

Avaliação de técnicas de criopreservação na sobrevivência e regeneração de plúmulas de coqueiro Anão-verde-do-Brasil-de-Jiqui (AVeBrJ)

Flávia Alves Ludovice¹, Caroline de Araújo Machado², Annie Carolina Araujo de Oliveira³, Aparecida Gomes de Araújo⁴, Fernanda Vidigal Duarte Souza⁵, Semíramis Ramalho Rabelo Ramos⁶, Ana da Silva Léo⁷

Resumo

O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito de soluções crioprotetoras e tempos de imersão na sobrevivência e regeneração de plúmulas criopreservadas de coqueiro anão-verde-do-Brasil-de-Jiqui (AVeBrJ), como alternativa para a conservação de recursos genéticos de coqueiro. Para os estudos de criopreservação de coqueiro foram testadas duas técnicas: Encapsulamento-desidratação e a Droplet-vitrificação de plúmulas excisadas de embriões zigóticos obtidos de plantas adultas do acesso AVeBrJ, provenientes do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de coco da Embrapa Tabuleiros Costeiros localizado no campo experimental de Itaporanga, Sergipe. Para avaliação da técnica do encapsulamento-desidratação, as plúmulas inicialmente pré-cultivadas por 72 horas em meio Y3 foram submetidas a duas soluções crioprotetoras compostas por meio Y3 suplementado com 0,5 e 1 m de sacarose. Para a técnica de droplet-vitrificação as plúmulas foram transferidas para solução de vitrificação PVS2 por 30, 45 e 60 minutos. Na fase de regeneração, em ambas as técnicas, as culturas foram mantidas em sala de

¹ Graduada em Engenharia Agrônoma, Universidade Federal de Sergipe (UFS), São Cristóvão, SE.

² Bióloga, mestre em Melhoramento Vegetal, Universidade Federal de Sergipe (UFS), Aracaju, SE.

³ Engenheira-florestal, Universidade Federal de Sergipe (UFS), Aracaju, SE.

⁴ Engenheira-agrônoma, doutora em Agronomia, bolsista CNPq/FAPITEC-SE/Embrapa, Aracaju, SE.

⁵ Pesquisadora doutora em Biologia Molecular, pesquisadora da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Alma, BA.

⁶ Engenheira-agrônoma, doutora em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisadora na Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

⁷ Engenheira-agrônoma, doutora em Agronomia, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, bolsista de produtividade do CNPq, Aracaju, SE.

crescimento com temperatura controlada de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa do ar média em torno de 70%, na ausência de luz por 15 dias e depois transferidas para fotoperíodo de 12 horas e intensidade luminosa de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Após três meses de cultivo in vitro, os explantes (-NL e + NL) foram avaliados quanto à porcentagem de sobrevivência e indução de calos embriogênicos. As soluções crioprotetoras compostas pelo meio Y3 suplementado com 0,5 e 1 M de sacarose proporcionam sobrevivência de plúmulas encapsuladas de coqueiro AVeBrJ, podendo ser recomendadas para futuros protocolos de criopreservação. O tempo de imersão de 30 minutos em solução de vitrificação PSV₂ induz maior sobrevivência de plúmulas submetidas a droplet-vitrificação.

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

Introdução

O banco de germoplasma de coco da Embrapa Tabuleiros Costeiros 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, em 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 (AVeBrJ). O coqueiro anão constitui-se na variedade de coqueiro mais utilizada comercialmente no Brasil, para produção de água de coco, com qualidade sensorial superior às demais cultivares, apesar de poder ser empregada também na agroindústria de alimentos e/ou do fruto seco in natura, com produtividade estimada de polpa nos plantios tecnificados (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 promitentes (BANDUPRIYA et al., 2010; MALAURIE et al., 2011; N'NAN et al., 2008, 2011, 2012). Entretanto, pesquisas para acessos coletados no Brasil são incipientes e os resultados com a criopreservação de embriões zigóticos não tem sido promissores possivelmente pelo tamanho do explante. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito de soluções crioprotetoras e tempos de imersão na sobrevivência e regeneração de plúmulas de embriões criopreservados de coqueiro AVeBrJ.

Material e Métodos

Para os estudos de criopreservação de coqueiro foram utilizadas plúmulas excisadas de embriões zigóticos oriundos de plantas adultas do acesso de coqueiro AVeBrJ, provenientes do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de coco da Embrapa Tabuleiros Costeiros localizado no campo experimental de Itaporanga, 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 sacos plásticos 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. As plúmulas foram excisadas dos embriões estéreis e mantidas em placa de Petri até a aplicação das técnicas de Encapsulamento-Desidratação e Droplet-Vitrificação. Para avaliação da qualidade das plúmulas, 10 embriões foram inoculadas em meio Y3 (EEUWENS, 1976) suplementado com 50 mg L⁻¹ de 2,4-D (meio de regeneração).

Para avaliação da técnica do encapsulamento-desidratação, as plúmulas foram inicialmente pré-cultivadas por 72 horas em meio Y3, suplementado com 0,12 m de sacarose. Em seguida, as plúmulas foram imersas em 100 mL do meio de cultura MS acrescido da solução de alginato de sódio 3% (m/v) e 2% de viscosidade, conforme metodologia de Soliman et al. (2013). Logo após, com auxílio da pipeta de Pasteur as plúmulas foram aspiradas e depositadas na solução de 100 m de cloreto de cálcio (CaCl₂) por 20 minutos, sob agitação, a fim de promover a polimerização das cápsulas contendo os explantes.

Os explantes encapsulados (60) foram transferidos para solução crioprotetora composta por meio Y3 suplementado com 0,5 e 1 m de sacarose (SOLIMAN, 2013) sob agitação a 100 rpm (SHARAF et al., 2012) onde permaneceram por 48 horas a 25 ± 2 °C na ausência de luz.

Em câmara de fluxo laminar, as plúmulas encapsuladas foram colocadas em placas de Petri sobre papel filtro para retirada do excesso do meio de cultura e, desidratadas por 16 horas em dessecador com sílica gel a temperatura ambiente (25 ± 2 °C). Após o encapsulamento e a desidratação, foram inoculados diretamente no meio de regeneração formando o controle (-NL), ou seja, material não criopreservado (30). O restante (30) dos explantes foi colocado em criotubos de polipropileno estéreis com capacidade de 4 mL (6 cápsulas/criotubo), devidamente selados e, submetido à criopreservação a -196 °C (+NL). Após 72 horas foram descongelados em banho-maria a 38 ± 2 °C por 2 a 3 minutos e, em seguida, inoculados em meio de regeneração.

Para a técnica de droplet-vitrificação as plúmulas (60) inicialmente pré-cultivadas por 72 horas em meio Y3, suplementado com 0,12 m de sacarose foram imersas em solução de vitrificação PVS2 (SAKAI et al., 1990) por 30, 45 e 60 minutos. Depois da desidratação, as plúmulas foram transferidas para

lâminas de alumínio contendo uma gota de 10 μL de PVS2 congelado e foram rapidamente imersas em nitrogênio líquido (NL+) e introduzidas em criotubos de polipropileno estéreis com capacidade de 4 mL (uma lâmina/criotubo), devidamente selados e, submetido à criopreservação a -196°C (+NL). Após 72 horas foram descongelados por 15 segundos em solução 0,8 M de sacarose em banho-maria a $38 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 2 a 3 minutos (PANIS et al., 2005) e, em seguida, inoculados em meio de regeneração.

Na fase de regeneração, em ambas as técnicas as culturas, foram mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar média em torno de 70%, na ausência de luz por 15 dias e depois transferidas para fotoperíodo de 12 horas e intensidade luminosa de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Após três meses de cultivo in vitro, os explantes (-NL e + NL) foram avaliados quanto à porcentagem de sobrevivência e indução de calos embriogênicos. O experimento de encapsulamento-desidratação foi instalado em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2×2 (duas soluções crioprotetoras x presença ou ausência de NL), com quatro repetições, sendo cada parcela composta por um criotubo contendo quatro cápsulas com plúmulas. O experimento de droplet-vitrificação foi instalado em delineamento inteiramente casualizado com três tratamentos (tempos de imersão) e sete repetições, sendo cada parcela composta por 1 lâmina de alumínio contendo quatro plúmulas. Aos 120 dias após a inoculação foram avaliadas as porcentagens de sobrevivência e de regeneração pela indução de calos embriogênicos. Os dados foram submetidos à análise de variância e comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância utilizando o programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011).

Resultados e Discussão

Na avaliação da capacidade de regeneração da plúmula do acesso AVeBrJ (Controle) houve 80% de formação de calos embriogênicos em meio de regeneração por indução de embriogênese somática composto pelos sais do meio Y3 + 50 mg L^{-1} de 2,4-D (Figura 1).



Figura 1. Indução de calos embriogênicos em plúmulas de coqueiro anão-verde-do-Brasil-de-Jiqui aos 120 dias após a inoculação em meio de regeneração Y3 + 50 mg L⁻¹ 2,4-D.

Não houve efeito significativo da solução crioprotetora e da interação solução e nitrogênio líquido para a sobrevivência e regeneração. Houve efeito significativo do nitrogênio líquido (NL), na sobrevivência e regeneração de plúmulas encapsuladas do acesso AVeBrJ (Tabela 1).

Tabela 1. Efeito da solução crioprotetora, tempo de imersão e criopreservação na sobrevivência e regeneração de plúmulas encapsuladas do acesso de coqueiro anão-verde-do-Brasil-de-Jiqui (AVeBrJ) aos 120 dias de cultivo in vitro.

	Sobrevivência (%)		Médias
	Meio Y3 + 0,5 m Sacarose	Meio Y3 + 1 m de Sacarose	
NL -	100,00	100,00	100,00A
NL +	69,23	54,54	62,50B
Médias	86,67a	66,67a	
CV (%)	41,70		
	Regeneração (%)		Médias
	Meio Y3 + 0,5 m Sacarose	Meio Y3 + 1 m de Sacarose	
NL -	46,15	36,60	41,67A
NL +	5,88	0	4,76B
Médias	23,33a	26,67a	
CV (%)	126,00		

NL - nitrogênio líquido; médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

A sobrevivência das plúmulas alcançou nas soluções crioprotetoras meio Y3 + 0,5 m de sacarose e meio Y3 + 1 m de sacarose, 86,67 e 66,67%, respectivamente. A ausência de criopreservação induziu maior sobrevivência (100%) quando comparado com plúmulas submetidas a temperatura de -196 °C (62,50%). Quanto à regeneração plúmulas encapsuladas submetidas à criopreservação obtiveram menor desempenho (4,76%) quando comparado com a ausência de nitrogênio líquido (41,67%), Figuras 2.

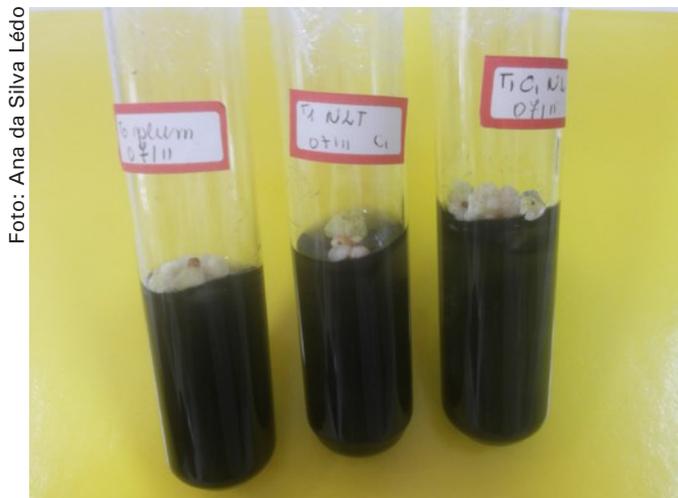


Figura 2. Indução de calos embriogênicos em plúmulas encapsuladas de coqueiro anão-verde-do-Brasil-de-Jiqui aos 120 dias após a inoculação em meio de regeneração Y3 + 50 mg L⁻¹ 2,4-D A- Controle, NL -; B- Crioprotetor C1, NL -; C- Crioprotetor C1, NL +C1- meio Y3 + 0,5 m de sacarose.

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. De acordo com Santos (2013), a desidratação pode provocar modificações deletérias afetando o metabolismo celular. Há um intervalo de umidade aceitável a ser atingido pelos explantes antes do congelamento, porém, a remoção da umidade abaixo de limite tolerável afeta diretamente a estrutura molecular e a integridade das organelas (SILVA et al., 2011; SERSHEN et al., 2012), o que se reflete em menor regeneração.

Houve efeito significativo do tempo de imersão na solução de vitrificação PVS2 na sobrevivência das plúmulas submetidas ao procedimento droplet-vitrificação, mas até os 90 dias não foi observada regeneração de nenhuma cultura. O tempo de imersão em solução de PVS2 por 30 minutos promoveu 100% de sobrevivência, seguida dos tempos de 45 e 60 minutos (43 e 27%, respectivamente) que não diferiram entre si (Tabela 2). Nenhuma regeneração foi observada nos tratamentos estudados.

Tabela 2. Efeito do tempo de imersão em solução PVS2 na sobrevivência e regeneração de plúmulas do acesso de coqueiro anão-verde-do-Brasil-de-Jiqui (AVeBrJ) submetidas a droplet-vitrificação aos 120 dias de cultivo in vitro.

Tempo de imersão (minutos)	Sobrevivência (%)	Regeneração (%)
30	100,00A	0
45	43,00B	0
60	27,00B	0
CV (%)	63,02	

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Apesar dos resultados de sobrevivência de plúmulas de coqueiro AVeBrJ serem satisfatórios após a criopreservação, estudos complementares devem ser conduzidos, para definição de um meio de regeneração e procedimentos de descongelamento, a fim de promover a regeneração das culturas.

Conclusões

As soluções crioprotetoras compostas pelo meio Y3 suplementado com 0,5 e 1 m de sacarose proporcionam sobrevivência de plúmulas encapsuladas de coqueiro AVeBrJ, podendo ser recomendadas para futuros protocolos de criopreservação;

O tempo de imersão de 30 minutos em solução de vitrificação PSV₂ induz maior sobrevivência de plúmulas submetidas a droplet-vitrificação.

Agradecimentos

À Embrapa, Rede Internacional de Recursos Genéticos (Cogent) e Probio II pelo aporte de recursos financeiros e a Fapitec-SE/CNPq pela concessão de bolsa.

Referências

- 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 de jun. 2015.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, MG, v. 35, n. 6, p.1 039- 1042, 2011.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. Part 1 – The technology. Edington, UK: Exegetics, 1996. 1574 p.
- LEDO, A. S.; MACHADO, C. A.; MOURA, C. R. F.; RAMOS, S. R. R. ; SILVA, A.V.C. ; LEDO, C. A. da. Mannitol for coconut ex situ conservation by minimum growth. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 49, p. 148-151, 2014.
- MALAURIE, 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.; MALAURIE, 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.; TREGAR, J.; MALAURIE, 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.; TREGAR, J.; N'GUETTA, A. S. P.; ENGELMANN, F.; MALAURIE, 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.

PANIS, B.; PIETTE, B.; SWENNEN, R. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all Musaceae. **Plant Science**, v. 168, p. 45-55, 2005.

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.

SAKAI, A. Cryopreservation of germplasm of woody plants. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry**. Berlin: Springer-Verlag, Berlin, 1995. p. 113-119.

SANTOS, P. A. A. **Cultivo e conservação in vitro de Hancornia speciosa Gomes**. 2013. 94 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SHARAF, S. A.; SHIBLI, R. A.; KASRAWI, M. A.; BAGHDADI, S. H. Cryopreservation of wild Shih (*Artemisia herba-alba* Asso.) shoot-tips by encapsulation-dehydration and encapsulation-vitrification. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 108, p. 437-444, 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s11240-011-0054-0>>. Acesso em: 28 mai. 2015.

SILVA, R. de C.; CAMILLO, J.; LUIS, Z. G; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Potencial germinativo e morfoanatomia foliar de plântulas de pinhão-mansão originadas de germoplasma criopreservado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.

46, n. 8, p. 836-844, 2011. Disponível em: <http://seer.sct.embrapa.br/index.php/pab/article/view/9954/6507>. Acesso em: 15 jun. 2015.

SERSHEN, P. B.; PAMMENTER N. W.; WESLEY-SMITH, J. Rate of dehydration, state of subcellular organization and nature of cryoprotection are critical factors contributing to the variable success of cryopreservation: studies on recalcitrant zygotic embryos of *Haemanthus montanus*. **Protoplasma**, v. 249, p. 171-186, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21499854>>. Acesso em: 27 jun. 2015.

SOLIMAN, H. I. A. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of apricot (*Prunus armeniaca* L.) using encapsulation-dehydration. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, p. 1419-1430, 2013. Disponível em: <http://academicjournals.org/article/article1380729484_Soliman.pdf>. Acesso em: 19 jun. 2015.