

Efeito de Soluções Crioprotetoras e Tempos de Imersão na Sobrevivência e Regeneração de Embriões de Coqueiro Gigante do Brasil Praia do Forte (GBrPF)

Caroline de Araújo Machado¹, Paulo Ricardo Marques², Aparecida Gomes de Araújo³, Ana da Silva Léo⁴

Resumo

O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito de soluções crioprotetoras e tempos de imersão na sobrevivência e regeneração de embriões criopreservados de coqueiro gigante do Brasil Praia do Forte (GBrPF), como alternativa para a conservação de recursos genéticos de coqueiro. Para os estudos de criopreservação de coqueiro foram utilizados embriões zigóticos oriundos de plantas adultas de acessos de coqueiro gigante do Brasil da Praia do Forte (GBrPF), provenientes do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de coco da Embrapa Tabuleiros Costeiros localizado no campo experimental de Betume, Platô de Neópolis, Sergipe. Os embriões assépticos foram imersos em duas soluções crioprotetoras: C1 - meio Y3 + 1,75 M sacarose + 15% glicerol e C2 - meio Y3 + 3,33 M glicose + 15% glicerol, onde permaneceram imersos nas soluções crioprotetoras por 24 e 48 horas. Parte dos embriões foi inoculada diretamente nos meios de regeneração, formado pelo meio de cultura Y3, suplementado com 60 g L⁻¹ de sacarose, 1 g L⁻¹ de carvão ativado e 5,8 g L⁻¹ de ágar (material não criopreservado, denominado NL-). O restante dos embriões foram colocados em criotubos (5 embriões/criotubo) com capacidade de 4 mL e submetido a criopreservação a -196°C por 48 horas (material criopreservado, denominado NL+). Após esse período, os embriões foram descongelados em banho maria a 38 ± 2°C por 3 minutos e, em seguida, inoculados em meio de regeneração descrito anteriormente. A solução

Bióloga, Pós-graduando de Doutorado, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE, caroline_machado866@hotmail.com

Biólogo, Pós-graduando de Mestrado, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE, Aracaju, SE, paricomar2@hotmail.com.

Engenheira-agrônoma, doutora, bolsista DCR/CNPq, Aracaju, SE, agaraujo2003@hotmail.com.

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

crioprotetora composta por 1,75 M de sacarose e 15% de glicerol proporciona $28,57 \pm 12,52$ de taxa de regeneração no tempo de 48h de imersão dos embriões zigóticos maduros de coco GBrPF, podendo ser recomendada para futuros protocolos de criopreservação.

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

Introdução

O banco de germoplasma de coco da Embrapa Tabuleiros resguarda uma variabilidade genética representativa da espécie oriunda de introduções e coletas realizadas desde 1982 (Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2009). O BAG está vinculado a Rede Nacional de Recursos Genéticos Vegetais da Embrapa com diversas atividades, dentre elas, ações de conservação *in vitro*. Desde 2006 por meio de um memorando de entendimento (MOA) entre Embrapa e Biodiversity Internacional, foi estabelecido na Embrapa Tabuleiros Costeiros, sob a coordenação da Rede Internacional de Recursos Genéticos do Coco (COGENT), o Banco Internacional de Germoplasma de Coco para a América Latina e Caribe (ICG-LAC).

Protocolos para a introdução de uma duplicata de segurança, a médio prazo por crescimento lento, já foram estabelecidos para o coco (Lédo et al., 2014). As principais variedades de coqueiro cultivadas no Brasil são gigante do Brasil Praia do Forte (GBrPF) 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 30m 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 (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. Alguns trabalhos com embriões zigóticos e explantes plumulares foram desenvolvidos no CIRAD com resultados promissores (BANDUPRIYA et al., 2010; MALAURIE et al., 2011; N'NAN et al., 2008, 2011, 2012). Entretanto, pesquisas para acessos coletados no Brasil são incipientes. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito de soluções crioprotetoras e tempos de imersão na sobrevivência e regeneração de embriões criopreservados de coqueiro gigante do Brasil Praia do Forte.

Material e Métodos

Para os estudos de criopreservação de coqueiro foram utilizados embriões zigóticos oriundos de plantas adultas de acessos de coqueiro gigante do Brasil da Praia do Forte (GBrPF), provenientes do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de coco da Embrapa Tabuleiros Costeiros localizado no campo experimental de Betume, Platô de Neópolis, Sergipe. No local de coleta dos frutos maduros com 10-11 meses de idade, foram retirados os cilindros de endosperma, contendo os embriões zigóticos, esses foram submetidos à desinfestação com imersão em hipoclorito de sódio comercial 2-2,5%, seguido 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. Em seguida foram submetidos à assepsia por meio da imersão em álcool etílico 70% por 30 segundos, em hipoclorito de sódio (1% v/v) por cinco minutos, seguida da tríplice lavagem em água destilada e estéril e, mantidos em placas de Petri. Para avaliação da qualidade dos embriões, amostras com 10 embriões foram inoculadas em meio Y3 (EEUWENS, 1976) e, determinadas as porcentagens de regeneração. Os embriões assépticos foram imersos em duas soluções crioprotetoras: C1 - meio Y3 + 1,75 M sacarose + 15% glicerol (COPELAND-GOMES, 2010) e C2 - meio Y3 + 3,33 M glicose + 15% glicerol (ASSY-BAH e ENGELMANN,

1992a), onde permaneceram imersos nas soluções crioprotetoras por 24 e 48 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 foram desidratados em 80 g de sílica gel por 30 horas, conforme metodologia de N'NAN et al. (2012). Parte dos embriões foi inoculada diretamente nos meios de regeneração, formado pelo meio de cultura Y3, suplementado com 60 g L^{-1} de sacarose, 1 g L^{-1} de carvão ativado e $5,8 \text{ g L}^{-1}$ de ágar (material não criopreservado, denominado NL-). O restante dos embriões foi colocado em criotubos (5 embriões/criotubo) com capacidade de 4 mL e submetido a criopreservação a -196°C por 48 horas (material criopreservado, denominado NL+). Após esse período, os embriões foram descongelados em banho maria a $38 \pm 2^\circ\text{C}$ por 3 minutos e, em seguida, inoculados no meio de regeneração descritos anteriormente.

As culturas foram mantidas na ausência de luz até o surgimento do primórdio foliar, após, transferidas para um ambiente com fotoperíodo de 16 h, temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa média do ar de 70% e intensidade luminosa de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Foram realizadas avaliações aos 90 dias de cultivo nos meios de regeneração, considerando a porcentagem de oxidação, porcentagem de sobrevivência e de regeneração, sendo sobreviventes aqueles embriões que se apresentaram intumescidos e/ou com o haustório expandido e, embriões regenerados aqueles com emissão de parte aérea e raiz. Para todas as variáveis foi realizada a análise descritiva com a determinação da média, desvio padrão e erro.

Resultados e Discussão

A maior oxidação foi observada quando os embriões zigóticos foram imersos em solução C1 por 24 horas (Tabela 1). Houve uma diferença na porcentagem entre as soluções crioprotetoras utilizadas, a solução C2 com imersão por 48 horas não promoveu a regeneração dos embriões nas condições NL- e NL+. A oxidação ocorre em função da liberação de compostos fenólicos em tecidos vegetais cultivados *in vitro* e, é um fenômeno observado em diversas espécies, principalmente lenhosas. A oxidação *in vitro* pode influenciar na absorção dos constituintes do meio pelo explante e, conseqüentemente, no crescimento destes, em virtude da obstrução do tecido oxidado, resultante da liberação de compostos fenólicos *in vitro*, precursores da síntese de lignina (VAN WINKLE et al., 2003).

Tabela 1. Porcentagem de oxidação, de sobrevivência e regeneração de embriões zigóticos de coqueiro GBrPF em função de duas soluções crioprotetoras (C1 e C2) dois tempos de imersão (24 e 48 horas).

Tratamentos	Embriões não criopreservados (NL -)			Embriões criopreservados (NL +)		
	Oxidação	Sobrevivência	Regeneração	Oxidação	Sobrevivência	Regeneração
C1T24	17,64 ± 39,29	82,35 ± 39,29	28,57 ± 46,88	0	100	12,5 ± 34,15
C1T48	0	93,33 ± 25,81	7,14 ± 26,72	0	100	28,57 ± 46,88
C2T24	0	84,61 ± 37,55	18,18 ± 40,45	0	100	21,42 ± 42,58
C2T48	0	100	0	0	100	0 ± 0
Testemunha	0	100	100			

C1 - meio Y3 + 1,75 M sacarose + 15% glicerol (COPELAND-GOMES, 2010) e C2 - meio Y3 + 3,33 M glicose + 15% glicerol (ASSY-BAH e ENGELMANN, 1992).

A solução que proporcionou maior desidratação do embrião foi a C1 (meio Y3 + 1,75 M sacarose + 15% glicerol), que teve maior taxa de regeneração. O tempo de imersão dos embriões também influenciou a sobrevivência e regeneração, sendo que a imersão por 48 horas promoveu maior desidratação dos embriões quando submetidos a conservação por nitrogênio líquido (NL+).

Em estudo com criopreservação de plúmulas de coqueiro Anão Amarelo da Malásia por encapsulamento e desidratação de coqueiro, N'NAN et al. (2008), obtiveram uma taxa de sobrevivência de $50 \pm 6\%$ em solução crioprotetora de 1M de sacarose por 48 horas e um período de dissecação de 8-14h. O tempo de desidratação é crucial para a regeneração do germoplasma criopreservado (Figura 1).

Fotos: Caroline de Araújo Machado



Figura 1. Regeneração de embriões zigóticos de coqueiro GBRPF em função de duas soluções crioprotetoras (C1 e C2) e dois tempos de imersão (24 e 48 horas).

Nesse caso, os autores utilizaram um explante menor, a plúmula, que é mais facilmente desidratada em comparação ao embrião zigótico. COPELAND-GOMES (2010), utilizando o pré-tratamento de embriões zigóticos maduros de coqueiro Anão Verde do Brasil de Jiqui com crioprotetor $1,75 \text{ mol.L}^{-1}$ de sacarose + 15% de glicerol por 12 e 16 horas verificou menor umidade dos embriões, esses dados corroboram com os resultados obtidos neste estudo realizado com o GBRPF.

Conclusões

A solução crioprotetora composta por 1,75 m de sacarose e 15% de glicerol proporciona maior taxa de regeneração no tempo de 48h de imersão de embriões zigóticos maduros de coco GBrPF, podendo ser recomendada para futuros protocolos de criopreservação.

Agradecimentos

À Embrapa, Rede Internacional de Recursos Genéticos (COGENT) e PROBIO II pelo aporte de recursos financeiros e à FAPITEC-SE/CNPq pela concessão de bolsa.

Referências

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.

BANDUPRIYA, H. D.; FERNANDO, S .C.; VERDEIL, J. L.; MALAURIE, B. Cryopreservation of encapsulated plumules of coconut: effect of transport/store conditions. **Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology**, Putra, MY, v.18, n.1, p.135-137. 2010.

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, FI, v.36, p.23-28, 1976.

EMBRAPA TABULEIROS COSTEIROS. **Banco ativo de germoplasma de coco (*Cocos nucifera* L.)**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2009. Disponível em: < http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes_2009/f_05.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2014.

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

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, SE.

LEDO, A. S.; MACHADO, C. A.; MOURA, C. R. F.; RAMOS, S. R. R.; SILVA, A. V. C.; LEDO, C. A. S. Mannitol for coconut ex situ conservation by minimum growth. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 49, p. 148-151, 2014.

MALAUURIE, B.; TREGGAR, J.; BANDUPRIYA, H. D. D.; VERDEIL, J. L.; BORGES, M.; N'NAN, O. Cryopreservation as a tool for the management of coconut germplasm. **Acta Horticulture**, Leuven, BE, v. 908, p. 461-466, 2011.

N'NAN, O.; HOCHER, V.; VERDEIL, J. L.; KONAN, J. L.; BALLO, K.; MONDEIL, F.; MALAUURIE, B. Cryopreservation by encapsulation–dehydration of plumules of coconut (*Cocos nucifera* L.). **Cryoletters**, Lewes, UK, v. 24, n. 4, p. 339-350, 2008.

N'NAN, O.; BORGES, M.; TREGGAR, J.; MALAUURIE, B.; BANDUPRIYA, H. D. D.; VERDEIL, J. L. Cryopreservation as a tool for the management of coconut germplasm. **Acta Horticulturae**, Leuven, BE, v. 98, p. 461-466, 2011.

N'NAN, O.; BORGES, M.; KONAN, J. L.; HOCHER, V. VERDEIL, J. L.; TREGGAR, J.; N'GUETTA, A. S. P.; ENGELMANN, F.; MALAUURIE, 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.

VAN WINKLE, S.; JOHNSON, S.; PULLMAN, G. S. The impact of gelrite and activated carbon on the elemental composition of plant tissue culture media. **Plant Cell Reports**, New York, v. 21, n. 12, p. 1175-1182, Aug. 2003.