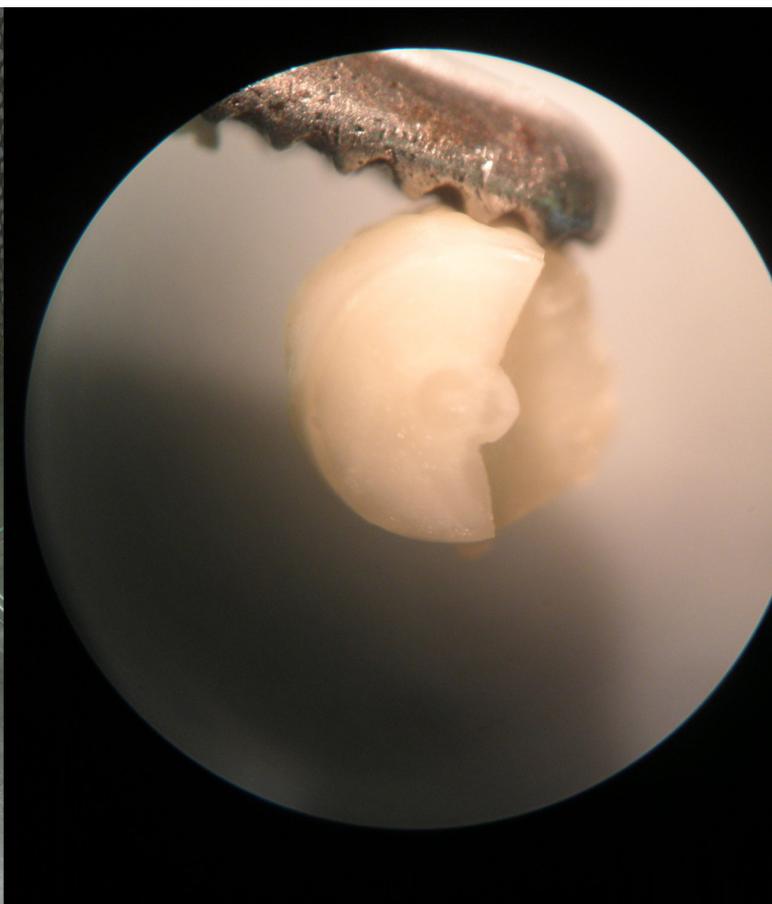




Fotos: Ana da Silva Lédo e Caroline de Araújo Machado



COMUNICADO
TÉCNICO

233

Aracaju, SE
Agosto, 2020

Embrapa

Criopreservação por vitrificação em gotas de plúmulas de embriões zigóticos de coqueiro anão verde do Brasil de Jiqui

Ana da Silva Lédo
Fernanda Vieira Santana
Annie Carolina Araújo de Oliveira
Caroline de Araújo Machado
Ana Veruska Cruz da Silva
Semíramis Rabelo Ramalho Ramos

Criopreservação por vitrificação em gotas de plúmulas de embriões zigóticos de coqueiro anão verde do Brasil de Jiqui¹

¹ Ana da Silva Lédo, Engenheira-agrônoma, doutora em Fitotecnia, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE. Fernanda Vieira Santana, Engenheira Florestal, doutoranda PPGAGRI em Agricultura e Biodiversidade, bolsista CAPES, Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE. Annie Carolina Araújo de Oliveira, Engenheira Florestal, doutora em Agricultura e Biodiversidade, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE. Caroline de Araújo Machado, Bióloga, doutora em Agricultura e Biodiversidade, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 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.

A conservação dos recursos genéticos do coco é realizada principalmente por meio de coleções e bancos de germoplasma em campo devido ao tamanho e recalcitrância das sementes, dificultando seu armazenamento (N'Nan et al., 2008). A criopreservação compreende a conservação do material vegetal em temperatura ultra baixa fornecida pelo nitrogênio líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, ou com sua fase de vapor a $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$. Assim, 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 de muitas espécies. Resultados promissores vêm sendo publicados para diversos acessos de coqueiro combinando diversas técnicas (encapsulamento-desidratação, vitrificação, vitrificação

em gotas) e explantes (embriões zigóticos, plúmulas, polen, inflorescências e folhas imaturas), conforme Sajini et al. (2011); Cueto et al. (2014); Machado et al. (2014); Welewanni et al. (2017). Estudos para o coqueiro anão verde do Brasil de Jiqui (AVEBrJ) são mais recentes (Lédo et al., 2018, 2019 e 2020).

A conservação de material genético em longo prazo possibilita principalmente a implantação de bancos de germoplasma ou coleções de segurança complementares à conservação de campo, com menor demanda de espaço físico, menor custo com manutenção 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).

São várias as técnicas para a criopreservação de material vegetal, mas a vitrificação em gotas está entre a mais utilizada por sua eficiência para várias espécies (Sakai; Engelmann, 2007; Sakai et al., 2008). A vitrificação consiste na transição da água para o estado vítreo, um estado semissólido e amorfo no qual, ela apresenta alta viscosidade, porém, sem que ocorra formação de cristais, responsáveis pelos maiores danos às estruturas celulares durante o congelamento (Benson et al., 2007). Na técnica os explantes são individualmente expostos a gotas da solução crioprotetora dispostas em lâmina de alumínio, seguida da imersão em nitrogênio líquido (Sakai et al., 2008).

O objetivo desta publicação é descrever a metodologia de criopreservação de plúmulas de embriões zigóticos de coqueiro AVeBrJ pela técnica de vitrificação em gotas desenvolvida pelo Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Tabuleiros Costeiros.

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

Esta etapa e a seguinte seguem as recomendações de Léo et al. (2019).

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. 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 (com 2,5 cm de diâmetro), retirar discos de endosperma da região dos poros germinativos.

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.

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.

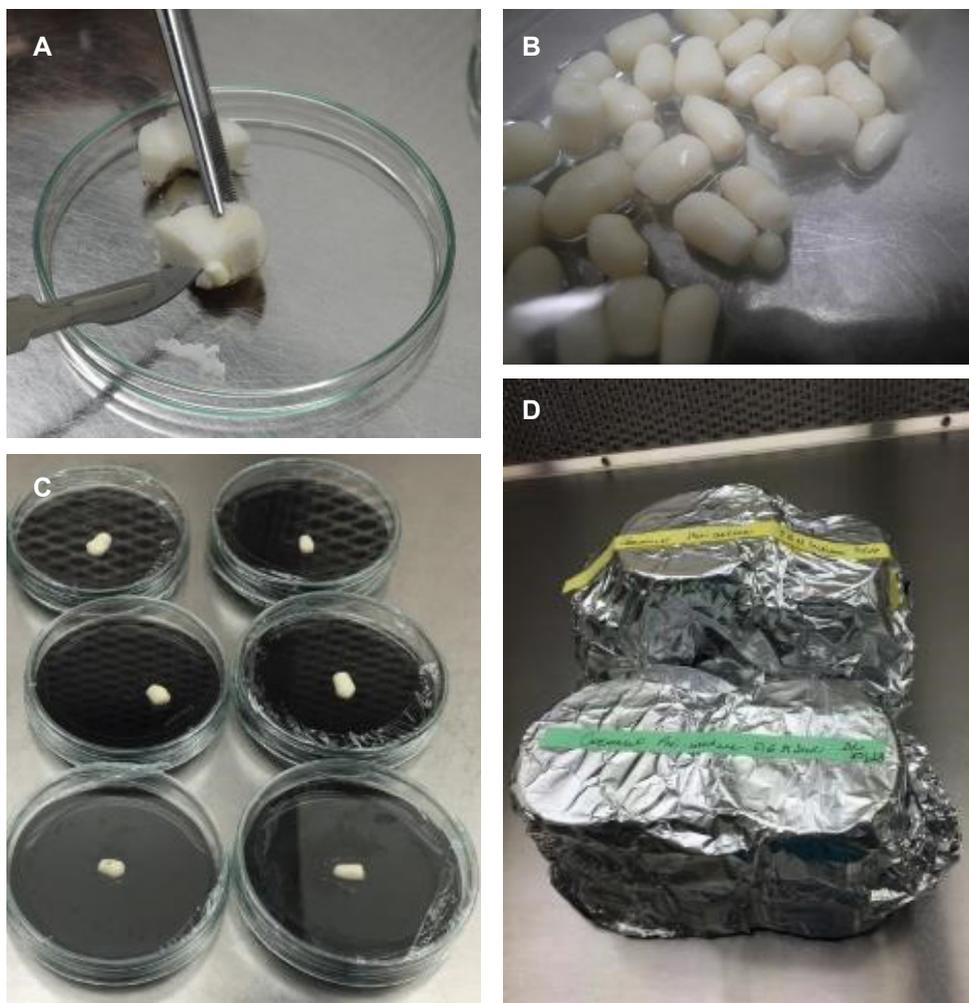
e) Posteriormente, são acondicionados em sacos plásticos ou recipientes estéreis e enviados ao Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas.

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 dois a quatro dias.

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 1A), 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 1B, 1C e 1D), na ausência de luz, por 72 horas em meio Y3 (Eeuwens, 1976) contendo sacarose 0,6 M + 2,2 g/L de agente gelificante (adaptado de Sajini et al., 2011).

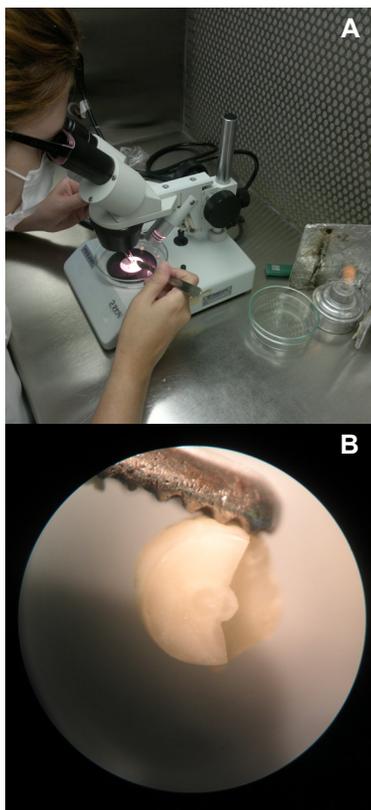


Fotos: Ana da Silva Léo

Figura 1. Etapas da excisão e inoculação em meio de pré-cultivo de embriões zigóticos de coqueiro AVEBrJ: A- Excisão de embriões dos discos de endospermas assépticos; B- Embriões zigóticos excisados; C- Embriões inoculados em placa de Petri com meio de pré-cultivo; D- Embriões na ausência de luz.

Criopreservação de plúmulas por vitrificação em gotas

a) Após o pré-cultivo, as plúmulas são excisadas dos embriões zigóticos em câmara de fluxo laminar com auxílio de lupa (Figuras 2A e 2B).



Fotos: Ana da Silva Léo e Caroline de Araújo Machado

Figura 2. Obtenção de plúmulas após o pré-cultivo de embriões zigóticos maduros de coqueiro AVeBrJ. A- Excisão de plúmulas com auxílio de lupa; B- Detalhe da plúmula na região central superior do embrião zigótico.

b) Após a excisão, serão expostas à Solução de Vitrificação de Planta 2 - PVS2 (Sakai et al., 1990): (30% (v/v) de glicerol; 15% (v/v) de etileno glicol e 15% (v/v) dimetilsulfóxido-DMSO ou solução de vitrificação de plantas 3- PVS3 (Nishizawa et al., 1993; Kim et al., 2009): soluções de 50% de glicerol (p/v) e 50% de sacarose (p/v).

c) Para este fim, são adicionadas gotas contendo 0,25 mL de solução crioprotetora (PVS2 ou PVS3) a temperatura de 0 °C com o auxílio de uma pipeta Pauster ou micropipeta em tiras de papel alumínio (~ 5 mm x 15 mm, 05-10 gotas / tira de alumínio), Figura 3A. Para manutenção da temperatura todo o procedimento deve ser realizado com as placas mantidas sobre condição de resfriamento por meio de placa de gelo.

d) As plúmulas são mantidas por 30 minutos nas gotas de solução crioprotetora (1 plúmula/gota) e, em seguida, as tiras de alumínio são inseridas nos criotubos de poliestireno estéril de 2 mL de capacidade imersos em nitrogênio líquido-NL (Figura 3B).

e) Os criotubos são fechados inseridos em canisters e rapidamente imersos em NL em recipiente de transporte (Figura 3C).

f) Em seguida, são rapidamente retiradas do recipiente de transporte e inseridos em canecas do tambor de NL;

g) Os tambores de NL devem ser mantidos em ambiente com temperatura de 25 ± 2 °C, com nível adequado de NL conforme capacidade dos mesmos.



Fotos: Ana da Silva Léo

Figura 3. Criopreservação por vitrificação em gotas de plúmulas de coqueiro AVeBrJ: A- Exposição das plúmulas as gotas de solução crioprotetora em tira de alumínio; B- Detalhe da tira de alumínio resfriada com as gotas de solução crioprotetora; C- Preparo dos criotubos com as tiras de alumínio e plúmulas.

Reaquecimento das plúmulas e indução de calos embriogênicos

a) Os criotubos contendo as plúmulas são retirados rapidamente do tambor de NL, abertos e imersos em solução de descarregamento à temperatura ambiente, composta de meio Y3 com 1,2 M de sacarose por 15 a 20 minutos (Figura 4A e 4B).

b) Após o reaquecimento as plúmulas são mantidas à temperatura ambiente por 5 minutos em placas com papel de filtro para retirada do excesso de solução.

c) Em seguida, são transferidas para placas de Petri estéreis de 140 mm x 15 mm, contendo meio de regeneração composto por sais e vitaminas do meio de cultura Y3 com 50 g/L de sacarose; 100 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D); 3 g/L de carvão ativado e 2,2 g/L de agente gelificante (Figura 4C).

d) As culturas são mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada de 25 ± 2 °C, umidade relativa de cerca de 70% na ausência de luz até a formação das primeiras estruturas embriogênicas (Figura 4D), que são transferidas para luz indireta ($26 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) fotoperíodo de 16/8 horas.

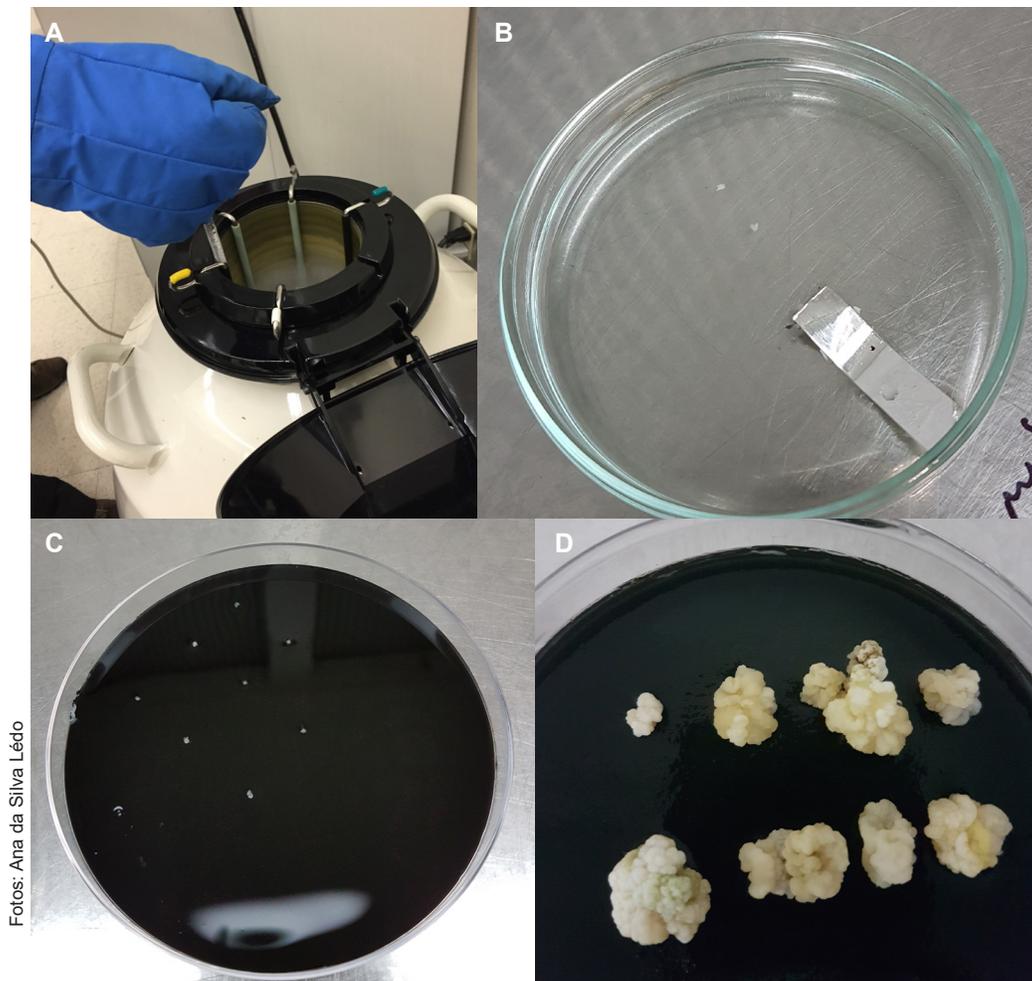


Figura 4. Reaquecimento plúmulas de coqueiro AVEBrJ. A- retirada dos canisteres do tambor de NL; B- Imersão dos criotubos em solução de descarregamento meio Y3 com 1,2 M de sacarose por 30 minutos; C- Plúmulas inoculadas em meio de indução de embriogênese somática meio Y3 com 50 g/L de sacarose; 100 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D); 3 g/L de carvão ativado e 2,2 g/L de agente gelificante; D- indução de calos embriogênicos.

e) Aproximadamente após 30 dias de cultivo *in vitro*, inicia-se a indução de calos embriogênicos (Figura 5A) com a formação inicial de estruturas do tipo “orelha” (Figura 5B) e embriões somáticos globulares (Figura 5C).



Fotos: Leila Albuquerque Oliveira

Figura 5. Desenvolvimento de calos embriogênicos após criopreservação em plúmulas de coqueiro AVeBrJ. A - calos com coloração esbranquiçada a amarelada-amarelada; B - estrutura do tipo “orelha” (eo); C- Estruturas globulares (eg).

Tabela 1. Componentes do meio de cultura básico Y3.

Macronutrientes	mg/L
CaCl ₂ .2H ₂ O	294
KCl	1492
KNO ₃	2020
MgSO ₄ .7H ₂ O	247
NH ₄ Cl	535
Micronutrientes	mg/L
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
Ácido nicotínico	50
Biotina	50
Ca-pantotenato	50
Mio-Inositol	100
Piridoxina – HCl	50
Tiamina – HCl	500

Fonte: Eeuwens, 1976.

Considerações finais

Recomenda-se a técnica de vitrificação em gotas para a criopreservação de plúmulas de coqueiro anão verde do Brasil de Jiqui com o uso das soluções crioprotetoras PVS2 ou PVS3 e reaquecimento das plúmulas criopreservadas em solução de descarregamento meio Y3 com 1,2 M de sacarose por 30 minutos.

A criopreservação de plúmulas oriundas embriões zigóticos de coqueiro anão verde do Brasil de Jiqui possibilitará a implantação de coleções ou bancos de germoplasma complementares às coleções de campo de forma segura pela menor possibilidade de transmissão de enfermidades. Além disso, possibilita a regeneração de várias plantas pela embriogênese somática.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos 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 e CAPES 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.

BENSON, E. E.; HARDING, K.; JOHNSTON, J. W. Cryopreservation of Shoot Tips and Meristems. In: DAY, J. G.; STACEY, G. N. (Ed.). **Cryopreservation and freeze-drying protocols**. Totowa: Humana Press, 2007. p. 163-184.

CUETO, C. A.; JOHNSON, V.; BOURDEIX, R.; ENGELMANN, F.; KEMBU, A.; KONAN, J. L.; KOUASSI, K. M.; OROPEZA, S. C. M.; RIVERA, R. L.; VIDHANAARACHCHI, V. R. M.; WEISE, S. **Chnical guidelines for the safe movement and duplication of Coconut (*Cocos nucifera* L.) germoplasm using embryo culture transfer protocols**. Montpellier, France: 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 on tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera*) and cultured in vitro. **Physiologia Plantarum**, v. 36, p. 23-28, 1976.

KIM, H. H.; LEE, Y. -G.; SHIN, D. - J.; KO, H. -C.; GWAG, J. -G.; CHO, E. -G.; FLORENT, E. Development of alternative plant vitrification solutions in droplet-vitrification procedures. **CryoLetters**, v. 30, p. 320-334, 2009.

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.

Lédo, A. da S.; MACHADO, C. de A.; OLIVEIRA, L. A. R. de; OLIVEIRA, A. C. de A.; MUNIZ, A. V. C. da S.; RAMOS, S. R. R. **Conservação a longo prazo de embriões zigóticos de coqueiro anão verde do Brasil de Jiqui**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2019. 11 p. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Comunicado Técnico, 227).

LÉDO, A. S.; SANTANA, F. V.; OLIVEIRA, A. C. A.; OLIVEIRA, L. A. R.; SILVA, V. C. Cryopreservation of Brazilian green dwarf coconut plumules by droplet-vitrification. **Ciência Rural**, v. 50, p. 1-8, 2020.

MACHADO, C. A.; MOURA, C. R. F.; LEMOS, E. E. P.; RAMOS, S. R. R.; RIBEIRO, F. E.; LÉDO, A. S. Pollen grain viability of coconut accessions at low temperatures. **Acta Scientiarum-Agronomy**, v. 36, p. 227-232, 2014.

N'NAN, O.; VERDEIL, J. L.; HOCHER, V.; KONAN, J-L. Cryopreservation by encapsulation-dehydration of plumules of coconut (*Cocos nucifera* L.). **CryoLetters**, v. 29, n. 4, p. 339-350, 2008.

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.

SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. **Plant Cell Reports**, v. 9, p. 30-33, 1990.

SAKAI, A.; ENGELMANN, F. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet vitrification: a review. **CryoLetters**, v. 28, p. 151-172, 2007.

SAKAI, A.; HIRAI, D.; NIINO, T. Development of PVS based vitrification and encapsulation-vitrification protocols. In: REED, B. M. (Org.). **Plant Cryopreservation: a practical guide**. Switzerland: Springer: 2008. p. 33-57.

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).

WELEWANNI, I.; BANDUPRIYA, D.; JAYASEKERA, A. Coconut cryopreservation: present status and future prospects. **Cord**, v. 31, n. 1, p. 41-61, 2017.

Unidade responsável pelo conteúdo e edição:

Embrapa Tabuleiros Costeiros
Avenida Beira Mar, nº 3250,
CEP 49025-040, Aracaju, SE
Fone: +55 (79) 4009-1300
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

1ª edição
Publicação digitalizada (2020)



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 Araujo de Amorim,
Lizz Kezzy de Moraes, Luciana Marques de
Carvalho, Tânia Valeska Medeiros Dantas,
Viviane Talamini

Supervisão editorial
Aline Gonçalves Moura

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
Caroline de Araújo Machado