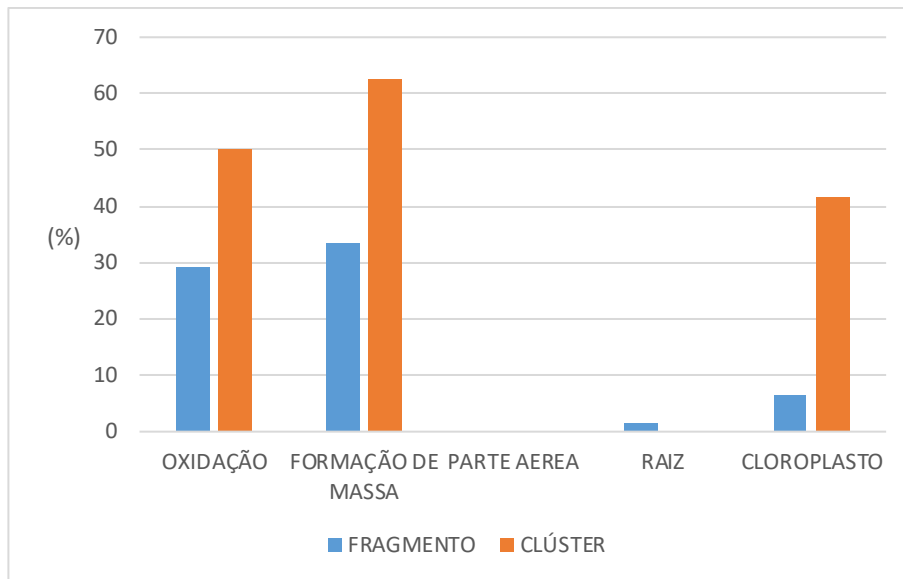
O comportamento *in vitro* das estruturas inoculadas, fragmentos formados por até 5 protuberâncias esféricas (Figura 17A) ou fragmentos com 5 a 10 protuberâncias esféricas (*clusters*) (Figura 17D), foi semelhante ao relatado no item 3.3.1. Ao final de 30 dias de cultivo, observou-se o aumento da massa calogênica em fragmentos e clusters (Figura 17 B e E). Parte dos fragmentos, mesmo com desenvolvimento de massa

calogênica, apresentaram indícios de oxidação, o que não foi um fator limitante ao desenvolvimento posterior do explante (Figura 18).

A ocorrência de pigmentação esverdeada teve início após os 30 dias de cultivo. Verificou-se também a formação de estruturas compostas por raízes e uma região semelhante a haustórios durante o processo de germinação de embriões zigóticos (Figura 17C), resultados estes similares aos reportados por Fernando e Gamage (2000). Esse comportamento foi observado somente quando fragmentos formados por até 5 protuberâncias esféricas foram inoculados. Já os explantes aqui nomeados como *clusters* formaram massas com aspecto compacto com pigmentação esverdeada (Figura 17F).



**Figura 17:** Diferentes respostas morfológicas na etapa de diferenciação a partir de diferentes calos (fragmentos formados por até 5 protuberâncias esféricas ou fragmentos com 5 a 10 protuberâncias esféricas - *clusters*) de *C. nucifera*; A- C: fragmentos com até 5 protuberâncias esféricas e D-F: *clusters*. A: Fragmento que não respondeu ao tratamento com regulador BAP. B: Fragmento responsivo com formação de massa compacta e com pigmentação esverdeada. C: Fragmento responsivo com formação de massa compacta semelhante a haustório (seta) e raiz primária com pequenas estruturas secundárias (seta). D: *Cluster* que não respondeu ao tratamento com regulador BAP. E: Formação de massa compacta (seta) em parte da estrutura do calo inicial sem pigmentação. F: Formação de massa compacta esverdeada cobrindo todo calo inicial. Escala: 1 cm.



**Figura 18:** Comparação entre os tipos de isolamento das estruturas globulares (isolados e cluster) durante a etapa de regeneração.

Na literatura são encontrados estudos que apontam o sucesso no uso da citocinina BAP durante a diferenciação de embriões somáticos de *C. nucifera* a partir de estruturas embriogênicas formadas na fase anterior. Todavia, a maioria dos trabalhos disponíveis na literatura não avaliaram o efeito sobre a formação de embriões somáticos do processo de isolamento de fragmentos de calos com números variados de estruturas globulares embriogênicas (RKW Hornung 1995). Tais autores reportaram sucesso na etapa de diferenciação de embriões somáticos utilizando BAP e subsequente regeneração de plantas.

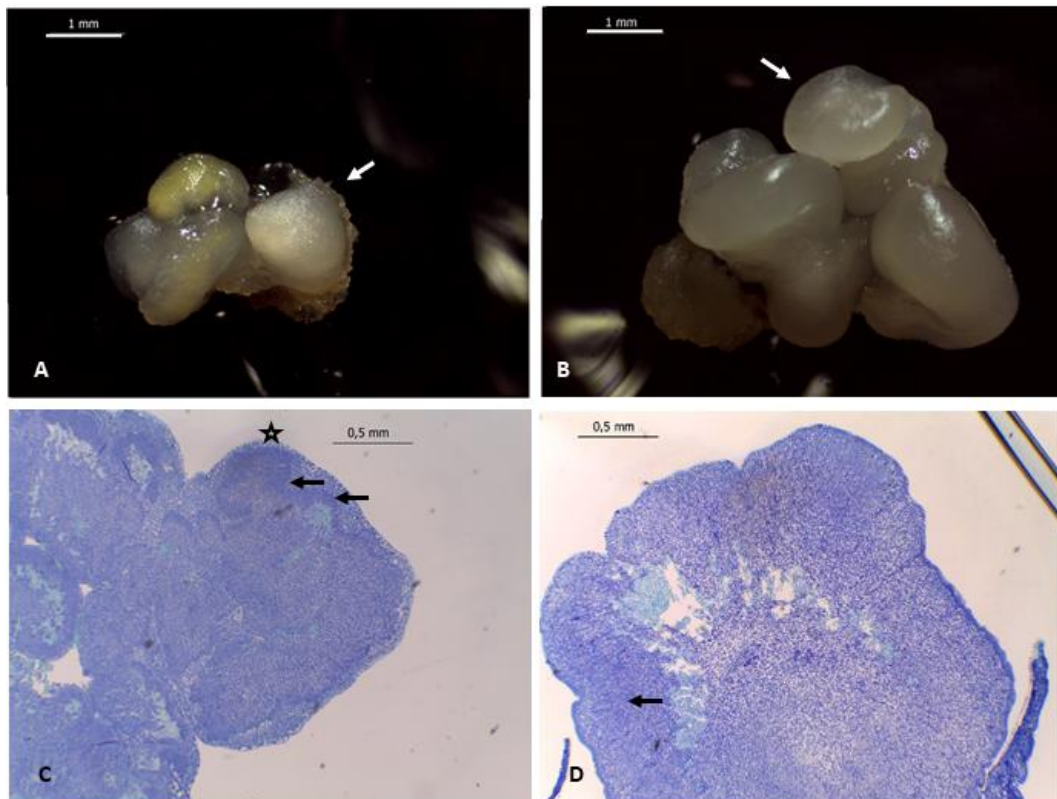
Outros autores citam a separação das estruturas embriogênicas durante o processo de diferenciação. Sandoval-Cancino *et al.* (2016) efetuaram a separação de estruturas embriogênicas durante a etapa de multiplicação e não verificaram diferenças entre as concentrações de BAP testadas durante a etapa de diferenciação. Similarmente, Pérez-Núñez *et al.* (2006) iniciaram a etapa de diferenciação de embriões somáticos a partir de estruturas globulares embriogênicas isoladas e inoculadas em meio com 300  $\mu$ M de BAP, porém os resultados não foram conclusivos.

#### d. Caracterização Morfoanatômica dos Calos

Após 60 dias de cultivo em meio de cultura suplementado com auxina, observaram-se o aumento do volume das plúmulas, assim como a formação sobre elas de estruturas translúcidas com consistência rígida e morfologia “ear-like” (Figura 19 A e B), semelhante ao descrito inicialmente por Sáenz *et al.* (2006) e citados por Jayaraj *et al.* (2015) e Rivera-Solís *et al.* (2018). Anatomicamente observou-se a formação de massas de calos correspondentes às estruturas translúcidas e o incremento de volume celular da plúmula (Figura 19 C e D, respectivamente). As massas contendo estruturas translúcidas exibiam início de formação de centros meristemáticos.

Com 120 dias de cultivo, observou-se a partir das estruturas translúcidas iniciais o desenvolvimento de calos nodulares compactos brancos e calos friáveis. Salienta-se que ambos os calos, embora morfologicamente diferentes, exibiam características anatômicas semelhantes. Tais estruturas eram formadas por dois tipos de células: células com características meristemáticas (pequenas, com alta relação núcleo citoplasma e sem vacúolos visíveis) formando ora um cordão ora nódulos, localizadas nas proximidades da protoderme, e por células com características parenquimáticas, localizadas entre a protoderme e a zona meristemática e imediatamente abaixo dessa zona. Jayaraj *et al.* (2015) classifica essa região meristemática como “centro meristemático periférico”. Segundo os autores essa região meristemática é responsável por originar embriões somáticos.

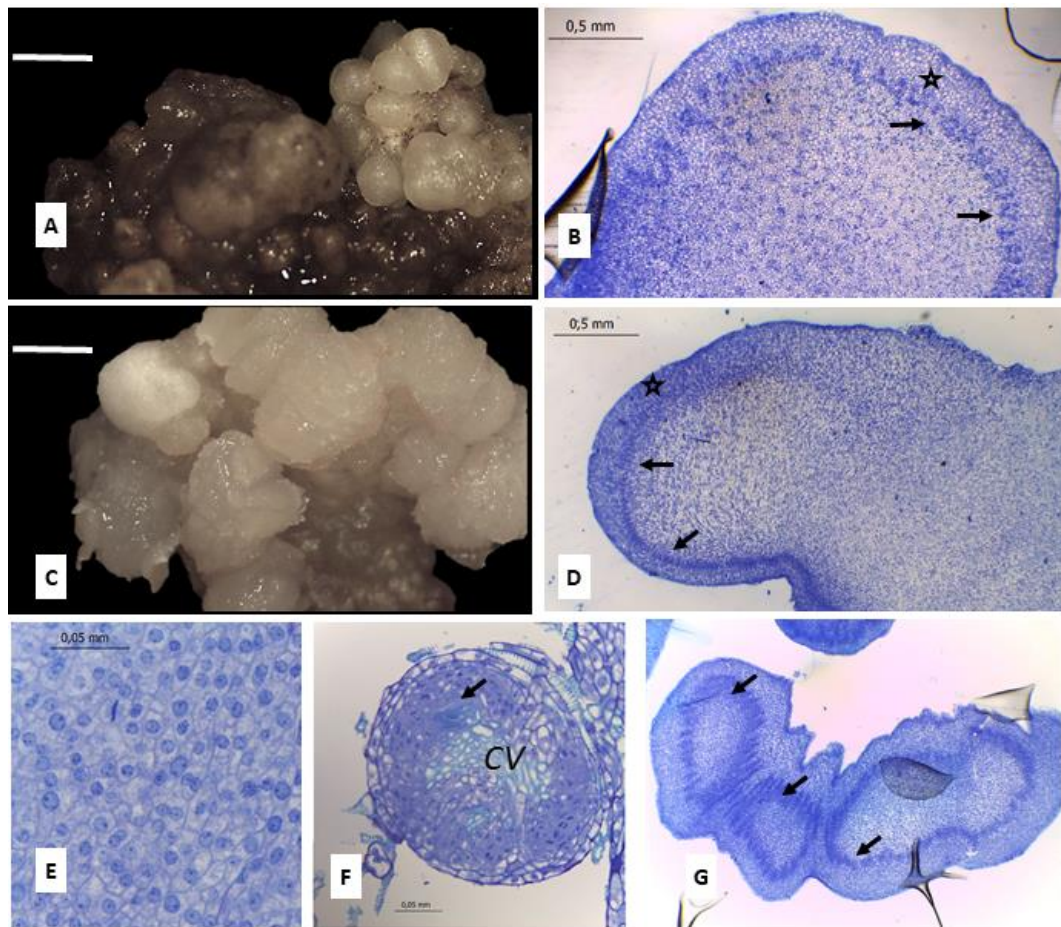
A presença de áreas meristemáticas evidentes em calos de *C. nucifera* também foi mencionado por Branton & Blake, (1983b), Buffard-Morel *et al.*, (1992), Fernando *et al.*, (2003) e Sáenz *et al.*, (2006) que, ao trabalharem com plúmulas de *C. nucifera*, verificaram a formação de nódulos embriogênicos a partir da quebra dessas áreas meristemáticas, as quais posteriormente adquiriram protoderme e formaram embriões somáticos de origem multicelular.



**Figura 19:** Desenvolvimento dos calos embriogênicos a partir de plúmulas do embrião de *Cocos nucifera*, var. Anão Verde do Brasil de Jiqui (AVeJ), **A e B:** Início do desenvolvimento das plúmulas após 60 dias em meio de cultura com 2,4-D e Picloram, respectivamente (seta-estrutura translúcidas); **C:** Secção anatômica de calo após 120 dias em meio com 2,4-D (setas-nódulo meristemático *NM*, estrela - protoderme *Pd*); **D:** Secção anatômica de calo após 150 dias em meio com Picloram (setas-nódulo meristemático *NM*, estrela - protoderme *PD*).

Os calos oriundos da etapa de indução apresentavam características morfológicas diferentes devido ao tratamento com diferentes reguladores de crescimento (Figura 20 A e C). Quando transferidas para meio líquido (fase de multiplicação), essas estruturas tornaram-se mais individualizadas, formando áreas esféricas bem definidas, com predominância de células meristemáticas e, portanto, caracterizadas como estruturas embriogênicas. Algumas dessas estruturas, semelhante ao descrito por Fernando *et al.* (2003), exibiam indícios de formação de protoderme (Figura 20 B e D). Acompanhando internamente a protoderme foi observado um cordão de células meristemáticas (Figura 20 E). A formação de centros meristemáticos pode ser observada em estruturas embriogênicas bem isoladas (Figura 20 E). Adicionalmente, células vasculares foram observadas em alguns *clusters* seccionados (Figura 20 F). Os nódulos meristemáticos foram encontrados em explantes que foram induzidos com regulador de crescimento Picloram (Figura 20 G).

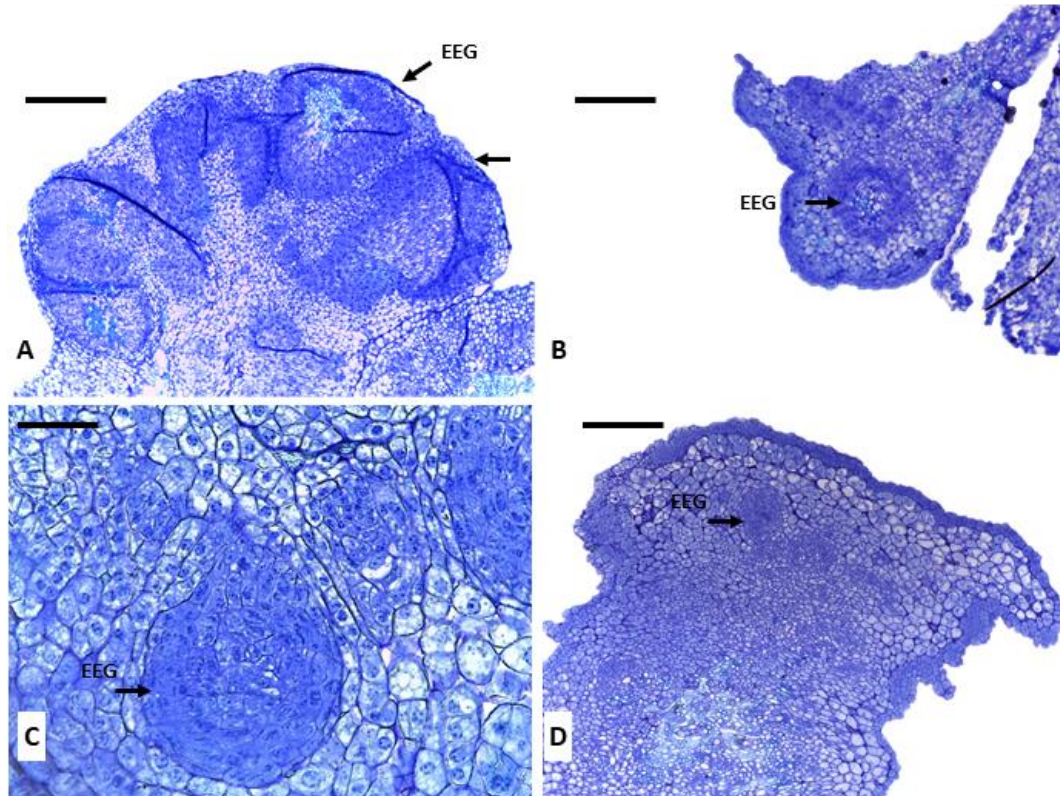




**Figura 20:** Desenvolvimento de estruturas embriogênicas a partir de explantes inoculados em meio líquido oriundas de plúmulas de *Cocos nucifera*, var. Anão Verde do Brasil de Jiqui (AVeJ), **A** e **C**: explantes com 2,4-D e Picloram, respectivamente; **B**: Secção anatômica de calo induzido com regulador 2,4-D, após 90 dias em meio líquido de multiplicação (setas-nódulo meristemático *NM*, estrela - protoderme *Pd*); **D**: Secção anatômica de calo induzido com regulador Picloram, após 90 dias em meio líquido de multiplicação (setas-nódulo meristemático *NM*, estrela - protoderme *PD*); **E**: células meristemáticas da região do nódulo meristemático; **F**: Secção anatômica de calo induzido com regulador 2,4-D evidenciando uma estrutura embriogênicas (setas-nódulo meristemático *NM*, células vasculares-*CV*); **G**: Secção anatômica de calo induzido com regulador Picloram evidenciando três estruturas embriogênicas isoladas por células meristemáticas dispostas em círculos.

O estágio de multiplicação dos calos é descrito em poucos trabalhos em *C. nucifera* (Verdeil *et al.* 1994; Pérez-Núñez *et al.* 2006). Nos estudos de Verdeil *et al.* (1994) os calos foram mantidos em meio de cultura por até oito meses em um “estágio de multiplicação” onde uma zona meristemática periférica foi mantida por todo o período nas estruturas embriogênicas que surgiram posteriormente. Pérez-Núñez *et al.* (2006) isolavam as estruturas embriogênicas e realizavam subcultivos em meio de cultura com

as mesmas concentrações usadas durante a indução. Os autores descrevem que não foram observadas diferenças histológicas nos calos durante o estágio de multiplicação quando comparados com calos durante a fase de indução.



**Figura 21:** Desenvolvimento de estruturas embriogênicas a partir de explantes inoculados **A e C:** Secção anatômica transversal de uma estrutura embriogênica globular formado em meio de cultura contendo BAP e 2,4-D após 60 dias de cultivo; **B e D:** Secção anatômica transversal de uma estrutura embriogênicas globular formado em meio de cultura contendo BAP e Picloram após 30 dias de cultivo. Escala: **A, B e D:** 0,2mm; **C:** 0,05mm.

Após o estágio de multiplicação os explantes foram selecionados e inoculados em meio de cultura para etapa de diferenciação contendo regulador de crescimento BAP juntamente com 2,4-D ou Picloram em baixa concentração. Em ambos os tratamentos foi possível observar os tecidos organizados formando um conjunto de células meristemáticas dispostas semelhantes a um círculo (Figura 21 A e B). Estas células coravam mais intensamente e possuíam um núcleo grande e citoplasma sem grandes vacúolos (Figura 21 C). Estas características estão de acordo com as descritas por Sáenz *et al.* (2006) que descreve como precursora do embrião somático. Jayaraj *et al.* (2015) descreve que nessa etapa as estruturas globulares pareciam se fundirem para a formação do embrião somático após a redução de 2,4-D e a adição de BAP e GA3 ao meio.

Essa organização pode ser vista em outros trabalhos que utilizam o regulador BAP após a indução de calos, independente da fonte de explante utilizada: inflorescência (Sandoval-Cancino *et al.* 2016), plúmula (Pérez-Núñez *et al.* 2006; Jayaraj *et al.* 2015) ou explantes embriogênicos (Rivera-Solís *et al.* 2018).

## CONCLUSÕES

### Indução

- Plúmulas são explantes responsivos ao cultivo *in vitro* sob altas concentrações de auxinas em meio de cultura contendo carvão ativado.
- A auxina 2,4-D é eficiente para indução de calos potencialmente embriogênicos (calos semifriáveis) a partir de plúmulas de *Cocos nucifera*.
- O tempo de inoculação da plúmula após a chegada dos embriões zigóticos, considerando um limite de até 35 dias, não é um fator limitante à formação de calos e à viabilidade dos calos formados.

### Multiplicação

- A coloração do explante não exerce influência na multiplicação de estruturas embriogênicas em meio de cultura líquida sob agitação.
- Fragmentos menores respondem melhor a etapa de multiplicação em meio de cultura líquida.
- Não há diferença significativa entre as diferentes composições dos meios de cultivo (MS e Y3) sendo o tempo de 30 dias o período mínimo necessário para essa etapa.

### Diferenciação

- O uso do regulador de crescimento 6-Benzilaminopurina na concentração (300  $\mu$ M) e condições estudadas não é eficiente na diferenciação de embriões somáticos em plantas completas a partir de calos de *C. nucifera* var. Anão Verde do Brasil de Jiqui (AVeJ) induzidos em meio contendo regulador de crescimento 2,4-D.
- A diferenciação e regeneração de explantes de *C. nucifera* induzidos em meio de cultura contendo regulador de crescimento Picloram, apresentam resultados que diferem aos encontrados na literatura. Protocolos de sucesso utilizam concentrações de 2,4-D como auxina indutora.

- A manutenção de estruturas embriogênicas em frascos RITA® se apresentou como opção a etapa de regeneração para *C. nucifera*.

## REFERÊNCIAS

- Alvard D, Cote F, Teisson C. 1993. Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation - Effects of temporary immersion of explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 32: 55–60.
- Von Arnold S, Sabala I, Bozhkov P, Dyachok J, Filonova L. 2002. Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 69: 233–249.
- Asghar MT, Yusof YA, Mokhtar MN, *et al.* 2019. Coconut (*Cocos nucifera* L.) sap as a potential source of sugar: Antioxidant and nutritional properties. *Food Science and Nutrition* 35: 1–11.
- Bandupriya HDD, Fernando SC, Vidhanaarachchil YRM. 2016. Micropropagation and Androgenesis in coconut: an assessment of Sri Lankan implication. *Cocos* 22: 31.
- Batugal P, Rao VR, Oliver J. 2005. *Coconut Genetic Resources. International Plant Genetic Resources Institute – Regional Office for Asia, the Pacific and Oceania (IPGRI-APO)*. Serdang, Selangor DE, Malaysia.
- Bett CC, Mweu CM, Nyende AB. 2019. *In vitro* regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L) through indirect somatic embryogenesis in Kenya. *African Journal of Biotechnology* 18: 1113–1122.
- Bettencourt GM de F, Zanella LB, Quoirin MGG, Degenhardt-Goldbach J. 2016. Efeito da fonte de carbono na embriogênese somática em *Bactris gasipaes*. *Pesquisa Florestal Brasileira* 36: 179.
- Bhatia S. 2015. Application of Plant Biotechnology In: *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences*. Elsevier, 157–207.
- Bhavyashree U, Lakshmi Jayaraj K, Muralikrishna KS, Sajini KK, Rajesh MK, Karun A. 2016. Initiation of coconut cell suspension culture from shoot meristem derived embryogenic calli: A preliminary study. *Journal of Phytology* 8: 13–16.
- Blake J. 1990. Coconut (*Cocos nucifera* L.): Micropropagation In: *Legumes and Oilseed Crops I. Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 538–554.
- Blake J, Hornung R. 1995. Somatic embryogenesis in coconut In: Jain SM, Gupta PK, Newton RJ, eds. *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*. Springer, 512.
- Boxtel J van, Berthouly M. 1996. High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 44: 7–17.

Branton RL, Blake J. 1983. Development of Organized Structures in Callus Derived from Explants of *Cocos nucifera* L. *Annals of Botany* 52: 673–678.

Branton R, Blake J. 1983. A lovely clone of coconuts. *New Scientist* 98: 554–557.

Buffard-Morel J, Verdeil JL, Pannetier C. 1992. Embryogénèse somatique du cocotier (*Cocos nucifera* L.) à partir d'explants foliaires: étude histologique. *Canadian Journal of Botany* 70: 735–741.

Campos SS de, Scherwinski-Pereira JE, Bernd RB, Fior CS, Schwaz SF. 2020. Somatic embryogenesis as an alternative for *in vitro* multiplication of *Butia odorata* from mature zygotic embryos. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 92: 1–13.

Chan JL, Saénz L, Talavera C, Hornung R, Robert M, Oropeza C. 1998. Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports* 17: 515–521.

Cueto C, Johnson V, Bourdeix R, et al. 2012. *Technical guidelines for the safe movement and duplication of Coconut (Cocos nucifera L.) germplasm using embryo culture transfer protocols* (VB Johnson, Ed.). Montpellier, France: Bioversity International/COGENT.

Debmandal M, Mandal S. 2011. Coconut (*Cocos nucifera* L.: Areaceae): In health promotion and disease prevention. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 4: 241–247.

Eeuwens CJ. 1976. Mineral Requirements for Growth and Callus Initiation of Tissue Explants Excised from Mature Coconut Palms (*Cocos nucifera*) and Cultured *in vitro*. *Physiologia Plantarum* 36: 23–28.

El-Gioushy SF, Liu R, Fan HK. 2020. A complete protocol to reduce browning during coconut (*Cocos nucifera* L.) tissue culture through shoot tips and inflorescence explants. *Plant Archives* 2: 2196–2204.

Etienne-Barry D, Bertrand B, Vasquez N, Etienne H. 1999. Direct sowing of *Coffea arabica* somatic embryos mass-produced in a bioreactor and regeneration of plants. *Plant Cell Reports* 19: 111–117.

Etienne H, Berthouly M. 2002. Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69: 215–231.

FAOSTAT. 2019. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. 24 Nov. 2019.

Fernando SC, Gamage CKA. 2000. Abscisic acid induced somatic embryogenesis in immature embryo explants of coconut (*Cocos nucifera* L.). *Plant Science* 151: 193–

198.

Fernando SC, Verdeil JL, Hocher V, Weerakoon LK, Hirimburegama K. 2003. Histological analysis of plant regeneration from plumule explants of *Cocos nucifera*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 72: 281–283.

Fki L, Masmoudi R, Drira N, Rival A. 2003. An optimised protocol for plant regeneration from embryogenic suspension cultures of date palm, *Phoenix dactylifera* L., cv. Deglet Nour. *Plant Cell Reports* 21: 517–524.

Foale M. 2005. An introduction to the coconut palm In: Batugal Pons VRR, Oliver J, eds. *Coconut Genetic Resources*. Serdang, Selangor DE, Malaysia: International Plant Genetic Resources Institute – Regional Office for Asia, the Pacific and Oceania (IPGRI-APO), 1–8.

Georgiev V, Schumann A, Pavlov A, Bley T. 2014. Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Engineering in Life Sciences* 14: 607–621.

Goh C-J, Lakshmanan P, Loh C-S. 1994. High frequency direct shoot bud regeneration from excised leaves of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.). *Plant Science* 101: 173–180.

Gomes HT, Bartos PMC, Balzon TA, Scherwinski-Pereira JE. 2016. Regeneration of somatic embryos of oil palm (*Elaeis guineensis*) using temporary immersion bioreactors. *Industrial Crops and Products* 89: 244–249.

Harries HC. 2012. Germination rate is the significant characteristic determining coconut palm diversity. *AoB Plants* 2012: pls045.

Harrison N, Oropeza C. 2008. Coconut lethal yellowing. *Characterization, Diagnosis and Management of Phytoplasmas*: 219–248.

Hashim AT, Ishak Z, Rosli SK, et al. 2018. Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) Somatic Embryogenesis In: Jain SM, Gupta P, eds. *Step Wise Protocols for Somatic Embryogenesis of Important Woody Plants*. Switzerland: Springer, 209–229.

Heringer AS, Steinmacher DA, Fraga HPF, et al. 2014. Improved high-efficiency protocol for somatic embryogenesis in Peach Palm (*Bactris gasipaes* Kunth) using RITA®.pdf. *Scientia Horticulturae* 24: 294–292.

Hornung R. 1995. Micropropagation of *Cocos nucifera* L. from plumular tissue excised from mature zygotic embryos. *In vitro Culture* 2: 38–41.

Hornung RKW. 1995. Developments in the micropropagation of *Cocos nucifera* L.

Hornung R, Verdeil JL. 1999. Somatic embryogenesis in coconut from immature

inflorescence explants. : 297–308.

Ibraheem Y, Pinker I, Böhme M. 2013. A comparative study between solid and liquid cultures relative to callus growth and somatic embryo formation in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Zaghlool. *Emirates Journal of Food and Agriculture* 25: 883–898.

Jain SM, Gupta P. 2018. *Step Wise Protocols for Somatic Embryogenesis of Important Woody Plants*.

Jayaraj KL, Bhavyashree U, Fayas TP, Sajini KK, Rajesh MK, Karun A. 2015. Histological studies of cellular differentiation during somatic embryogenesis of coconut plumule-derived calli. *Journal of Plantation Crops* 43.

Kalil-Filho AN, Resende MDV de. 2001. Melhoramento de Palmáceas In: Resende MDV de, ed. *Workshop: Melhoramento de Espécies Florestais e Palmáceas no Brasil*. Colombo-Paraná: Embrapa Florestas, 245.

Karnovsky MJ. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron-microscopy. *Journal of Cell Biology* 27: 137–138.

Karunaratne S, Periyapperuma K. 1990. Culture of immature embryos of coconut, *Cocos nucifera* L: Callus proliferation and somatic embryogenesis. *Cocos* 8: 13–22.

Koffi E, Sie R, Koffi Y, *et al.* 2016. Morphological Diversity among 18 Genitors of Vanuatu Tall (VTT) Coconut (*Cocos nucifera* L.) Population used in Crosses for Hybrids Resistant to Lethal Yellowing Disease Selection at Port-Bouët, Côte d'Ivoire. *Greener Journal of Agricultural Sciences* 6: 134–144.

Kong L, Holtz CT, Nairn CJ, *et al.* 2014. Application of airlift bioreactors to accelerate genetic transformation in American chestnut. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 117: 39–50.

Larkin PJ, Scowcroft WR. 1981. Somaclonal variation — a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics* 60: 197–214.

Lédo A da S, Passos EEM, Fontes HR, Ferreira JMS, Talamini V, Vendrame WA. 2019. Advances in Coconut palm propagation. *Revista Brasileira de Fruticultura* 41: 1–14.

Lee-Stadelmann OY, Lee SW, Hackett WP, Read PE. 1989. The formation of adventitious buds *in vitro* on micro-cross sections of hybrid *Populus* leaf midveins. *Plant Science* 61: 263–272.

Lima EBC, Sousa CNS, Meneses LN, *et al.* 2015. *Cocos nucifera* (L.)



(Arecaceae): A phytochemical and pharmacological review. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 48: 953–964.

Lorenzi H. 2004. *Árvore brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Nova Odessa, São Paulo.

Luis ZG, Scherwinski-Pereira JE. 2014. An improved protocol for somatic embryogenesis and plant regeneration in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from mature zygotic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 118: 485–496.

Machado LJ, Sartori RA, Marques DD, Nascimento AE da S, Furtado JM. 2020. Utilização da biomassa do coco verde (*Cocos nucifera* L.) para obtenção de subprodutos. *Brazilian Journal of Development* 6: 3808–3826.

Mahmoud M.Saker, Mai A.Allam AHG and AE-ZMH. 2007. Development of Suspension Culture System for *in vitro* Propagation of Date palm. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 5: 51–56.

Marbun CLM, Toruan-Mathius N, Reflini, Utomo C, Liwang T. 2015. Micropropagation of Embryogenic Callus of Oil Palm (*Elaeis Guineensis* Jacq.) Using Temporary Immersion System. *Procedia Chemistry* 14: 122–129.

Martins CR, Junior LA de J. 2014. Produção e comercialização de coco no Brasil frente ao comércio internacional: panorama 2014. *Comitê Local de Publicações da Embrapa Tabuleiros Costeiros* 1: 53.

Meerow AW, Broschat TK. 2012. Palm Seed Germination. *IFAS Extension*: 1–9.

Monteiro TR, Freitas EO, Nogueira GF, Scherwinski-Pereira JE. 2018. Assessing the influence of subcultures and liquid medium during somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 93: 196–203.

Monteiro TR, Luis ZG, Freitas E de O, Matsumoto K, Scherwinski-Pereira JE. 2011. Diluição celular, características do meio de cultura e biorreatores de imersão temporária na diferenciação e regeneração de células em suspensão de bananeira. *Revista Brasileira de Fruticultura* 33: 213–221.

Montero-Cortés M, Rodríguez-Paredes F, Burgeff C, *et al.* 2010. Characterisation of a cyclin-dependent kinase (CDKA) gene expressed during somatic embryogenesis of coconut palm. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 102: 251–258.

Morales AA. 2003. Estudio de diferentes estrategias para promover la embriogénesis somática en cocotero (*Cocos nucifera* L.) a partir de explantes de plúmula.

Moura EF, Ventrella MC, Motoike SY. 2010. Anatomy, histochemistry and

ultrastructure of seed and somatic embryo of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). *Scientia Agricola* 67: 399–407.

Muhammedali S, Thomas RJ. 2014. Studies on vivipary in dwarf coconut cultivars. *Indian Journal of Agricultural Sciences* 4: 464–468.

Murashige T, Skoog F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473–497.

Nguyen QT, Bandupriya HDDD, López-Villalobos A, Sisunandar S, Foale M, Adkins SW. 2015. Tissue culture and associated biotechnological interventions for the improvement of coconut (*Cocos nucifera* L.): A review. *Planta* 242: 1059–1076.

O'Brien TP, Feder N, McCully ME. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59: 368–373.

Osório ML, Gonçalves S, Coelho N, Osório J, Romano A. 2013. Morphological, physiological and oxidative stress markers during acclimatization and field transfer of micropropagated *Tuberaria major* plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 115: 85–97.

Perera PIP, Hoche V, Verdeil J-LL, Bandupriya HDD, Yakandawala DMD, Weerakoon LK. 2008. Androgenic potential in coconut (*Cocos nucifera* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 92: 293–302.

Perera PIP, Hoche V, Verdeil JL, Doubeau S, Yakandawala DMD, Weerakoon LK. 2007. Unfertilized ovary: A novel explant for coconut (*Cocos nucifera* L.) somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports* 26: 21–28.

Perera PIP, Vidhanaarachchi VRM, Gunathilake TR, et al. 2009. Effect of plant growth regulators on ovary culture of coconut (*Cocos nucifera* L.). *Plant Cell Reports*: 73–81.

Pérez-Núñez MT, Chan JL, Sáenz L, González T, Verdeil JL, Oropeza C. 2006. Improved somatic embryogenesis from *Cocos nucifera* (L.) plumule explants. *In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 42: 37–43.

Rajesh MK, Fayas TP, Naganeeswaran S, et al. 2016. De novo assembly and characterization of global transcriptome of coconut palm (*Cocos nucifera* L.) embryogenic calli using Illumina paired-end sequencing. *Protoplasma* 253: 913–928.

Ree JF, Guerra MP. 2015. Palm (Arecaceae) somatic embryogenesis. *In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 51: 589–602.

Rivera-Solís G, Sáenz-Carbonell L, Narváez M, Rodríguez G, Oropeza C. 2018. Addition of ionophore A23187 increases the efficiency of *Cocos nucifera* somatic

embryogenesis. *3 Biotech* 8: 366.

Sáenz L, Azpeitia A., Chuc-Armendariz B, *et al.* 2006. Morphological and histological changes during somatic embryo formation from coconut plumule explants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 42: 19–25.

Sáenz L, Herrera-Herrera G, Uicab-Ballote F, Chan JL, Oropeza C. 2010. Influence of form of activated charcoal on embryogenic callus formation in coconut (*Cocos nucifera*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 100: 301–308.

Saker MM, Allam MA, Goma AH, Abd El-zaher MH. 2007. Development of Suspension Culture System for *in vitro* Propagation of Date palm. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 5: 51–56.

Sandoval-Cancino G, Sáenz L, Chan JL, Oropeza C. 2016. Improved formation of embryogenic callus from coconut immature inflorescence explants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 52: 367–378.

Scherwinski-Pereira JE, da Silva Guedes R, da Silva RA, Fermino PCP, Luis ZG, de Oliveira Freitas E. 2012. Somatic embryogenesis and plant regeneration in açai palm (*Euterpe oleracea*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 109: 501–508.

Shareefa M, Thomas RJ, Nampoothiri CK, Karun A. 2014. Studies on vivipary in dwarf coconut cultivars. *Indian Journal of Horticulture* 71: 464–468.

Shareefa M, Thomas RJ, Sreelekshmi JS, Rajesh MK, Karun A. 2019. *In vitro* regeneration of coconut plantlets from immature inflorescence. *Current Science* 117: 813–820.

Silva IM de A, Scherwinski-Pereira JE. 2018. Somatic embryogenesis as tool for propagation of palm trees (Arecaceae): Principles, strategies and challenges In: Taoufik Bettaieb, ed. *Micropropagation of Ornamental Plants*. Nova Science Publishers, .

Silvosa- Millado CSC, Dejan ACM, Asumbrado MJLC, Delima AGD, Novero AU. 2020. Alternative Materials for Plumule Initiation and Callus Induction of Coconut (*Cocos nucifera* L.) cv. Laguna Tall. *Banwa B* 15.

Solís-Ramos LY, Andrade-Torres A, Senz Carbonell LA, Oropeza Sahn CM, Serna EC de la. 2012. Somatic Embryogenesis in Recalcitrant Plants In: *Embryogenesis*. INTECH Open Access Publisher, .

Steinmacher Douglas A., Clement CR, Guerra MP. 2007. Somatic embryogenesis from immature peach palm inflorescence explants: Towards development of an efficient protocol. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 89: 15–22.

Steinmacher DA, Guerra MP, Saare-Surminski K, Lieberei R. 2011. A temporary

immersion system improves *in vitro* regeneration of peach palm through secondary somatic embryogenesis. *Annals of Botany* 108: 1463–1475.

Steinmacher D. A., Krohn NG, Dantas ACM, *et al.* 2007. Somatic embryogenesis in peach palm using the thin cell layer technique: Induction, morpho-histological aspects and AFLP analysis of somaclonal variation. *Annals of Botany* 100: 699–709.

Sugimura Y, Murakami T, Sugimura Y, Murakami T, Sugimura Y, Murakami T. 1990. Structure and Function of the Haustorium in Germinating Coconut Palm Seed. *JARQ* 14: 1–14.

Tarmizi AH, Norjihan MA, Zaiton R. 2004. Multiplication of oil palm suspension cultures in bench-top (2-litre) bioreactor. *Journal of Oil Palm Research* 16: 44–49.

Tarmizi AH, Samsul KR, Zaiton R, Rosli MY. 2008. Multiplication of oil palm liquid cultures in bioreactors. *Journal of Oil Palm Research*: 44–50.

Teisson C, Alvard D. 1995. A New Concept of Plant *In vitro* Cultivation Liquid Medium: Temporary Immersion In: Terzi M, Cella R, Falavigna A, eds. *Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture. Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology*. Dordrecht: Springer Netherlands, 105–110.

Teixeira JB, Cid LPB. 2010. Biorreatores para a produção de mudas em larga escala In: Cid LPB, ed. *Cultivo in vitro de Plantas*. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 303.

Teixeira JB, Söndahl MR, Nakamura T, Kirby EG. 1995. Establishment of oil palm cell suspensions and plant regeneration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 40: 105–111.

Tonon G, Capuana M, Di Marco A. 2001. Plant regeneration of *Fraxinus angustifolia* by *in vitro* shoot organogenesis. *Scientia Horticulturae* 87: 291–301.

Touchet B de, Duval Y, Pannetier C. 1991. Plant regeneration from embryogenic suspension cultures of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Plant Cell Reports* 10: 529–532.

Tran Thanh Van K. 2003. Thin Cell Layer Concept In: Publishers KA, ed. *Thin Cell Layer Culture System: Regeneration and Transformation Applications*. Springer, 1–16.

Veramendi J, Navarro L. 1996. Influence of physical conditions of nutrient medium and sucrose on somatic embryogenesis of date palm. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 45: 159–164.

Verdeil JL, Buffard-Morel J, Pannetier C. 1989. Embryogénèse somatique du

cocotier. *Oleagineux* 44: 403–411.

Verdeil J-L, Hornung R, Jacobsen H-J, *et al.* 1999. Recent progress on coconut micropropagation through a joined effort involving different countries (SJM Oropeza C., Verdeil J.L., Ashburner G.R., Cardeña R., Ed.). *Current Advances in Coconut Biotechnology. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*: 391–405.

Verdeil JL, Huet C, Grosdemange F, Buffard-Morel J. 1994. Plant regeneration from cultured immature inflorescences of coconut (*Cocos nucifera* L.): evidence for somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports* 13: 218–221.

Vijay Selvaraj KS, Rajendran R, Saraladevi D, Maheswarappa HP. 2017. Evaluation of Coconut Hybrids Developed for High Nut and Copra. *Agricultural Research & Technology: Open Access Journal* 5: 84–87.

Wang FX, Shang GD, Wu LY, Xu Z-G, Zhao XY, Wang JW. 2020. Chromatin accessibility dynamics and a hierarchical transcriptional regulatory Network structure for plant somatic embryogenesis. *Developmental Cell*: 1–16.

Williams EG, Maheswaran G. 1986. Somatic Embryogenesis: Factors Influencing Coordinated Behaviour of Cells as an Embryogenic Group. *Ann. Bot.* 57: 443–462.

Yong JWH, Ge L, Ng YF, Tan SN. 2009. The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos Nucifera* L.) water. *Molecules* 14: 5144–5164.

Zeng F, Zhang X, Jin S, *et al.* 2007. Chromatin reorganization and endogenous auxin/cytokinin dynamic activity during somatic embryogenesis of cultured cotton cell. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 90: 63–70.

Ziv M. 2005. Simple bioreactors for mass propagation of plants In: Hvoslef-Eide AK, Preil W, eds. *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*. Dordrecht: Springer Netherlands, 79–93.