

Foto: Caroline Machado



Aplicação do Teste de Tetrazólio para Estudos de Viabilidade em Embriões Zigóticos de Coqueiros

Ana da Silva Léo¹
Kicia Karinne Pereira Gomes²
Daniela Cordeiro Gondim³
Caroline de Araújo Machado⁴

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.) é uma cultura perene na qual a conservação de seus recursos genéticos é baseada, sobretudo, em coleções em campo, em virtude do tamanho da sua semente e por ser uma espécie que apresenta sementes recalcitrantes, sensíveis ao dessecação, o que dificulta o seu armazenamento (N´NAN et al., 2008).

Diversos procedimentos biotecnológicos vêm sendo desenvolvidos ao longo dos anos para viabilizar a preservação do material genético. Neste sentido, a cultura de tecidos é um dos ramos que mais prosperou, auxiliando diversas áreas do conhecimento tais como fitopatologia, fisiologia, engenharia genética, química, citogenética, bioquímica, biologia molecular, bem como, em estudos básicos da biologia de plantas que abrangem recentes e importantes métodos que permitem a propagação de plantas isentas de vírus e outros patógenos sistêmicos ou não, além de poder gerar novos genótipos em laboratório (SOUZA et al., 2006).

A cultura in vitro de embriões zigóticos de coqueiro tem sido utilizada, principalmente, para a coleta e o

intercâmbio de germoplasma porque suas sementes apresentam grandes dimensões, o que aumenta drasticamente o volume de material (germoplasma) a ser coletado e conservado a médio e a longo prazo (ENGELMANN; BATUGAL, 2002).

Uma das metodologias aplicadas para avaliar o vigor de uma semente é o teste de tetrazólio, devido à sua rapidez na determinação da viabilidade das sementes. A aplicação do teste em sementes de algumas palmeiras como as do coqueiro, torna-se inviável devido, principalmente, ao tamanho das sementes e a dificuldade de exposição dos tecidos externos, sendo necessária a excisão do embrião zigótico. A utilização de embriões zigóticos para estudos de viabilidade em sementes de palmeiras é recente e tem apresentado adequada precisão (FERNANDES et al., 2007; GOMES-COPELAND, 2010; MINARDI et al., 2011).

O objetivo dessa publicação é descrever o protocolo de aplicação do teste de tetrazólio para avaliação da viabilidade de embriões zigóticos de coqueiro.

¹ Engenheira-agrônoma, Ph.D. em Fitotecnia, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, ana.ledo@embrapa.br.

² Química, M.Sc. em Biotecnologia, Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, SE, kiciagomes@gmail.com.

³ Bióloga, M.Sc. em Biotecnologia, Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, SE, Daniela_gondim@yahoo.com.br.

⁴ Bióloga, M.Sc. em Agroecossistemas, Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, SE, caroline_machado866@hotmail.com.

Morfologia do fruto e da semente do coqueiro

O fruto do coqueiro é, botanicamente, uma drupa que apresenta cor variável entre marrom, amarelo, vermelho e verde, a depender da sua variedade, e é formado por uma epiderme lisa ou epicarpo (Ep), que envolve o mesocarpo espesso e fibroso (Ms), ficando mais para o interior uma camada muito dura, o endocarpo, o qual envolve a semente, que por sua vez, é constituída por uma camada fina de cor marrom - o tegumento (Tg) - que fica entre o mesocarpo e o albúmen sólido (As). Este último é uma camada carnosa, branca, muito oleosa, formando uma grande cavidade onde se encontra um líquido opalescente ou albúmen líquido. Próximo a um dos três poros germinativos encontra-se o embrião zigótico (Ez), envolvido pelo albúmen sólido (Figura 1) (PASSOS, 1998).

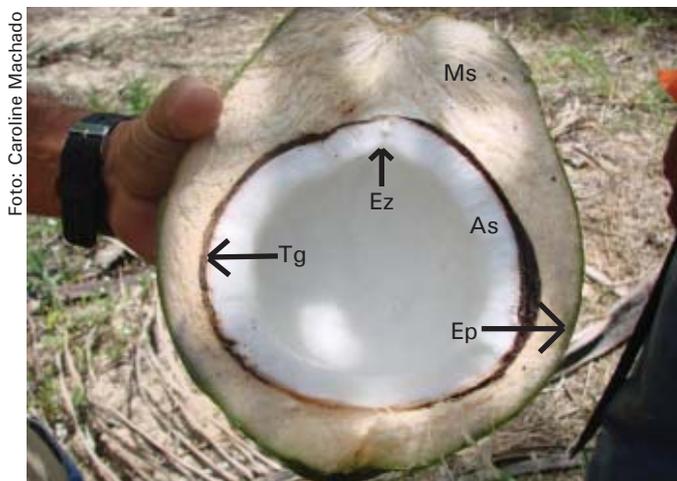


Figura 1. Corte transversal do fruto e da semente do coqueiro. Ep - epicarpo; Ms - mesocarpo; Tg - tegumento; As - albúmen sólido; Ez- embrião zigótico.

Obtenção dos embriões zigóticos

Os embriões zigóticos deverão ser oriundos de frutos maduros com 10 a 11 meses de idade (Figura 2A). Cilindros de endosperma contendo os embriões zigóticos (Figura 2B) devem ser extraídos (Figura 2C) e submetidos à pré-assepsia ainda no campo, mediante a imersão dos mesmos em hipoclorito de sódio (2 a 2,5%) e lavados em água potável por três vezes. Os cilindros de endosperma devem ser acondicionados em recipientes estéreis (Figura 2D) e encaminhados para o laboratório. Em câmara de fluxo laminar os embriões devem ser excisados dos cilindros de endosperma (Figura 2E), imersos em água destilada estéril e colocados em placas de Petri estéreis (Figura 2F).

As regras de análises de sementes preconizam que, para sementes pequenas, devem ser usadas quatro amostras de 50 sementes ou duas amostras de 100 sementes e que, para sementes maiores, como as do coqueiro, seriam recomendadas 25 amostras de sementes (BRASIL, 2009), as quais originaram 25 embriões/amostra.

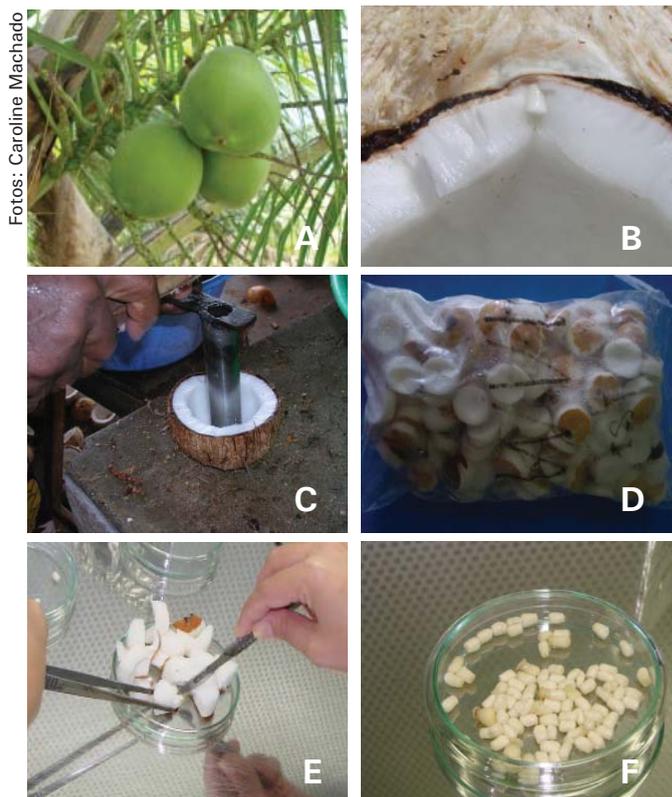


Figura 2. Obtenção de embriões zigóticos de coqueiro. Etapas da coleta de frutos, extração e acondicionamento dos embriões zigóticos de coqueiro: A - frutos no estágio maduro na planta; B - embrião zigótico no endosperma do fruto; C - extração dos discos de endosperma contendo o embrião zigótico; D - discos de endosperma acondicionados após pré-assepsia de campo; E - Excisão do embrião zigótico em câmara de fluxo laminar; F - imersão em água destilada.

Princípio de teste

No teste de tetrazólio, os embriões zigóticos são embebidos em uma solução incolor de 2,3,5 trifenil cloreto ou brometo de tetrazólio, que é usada como indicador para revelar o processo de redução que acontece dentro das células vivas. Neste processo, os íons de H^+ liberados durante a respiração dos tecidos vivos são transferidos por um grupo de enzimas, particularmente, a desidrogenase do ácido málico, que catalizam a reação de redução do sal de tetrazólio, formando um composto de coloração vermelha carmim, estável e não difusível chamado de trifenil formazan, resultado da reação de redução devido à atividade respiratória das mitocôndrias. Como esta reação se processa no interior das células vivas e o composto não se difunde, há nítida separação dos tecidos vivos e coloridos que respiram, daqueles mortos e que não colorem (VIEIRA, 1994; BRASIL, 2009).

Preparo de soluções

As soluções devem ser preparadas de acordo com as Regras para Análise de Sementes do Brasil, podendo ser utilizadas concentrações de tetrazólio na faixa de 0,05 a 1,0% (BRASIL, 2009), sendo que a concentração de 0,25% de sal de tetrazólio apresentou ótimas condições

de visualização da viabilidade dos embriões de coqueiro e menor custo (GOMES-COPELAND, 2010).

A concentração de 0,25% da solução de tetrazólio pode ser obtida com a dissolução de 0,25 g do sal de tetrazólio em 1000 mL da solução tampão ou de água destilada ou a partir de solução estoque a 1% (10 g de tetrazólio dissolvidos em 1000 mL de água destilada). A solução de tetrazólio deverá ser mantida em frasco âmbar, em local escuro e fresco, preferencialmente em geladeira.

Se a solução de tetrazólio não apresentar pH dentro da faixa de 6,5-7,5, o sal de tetrazólio deverá ser dissolvido em uma solução tampão preparada de acordo com as seguintes especificações: **Solução 1:** dissolver 9,078 g de fosfato de potássio (KH_2PO_4) em 1000 mL da água destilada; **Solução 2** – dissolver 11,876 g de fosfato monoácido de sódio bihidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) em 1000mL da água destilada; ou dissolver 9,472 g de Na_2HPO_4 em 1000mL de água destilada.

Misturar duas partes da Solução 1 em três partes da Solução 2 e observar o pH, que deve estar 6,5 e 7,5. Para preparar um litro de solução tampão, misturar 400 mL da Solução 1 com 600 mL da Solução 2.

Aplicação de teste de tetrazólio

Os embriões zigóticos são imersos na solução de tetrazólio (Figura 3A) e mantidos na ausência de luz em câmara incubadora refrigerada tipo BOD, à 40°C (Figura 3B) por duas horas (GOMES-COPELAND, 2010). Posteriormente, são lavados em água corrente e mantidos submersos em água até o final do teste, para evitar o ressecamento. Se a avaliação não puder ser efetuada de imediato, os embriões poderão ser mantidos em geladeira (5 a 10°C) por até 24 horas (BRASIL, 2009).



Figura 3. Teste de tetrazólio: A - Imersão dos embriões zigóticos de coqueiro em solução de 0,25%; B - incubadora tipo BOD.

Interpretação do teste

O teste tem como objetivos diferenciar embriões viáveis dos inviáveis. Os embriões viáveis são aqueles que apresentem coloração carmim em toda a área ou em pelo menos 75% dela (Figuras 4 e 5) e que, em meio de cultura suplementado com sais minerais, vitaminas, aminoácidos e outros componentes, produzam plântulas de coqueiro normais (Figura 6A). Os embriões inviáveis são os que não atendem os requisitos anteriores, apresentando coloração não definida ou estruturas essenciais não coloridas e flácidas e que, em condições *in vitro* consideradas ideais, apresentam desenvolvimento anormal (Figura 6B).

Para avaliação da viabilidade dos embriões deve-se considerar a categoria determinada em função da porcentagem da área do embrião com coloração de vermelho carmim (resultado da reação de redução do sal tetrazólio) e aspecto dos tecidos (Figura 4; adaptado de MOORE, 1972; GABRE, 1976; ISLA, 1992 citados por OLIVEIRA et al., 2005):

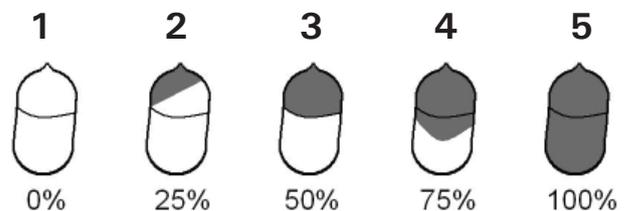


Figura 4. Categorias utilizadas para avaliar a viabilidade de embriões zigóticos de coqueiro. **Categoria 1 (viável):** 100% do embrião com coloração carmim, tecidos firmes; **Categoria 2 (viável):** 75% da zona meristemática completamente colorida e parte da zona basal do embrião, tecidos firmes; **Categoria 3 (inviável):** 50% de coloração na zona meristemática do embrião, tecidos não firmes; **Categoria 4 (inviável):** 25% da coloração da zona meristemática do embrião, tecidos não firmes e **Categoria 5 (inviável):** 0% - embrião sem coloração, tecidos não firmes.

Fotos: Caroline Machado





Foto: Caroline Machado

Figura 5. Embriões zigóticos de coqueiro viáveis (categoria 1) após aplicação de teste de tetrazólio a 0,25%.

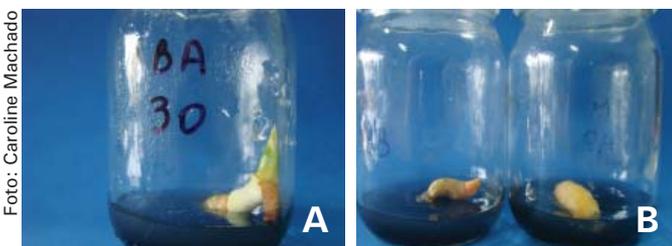


Foto: Caroline Machado

Figura 6. Cultura in vitro de embriões zigóticos de coqueiro: A - Plântulas com desenvolvimento normal; B - Embriões zigóticos com desenvolvimento anormal.

Considerações Finais

O desenvolvimento de testes rápidos e precisos para avaliação da qualidade fisiológica da semente tem contribuído sobremaneira para a indústria de sementes. O teste de tetrazólio é resultado de muitas pesquisas e sua aplicação em embriões zigóticos para estudo da viabilidade de sementes de coqueiro é importante por possibilitar uma rápida e precisa avaliação da qualidade fisiológica da semente evitando a demora e alto custo para de um teste de germinação em campo, considerando a impossibilidade de aplicação do teste de germinação de coqueiro em laboratório.

Agradecimentos

Aos assistentes de pesquisa Inácio Roque de Andrade Junior, Cleverson Matos Santos e Erivaldo Fonseca Moraes pelo apoio nas atividades de laboratório e coleta e preparo do material vegetal e a curadora da BAG Coco, pesquisadora Semíramis Rabelo Ramalho Ramos pela cessão de disponibilização de acessos de coqueiro.

Referências bibliográficas

- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de** Brasília, DF: Mapa, 2009. 399 p.
- 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. (Ed.). **Coconut embryo in vitro culture**. Malaysia: IPGRI-APO, 2002. v p.1-4, 2.
- FERNANDES, R. C.; MAGALHÃES, H. M.; LOPES, P. S. N.; BRANDÃO JUNIOR, D. S.; FERNANDES, R. C.; GOMES, J. A. O.; PAULINO, M. A. O.; CARNEIRO, P. A. P. Elaboração da metodologia de aplicação do teste de tetrazólio para avaliação da viabilidade das sementes de coquinho-azedo *Butia capitata* Mart (Becc). **Revista Brasileira de Agrotecnologia**, Caraubas, RN, v. 2, n. 2, p. 1004-1007, 2007.
- GOMES-COPELAND, K. K. P. **Estudos fisiológicos e bioquímicos para criopreservação de embriões zigóticos de coqueiro anão verde de Jiqui do Brasil**. 2010. 39 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, 2010.
- MERROW, A. W. Palm seed germination. **IFAS Cooperative Extension Bulletin**, Florida, USA, n. 274, p. 1-10, jun. 2004.
- MINARDI, B. D.; VOYTENA, A. P. L.; RANDI, A. M.; ZAFFARI, G. R. Cultivo in vitro de embriões zigóticos de *Butia eriospatha* (Mart. ex Drude) Becc. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, n. 40, p. 70-81, 2011.
- N'NAN, O.; HOCHER V.; VERDEIL, J.-L.; KONAN, J. L.; BALO, K., MONDEIL, F.; MALAURIE, B. Cryopreservation by encapsulation-dehydration of plumules of coconut (*Cocos nucifera* L.). **CryoLetters**, Cambridge, UK, v. 29, n. 4, p. 339-350, 2008.
- OLIVEIRA, L. M. de O.; CARVALHO, M. L. M. de; DAVIDE, A. C. Teste de tetrazólio para avaliação da qualidade de sementes de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert - Leguminosae Caesalpinioideae. **Cerne**, Lavras, v. 11, n. 2, p. 159-166, 2005.
- PASSOS, E. E. M. Morfologia do coqueiro. In: FERREIRA, J. M. S.; WARWICK, D. R. N.; SIQUEIRA, L. A. (Eds) **A cultura do coqueiro no Brasil**. Brasília: Embrapa-SPI; Aracaju: Embrapa-CPATC, 1998. p. 57-64.
- SOUZA, A. da S.; COSTA, M. A. P. de. C.; SANTOS-SEREJO, J. A. dos; JUNGHANS, T. G.; SOUZA, F.

V. D. Introdução à cultura de tecidos de plantas. In: SOUZA, A. da S.; JUNGHANS, T. G. (Ed.). **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. p. 11-37.

VIEIRA, R. D. Teste de condutividade elétrica. In: VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M. de. (Ed.). **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal, SP: FUNEP, 1994. p. 103-132.

Comunicado Técnico, 130

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Tabuleiros Costeiros

Endereço: Avenida Beira Mar, 3250, CP 44,
CEP 49025-040, Aracaju - SE.

Phone: (79) 4009-1344

Fax: (79) 4009-1399

E-mail: sac@cpatc.embrapa.br

Disponível em http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes_2013/cot_130.pdf

1st edição (2013)

Comitê de publicações

Presidente: *Marcelo Ferreira Fernandes*

Secretária-executiva: *Raquel Fernandes de Araújo Rodrigues*

Membros: *Alexandre Nízio Maria, Ana da Silva Lédo, Ana Veruska Cruz da Silva Muniz, Élio César Guzzo, Hymerson Costa Azevedo, Josué Francisco da Silva Junior, Viviane Talamini e Walane Maria Pereira de Mello Ivo*

Supervisora editorial: *Raquel Fernandes de Araújo Rodrigues*

Expediente

Tratamento das ilustrações: *José Gabriel Santos*

Editoração eletrônica: *José Gabriel Santos*