

*Revista*

# Científica Rural

*Revista Técnico-Científica*

ISSN 1413-8263

REVISTA CIENTIFICA RURAL: ...  
v.8, n.1, Janeiro. 2003



CPAA-793-5

**Vol.8 Nº01 - 2003**





# CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS PROVENIENTES DE VARIEDADES BRASILEIRAS DE COQUEIRO (*Cocos nucifera* L.)

Angelo, P.C.S.<sup>1\*</sup>; Leal, M. de L. da S.<sup>2</sup>; Gomes, K.K.P.<sup>3</sup>

**RESUMO:** Este trabalho teve como objetivo adaptar métodos de cultivo *in vitro* para embriões zigóticos provenientes de variedades brasileiras de coqueiro (*Cocos nucifera* L.), Anão Verde do Brasil (BrGD) e Gigante do Brasil (BrT1). Os experimentos foram realizados na Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju/SE. Soluções nutritivas preparadas com sais de Y3 (modificada) ou de MS e dois tipos de frascos para cultura foram testados. A frequência e o tempo necessários para o surgimento das radículas e das plúmulas foram avaliados. A variedade das plantas doadoras de embriões influenciou significativamente os resultados. Embriões provenientes de plantas BrGD apresentaram germinação mais frequente e mais rápida e geraram dados para a construção de distribuições de frequência mais homogêneas para emissão de radículas e plúmulas. A solução de Y3 (modificada) mostrou-se mais eficiente para induzir germinação em todos os tratamentos. O tipo de frasco não apresentou interações significativas com os outros fatores.

**Palavras-chave:** *Cocos nucifera*; embriões zigóticos; germinação *in vitro*.

## *IN VITRO* CULTURE OF ZYGOTIC EMBRYOS FROM BRAZILIAN COCONUT VARIETIES (*Cocos nucifera* L.)

**ABSTRACT:** Our objective was to adapt methods for *in vitro* culture of zygotic embryos taken from the Brazilian coconut varieties Green Dwarf (BrGD) and Tall 1 (BrT1). The experiments were conducted at Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju/SE. Nutritive solutions prepared with Y3 (modified) and MS salts and two types of culture flasks were tested. The frequency and the time necessary to radicle and plumule development were analyzed. The coconut variety from which embryos were obtained significantly influenced the results recovered. Results recovered from the BrGD sets were used to demonstrate its shorter germination period and to produce a distribution plot that showed small variability concerning to the time necessary to radicle development. Y3 nutritive solution was more efficient in inducing germination in all the situations tested. Flask type did not interact significantly with the other factors analyzed.

**Key words:** *Cocos nucifera*; zygotic embryos; *in vitro* germination

<sup>1</sup> Pesquisadora da Embrapa Amazônia Ocidental. Caixa Postal 319, Cep 69.048-660, Manaus, AM

<sup>2</sup> Pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros. Caixa Postal 44, Cep 49.025-040, Aracajú, SE

<sup>3</sup> Estagiária da Embrapa Tabuleiros Costeiros. Caixa Postal 44, Cep 49.025-040, Aracajú, SE

## INTRODUÇÃO

O cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de coqueiro vem sendo realizado há cerca de 50 anos e ainda não existem protocolos publicados especificamente para a maioria das variedades. Isto também ocorre com outras espécies, muito mais freqüentemente utilizadas em pesquisa do que o coqueiro. Podemos citar, como exemplo, que as tentativas de padronização de métodos de desenvolvimento *in vitro* de microtubérculos de batata para o uso como modelo em pesquisa sobre metabolismo vegetal, seleção e avaliação de germoplasma ocorrem há mais de 40 anos. Segundo COLEMAN *et al.* (2001), parte desta demora é causada pela existência de respostas variedade-específicas, que dificultam a interpretação de resultados. Efeito similar - respostas variedade-específicas - pode ser percebido em experimentos de cultura de tecidos com explantes de coqueiro (VERDEIL *et al.*, 1994). Em trigo há um componente genético importante e com herdabilidade alta que concorre para o aparecimento de respostas diferentes para embriões provenientes de cultivares distintos, quando induzidos à germinação precoce *in vitro* (LANGE *et al.*, 1998).

Esta técnica pode ser utilizada para coleção e intercâmbio de germoplasma e para propagação de híbridos raros de coqueiro (RILLO & PALOMA, 1990; ASHBURNER *et al.*, 1991). Embriões podem, ainda, ser usados como acessos em coleções *in vitro* de germoplasma mantidas a baixa temperatura, a exemplo do que tem sido feito com aveia (RYAN *et al.*, 1999), e como alvos ideais para a introdução de transgenes. Embriões de *Allium* foram transformados com um vetor de expressão para gene repórter antes da introdução em cultivo e a expressão do gene foi mantida em calos produzidos *in vitro* (ZHENG *et al.*, 2001). Uma outra aplicação para embriões cultivados *in vitro* foi relatada por KARUNARATNE *et al.* (1991). Estes autores realizaram um "screening" *in vitro* para germoplasma adaptado a níveis altos de salinidade, utilizando embriões zigóticos de coqueiro.

Buscou-se, com o presente trabalho, adaptar e divulgar metodologias para o cultivo *in vitro* de embriões zigóticos provenientes de plantas de duas variedades brasileiras de coqueiro (BrGD e BrT1) que apresentam importância econômica, uma vez que a grande maioria

dos trabalhos publicados neste tópico refere-se a embriões provenientes de plantas do híbrido PB121, que não é comercialmente explorado no Brasil.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material vegetal e condições de cultivo *in vitro*

O material vegetal foi coletado no campo experimental do Betume, na cidade de Neópolis, Sergipe.

Seções de endosperma sólido com dimensões aproximadas de 2,5 cm de diâmetro por 1,0 cm de espessura, contendo os embriões zigóticos do coqueiro (*Cocos nucifera* L.), foram extraídas de frutos maduros, coletados em plantas das variedades Anão Verde do Brasil (BrGD) e Gigante do Brasil (BrT1). Estas seções de endosperma foram esterilizadas em água sanitária comercial, enxaguadas em água potável, por três vezes, no local da coleta, acondicionadas em frascos de vidro etiquetados e transportadas, em uma caixa de isopor, até o Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju/SE, onde foram conservadas, por dois dias, em geladeira (cerca de 4 °C).

No Laboratório de Biotecnologia, os embriões foram assepticamente extraídos das seções de endosperma, novamente esterilizados em água sanitária comercial a 10 % e enxaguados, por três vezes, em água destilada estéril; foram inoculados em solução nutritiva para o cultivo *in vitro* e transferidos para a sala de crescimento, onde a temperatura foi mantida entre  $24,2 \pm 2,1$  e  $30,8 \pm 1,9$  °C. Sobre parte das bancadas da sala de crescimento, a luminosidade incidente foi de 4.500 Lux, fornecidos por lâmpadas fluorescentes do tipo "Luz do Dia", durante 12 horas/dia. A outra parte das bancadas foi protegida por um plástico preto de alta densidade para impedir a incidência da luz sobre o material cultivado, até que as plúmulas emitidas atingissem pelo menos 3 mm e os frascos fossem transferidos para as bancadas iluminadas. A transferência dos embriões para solução nutritiva fresca foi realizada em intervalos de quatro semanas.



### Desenho experimental

O experimento foi conduzido durante 26 semanas, entre março e outubro de 2001, com seis tratamentos, em esquema fatorial incompleto, organizado com 3 repetições e 20 embriões por repetição. Embriões provenientes de plantas da variedade BrGD foram cultivados em solução nutritiva de MS (formulação dos sais de MURASHIGE & SKOOG, 1962) com 60 g x l<sup>-1</sup> de sacarose (ASSYBAH *et al.*, 1989) ou em solução nutritiva de Y3 (EEUWENS, 1976; com a concentração de Fe-EDTA ajustada conforme o definido por MURASHIGE & SKOOG, 1962) e adição de 60 g x l<sup>-1</sup> de sacarose. Frascos de vidro Nalgene (40 x 125 mm), com tampa plástica Nalgene e frascos de vidro para drágeas (45 x 100 mm), cobertos com recortes de plástico presos por elásticos de látex foram testados para o cultivo *in vitro* dos embriões desta variedade. Embriões provenientes de plantas da variedade BrT1 foram submetidos ao cultivo nas duas soluções nutritivas já citadas, mas apenas frascos de drágeas foram utilizados para o cultivo *in vitro* dos embriões provenientes de plantas desta variedade.

As variáveis analisadas foram o número de embriões que emitiu radícula e plúmula; perdas por contaminação e por outras razões (oxidação dos tecidos, com aparecimento de cor amarelada; má formação das estruturas das plântulas e danos produzidos nos embriões durante a manipulação, que só puderam ser percebidos depois da inoculação *in vitro*). O teste do c2 foi aplicado para decidir sobre a significância das diferenças encontradas entre estas variáveis, agrupadas segundo cada um dos fatores testados (variedades doadoras de embriões, soluções nutritivas e tipos de frascos).

O tempo necessário para a emissão das radículas e o tempo necessário para a emissão das plúmulas também foram analisados. Os dados referentes ao tempo necessário para emissão das radículas foram tomados sempre que os primórdios tornaram-se visíveis. Os dados referentes ao tempo necessário para a emissão das plúmulas foram anotados quando as plântulas foram transferidas para as bancadas iluminadas (plúmulas com pelo menos 3 mm). Estes dados foram utilizados para a construção de curvas de distribuição de frequência e o índice de normalidade D, do teste de Kolmogorov foi calculado. Este teste

compara os dados analisados com uma curva de média e variância iguais para decidir se os dados analisados são uma amostra aleatória de uma distribuição normal (SAS, 1985). As médias obtidas para cada uma destas duas últimas variáveis foram submetidas a um teste de significância para as diferenças encontradas entre amostras constituídas de embriões provenientes de plantas BrGD e BrT1. As médias e os desvios médios (DMs) referentes ao tempo necessário para a emissão de radículas e plúmulas foram calculados para um número diferente de embriões provenientes de plantas BrGD e de plantas BrT1 porque o tempo foi contado apenas para os embriões que emitiram plúmulas e/ou radículas (embriões que germinaram).

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ocorreu interação positiva entre a solução nutritiva baseada na formulação de Y3 (EEUWENS, 1976) e modificada para conter Fe-EDTA na concentração indicada por MURASHIGE & SKOOG (1962) e todos os outros fatores testados. Em todos os tratamentos esta solução mostrou-se significativamente (P = 5 %) mais efetiva na indução da emissão de radículas e plúmulas do que a solução preparada exatamente de acordo com a formulação de MURASHIGE & SKOOG (1962), não importando se os embriões foram provenientes de plantas BrGD ou BrT1 ou que tipo de frasco foi utilizado para cultivá-los (Tabela I). Portanto, embriões provenientes de plantas destas duas variedades deveriam ser cultivados em solução Y3 modificada, em experimentos subsequentes.

A análise dos dados coletados durante o experimento demonstrou a existência de diferença estatisticamente significativa (P = 5 %) entre a frequência de embriões provenientes de plantas BrGD e BrT1 que emitiram radícula e que emitiram plúmula e também que o tempo médio necessário para a emissão de radículas e para emissão de plúmulas foi significativamente diferente para embriões provenientes de plantas BrGD e BrT1 (Tabelas I e II). Durante as 26 semanas de experimento, 77,0 % dos embriões provenientes de plantas BrGD emitiram a radícula e 59,1 % emitiram a plúmula. Entre os embriões provenientes de plantas BrT1, 55,0 % emitiram a radícula e 30,0 % emitiram a plúmula (Tabela I). O tempo médio necessário para a emissão de radículas e

**Tabela I** - Dados referentes aos experimentos de germinação *in vitro* de embriões zigóticos provenientes de plantas das variedades brasileiras de coqueiro Anão Verde do Brasil (BrGD) e Gigante do Brasil (BrT1) e cultivados *in vitro*, na Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju/SE, entre março e outubro do ano de 2001.

Fatores	Emissão de radícula	Emissão de plúmula	Contaminação	Perdas por outras causas
BrGD	77,0 %	59,1 %	49,1 %	20,4 %
BrT1	55,0 %	30,0 %	53,3 %	26,7 %
$\chi^2$	17,91	26,77	1,56	1,75
P	< 0,0001	< 0,0001	0,4554	0,1856
Solução de MS	66,3 %	42,8 %	51,7 %	25,0 %
Solução de Y3 modificada	75,9 %	55,9 %	49,4 %	20,0 %
$\chi^2$	6,49	6,01	0,18	1,25
P	0,0109	0,0142	0,6732	0,2634
Frasco Nalgene	70,8 %	47,9 %	53,8 %	22,0 %
Frasco de drágeas	66,7 %	51,7 %	43,9 %	23,7 %
$\chi^2$	0,61	0,46	3,05	0,12
P	0,4357	0,4970	0,0809	0,7293

plúmulas para os embriões provenientes de plantas BrGD foi de 4,5 e 10,2 semanas, respectivamente. Embriões provenientes de plantas BrT1 emitiram as radículas em 6,9 semanas e as plúmulas em 14,5 semanas de cultivo *in vitro* (Tabela II). Ou seja, embriões provenientes de plantas BrGD germinaram (emitiram radículas ou plúmulas) mais frequentemente e mais rapidamente que embriões provenientes de plantas BrT1.

Plantas de coqueiro das variedades Gigante (variedades típica) produzem a grande maioria de frutos por alogamia e suas progênies são, geralmente, mais heterogêneas para grande parte das características que se relacionam com a duração dos processos de desenvolvimento. Variedades de coqueiro tipo Anão (variedades nana) apresentam percentagem muito menor de frutos produzidos por alogamia e

produzem progênies, geralmente, mais homogêneas, mais precoces para características como o início da fase reprodutiva e com um intervalo de tempo mais curto entre a abertura de inflorescências sucessivas, em cada planta (SIQUEIRA *et al.*, 1994). A emissão de radículas e plúmulas durante o cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de coqueiro parece ter correspondido a este modelo. Embriões provenientes de plantas BrGD (Anão Verde do Brasil) emitiram radícula e plúmula mais rapidamente (Tabela II) e geraram curvas de distribuição de frequência, para estas variáveis, mais homogêneas e com maior tendência para a normalidade (índice D = 0,29 e 0,22, respectivamente, para radícula e plúmula) do que embriões provenientes de plantas BrT1 (Gigante do Brasil, com índice D = 0,21 para a plúmula e para radícula - Figuras 1 e 2).

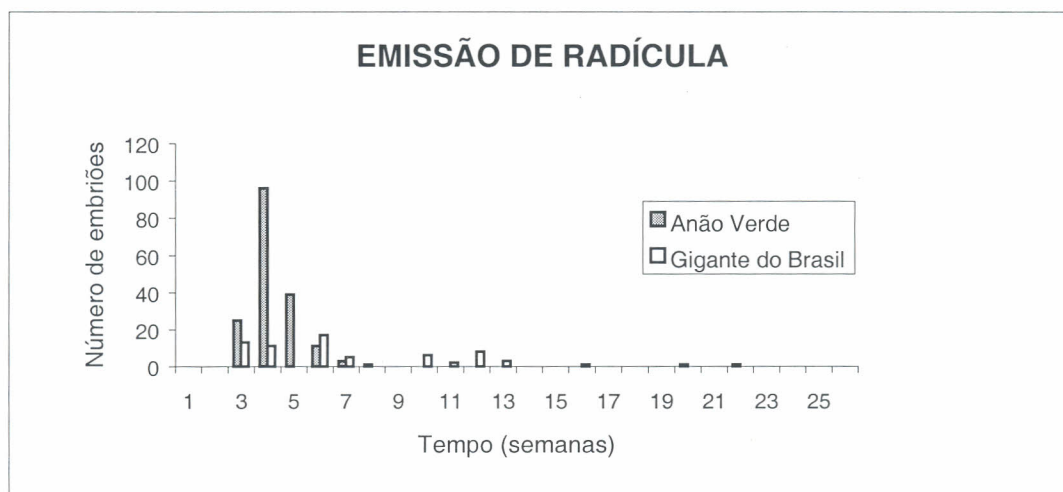
**Tabela II** - Teste de médias para o tempo, em semanas, gasto para a emissão de radículas e emissão de plúmulas por embriões zigóticos provenientes de plantas das variedades brasileiras de coqueiro Anão Verde do Brasil (BrGD) e Gigante do Brasil (BrT1), cultivados *in vitro*, na Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju/SE, entre março e outubro do ano de 2001.

	BrGD	BrT1	DM *
Tempo médio para a emissão de plúmulas (semanas)	10,2 a	14,5 b	1,6
Tempo médio para a emissão de radículas (semanas)	4,5 a	6,9 b	0,8

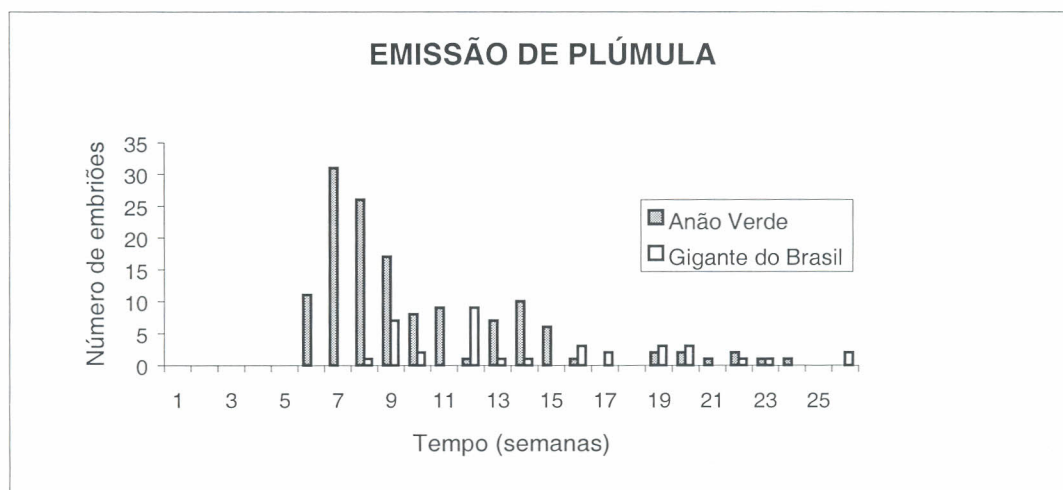
Letras diferentes indicam diferenças significativas (P = 5 %)

\*Os DMs diferem em virtude do número de repetições em cada caso, visto que o tempo só é contado para embriões germinados.





**Figura 1** - Distribuição de freqüências para emissão de radículas por embriões zigóticos provenientes de plantas das variedades brasileiras de coqueiro Anão Verde do Brasil (BrGD) e Gigante do Brasil (BrT1) e cultivados *in vitro*, na Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju/SE, entre março e outubro do ano de 2001.



**Figura 2** - Distribuição de freqüências para emissão de plúmulas por embriões zigóticos provenientes de plantas das variedades brasileiras de coqueiro Anão Verde do Brasil (BrGD) e Gigante do Brasil (BrT1) e cultivados *in vitro*, na Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju/SE, entre março e outubro do ano de 2001.

O tipo de frasco utilizado para cultivar os embriões não influenciou significativamente os resultados obtidos. Não ocorreu interação entre a freqüência de contaminação e de perdas por outras razões com os outros fatores introduzidos no experimento (Tabela I).

Grande parte dos embriões emitiu radículas até a 5a. semana (Figura 1) e plúmulas até a 15a. semana (Figura 2). O período de 26 semanas de condução do experimento permitiu que um maior número de embriões germinasse, lançando radículas ou plúmulas, especialmente embriões provenientes de plantas BrT1,

que apresentaram desenvolvimento *in vitro* mais lento. Infelizmente, a manutenção do experimento por um período longo de tempo propiciou a contaminação de um maior número de embriões (germinados e não germinados). De todo o material manipulado durante o período do experimento, 50,6 % dos explantes foram eliminados em função da contaminação. Picos de contaminação ocorreram nos meses de maio (8 %) e junho (13 %) do ano de 2001. No restante do período de observação, apresentaram sintomas de contaminação, 4 a 7 % dos embriões manipulados em cada mês.

A percentagem de perdas não relacionadas à contaminação foi de cerca de 22 % e não houve interação com o genótipo, solução nutritiva ou tipo de frasco. Não germinaram, apesar de terem sido mantidos livres de contaminação até o final do experimento, 16,3 % dos embriões cultivados durante o período de 26 semanas.

As dificuldades encontradas para a aplicação plena das metodologias de cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de coqueiro das variedades brasileiras testadas podem, aparentemente, ser superadas com modificações pequenas nos protocolos já existentes. Resultados anteriores obtidos neste laboratório demonstraram que, de maneira geral, um em cada seis embriões atinge desenvolvimento suficiente para a transferência ao substrato, em casa de vegetação, após seis meses de cultivo *in vitro*. A utilização do ácido abscísico nos meios de cultivo tem sido associada com a aceleração de germinação *in vitro* de embriões (VASIL & VASIL, 1982). Experimentos como este poderiam ser conduzidos utilizando embriões zigóticos de coqueiro, para sincronizar o processo de maturação do material cultivado, aumentar a frequência de germinação e reduzir o tempo de permanência *in vitro*.

## CONCLUSÕES

Para o cultivo *in vitro* de embriões zigóticos maduros provenientes das variedades brasileiras de coqueiro, Anão Verde do Brasil (BrGD) e Gigante do Brasil (BrT1) é conveniente utilizar solução nutritiva de Y3.

Frascos de vidro Nalgene ou frascos para drágeas não geraram variação significativa e não interagiram com os outros fatores analisados.

Embriões zigóticos provenientes de plantas BrT1 apresentam desenvolvimento mais lento *in vitro* e precisam ser cultivados por um período de tempo mais longo para que emitam radículas e plúmulas.

## AGRADECIMENTOS

Aos Pesquisadores da Embrapa Tabuleiros Costeiros. Aos responsáveis pelo Setor de Compras, especialmente Nilo Sérgio Silva Dantas. Aos Técnicos

de Laboratório Daniel de Oliveira Santos, Robson Dantas Viana, Tereza Cristina de Oliveira, Luis Fernando de Carvalho e Jadson Alves Nascimento. À estagiária Juliana Paschoetto. Ao Técnico Agrícola Robson de Oliveira. À Auxiliar de Laboratório Maria da Conceição. Ao Banco do Nordeste, pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASHBURNER, G.R.; THOMPSON, W.K.; MAHESWARAN, G.; BURCH, J.M. (1991). The effect of solid and liquid phase in the basal medium of coconut (*Cocos nucifera* L.) embryo cultures. **Oléagineux**, 46(4): 149-152.
- ASSY-BAH, B.; DURANT-GASSELIN, T.; ENGELMANN, F.; PANNETIER, C. (1989). Culture *in vitro* d'embryons zygotiques de cocotier (*Cocos nucifera* L.). **Oléagineux**, 44(11): 516-523.
- COLEMAN, W.K.; DONNELLY, D.J.; COLEMAN, S.E. (2001). Potato microtubers as research tools: A review. **American Journal of Potato Research**, 78(1): 47-55.
- EEUWENS, C.J. (1976). Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera*) and cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, 36: 23-28.
- KARUNARATNE, S.; SANTHA, S.; KAVOOR, A. (1991). An *in vitro* assay for drought-tolerant coconut germplasm. **Euphytica**, 53: 25-30.
- LANGE, C.E.; FEDERIZZI, L.C.; CARVALHO, F.I.F.; DORNELLES, A.L.C.; HANDEL, C.L. (1998). Genetics of *in vitro* organogenesis and precocious germination of wheat embryos. **Genetics and Molecular Biology**, 21(1): 87-92.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 15: 473-479.

- RILLO, E.P.; PALOMA, M.B.F. (1990). Comparison of three media formulations for *in vitro* culture of coconut embryos. **Oléagineux**, 45: 319-323.
- RYAN, A.B.; CASTILLO, A.M.; VALLES, M.P.; SANZ, J.M.; CISTUE, L. (1999). Desiccated doubled-haploid embryos obtained from microspore culture of barley cv. **Plant Cell Reports**, 18(11): 924-928.
- SAS INSTITUTE INC. **SAS User's Guide: Basics, Version 5 Edition**. Cary, North Caroline, USA. 1985. p.1187.
- SIQUEIRA, E.R.; RIBEIRO, F.E.; ARAGÃO, W.M. Melhoramento genético do coqueiro. In: Ferreira, J.M.S; Warwick, D.R.N; Siqueira, L.A. (eds). **Cultura do Coqueiro no Brasil**. Aracaju: EMBRAPA-SPI, 1994. 309 p.
- VASIL, V.; VASIL, I.K. (1982). The ontogeny of somatic embryos of *Pennisetum americanum* (L.) K. Schum. I. Cultured immature embryos. **Botanical Gazette**, 143: 454-465.
- VERDEIL, J.L.; HUET, C.; GROSDÉMANGE, F.; BUFFARD-MOREL, J. (1994). Plant regeneration from cultured immature inflorescences of coconut (*Cocos nucifera* L.): evidence for somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**, 13(3-4): 218-221.
- ZHENG, S.J.; KHRUSTALEVA, L.; HENKEN, B.; SOFIARI, E.; JACOBSEN, E.; KIK, C.; KRENS, F.A. (2001). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Allium cepa* L.: the production of transgenic onions and shallots. **Molecular Breeding**, 7(2): 101-115.