

Foto: Ana da Silva Lédo

COMUNICADO
TÉCNICO

227

Aracaju, SE
Dezembro, 2019

Embrapa

Conservação a longo prazo de embriões zigóticos de coqueiro anão verde do Brasil de Jiqui

Ana da Silva Lédo
Caroline de Araújo Machado
Leila Albuquerque Resende de Oliveira
Annie Carolina Araújo de Oliveira
Ana Veruska Cruz da Silva
Semíramis Rabelo Ramalho Ramos

Conservação a longo prazo de embriões zigóticos de coqueiro anão verde do Brasil de Jiqui¹

¹ Ana da Silva Léo, Engenheira-agrônoma, doutora em Fitotecnia, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE. Caroline de Araújo Machado, Bióloga, doutora em Agricultura e Biodiversidade, bolsista de pós-doutorado, CNPq, Aracaju, SE. Leila Albuquerque Resende de Oliveira, Engenheira Florestal, doutora em Agricultura e Biodiversidade, bolsista de pós-doutorado, CNPq, Aracaju-SE. Annie Carolina Araújo de Oliveira, Engenheira-florestal, mestra em Agroecossistemas, Aracaju, SE. Ana Veruska Cruz da Silva, Engenheira-agrônoma, doutora em Produção Vegetal, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE. Semíramis Rabelo Ramalho Ramos, Engenheira-agrônoma, doutora em Melhoramento Genético, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.) é uma planta tropical que apresenta uma gama de produtos e subprodutos para uso em nutrição humana, indústria da construção, cosméticos e produtos farmacêuticos, dentre outros. Por ser adaptado a solos de baixa fertilidade natural, é cultivado em mais de 86 países. Em 2017, o Brasil ficou em sexto lugar no mundo, com produção em torno de 2.342.942 toneladas (FAO, 2019). A conservação de recursos genéticos do coqueiro geralmente é realizada em coleções de campo, devido ao tamanho e recalcitrância da semente, que dificulta seu armazenamento.

A criopreservação compreende a conservação do material vegetal em temperatura ultra baixa fornecida pelo nitrogênio líquido a -196 °C, ou com sua fase de vapor a -150 °C. A técnica se torna um procedimento viável para conservação de material biológico por longos períodos de tempo, exigindo

pouco espaço e manutenção (Benson, 2008). A criopreservação tem sido usada para conservação de recursos genéticos em muitas espécies. Resultados promissores foram relatados para embriões zigóticos, plumulas e pólen de coqueiro usando diferentes técnicas de criopreservação (Sajini et al., 2011; Cueto et al., 2014; Ledo et al., 2018).

A conservação de material genético em longo prazo possibilita principalmente a implantação de bancos de germoplasma ou coleções complementares à conservação de campo e estoque de material propagativo pronto para regeneração em qualquer época do ano. O material biológico pode ser conservado por longos períodos em nitrogênio líquido, uma vez que a temperatura reduz de forma significativa à atividade metabólica do material (Benson, 2008). Entretanto, estudos de avaliação da estabilidade genética e da integridade biológica do material criopreservado é essencial para

se determinar a longevidade do material e a estabilidade das condições de armazenamento (Santos; Salomão, 2010).

O objetivo desta publicação é descrever a metodologia de criopreservação e regeneração de embriões zigóticos de coqueiro anão verde do Brasil de Jiqui (AVeBrJ) desenvolvida pelo Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Tabuleiros Costeiros, em Aracaju, SE.

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

a) Os frutos devem ser coletados com 10 a 11 meses de maturação oriundos de bancos de germoplasma ou plantios com certificação fitossanitária e genética.

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

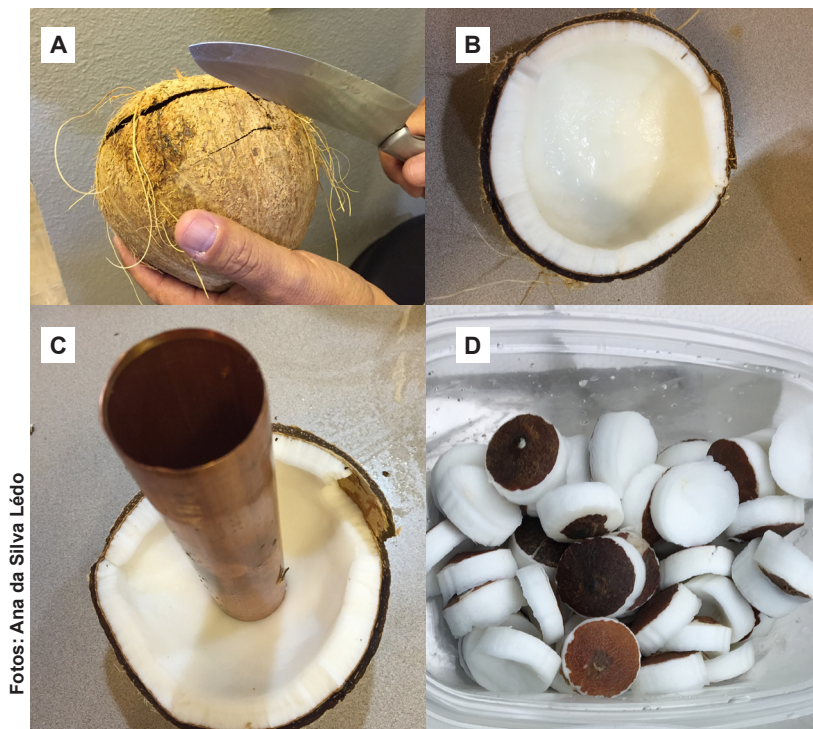
c) Com auxílio de extrator de disco ou cilindro de endosperma que deverá ter,

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).

d) Os discos de endosperma devem ser submetidos à esterilização com imersão em álcool 70% por 1-2 minutos e, em seguida, hipoclorito de sódio comercial 2%-2,5% por 30 minutos, seguido da tríplice lavagem em água potável (Figuras 1E e 1F). Soluções mais concentradas de hipoclorito de sódio (em torno de 5%-6%) por 5 a 7 minutos 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, são acondicionados em sacos plásticos ou recipientes estéreis e enviados ao Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas.

f) O material, após a entrada no laboratório poderá ser mantido na parte inferior de geladeira com temperatura entre 10 °C a 15 °C por 2 a 4 dias.



Fotos: Ana da Silva Léo

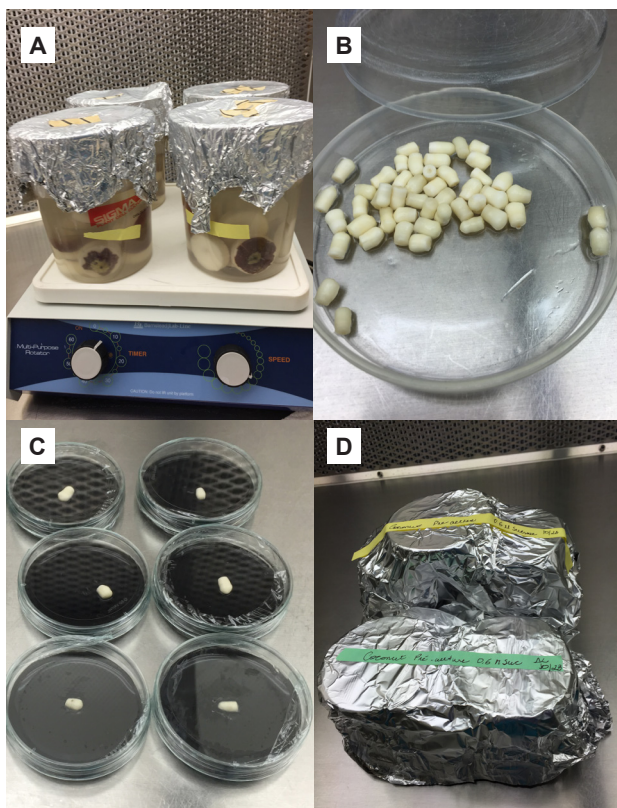
Figura 1. Etapas da obtenção de discos de endosperma contendo embriões zigóticos de coqueiro AVeBrJ a partir de frutos maduros (10-11 meses de idade). A) quebra transversal de fruto descascado; B) abertura do fruto descascado e poros germinativos (PG); C) extração do disco de endosperma com embrião zigótico na região dos poros germinativos; D) discos de endosperma lavados em hipoclorito de sódio comercial 2%-2,5% por 30 minutos e enxaguados em água potável.

Assepsia e excisão e pré-cultura dos embriões zigóticos

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%-2,5% v/v) por cinco minutos, sob agitação, e lavados três vezes em água destilada e estéril.

b) Em seguida, os embriões são excisados e pré-cultivados (Figuras 3B e 3C), na ausência de luz, por 72 horas em meio Y3 (Eeuwens, 1976) contendo sacarose 0,6 M + 2,2 g L⁻¹ de agente gelificante (adaptado de Sajini et al., 2011).



Fotos: Ana da Silva Léo

Figura 2. Etapas da assepsia de discos de endosperma, excisão e inoculação em meio de pré-cultivo de embriões zigóticos de coqueiro AVeBrJ: A) imersão em hipoclorito de sódio 2%-2,5% dos discos de endosperma em câmara de fluxo laminar; B) embriões zigóticos excisados; C) embriões inoculados em placa de Petri com meio de pré-cultivo; D) embriões na ausência de luz.

Crioproteção e criopreservação de embriões zigóticos

a) Após o pré-cultivo, em câmara de fluxo laminar, os embriões zigóticos são transferidos para erlenmeyers com solução de crioproteção PVS3 (Nishizawa et al., 1993) composta de

2 M de glicerol e 0,4 M de sacarose em meio de cultura padrão Y3 líquido. Em seguida, os erlenmeyers vedados são transferidos para mesa orbital com rotação de 90 rpm por 16 horas (Sajini et al., 2011).

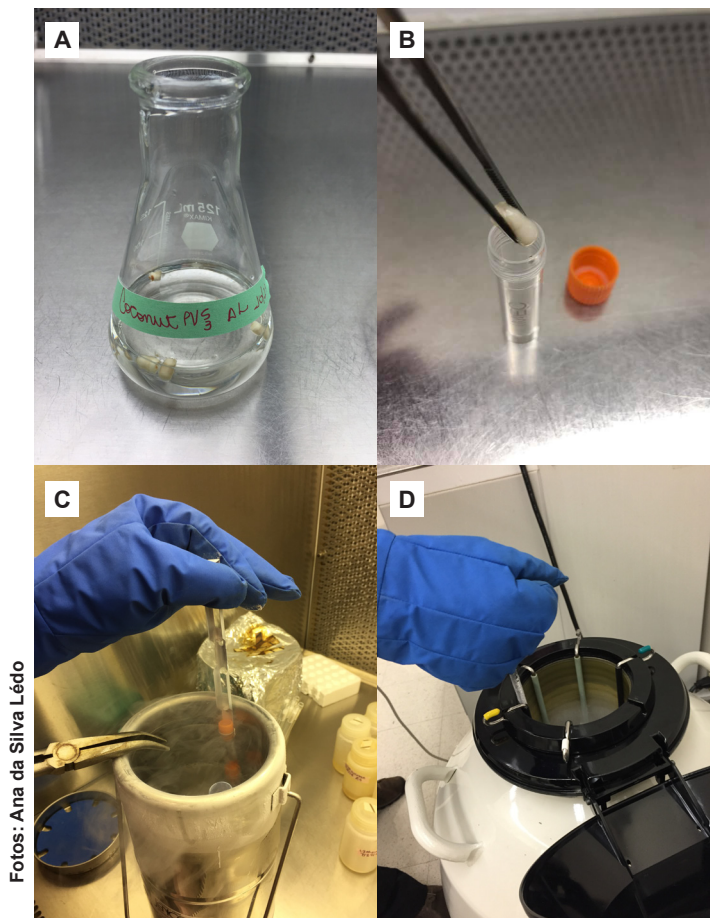
c) Após esse período, são transferidos para frascos (criotubos capacidade de 3 ou 5 mL com 3 a 5 embriões/criotubo) de polipropileno estéreis (Figura 3B),

inseridos em canisters (Figura 3C) e rapidamente imersos em nitrogênio líquido em recipiente de transporte (Figura 3D).

d) Em seguida, os canisters contendo os criotubos com os embriões zigóticos são rapidamente retirados do

recipiente de transporte e inseridos em canecas do tambor de nitrogênio líquido;

e) Os tambores de nitrogênio líquido devem ser mantidos em ambiente com temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, com nível adequado de nitrogênio líquido conforme capacidade dos mesmos.



Fotos: Ana da Silva Léo

Figura 3. Crioproteção e conservação in vitro de embriões zigóticos de coqueiro AVEBrJ: A) imersão dos embriões em solução crioprotetora PVS3 com 2 M de glicerol e 0,4 M de sacarose; B) transferência dos embriões para o criotubo; C) imersão do canister em recipiente de transporte com nitrogênio líquido; D) tambor de nitrogênio líquido.

Descongelamento e regeneração de embriões zigóticos

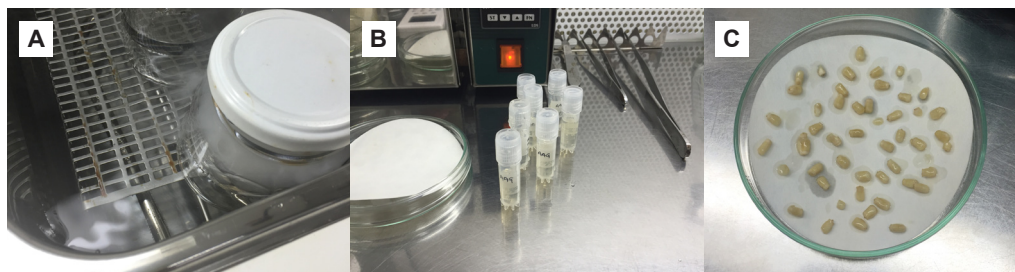
a) Após a criopreservação, os criotubos contendo os embriões são retirados rapidamente do nitrogênio líquido e colocados em banho-maria (BM) a 38 ± 2 °C por 2-3 minutos (Figura 4A); ou podem ser imersos em solução de descarregamento à temperatura ambiente, composta de meio Y3 com 1,2 M de sacarose por 90 minutos, com troca de toda solução após os 30 primeiros minutos (Figura 4B).

b) Após o descongelamento os embriões são mantidos à temperatura

ambiente por 5 minutos em placas com papel de filtro para retirada do excesso de solução (Figura 4C).

b) Os embriões descongelados são transferidos para meio de regeneração composto pelos sais e vitaminas do meio Y3 + 45 g L⁻¹ de sacarose + agente gelificante. As culturas são mantidas em sala de crescimento com temperatura 25 ± 2 °C, umidade relativa do ar 70% e intensidade luminosa de 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, na ausência de luz por duas semanas. Posteriormente são transferidas para um fotoperíodo de 16/8 horas (Figura 5).

c) Aproximadamente após 6 a 7 meses de cultivo in vitro, as plântulas estão prontas para a etapa de aclimação.



Fotos: Ana da Silva Léo

Figura 4. Descongelamento dos embriões zigóticos de coqueiro AVeBrJ. A) em banho-maria a 38 ± 2 °C por 2-3 minutos; B) em solução de descarregamento meio Y3 com 1,2 M de sacarose por 90 minutos; C) embriões zigóticos descongelados antes da inoculação em meio de regeneração.

Foto: Ana da Silva Léo



Figura 5. Plântulas de coqueiro AVEBrJ em meio de regeneração Y3 aos 4 meses.

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

Continua...

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.

Considerações finais

A criopreservação de embriões zigóticos de coqueiro anão verde do Brasil de Jiqui possibilitará a implantação de coleções ou bancos de germoplasma como forma complementar às coleções de campo, além de estoque de material propagativo com viabilidade na fase de regeneração, em média, de 70%.

Estudos para validação do protocolo com acompanhamento da longevidade e integridade deverão ser conduzidos após a implantação do criobranco de coco.

A técnica pode ser utilizada por programas de conservação de recursos genéticos e melhoramento do coqueiro.

Agradecimentos

Os autores agradecem os assistentes de pesquisa 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 e ao CNPq pelo aporte de recursos financeiros e bolsa.

Referências

BENSON, E. E. Cryopreservation of phytodiversity: a critical appraisal of theory & practice. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 27, p. 141-219, 2008.

CUETO, C. A.; JOHNSON, V.; BOURDEIX, R.; ENGELMANN, F.; KEMBU, A.; KONAN, J-L; KOUASSI, K. M.; OROPEZA, S. C. M.; RIVERA, R. L.; VIDHANARACHCHI, V. R. M.; WEISE, S. **Technical guidelines for the safe movement and duplication of Coconut (*Cocos nucifera* L.) germoplasm using embryo culture transfer protocols**. Montpellier, FRA: COGENT; Bioversity International, 2012.

CUETO, C.; RIVERA, R. L.; KIM, H. H.; KONG, H. J.; BAEK, H. J.; SEBASTIAN, L.; PARK, H. J. Development of cryopreservation protocols for cryobanks of coconut zygotic embryos. **Acta Horticulture**, v.1039, p.297-300, 2014. DOI: 10.17660/ActaHortic.2014.1039.37.

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

FAO. Statistic data base. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em: 20 agosto de 2019.

LÉDO, A. da S.; JENDEREK, M.; SKOGERBOE, D.; STAATS, E.; MACHADO, C. A.; OLIVEIRA, L. A. R. Cryopreservation of zygotic embryos of the Brazilian Green Dwarf coconut. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 53, p. 514-517, 2018.

NISHIZAWA, S.; SAKAI, A.; AMANO, Y.; MATSUZAWA, T. Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification. **Plant Science**, v.91, p.67-73, 1993. DOI:10.1016/0168-9452(93)90189-7.

SAJINI, K. K.; KARUN, A.; AMAMATH, C. H.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of coconut (*Cocos nucifera* L.) zygotic embryos by vitrification. **CryoLetters**, v. 32, p. 317-328, 2011.

SANTOS, I. R. I.; SALOMÃO, A. N. **Manual de curadores de germoplasma vegetal**: criopreservação. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010. 16 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 319).

Unidade responsável pelo
conteúdo e edição:

Embrapa Tabuleiros Costeiros

Av. Paulo Barreto de Menezes, nº 3.250,
Bairro Jardins, CEP: 49025-040, Aracaju, SE
Fone: +55 (79) 4009-1300
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

1ª edição

Publicação digitalizada (2019)



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



Comitê Local de Publicações
da Unidade Responsável

Presidente

Ronaldo Souza Resende

Secretário-Executivo

Ubiratan Piovezan

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,
Viviane Talamini*

Supervisão editorial

Flaviana Barbosa Sales

Normalização bibliográfica

Josete Cunha Melo

Projeto gráfico da coleção

Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica

Aline Gonçalves Moura

Foto da capa

Ana da Silva Lédo