

Efeito de Soluções Crioprotetoras na Umidade de Embriões de Coqueiros Gigante do Brasil Praia do Forte (GBrPF) e Anão Verde do Brasil de Jiqui (AVeJBr)

José Edmário dos Santos¹, Francielen Paola de Sá², Semíramis Rabelo Ramalho Ramos³, Francisco Elias Ribeiro⁴, Ana da Silva Léo⁵

Resumo

A manutenção de bancos de germoplasma de coqueiro no campo tem sido a estratégia mais utilizada para a conservação de recursos genéticos. O valor e o papel dos métodos convencionais sempre terão grande importância na conservação de recursos genéticos, entretanto os elevados custos de manutenção e riscos de perda têm reforçado o estabelecimento de métodos complementares como a criopreservação. O objetivo do trabalho foi gerar conhecimento técnico-científico para aprimorar protocolos de criopreservação de coqueiros gigante do Brasil Praia do Forte e anão verde do Brasil de Jiqui como estratégia complementar de conservação de recursos genéticos de coqueiro. Para os estudos de criopreservação foram utilizados embriões zigóticos oriundos de plantas adultas de acessos de coqueiro anão verde do Brasil de Jiqui (AVeBrJ) e de coqueiro gigante do Brasil da Praia do Forte (GBrPF), provenientes do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de coco da Embrapa Tabuleiros Costeiros. Não houve efeito significativo dos tempos de imersão (24, 48 e 72 horas) na umidade dos embriões AVeBrJ, sendo que o valor médio obtido foi de 13,5% de umidade. Houve efeito altamente

¹ Graduando, bolsista CNPq/Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, edmario_jeds2012@hotmail.com.

² Pós-graduando de Doutorado, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE, francielenpaola@yahoo.com.br.

³ Engenheira-agrônoma, doutora em Melhoramento Genético de Plantas, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, semiramis.ramos@embrapa.br.

⁴ Engenheiro-agrônomo, doutor em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, francisco.elias@embrapa.br.

⁵ Engenheira-agrônoma, doutora em Fitotecnia, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, ana.ledo@embrapa.br.

significativo das soluções crioprotetoras na umidade dos embriões de coco AVeBrJ. Os embriões imersos na solução 1,75 M de sacarose + 15% glicerol apresentaram menor umidade (12,3%) quando comparado com a solução 3,33 M de glicose + 15% glicerol (14,6% de umidade). Não houve efeito significativo das soluções crioprotetoras na umidade dos embriões do acesso GBrPF. Os embriões imersos na solução C1 (meio Y3 + 3,33 M glicose) apresentaram umidade média de 20,06% e, na solução C2 (meio Y3 + 3,33 M glicose + 15% glicerol) 23,17%. Houve efeito significativo dos tempos de imersão, sendo que 24 horas de imersão proporcionou menor umidade (11,8%) quando comparado com 72 horas (29,1%).

Palavras-chave: *Cocos nucifera*, recursos genéticos, conservação *ex situ*, crioprotetor.

Introdução

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.) é uma das plantas tropicais que apresenta uma ampla gama de produtos e subprodutos para a utilização na alimentação humana, indústria, construção rural, confecção de artesanato, além de ser adaptado a solos de baixa fertilidade natural, e é cultivado em mais de 86 países. O Brasil, segundo dados da FAO de 2008, ocupa no mundo o quarto lugar em área colhida e produção de coco. A cocoicultura é uma alternativa para a base da agricultura sustentável nas pequenas e médias propriedades da região Nordeste, que ocupa o primeiro lugar de área plantada de coco no Brasil sendo responsável por 66% da produção total ocupando 46.642 ha. No total a exploração do coco gerou para o Nordeste, considerando apenas o valor da produção, cerca de 631,95 milhões de reais no ano de 2006 (IBGE, 2011). O Estado de Sergipe detém cerca de 10% da área ocupada de coco no Nordeste (IBGE, 2011). As principais variedades de coqueiro cultivadas no Brasil são gigante do Brasil Praia do Forte e anão verde do Brasil de Jiqui. A variedade gigante, que compõe 70% dos coqueirais brasileiros, apresenta crescimento rápido e sua fase vegetativa é longa, iniciando seu florescimento entre 5 a 7 anos quando cultivado em condições edafoclimáticas ideais. Esta variedade atinge normalmente de 20 a 30 m de altura, podendo produzir até 80 frutos/planta/ano, de tamanho que varia de médio a grande, e com vida econômica de 60 a 70 anos. No Brasil é muito empregado, in natura, para uso culinário (na produção de doces, bolos etc.), bem como na agroindústria de alimentos

para leite de coco, farinha de coco, entre outros. A variedade Anã, que compõe 20% dos coqueirais brasileiros, apresenta desenvolvimento vegetativo lento, é precoce, iniciando a produção em média com dois a três anos após o plantio. Chega a atingir 10 a 12 m de altura e tem vida útil em torno de 30 a 40 anos. Apresenta estipe delgado, folhas numerosas, porém curtas, produz um grande número de pequenos frutos (150 a 200 frutos/planta/ano), é mais sensível ao ataque de pragas, como ácaro, e doenças foliares. Em geral apresenta maiores exigências de clima e solo do que a variedade Gigante (RIBEIRO et al., 2002).

A manutenção de bancos de germoplasma de coqueiro no campo tem sido a estratégia mais utilizada para a conservação de recursos genéticos. O valor e o papel dos métodos convencionais sempre terão grande importância na conservação de recursos genéticos, entretanto os elevados custos de manutenção e riscos de perda têm reforçado o estabelecimento de métodos complementares como a criopreservação. A conservação de plantas *in vitro* se baseia no cultivo das coleções em laboratórios, a partir da técnica de cultura de tecidos, permitindo a rápida multiplicação e armazenamento de germoplasma de plantas em ambiente asséptico, livre de patógenos (GEORGE, 1993). O aprimoramento de protocolos de criopreservação de coqueiro é de primordial importância para estabelecer estratégias complementares de conservação e intercâmbio de germoplasma. As primeiras pesquisas no Brasil com criopreservação de coqueiro foram iniciadas em 2011 com o coqueiro AVEJBr na Embrapa Tabuleiros Costeiros, onde foi possível desenvolver um protocolo de desidratação de embriões e a adaptação de metodologias para estudo da viabilidade de embriões zigóticos após a desidratação (COPELAND-GOMES, 2010). O objetivo do trabalho foi gerar conhecimento técnico-científico para aprimorar protocolos de criopreservação de coqueiros gigante do Brasil Praia do Forte e anão verde do Brasil de Jiqui como estratégia complementar de conservação de recursos genéticos de coqueiro.

Material e Métodos

Para os estudos de criopreservação de coqueiro foram utilizados embriões zigóticos oriundos de plantas adultas de acessos de coqueiro anão verde do Brasil de Jiqui (AVEBrJ) e de coqueiro gigante do Brasil da Praia do Forte (GBrPF), provenientes do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de coco da Embrapa Tabuleiros Costeiros. No local de coleta cilindros de endosperma, contendo o embrião zigótico, foram extraídos de frutos maduros com 10-

11 meses de idade, e submetidos à assepsia com imersão em hipoclorito de sódio comercial 2-2,5%, seguida da tríplice lavagem em água potável. Posteriormente, o material foi acondicionado em recipientes estéreis e enviado ao Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, Sergipe. Em câmara de fluxo laminar, os embriões foram excisados dos cilindros de endosperma e submetidos à assepsia por meio da imersão em álcool etílico 70% por 30 segundos, em hipoclorito de sódio (2-2,5% v/v) por cinco minutos, seguida da tríplice lavagem em água destilada e estéril. Para avaliação do efeito das soluções crioprotetoras e dos tempos de imersão na desidratação, os embriões zigóticos do acesso AVeBrJ foram imersos em duas soluções crioprotetoras: C1 - meio Y3 (EEUWENS, 1976) + 1,75 M sacarose + 15% glicerol (COPELAND-GOMES, 2010) e C2 - meio Y3 + 3,33 M glicose + 15% glicerol (Assy-Bah e Engelmann, 1992) e os embriões do acesso GBrPF em C1 - meio Y3 + 3,33 M glicose e C2 - meio Y3 + 3,33 M glicose + 15% glicerol (ASSY-BAH e ENGELMANN, 1992), por 24, 48 e 72 horas sob agitação de 100 rpm em mesa orbital a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ na ausência de luz. Em seguida, os embriões zigóticos AVeBrJ e GBrPF foram desidratados em 80 g de sílica gel por 34 e 30 horas, respectivamente, conforme metodologia de N'NAN et al. (2012). Após cada período de imersão nas soluções crioprotetoras (24, 48 horas ou 72 horas) e permanência em sílica gel, 72 embriões foram pesados em balança digital, para determinação da massa fresca (MF). Em seguida, os embriões foram colocados em recipientes de metal e mantidos em estufa a 105°C por 18 horas para a determinação da massa seca (MS) (COPELAND-GOMES, 2010). A umidade dos embriões foi determinada utilizando a fórmula: $TU = (MF-MS)/MF \times 100$ (AOAC, 2003). Na avaliação do efeito das soluções crioprotetoras e tempo de imersão na umidade de cada acesso foi considerado um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2×3 (2 soluções crioprotetoras \times 3 tempos de imersão), com quatro repetições, sendo cada parcela composta por três embriões, perfazendo 72 embriões. As médias das variáveis foram submetidas à análise de variância e comparadas pelo teste de Tukey a 5% utilizando o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011).

Resultados e Discussão

Os embriões zigóticos do acesso AVeBrJ apresentaram umidade inicial média de 80,3%, porém, após a imersão nas soluções crioprotetoras e desidratação em sílica gel, houve a redução de 66,9% do teor de água. Não houve diferença entre os tempos de imersão (24, 48 e 72 horas) na umidade dos embriões AVeBrJ (Tabela 1), sendo que o valor médio obtido foi de 13,5% de umidade. Houve efeito altamente significativo das soluções crioprotetoras na umidade dos embriões de coco AVeBrJ. Os embriões imersos na solução C1 (meio Y3 + 1,75 M de sacarose + 15% glicerol) apresentaram em média menor umidade (12,3%) quando comparado com a solução C2 (meio Y3 + 3,33 M de glicose + 15% glicerol) (14,6% de umidade) (Figura 1).

Tabela 1. Resumo da análise de variância da umidade de embriões zigóticos de coqueiro AVeBrJ, em função de duas soluções crioprotetoras (S), durante três faixas de tempo de imersão (T)1.

Fonte de variação	GL	QM
Tempo (T)	2	0,8628 ns
Solução (S)	1	29,4844 **
Solução x Tempo	2	2,0886 ns
Resíduo	17	0,9379
CV%	7,17	

** Significativo a 5% de probabilidade, * significativo a 1% de probabilidade; ns Não significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Dados transformados em $(X + 0,5)^{1/2}$.

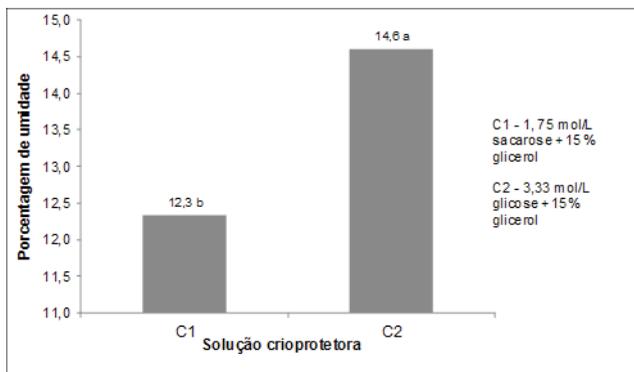


Figura 1. Umidade dos embriões zigóticos do acesso AVEBrJ em função de duas soluções crioprotetoras. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Não houve efeito significativo das soluções crioprotetoras na umidade dos embriões do acesso GBrPF (Tabela 2). Os embriões imersos na solução C1 (meio Y3 + 3,33 M glicose) apresentaram umidade média de 20,06% e, na solução C2 (meio Y3 + 3,33 M glicose + 15% glicerol) 23,17%.

Tabela 2. Resumo da análise de variância da umidade de embriões zigóticos de coqueiro GBrPF, em função de duas soluções crioprotetoras (S), durante três faixas de tempo de imersão (T)¹.

Fonte de variação	GL	QM
Solução	1	0,36 ns
Tempo	2	6,87*
Solução x Tempo	2	1,31 ns
Resíduo	12	1,12
CV%	23,46	

** Significativo a 5% de probabilidade, * significativo a 1% de probabilidade; ns Não significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ¹ Dados transformados em $(X + 0,5)^{1/2}$.

Houve efeito significativo dos tempos de imersão (Tabela 2), sendo que 24 horas de imersão proporcionou menor umidade (11,8%) quando comparado com 72 horas (29,1%) (Figura 2).



Figura 2. Umidade dos embriões zigóticos do acesso GBrPF em função dos três tempos de imersão nas soluções crioprotetoras. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para fins de criopreservação o tempo de 24 horas é o mais indicado, por proporcionar menor umidade, reduzindo os riscos de formação de cristais de gelo durante o congelamento.

Conclusões

A solução crioprotetora composta por meio Y3 + 1,75 M de sacarose + 15% glicerol proporciona menor umidade aos embriões zigóticos maduros de coco AVeBrJ, e as soluções crioprotetoras compostas por meio Y3 + 3,3 M de glicose e meio Y3 + 3,3 M de glicose + 15% de glicerol combinadas com o menor tempo de imersão de 24 horas proporcionam menor umidade aos embriões zigóticos maduros de coco GBrPF, podendo ser recomendadas para futuros protocolos de criopreservação.

Agradecimentos

À Embrapa, Rede Internacional de Recursos Genéticos (COGENT) e PROBIO II pelo aporte de recursos financeiros e ao CNPq pela concessão de bolsa.

Referências

AOAC International. **Official methods of analysis of AOAC International**. Gaithersburg, MD: Association of Official Analytical Chemists, 2003.

ASSY-BAH, B.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of mature embryos of coconut (*Cocos nucifera* L.) and subsequent regeneration of plantlets. **Cryo-Letters**, Lewes, UK, v. 13, p. 117-126, 1992.

COPELAND-GOMES, K. K. P. **Estudos fisiológicos e bioquímicos para criopreservação de embriões zigóticos de coqueiro anão verde de jiqui do Brasil**. 2010. 56f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Sergipe (UFS), São Cristóvão.

EEUWENS, C.J. Mineral requirements for growth and callus initiation os tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera*) and cultured in vitro. **Physiologia Plantarum**, Helsinki, Fl., v. 36, p. 23-28, 1976.

FERREIRA, D.F. SISVAR: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, MG, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. Part 1 – The technology. Edington, UK: Exegetics, 1996. 1574 p.

N'NAN, O.; BORGES, M.; KONAN, J.L.; HOCHER, V. VERDEIL, J,L.; TREGEAR, J.; N'GUETTA, A.S.P.; ENGELMANN, F.; MALAURIE, B. A simple protocol for cryopreservation of zygotic embryos of ten accessions of coconut (*Cocos nucifera* L.). **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Clenson, SC, v. 48, p. 160-166, 2012.

RIBEIRO, F.E.; SIQUEIRA, E.R. de.; ARAGÃO, W.M. Coqueiro. In: BRUCKNER, C.H. (Ed.) **Melhoramento de Fruteiras Tropicais**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2002. p. 225-249.