

Foto: Ana da Silva Léo



Recomendações para o Intercâmbio e Resgate de Germoplasma de Coqueiro

Ana da Silva Léo¹
Leila Albuquerque Resende de Oliveira²
Caroline de Araújo Machado³
Francielen Paola de Sá⁴
Ana Veruska Cruz da Silva⁵
Semíramis Rabelo Ramalho Ramos⁶

O intercâmbio de genótipos de coqueiro tem aumentado entre países para ampliar a variabilidade em programas de conservação e melhoramento genético. No entanto, o movimento de germoplasma de coqueiro também representa um risco de transferência de pragas e doenças, uma vez que alguns destes problemas fitossanitários estão isolados geograficamente (CUETO et al., 2012).

Dentre diversas doenças que afetam o cultivo do coqueiro e à segurança na movimentação de material propagativo do coco entre países, destacam-se: o amarelecimento letal e o cadang-cadang (LÉDO et al., 2017).

O amarelecimento letal é causado por fitoplasmas que em alguns casos é transmitido por insetos vetores (GURR et al., 2016). O cadang-cadang por sua vez é causado pelo *viroide Coconut cadang cadang viroid* - CCCVd, cujo mecanismo de dispersão natural ainda não está esclarecido (PACUMBABA et al., 1994 citado por BATISTA et al., 2003). Essas doenças causam prejuízos econômicos e precauções são necessárias quando se transporta material vegetal de coqueiro para evitar a sua disseminação.

Em 1993, a Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) lançou o primeiro

documento orientador para o trânsito internacional seguro de germoplasma para a cultura do coqueiro, com ênfase nos procedimentos de intercâmbio de sementes, pólen e embriões zigóticos extraídos ou não do endosperma. Entretanto, a indexação de plantas na origem, e a quarentena no país receptor em transportes internacionais são essenciais para a aplicação segura de técnicas de cultura de tecidos de plantas no intercâmbio de recursos genéticos.

Dessa forma, técnicas de cultura e resgate de embriões simples e eficientes têm sido estabelecidas por vários grupos de pesquisa em diversos países para coleta, intercâmbio e conservação de germoplasma (ENGELMANN et al., 2002). Os principais protocolos para o cultivo in vitro de embriões zigóticos de coqueiro foram obtidos por institutos de pesquisa em diversos países como protocolos PCA e UPLB (Filipinas), CPCRI (Índia) e ORSTOM/IRD (França) (ENGELMANN et al., 2002). As diretrizes mais recentes do International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI) e da FAO (CUETO et al., 2012) recomendam o intercâmbio de discos de endosperma contendo

¹Engenheira-agrônoma, doutora em Fitotecnia, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

²Engenheira-florestal, mestre em Agroecossistemas, doutoranda da Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE.

³Bióloga, mestre em Agroecossistemas, Aracaju-SE.

⁴Bióloga, mestre em Biotecnologia, Curitiba, PR.

⁵Engenheira-agrônoma, doutora em Produção Vegetal, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

⁶Engenheira-agrônoma, doutora em Melhoramento Genético pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros Aracaju, SE.

o embrião zigótico ou embriões zigóticos in vitro. As recomendações incluem desde a seleção e o preparo das plantas mães doadoras até a transferência dos embriões zigóticos para meio de germinação. Ajustes nos protocolos de intercâmbio têm sido alvo de estudos, e uma padronização nos protocolos de introdução, com prioridade para a adoção de técnicas de cultura de tecidos de plantas, tem sido recomendada (CUETO et al., 2012).

O objetivo desta publicação é descrever a metodologia para o intercâmbio e resgate de embriões zigóticos de germoplasma de coqueiro desde a seleção de frutos e extração de discos de endosperma no campo, condições de transporte, introdução em laboratório, bem como etapas de recuperação e regeneração de plantas partir de estudos realizados pelo Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Tabuleiros Costeiros, em Aracaju, SE.

Obtenção de frutos, extração e assepsia de discos de endosperma com embriões zigóticos em campo

a) Os frutos devem ser coletados com 10 a 11 meses de maturação oriundos de áreas comprovadamente livres de pragas e doenças, conforme a legislação do país doador e receptor.

b) Após a coleta, os frutos devem ser imersos em solução de hipoclorito de sódio comercial (2% NaOCl a 5,25% NaOCl) por 30 min (CUETO et al., 2012), descascados, quebrados e abertos transversalmente (Figuras 1A e 1B). Sementes que estiverem em início de germinação, com haustório expandido internamente e com aspecto de deteriorado, deverão ser descartadas.

c) Com auxílio de extrator de disco que deverá ter, aproximadamente, 2,5 cm de diâmetro (Figura 1C), cilindros de endosperma, contendo os embriões zigóticos deverão ser extraídos da região dos poros germinativos (Figura 1D).

Fotos: Ana da Silva Lédó



Figura 1. Etapas da obtenção de discos de endosperma contendo embriões zigóticos a partir de frutos: **(A)** quebra transversal de fruto descascado; **(B)** abertura do fruto descascado; **(C)** extração do disco de endosperma com embrião zigótico na região dos poros germinativos (PG); **(D)** Discos de endosperma lavados em hipoclorito de sódio comercial 2% a 2,5% por 30 minutos e enxaguados em água potável.

d) Os discos de endosperma devem ser submetidos à esterilização com imersão em álcool 70% por 1 min a 2 min e, em seguida, hipoclorito de sódio comercial 2% a 2,5% por 30 min, seguido da tríplice lavagem em água potável.

Soluções mais concentradas de hipoclorito de sódio (5% a 6%) por 5 min a 7 min poderão ser utilizadas (CUETO et al., 2012), principalmente se o tempo da coleta de frutos, extração dos discos e chegada ao laboratório de destino for longo.

e) Posteriormente, os discos de endospermas contendo o embrião são acondicionados em sacos plásticos ou recipientes estéreis e enviados ao Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas.

f) Após a entrada no laboratório, o material poderá ser mantido na parte inferior da geladeira com temperatura entre 10 °C a 15 °C por no máximo dois dias (CUETO et al., 2012), quando serão processados.

Assepsia, excisão e inoculação dos embriões zigóticos em laboratório para remessa

a) Em câmara de fluxo laminar, os discos de endosperma devem ser submetidos à assepsia por meio da imersão em álcool etílico

70% por 30 segundos (Figura 2A), em hipoclorito de sódio (2% a 2,5% v/v) por cinco minutos, e lavados três vezes em água destilada e estéril (Figura 2B).

b) Em seguida, os embriões são excisados cuidadosamente com auxílio de pinça e bisturi autoclavados (Figuras 2C e 2D) e inoculados em microtubos de polipropileno estéreis (um embrião/microtubo) capacidade de 2 mL a 5 mL (Figura 2E) ou placas de Petri de polipropileno estéreis de 60 mm x 15 mm (4 embriões/placa), com 5 mL a 7 mL de meio de cultura (6 a 8 embriões/placa) (Figura 2F) ou de 90 mm x 15 mm contendo 15 mL a 20 mL de meio de cultura Y3 (EEWEENS, 1976), conforme Tabela 1, modificado sem sacarose com 5,8 g L⁻¹ de ágar (meio de transporte).

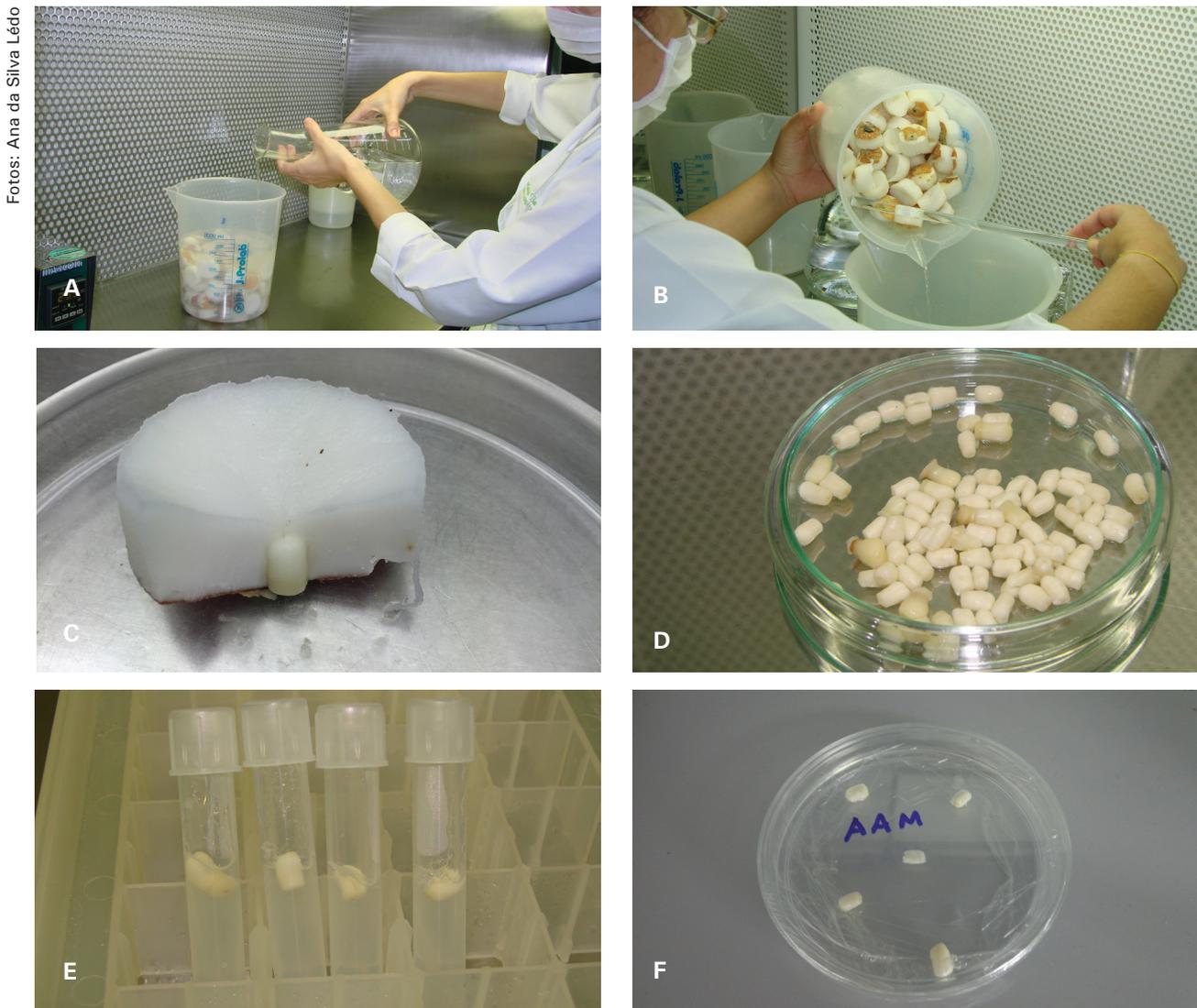


Figura 2. Etapas da assepsia de discos de endosperma, excisão e isolamento de embriões zigóticos de coqueiro: (A) imersão em álcool etílico dos discos de endosperma em câmara de fluxo laminar; (B) lavagem dos discos de endosperma com água autoclavada; (C) disco de endosperma com embrião zigótico; (D) embriões zigóticos excisados; (E) embriões de coqueiro anão amarelo da Malásia (AAM) inoculados em microtubo com capacidade de 5 mL, com 2 mL a 3 mL de meio de transporte; (F) embriões de coqueiro anão inoculados em placa de Petri com meio de transporte.

Tabela 1. Componentes do meio de cultura básico Y3.

Macronutrientes	mg.L ⁻¹
CaCl ₂ .2H ₂ O	294
KCl	1492
KNO ₃	2020
MgSO ₄ .7H ₂ O	247
NH ₄ Cl	535
Micronutrientes	mg.L ⁻¹
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,24
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,25
H ₃ BO ₃	3,1
KI	8,3
MnSO ₄ .4H ₂ O	11,2
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,24
NiCl ₂ . 6H ₂ O	0,024
ZnSO ₄ .7H ₂ O	7,2
FeEDTA	
FeSO ₄ .7H ₂ O	13,9
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,3
Vitaminas	µg.L ⁻¹
Ácido nicotínico	50
Biotina	50
Ca-pantotenato	50
Mio-Inositol	100
Piridoxina - HCl	50
Tiamina - HCl	500

Fonte: Eeuwens (1976).

c) Para transporte, placas de Petri ou microtubos deverão ser acondicionados em caixas térmicas resfriadas com gelo e enviados, o mais rápido

possível, para o laboratório de destino de processamento, não ultrapassando o prazo máximo de oito dias (Figura 3).

Fotos: Ana da Silva Léo



Figura 3. Etapas do acondicionamento de embriões zigóticos para transporte.

Cultura de embriões zigóticos no laboratório

a) Após o transporte, em laboratório de cultura de tecidos de plantas, os embriões são transferidos para frascos ou tubos de ensaio contendo 30 mL de meio de cultura Y3 (EWEENS, 1976) suplementado com 60 g L⁻¹ de sacarose, 1 g L⁻¹ de carvão ativado, 5,8 g L⁻¹ de ágar (opcional) e 0,5 µM de ácido giberélico (GA3) (meio de germinação modificado de LÉDO et al., 2007), Figura 4A.

b) As culturas são mantidas na ausência de luz até o surgimento do primórdio foliar (30 a 40 dias).

c) Em seguida, os embriões com parte aérea são inoculados em frascos ou tubos de ensaio contendo 30 mL de meio de cultura Y3 (EWEENS, 1976) suplementado com 40 g L⁻¹ de sacarose, 2,5 g L⁻¹ de carvão ativado, 5,8 g L⁻¹ de ágar, 2 mg L⁻¹ de ácido naftalenacético (ANA) e 0,5 mg L⁻¹ de benzilaminopurina (BAP) (LÉDO et al., 2007), Figura 4B.

Fotos: Ana da Silva Lédo



Figura 4. Etapas do desenvolvimento in vitro de embriões zigóticos de coqueiro anão: (A) estabelecimento; (B) desenvolvimento da parte aérea e raiz.

d) As culturas são transferidas para fotoperíodo de 12h a 16h, sob 52 µmol m⁻² s⁻¹ a 60 µmol m⁻² s⁻¹ de irradiância, temperatura de 25 °C ± 2 °C por 6 a 7 meses, com renovação de meio de cultura a cada 30 a 35 dias.

Aclimação das mudas

a) Após o período de cultivo in vitro que pode variar em função do genótipo, as plântulas são transferidas para casa de vegetação ou em viveiro telado com 50% a 60% de sombreamento dotado de sistema de irrigação por nebulização;

b) As mudas, após a retirada dos frascos e lavagem das raízes, são transplantadas em sacos perfurados de polietileno preto nas dimensões 28 cm x 20 cm, com substrato composto por mistura de areia lavada e pó de casca de coco seco, na proporção de 1:1, em volume.

c) Podem também ser utilizados vasos ou potes cerâmicos de diversas dimensões, e outros

substratos em função da disponibilidade e protocolo utilizado no laboratório de origem.

d) Recomenda-se na primeira e até a segunda semana o uso de câmara úmida individual com sacos plásticos transparentes para minimizar as perdas nessa etapa (Figura 5A).

d) As mudas devem ser suplementadas quinzenalmente com 30 mL/muda de solução nutritiva composta de 50% da concentração de sais do meio de cultura Y3.

e) As mudas devem permanecer na área de aclimação até seu completo desenvolvimento quando estão prontas para o plantio definitivo no campo, em torno de 90 a 120 dias, podendo esse período variar em função do genótipo.

f) Alguns protocolos recomendam a transferência das mudas, após a condição de sombreamento, para viveiros a céu aberto, antes do plantio definitivo (Figura 5B).



Figura 5. Etapas da acclimação de mudas de coqueiro regeneradas a partir da cultura de embriões zigóticos: **(A)** câmara úmida individual; **(B)** viveiro a céu aberto.

Considerações finais

O sucesso do intercâmbio de acessos de coqueiro por cultura de embriões zigóticos depende das condições fitossanitárias do campo de origem, laboratórios, casas ou telados de acclimação e protocolos eficientes de regeneração. Para tanto, a indexação de plantas na origem e quarentena no país receptor em transportes internacionais são essenciais para a aplicação segura da técnica. O uso de embriões zigóticos já excisados e mantidos em meio de cultura na ausência de sacarose, permite o transporte do germoplasma em condições assépticas até a chegada ao laboratório de destino, reduzindo sobremaneira as possibilidades de contaminação, quando comparado com o transporte de frutos e mudas que apresentam a possibilidade de introdução de insetos vetores e outros microrganismos. Além disso, devem ser consideradas a redução dos custos de transporte e a ampliação do tempo até a transferência dos embriões para o meio de germinação.

Considerando as variações em resposta *in vitro* do germoplasma de coqueiro e entre diferentes protocolos adotados em diversos países, esse documento apresentou as principais etapas do processo e isso pode contribuir para minimizar os riscos de introdução de pragas e doenças quarentenárias no Brasil em um processo de intercâmbio de germoplasma.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos assistentes de pesquisa da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Erivaldo Fonseca Moraes e Cleverson Matos Santos por todo apoio nas atividades de coleta e processamento de discos de endosperma de coco no Campo Experimental de Itaporanga.

Referências

- BATISTA, M. de F.; MARINHO, V. L. de A.; MILLER, R. Praga **Quarentenária A1 “Cadang Cadang Disease” Coconut Cadang-Cadang viroid (CCCvd)**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003. 5p. Comunicado Técnico, 88.
- CUETO, C. A.; JOHNSON, V. B.; ENGELMANN, F.; KEMBU, A.; KONAN, J. L.; KAN, M. K.; RIVERA, R. L.; VIDHANAARACHCHI, V.; BOURDEIX, R.; WEISE, S. F. **Technical guidelines for the safe movement and duplication of Coconut (*Cocos nucifera* L.) germoplasm using embryo culture transfer protocols**. COGENT; Bioversity International, Montpellier, France, 2012.
- 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**, Amsterdam, v.36, p.23-28, 1976.
- ENGELMANN, F.; BATUGAL, P.A. Background on the development and implementation of the coconut embryo *in vitro* culture project. In: ENGELMANN, F.; BATUGAL, P.A.; OLIVER, J. **Coconut embryo *in vitro* culture**. Malaysia: IPGRI-APO, 2002.
- GURR, G. M.; JOHNSON, A. C.; ASH, G. J.; WILSON, B. A. L.; ERO, M. M.; PILOTTI, C. A.; DEWHURST, C. F.; YOU, M. S. Coconut Lethal Yellowing Diseases: a phytoplasma threat to palms of global economic and social significance. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 20, n. 7, p. 1521, 2016.
- LÉDO, A. S.; GOMES, K. K. P.; BARBOZA, S.B.S.C ; VIEIRA, G. S. S. ; ARAGÃO, W. M. de;

TUPINAMBÁ, E. A. Cultivo in vitro de embriões zigóticos e aclimação de plântulas de coqueiro anão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, p. 147-154, 2007.

LÉDO, A. S.; PASSOS, E. E. M.; FONTES, H. R.; FERREIR, J. M. S.; TALAMINI, V.; VENDRAME, W. A. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 39, p. 75-90, 2017

Comunicado Técnico, 209

Embrapa Tabuleiros Costeiros
Endereço: Avenida Beira Mar, 3250,
CEP 49025-040, Aracaju, SE
Fone: (79) 4009-1344
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



1ª edição
On-line (2017)

Comitê de publicações

Presidente: Marcelo Ferreira Fernandes
Secretário-Executivo: *Marcus Aurélio Soares Cruz*
Membros: *Amaury da Silva dos Santos, Ana da Silva Lédo, Anderson Carlos Marafon, Joézio Luiz dos Anjos, Julio Roberto Araújo de Amorim, Lizz Kezzy de Moraes, Luciana Marques de Carvalho, Tânia Valeska Medeiros Dantas e Viviane Talamini*

Expediente

Supervisora editorial: *Flaviana Barbosa Sales*
Normalização bibliográfica: *Josete Cunha Melo*
Editoração eletrônica: *Beatriz Ferreira da Cruz*