



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE**

**CRIOPRESERVAÇÃO E TÉCNICAS DE INTERCÂMBIO DE
EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE ACESSOS DE COQUEIRO**

LEILA ALBUQUERQUE RESENDE DE OLIVEIRA

2015



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE**

LEILA ALBUQUERQUE RESENDE DE OLIVEIRA

**CRIOPRESERVAÇÃO E TÉCNICAS DE INTERCÂMBIO DE EMBRIÕES
ZIGÓTICOS DE ACESSOS DE COQUEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de “Mestre em Ciências”.

Orientador
Prof^a. Dr^a. Ana da Silva Lédo
Co-Orientador
Dr. José Guedes de Senna Filho

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL
2015

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA SISTEMA DE BIBLIOTECAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

O48c Oliveira, Leila Albuquerque Resende de
 Criopreservação e técnicas de intercâmbio de embriões zigóticos de acessos de
 coqueiro / Leila Albuquerque Resende de Oliveira ; orientadora Ana da Silva
 Ledo. – São Cristóvão, 2015.
 45 f. : il.

 Dissertação (mestrado em Agricultura e Biodiversidade)– Universidade
 Federal de Sergipe, 2015.

 1. Genética vegetal. 2. Coqueiro. 3. Coqueiro - Preservação. I. Ledo, Ana da
 Silva, orient. II. Título.

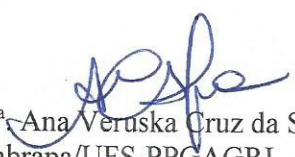
CDU 581.3:634.616

LEILA ALBUQUERQUE RESENDE DE OLIVEIRA

**CRIOPRESERVAÇÃO E TÉCNICAS DE INTERCÂMBIO DE EMBRIÕES
ZIGÓTICOS DE ACESSOS DE COQUEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de “Mestre em Ciências”.

APROVADA em 03 de fevereiro de 2015.


Prof.ª Dr.ª Ana Veruska Cruz da Silva
Embrapa/UFS-PPGAGRI


Prof.ª Dr.ª Aparecida Gomes de Araújo
Embrapa/Fapitec-SE


Prof.ª Dr.ª Ana da Silva Lédo
Embrapa/UFS-PPGAGRI
(Orientador)

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado força e coragem para conclusão desta etapa.

À CAPES, pela concessão de bolsa de mestrado.

À EMBRAPA, em especial à Embrapa Tabuleiros Costeiros pelo aporte de recursos.

À Universidade Federal de Sergipe, em especial ao PPGAGRI pela oportunidade.

À minha orientadora Dra. Ana da Silva Lédo, pela paciência e disposição, sempre me acompanhando e se dedicando para o meu crescimento profissional.

À Dra Aparecida Araujo Gomes, pela atenção, amizade e ensinamentos no laboratório.

Ao meu co-orientador Dr. José Guedes de Sena Filho, pelo entusiasmo e colaboração no trabalho.

À Dra. Ana Veruska Cruz da Silva, pelo apoio e carinho.

Às minhas queridas amigas Kicia Gomes-Copeland e Caroline Machado, pelos momentos especiais de cumplicidade. Sem vocês nada teria sido como foi, agradeço sempre a Deus por ter colocado cada uma no meu caminho, vocês são verdadeiras irmãs. Amo vocês!

À Inácio Roque, que esteve sempre pronto para ajudar, independente do dia ou hora. Obrigada!

Aos amigos do LABCULT/Embrapa: Annie, Isabella, Sara, Milena, Felipe e Flávia. Agradeço muito por todos os momentos especiais que dividimos.

Aos amigos do LABMOL/Embrapa: Silvio, Marina e Grasi. Obrigada pelo apoio.

Aos meus pais, José Carlos e Zuleide Albuquerque, por sempre acreditarem em mim, e por todo amor. Vocês são meus maiores exemplos!

Aos meus irmãos, Antônio Carlos, Livinha e Lili, pela confiança.

Enfim, obrigada a todos que contribuíram para a conclusão deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	ii
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO	2
3. CONCLUSÕES GERAIS	8
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	9
5. ARTIGO 1: CRIOPRESERVAÇÃO DE ACESSOS DE COQUEIRO (<i>Cocos nucifera</i> L.)	
Resumo.....	15
Abstract	16
5.1. Introdução	17
5.2. Material e Métodos	18
5.3. Resultados e Discussão	21
5.4. Conclusões	30
5.5. Referências Bibliográficas	30
6. ARTIGO 2: AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS DE INTERCÂMBIO NA CONTAMINAÇÃO E GERMINAÇÃO DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE ACESSOS DE COQUEIRO	
Resumo.....	34
Abstract	35
6.1. Introdução	36
6.2. Material e Métodos	36
6.3. Resultados e Discussão	39
6.4. Conclusões	42
6.5. Referências Bibliográficas	42
ANEXOS	44

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. Etapas da extração e assepsia de embriões zigóticos de coqueiro	19
FIGURA 2. Fluxograma da avaliação dos embriões zigóticos dos acessos AVeBrJ e GBrPF submetidos a soluções crioprotetoras em diferentes tempos de imersão e meios de regeneração.....	20
FIGURA 3. Porcentagem de sobrevivência de embriões zigóticos criopreservados (com formação de haustório e intumescidos) do acesso AVeBrJ em função de soluções crioprotetoras.....	24
FIGURA 4. Desenvolvimento de embrião criopreservado aos sete meses de cultivo em meio de regeneração.....	24
FIGURA 5. Alterações durante o desenvolvimento dos embriões zigóticos criopreservados do acesso AVeBrJ na fase de recuperação.....	25
FIGURA 6. Acessos de coqueiro	37
FIGURA 7. Etapas da assepsia de discos de endosperma, excisão e isolamento de embriões zigóticos de coqueiro	38

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1. Efeito de duas soluções crioprotetoras e tempos de imersão na umidade (%) de embriões zigóticos de coqueiro AVeJBr.....	22
TABELA 2. Porcentagem de sobrevivência de embriões zigóticos do coqueiro AVeBrJ criopreservados, pré-cultivados em duas soluções crioprotetoras em diferentes tempos de imersão, na ausência e presença de 0,5 µM ácido giberélico (GA ₃).....	23
TABELA 3. Efeito de duas soluções crioprotetoras e tempos de imersão na umidade (%) de embriões zigóticos de coqueiro GBrPF.....	26
TABELA 4. Porcentagem de sobrevivência de embriões zigóticos do coqueiro GBrPF criopreservados, pré-cultivados em duas soluções crioprotetoras em diferentes tempos de imersão.....	26
TABELA 5. Porcentagem de sobrevivência de embriões zigóticos de coqueiro AVeBrJ criopreservados (+NL) e não criopreservados (-NL) aos sete meses de cultivo <i>in vitro</i> em função das soluções crioprotetoras, faixas de tempo de imersão e ácido giberélico (GA ₃).....	28
TABELA 6. Porcentagem de sobrevivência de embriões zigóticos de coqueiro GBrPF criopreservados (+NL) e não criopreservados (-NL) aos sete meses de cultivo <i>in vitro</i> em função das soluções crioprotetoras, faixas de tempo de imersão e ácido giberélico (GA ₃).....	29
TABELA 7. Porcentagem de contaminação fúngica e bacteriana de embriões zigóticos de acessos de coqueiro anão vermelho da Malásia (AVM), anão vermelho dos Camarões (AVC) e anão amarelo da Malásia (AAM) em função de diferentes técnicas de intercâmbio aos 30 dias de cultivo <i>in vitro</i>	40
TABELA 8. Porcentagem de germinação de embriões zigóticos de acessos de coqueiro anão vermelho da Malásia (AVM), anão vermelho dos Camarões (AVC) e anão amarelo da Malásia (AAM) em função em função de diferentes técnicas de intercâmbio aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i>	41

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AAM	coqueiro anão amarelo da Malásia
AVC	coqueiro anão vermelho dos Camarões
AVM	coqueiro anão vermelho da Malásia
AVeBrJ	coqueiro anão verde do Brasil de Jiqui
BAG	banco ativo de germoplasma
GA ₃	ácido giberélico
GBrPF	coqueiro gigante do Brasil da Praia do Forte
Y3	meio de cultura estabelecido por Eeuwens (1975)
MF	massa fresca
MS	massa seca
+NL	material imerso em nitrogênio líquido
-NL	material não imerso em nitrogênio líquido

RESUMO

OLIVEIRA, Leila Albuquerque Resende de. **Criopreservação e técnicas de intercâmbio de embriões zigóticos de acessos de coqueiro**. São Cristóvão: UFS, 2015. 45p. (Dissertação – Mestrado em Agricultura e Biodiversidade).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de soluções crioprotetoras, tempos de imersão e meios de regeneração de embriões zigóticos criopreservados de coco e avaliar o efeito de diferentes procedimentos para a embalagem e tempo de armazenamento sobre a contaminação e germinação de embriões zigóticos. Para a criopreservação foram utilizados embriões zigóticos obtidos de frutos maduros provenientes de plantas matrizes de coqueiro gigante do Brasil da Praia do Forte (GBrPF) e anão verde do Brasil de Jiqui (AVeBrJ) do Banco Ativo de Germoplasma de Coco da Embrapa Tabuleiros Costeiros. Embriões de coqueiro AVeBrJ foram imersos em duas soluções crioprotetoras: C₁ – meio Y3 + 1,75 M sacarose + 15% glicerol, C₂ – meio Y3 + 3,33 M glicose + 15% glicerol e, embriões de coqueiro GBrPF nas soluções: C₁ - meio Y3 + 3,33 M glicose e C₂ – meio Y3 + 3,33 M glicose + 15% glicerol, ambos os acessos permaneceram imersos por 24, 48 e 72 horas. Posteriormente os explantes foram desidratados em sílica gel por 34 (AVeBrJ) e 30 horas (GBrPF), e imersos em nitrogênio líquido a -196° C por 24 horas, após esse período foram descongelados a 38 ± 2°C. Foi determinada a umidade dos embriões ao final da etapa de tratamentos crioprotetores e desidratação. Foi avaliada a porcentagem de sobrevivência e regeneração, após a transferência dos embriões para o meio de cultura Y3 suplementado ou não com 0,5 µmol de ácido giberélico. O pré-cultivo nas soluções crioprotetoras e os diferentes tempos de imersão não alteraram a viabilidade dos embriões. A solução crioprotetora composta por 1,75 M de sacarose e 15% de glicerol proporcionou menor umidade (12,3%) e maior sobrevivência (63,3%) aos embriões zigóticos de coco AVeBrJ criopreservados. Os embriões do acesso GBrPF alcançaram 77,8% de sobrevivência quando imersos no crioprotetor formado pelo meio Y3 + 3,33 M glicose, porém, ambas as soluções crioprotetoras quando combinadas com o menor tempo de imersão (24 horas) podem ser recomendadas. Para os estudos de procedimentos de transporte e armazenamento foram utilizados embriões de coqueiro anão vermelho dos Camarões (AVC), anão amarelo da Malásia (AAM) e anão vermelho da Malásia (AVM). Foram avaliados cinco procedimentos; T1- Armazenamento do disco de endosperma a 10 ± 2°C durante 5 dias; T2- Armazenamento do disco de endosperma a 10 ± 2°C durante 8 dias; T3- Armazenamento do disco de endosperma a 10 ± 2°C durante 12 dias (antes da excisão de embrião e a inoculação no meio de cultura Y3); T4- embrião zigótico excisado e inoculado em microtubo de 5 mL com 3 mL de meio de cultura Y3 sem sacarose e depois de 2 dias transferidos para meio de cultura Y3; T5- cinco embriões zigóticos inoculados em placa de Petri com meio de cultura Y3 sem sacarose e depois de 2 dias transferidos para meio de cultura Y3. O transporte de embriões zigóticos em placa de Petri com meio de cultura Y3 sem sacarose durante dois dias promove menor porcentagem de contaminação bacteriana. Todos os procedimentos estudados promovem baixa contaminação fúngica. O transporte de discos de endosperma em sacos plásticos e armazenados por cinco, oito e doze dias promove maior germinação de embriões zigóticos não contaminados dos acessos AVM e AAM. O transporte de embriões zigóticos isolados em microtubo com meio de cultura Y3 sem sacarose por dois dias e de discos de endosperma em sacos plásticos e armazenados por cinco e oito dias promovem maior germinação de embriões zigóticos não contaminados do acesso AVC.

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

ABSTRACT

OLIVEIRA, Leila Albuquerque Resende de. **Cryopreservation and exchange technicals of zygotic embryos of coconut accessions.** São Cristóvão: UFS, 2015. 45p. (Thesis - Master of Science in Agriculture and Biodiversity).*

The objective of this study was to evaluate the effect of cryoprotectant solutions, immersion times and regeneration means of zygotic embryos cryopreserved coconut and evaluate the effect of different procedures for packaging and storage time on contamination and germination of zygotic embryos. For cryopreservation were used zygotic embryos obtained from mature fruits of Brazil Green Dwarf (BGD) and Brazilian Tall (BRA) accessions of Active Bank Coconut Germplasm Embrapa Coastal Tablelands. BGD coconut seeds were placed in two cryoprotectant solutions: C1 - medium Y3 + 1.75 M sucrose + 15% glycerol, C2 - medium Y3 + 3.33 M glucose + 15% glycerol and BRA coconut embryos in solutions: C1 - medium Y3 + 3.33 M glucose and C2 - medium Y3 + 3.33 M glucose + glycerol 15%, both accesses remained immersed for 24, 48 and 72 hours. Thereafter explants were dehydrated on silica gel 34 (BGD) and 30 hours (BRA) and immersed in liquid nitrogen at -196 ° C for 24 hours, after this period were thawed at 38 ± 2 ° C. It was determined the humidity of the embryos at the end of step of cryoprotectants and dehydration treatments. The percentage of survival and regeneration was assessed after the embryo transfer into the culture medium Y3 supplemented or not with μmol 0.5 gibberellic acid. The pre-cultivation in cryoprotectant solutions and different immersion times did not affect embryo viability. The cryoprotective solution composed of 1.75 M sucrose and 15% glycerol showed lower moisture content (12.3%) and improved survival (63.3%) to the coconut BGD zygotic embryos cryopreserved. The BRA access the embryos reached 77.8% survival when immersed in cryoprotectant formed medium Y3 + 3.33 M glucose, however, both cryoprotectant solutions when combined with the shortest time of immersion (24 hours) may be recommended. For studies of transport and storage procedures were used Cameroon red dwarf (CRD), Malayan yellow dwarf (MYD) and Malayan red dwarf (MRD) accessions. We evaluated five cases; T1 endosperm disk storage at 10 ± 2 ° C for 5 days; T2 endosperm disk storage at 10 ± 2 ° C for 8 days; T3 endosperm disk storage at 10 ± 2 ° C for 12 days (before excision and embryo inoculation in culture medium Y3); T4 excised zygotic embryo and inoculated into culture medium Y3 in individual storage and 5 ml microtube 2 days and then transferred to culture medium Y3; T5- five zygotic embryos inoculated in culture medium Y3 in a Petri dish after 2 days and transferred to culture medium Y3. The transport zygotic embryos in Petri plate with Y3 culture medium without sucrose for two days promotes low percentage of bacterial contamination. All procedures studied promote low fungal contamination. The transport endosperm discs in plastic bags and stored for five, eight, and twelve days promotes higher germination of zygotic embryos uncontaminated MRD and MYD access. The transport of isolated zygotic embryos in microtube with Y3 culture medium without sucrose for two days and endosperm discs in plastic bags and stored for five and eight days promote increased germination of zygotic embryos uncontaminated CRD access.

Key-words: *Cocos nucifera*, *ex situ* conservation, genetic resources.

* Supervising Committee: Dra. Ana da Silva Léo – Embrapa Coastal Tablelands/PPGAGRI-UFS (Orientadora), Dr. José Guedes de Senna Filho – Embrapa Coastal Tablelands (Co-orientador).

1. INTRODUÇÃO GERAL

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.) é uma palmeira perene pertencente à família Arecaceae, denominada árvore da vida devido à sua versatilidade de uso, na qual possibilita a obtenção de ampla gama de produtos e subprodutos utilizados na indústria alimentícia, agroindustrial e em confecções.

O coqueiro apresenta sementes que dificultam o armazenamento por longo período de tempo, devido ao seu tamanho e recalcitrância, prevalecendo à conservação *ex situ* realizada por meio de coleções em campo, que possuem alto custo de manutenção, conservam os recursos genéticos por curto ou médio prazo e estão sob ameaça constante de fatores bióticos e abióticos, como o ataque de patógenos, intempéries climáticas e vandalismo. Diante desses entraves, justifica-se o desenvolvimento de técnicas alternativas de conservação.

Apesar das potencialidades e adaptabilidade são poucos os trabalhos relacionados à conservação a longo prazo dessa espécie. Desta forma é necessário a elaboração de estratégias para sua conservação, a fim de evitar ou reduzir a erosão da diversidade genética.

Com os avanços na área da biotecnologia vegetal torna-se possível a conservação de germoplasma de *Cocos nucifera* em bancos de germoplasma *in vitro* utilizando a técnica da criopreservação, na qual surge como estratégia complementar às coleções de campo. Os bancos de germoplasma *in vitro* oferecem vários benefícios, tais como produção de matrizes livres de patógenos, redução da erosão genética, redução da demanda por espaço e mão de obra. Desta forma pesquisas envolvendo o aprimoramento de técnicas que auxiliam a formação de tais bancos são de fundamental importância.

Outro aspecto a ser considerado é o intercâmbio seguro de germoplasma da espécie. A coleta e o intercâmbio de germoplasma de coqueiro, pelo método convencional, é inviável devido ao volume, peso e recalcitrância das sementes. Além disso, estudos demonstram a irregularidade nos rendimentos de germoplasma de coco introduzido por discos de endosperma e as altas porcentagens de contaminações.

Dessa forma, ajustes nos protocolos de intercâmbio têm sido alvo de estudos, e uma padronização nos protocolos de introdução com prioridade para a adoção de técnicas de cultura de tecidos de plantas tem sido recomendada.

Objetivou-se com o presente trabalho gerar conhecimento técnico-científico para estabelecer protocolos de criopreservação de coqueiro, como uma alternativa à conservação no campo, bem como estabelecer técnicas de intercâmbio de embriões zigóticos.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Origem, aspectos botânicos e socioeconômicos do coqueiro

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.) é a palmeira de maior importância socioeconômica das regiões intertropicais do globo terrestre (FONTENELE, 2005). Originária do sudeste da Ásia, nas ilhas situadas entre os oceanos Índico e Pacífico, essa planta de clima tropical foi disseminada para outras regiões do globo através de correntes marítimas e posteriormente por navegadores colonizadores (CHAN & ELEVITCH, 2006). No Brasil, foi introduzida pela primeira vez na Bahia, em 1553 a bordo de embarcações portuguesas provenientes das ilhas de Cabo Verde (SILVA, 2002).

Pela possibilidade de utilização da raiz, estipe, inflorescência, folhas e principalmente o fruto, através da obtenção de óleo, copra, água de coco, ácido láurico, etc, essa espécie tem sido denominada de “árvore da vida” (CHAN & ELEVITCH, 2006). Sua exploração gera emprego e renda em mais de 86 países, onde são extraídos produtos e subprodutos de grande interesse econômico (SOUTO, 2008).

De acordo com a FAO (2014) a Ásia é o maior continente produtor, com 51.582.214 toneladas, seguida das Américas, onde o Brasil é o primeiro produtor, responsável por uma produção de 2.890.286 toneladas de frutos (ano base 2013).

No litoral brasileiro é uma das culturas mais tradicionais, sendo a região Nordeste o primeiro produtor, correspondendo a 70% da produção nacional (IBGE, 2013). Tal porcentagem se deve às características climáticas desses locais, as quais influenciam diretamente no desenvolvimento do coqueiro. Este requer para um crescimento ideal, temperaturas médias anuais em torno de 27°C, precipitação anual em torno de 1.500 mm, insolação de 2.000 horas anuais, solos arenosos bem drenados e profundos (FONTES et al., 2002).

O gênero *Cocos* é constituído apenas pela espécie *Cocos nucifera* L., composta de duas variedades principais: *Typica* (variedade gigante) e *Nana* (variedade anã) (FOALE & HARRIES, 2009). Os híbridos de coqueiro mais utilizados são resultantes dos cruzamentos entre essas variedades. No Brasil, a área plantada é de aproximadamente 290 mil hectares, sendo que cerca de 10% dessa área é ocupada com híbridos, 20% com a variedade Anã, e 70% com a variedade gigante (EMBRAPA1).

O coqueiro gigante é uma variedade rústica, de crescimento rápido que atinge até 30 metros de altura. Inicia o florescimento entre 5 a 7 anos e produz até 80 frutos/planta/ano (EMBRAPA1), sendo empregados para uso culinário, na produção de doces e bolos, assim como na agroindústria de alimentos para leite de coco, farinha de coco (SANTANA, 2012; SILVA, 2002).

A variedade *Nana* é predominantemente autógama, pode atingir de 10 a 12 m de altura, possui vida útil de 30 a 40 anos (ARAGÃO, 2012), originou-se provavelmente, de uma mutação ocorrida na variedade gigante (ARAGÃO et al., 1999) e é composta pelas cultivares amarela, verde, vermelho de Camarões e vermelho da Malásia (CARVALHO et al., 2008a). Inicia a produção com dois a três anos após o plantio e produz até 200 frutos/planta/ano, estes bastante utilizados na forma de “coco verde”, em função da excelente qualidade de sua água (BENASSI, 2006; CAMBUÍ, 2007).

O coqueiro híbrido, por sua vez, possui porte intermediário, alcança cerca de 20 metros de altura e inicia a produção aos quatro anos após o plantio, produzindo até 150 frutos/planta/ano que são destinados tanto pela indústria de processamento de coco-seco, quanto na forma de coco-verde (SILVA, 2002; EMBRAPA1).

Esta palmeira tropical ainda é fonte de celulose para diversas aplicações (MAHESWARI, 2012), produz carvão vegetal de boa qualidade (ANDRADE, 2004), sua raiz é utilizada na fabricação de balaio e extração de medicamentos, a estipe no fornecimento de madeira para marchetaria e, as folhas na produção de chapéus, peneiras e cesto (ARAGÃO,

2012; BENASSI, 2006). A fibra do coco pode ser usada na manufatura de esteiras, cordas e, sua casca pode ser transformada em pó e utilizada como substrato para plantas (BRAZILIAN FIBRES, 2013).

Além das diversas aplicações dos seus produtos e subprodutos a cultura do coco apresenta uma série de vantagens agroeconômicas, sociais e ambientais (FONTENELLE, 2005). Por ser uma cultura perene, o coqueiro permite a consorciação com outras culturas, formando sistemas agroflorestais (ALMEIDA et al., 2002) e com animais (FERREIRA et al., 2011). Socialmente, constitui-se em uma alternativa para a base da agricultura sustentável nas pequenas e médias propriedades da região nordeste do Brasil (LÉDO, 2004) e, como fonte de geração de renda e meio de fixação do homem no campo, garantindo a ocupação de expressivo contingente rural durante o ano inteiro (CARVALHO et al., 2008a). Em termos ambientais, o coqueiro permite a recuperação de áreas degradadas em virtude de desmatamentos e o controle dos processos erosivos nas regiões litorâneas, onde melhor se desenvolve (FONTENELE, 2005).

2.2. Biotecnologia e conservação de recursos genéticos vegetais

O desenvolvimento de processos e produtos que tenham uma função econômica e, ou social a partir do uso parcial ou integral de organismos vivos, denomina-se biotecnologia (FALEIRO et al., 2011). Entre as técnicas biotecnológicas existentes, destacam-se: a cultura de tecidos, utilização de marcadores moleculares e a transformação genética.

Os recursos genéticos podem ser compreendidos como a variabilidade de espécies de plantas, animais e microrganismos integrantes da biodiversidade, de interesse socioeconômico atual e potencial para utilização em programas de melhoramento genético, biotecnologia e outras ciências afins (VALOIS et al., 1998). Portanto, os recursos genéticos são um reservatório natural de genes com potencial de uso para a produção sustentável de gêneros essenciais à humanidade, tais como alimentos, fibras e medicamentos e, como fonte da variabilidade para o melhoramento genético (SOUZA, et al., 2009; SANTOS, 2000).

Devido a sua grande importância, os recursos fitogenéticos devem ser protegidos de eventuais perdas, provocadas, por exemplo, pela ação antropogênica ou alterações ambientais, garantindo a sua utilização e evitando a erosão genética. A manutenção desta variabilidade ocorre por meio de duas estratégias básicas: conservação *in situ* e *ex situ* (CGIAR, 1993 citado por SANTOS, 2000).

Na conservação *in situ* as espécies são mantidas em seus habitats naturais, objetivando garantir proteção ao conjunto de genes das espécies e, quando necessário, preservar seu ecossistema inteiro (PAIVA, 1994).

A conservação *ex situ* envolve a manutenção, fora do habitat natural, de uma representatividade da biodiversidade, de importância científica ou econômica-social, inclusive para o desenvolvimento de programas de pesquisa, particularmente aqueles relacionados ao melhoramento genético (MMA, 2012). A manutenção de recursos genéticos *ex situ* podem ser em: câmaras de conservação de sementes (-20° C), cultura de tecidos (conservação *in vitro*), conservação *in vivo* (coleções de plantas no campo), bancos de germoplasma (para o caso de espécies vegetais) e núcleos de conservação (para o caso de espécies animais) (JARAMILLO & BAENA, 2002).

As instituições que mantêm as coleções *ex situ* são responsáveis por garantir a diversidade dos recursos genéticos através de coletas periódicas ou intercâmbio entre bancos de germoplasma; pela multiplicação; distribuição aos usuários e caracterização por diferentes metodologias (VIEIRA, 2000).

A conservação dos recursos genéticos do coqueiro baseia-se principalmente em coleções de campo, em função do tamanho da semente e pelo fato de serem recalcitrantes (N' NAN et al., 2011), ou seja, são sementes sensíveis à dessecação e baixas temperaturas, o que dificulta o seu armazenamento (CARVALHO, 2006).

Com objetivo de fortalecer a conservação e uso dos recursos genéticos do coqueiro foi formada a rede internacional de recursos genéticos de coco - COGENT, criada em 1992 pelo *Bioversity International*, no qual integra 39 países incluindo o Brasil (COGENT, 2012).

No Brasil a empresa brasileira de pesquisa agropecuária - Embrapa é a responsável por coletar, caracterizar e conservar a variabilidade genética do Banco Ativo de Coco (BAG) para América Latina e Caribe. A Embrapa Tabuleiros Costeiros possui o BAG de coco, criado em 1982 a partir da importação dos primeiros acessos de coqueiro da Costa do Marfim. Este BAG mantém a variabilidade genética por meio da conservação de 35 acessos de coqueiro anão e gigante, distribuídos em dois campos experimentais: o campo experimental de Itaporanga, localizado no município de Itaporanga d'Ajuda - SE e o segundo, em fase de desativação, encontra-se no Campo experimental do Betume, localizado em Ilha das Flores - SE (EMBRAPA2).

2.3. Conservação *in vitro*

Os métodos convencionais de manutenção de bancos de germoplasma, geralmente são compostos por coleções de campo, nos quais necessitam de grande área de cultivo, apresentam altos custos de manutenção (poda, controle de pragas, propagação e fertilização), elevada suscetibilidade ao ataque de patógenos, além de falhas na identificação, vandalismo e intempéries climáticas (ENGELMANN, 1991; ENGELMANN, 2011; STUSHNOFF, 1987).

A conservação de plantas *in vitro* vem com uma forma alternativa complementar ao método convencional, principalmente para espécies que produzem sementes recalcitrantes e intermediárias. A conservação *in vitro* baseia-se no cultivo das coleções vegetais em laboratório, a partir de técnicas da cultura de tecidos (GEORGE, 1993). Esta técnica consiste na seleção de fragmentos vegetais, denominados explantes, seguido da desinfestação e inoculação em meio de cultura em condições adequadas de temperatura e luminosidade (SANTOS, 2000).

Esse método de conservação possibilita a manutenção de um grande número de acessos em pequeno espaço físico, mão de obra e custos reduzidos, livre das intempéries e de riscos existentes no campo. Além disso, garante a manutenção da fidelidade genética e facilita a disponibilidade de material para o melhoramento genético, pois proporciona ao melhorista acesso imediato a todo germoplasma da coleção e o seu intercâmbio (FARIA et al., 2006).

No entanto, existem desvantagens como o risco de contaminação do meio de cultivo, a necessidade de construção de instalações e a exigência de mão-de-obra especializada para o manuseio dos acessos (SOUZA et al., 2009).

O método de conservação *in vitro* pode ser realizado via meio de cultura para crescimento lento e também por meio da criopreservação. A escolha por determinado método de conservação dependerá do período de conservação desejável, das espécies a serem conservadas, da parte da planta a ser preservada, da disponibilidade de mão de obra e dos recursos financeiros disponíveis (CARVALHO, 2006).

2.3.1. Criopreservação

A criopreservação compreende a conservação do material vegetal em temperatura ultra baixa fornecida pelo nitrogênio líquido a -196°C , ou em sua fase de vapor ao redor de -150°C (SANTOS, 2000). Desta forma, a criopreservação torna-se um procedimento viável para conservação de material biológico por longos períodos de tempo. A baixa temperatura permite que as reações bioquímicas e físicas fiquem praticamente interrompidas, portanto, não são necessários subcultivos e a ameaça de variação somaclonal é reduzida (BENEDITO, 2004).

Além disso, a criopreservação mantém a estabilidade genética e características fenotípicas, requerendo reduzido espaço e pouca manutenção (SARTOR, 2012). E, permite armazenar diferentes tipos de células de plantas, tecidos e órgãos, incluindo células em suspensão, pólen, culturas embriogênicas, embriões somáticos e zigóticos, gemas apicais ou meristemas (BENEDITO, 2004).

A criopreservação tem sido utilizada na conservação de recursos genéticos de muitas espécies, incluindo espécies ameaçadas de extinção (TOUCHELL, 1996) e espécies com características recalcitrantes, tais como o coqueiro (ENGELMANN, 2011).

O primeiro trabalho envolvendo a criopreservação de embriões de coco foi desenvolvido em 1984, onde somente uma plântula foi obtida depois de 15 meses no meio de cultura (MAULARIE et al., 2004). O sucesso na criopreservação de embriões de coco proveniente de frutos imaturos (7 a 8 meses após a polinização) e maduros foi relatado por Assy Bah & Engelmann (1992). Outro material interessante para iniciar a criopreservação do coqueiro são as plúmulas (meristema embrionário cercado por primórdios foliares), retiradas de embriões zigóticos, pois apresentam intensa divisão celular, tamanho reduzido (cerca de 1 mm) e são livres de doenças virais (BANDUPRIYA et al., 2010).

A maioria das células vivas vegetais possui grande quantidade de água, e um dos grandes problemas da criopreservação é a formação de gelo devido ao congelamento da água intracelular. Os cristais de gelo causam a ruptura do sistema de membranas celulares, resultando em perda da semipermeabilidade e da compartimentalização da célula, ocasionando, conseqüentemente, a morte celular (SANTOS, 2001). Uma das formas de evitar este problema é por meio da desidratação dos explantes antes da imersão em nitrogênio líquido.

De acordo com SISUNANDAR et al. (2010) o uso da câmara de fluxo laminar é a técnica de desidratação mais utilizada para reduzir o teor de umidade do material vegetal. Porém, Benelli et al. (2013) asseguram que a desidratação de embriões por meio da sílica gel é mais seguro e reprodutível, em relação à desidratação sob as condições de câmara de fluxo laminar. Esta afirmação é confirmada pelos resultados obtidos por N'Nan et al. (2012), que testaram durante o pré-tratamento de embriões zigóticos de duas variedades de coco, quantidades diferentes de sílica gel (80 e 160 g) por 48 ou 24 h de secagem. Os maiores percentuais de germinação dos embriões zigóticos para as variedades anã e gigante foram de 93,8% (48 h) e 46,8% (30 h), respectivamente.

A garantia da estabilidade genética do material é necessária durante a criopreservação, sendo, geralmente, alcançada quando são utilizados como explantes meristemas apicais, devido ao fato desses apresentarem um processo ordenado de replicação cromossômica, o que resulta na redução do risco de instabilidade genética (SOUZA et al., 2009).

Com relação a *Cocos nucifera*, desde 1984 já são relatados os primeiros estudos de criopreservação. Em 1992, Assy-Bah & Engelmann iniciaram estudos preliminares utilizando embriões zigóticos de coco. Atualmente, há muitas pesquisas com resultados promissores em termos de descongelamento e regeneração.

Entretanto, pesquisas direcionadas para cultivares são incipientes. As primeiras pesquisas no Brasil com criopreservação de coqueiro foram iniciadas em 2011 com o coqueiro anão verde do Brasil de Jiqui, na Embrapa Tabuleiros Costeiros, onde foi possível desenvolver um protocolo de desidratação de embriões e a adaptação de metodologias para estudo da viabilidade de embriões zigóticos após a desidratação (GOMES-COPELAND, 2010; GOMES-COPELAND et al., 2012) e a crioconservação de grãos de pólen para diversos acessos (MACHADO et al., 2014).

Ao longo dos últimos dez anos observa-se o desenvolvimento de técnicas denominadas vitrificação e encapsulamento-desidratação, com base no congelamento ultrarrápido de materiais, incluindo gemas apicais e embriões somáticos, a fim de minimizar os danos da dessecação e do congelamento (SANTOS, 2000).

A vitrificação é o processo onde a água sofre uma transição da fase líquida para um estado sólido amorfo ou vítreo (FRANKS, 1982). Quando as células desidratadas atingem o estado vítreo, a viscosidade obtida restringe a difusão de substratos e produtos dentro das células, promovendo a inatividade metabólica e estabilidade ao longo do tempo (GOMES-COPELAND et al., 2012).

De acordo com Kaviani (2011), a vitrificação envolve a remoção total ou parcial da água passível de congelamento, por meio da desidratação física ou osmótica dos explantes, seguido do congelamento ultrarrápido em nitrogênio líquido. Portanto, na técnica de vitrificação o material vegetal é desidratado na presença de sílica gel ou câmara de fluxo laminar e/ou, por meio da exposição às altas concentrações de solução criopreservantes. Atualmente, as soluções criopreservantes mais utilizadas são a sacarose, trealose e glicose, pois não apresentam citotoxicidade e possuem alta eficiência na estabilização da membrana celular durante a imersão do material vegetal em nitrogênio líquido (SILVA, 2011).

A técnica de vitrificação é considerada de fácil realização e, frequentemente, atinge alta porcentagem de regeneração, sendo amplamente aplicada, particularmente em espécies sensíveis às baixas temperaturas (TAKAGI et al., 1997). Assy-Bah e Engelmann (1992) aplicaram a técnica da vitrificação em embriões zigóticos de *Cocos nucifera*, utilizando como solução crioprotetora: 3,32 M de glicose + 15% de glicerol durante 24 horas de imersão, e obtiveram 93% de sobrevivência de embriões criopreservados do híbrido PB121. Sakai (2000) recomenda cultivar previamente os tecidos em meio com alta concentração de sacarose (0,3 M) ou sorbitol (1,4 M) para induzir tolerância à dessecação.

Esse método tem sido aplicado em vários tipos de explantes, incluindo organismos complexos, tais como gemas apicais e embriões zigóticos (ASSY-BAH & ENGELMANN, 1992; BENELLI et al., 2013). De acordo com Berjak et al. (2000), os embriões zigóticos são usados com sucesso na criopreservação do germoplasma de muitas espécies vegetais que possuem sementes recalcitrantes, intermediárias ou com problemas no armazenamento. Além disso, os embriões são tecidos altamente organizados, capazes de regenerar uma planta completa, reduzindo os riscos de variação somaclonal.

O encapsulamento-desidratação é baseado na tecnologia de sementes sintéticas, técnica desenvolvida por Kitto & Janick em 1982. Segundo Benelli (2013), esta técnica refere-se ao encapsulamento do material vegetal nas soluções de alginato de sódio e cloreto de cálcio, seguido da imersão em meio líquido enriquecido com concentrações de sacarose variando de 0,75 e 1,25 M por 1 a 7 dias, da desidratação dos encapsulados em câmara de fluxo laminar por diferentes períodos e, imersão em nitrogênio líquido.

Ampla variedade de explantes podem ser criopreservados por meio do encapsulamento-desidratação, desde que possuam dimensões de até 4 mm de comprimento. Em estruturas maiores (5 a 8 mm) como o embrião de coco, por exemplo, torna-se inviável a aplicação desta técnica, devido à dificuldade em se formar as cápsulas (GOMES-COPELAND, 2010).

Esta técnica tem sido aplicada para inúmeras espécies e tipos de explantes, como: ápices caulinares de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) (LOPES, 2005), gemas apicais de damasqueiro *Prunus armeniaca* L. (SOLIMAN, 2013), gemas apicais e laterais de mangabeira (*Hancornia speciosa*) (SARTOR et al., 2012), plúmulas de coqueiro (N'NAN et al., 2008; BANDUPRIYA et al., 2007, 2010; MALAURIE et al., 2011).

Plúmulas de coqueiro têm sido criopreservadas pelo método do encapsulamento-desidratação utilizando diferentes concentrações de sacarose e períodos de desidratação, obtendo de 40-70% de sobrevivência após a criopreservação (N'NAN et al., 2008). Testando o efeito do ácido abscísico combinado com 0,75 M sacarose no método de encapsulamento-desidratação para criopreservação de plúmulas de coqueiro, Bandupriya et al. (2007) obtiveram até 84% de plúmulas criopreservadas sobreviventes.

Tanto o encapsulamento-desidratação quanto a vitrificação são empregados com o objetivo de desenvolver e ajustar protocolos de bancos de germoplasma no mundo (ENGELMANN, 1991).

Vários fatores influenciam o sucesso da conservação *in vitro*, dentre estes se destaca a regeneração do material, ou seja, a recuperação das células vivas e formação de uma planta completa e vigorosa. Para que o protocolo de conservação *in vitro*, seja efetivo é necessária a manutenção da viabilidade do material com a retomada do crescimento e regeneração de uma

nova plântula. Desta forma, é de fundamental importância que a espécie possua protocolos de regeneração *in vitro* definidos (SANTOS & SALOMÃO, 2010).

2.4. Coleta e intercâmbio de recursos genéticos

O intercâmbio de germoplasma é uma estratégia de transferência e enriquecimento de patrimônio genético vegetal de um país ou organização, fundamentada no princípio de reciprocidade e delimitada por regras preestabelecidas pela segurança biológica baseada em lei fitossanitária e de proteção ao patrimônio genético dos países. Seu principal objetivo é suprir, de germoplasma indispensável à pesquisa, os programas de melhoramento genético do país, adotando-se as precauções necessárias com a finalidade de evitar a entrada de pragas (EMBRAPA3).

O intercâmbio de germoplasma é importante por permitir o acesso a materiais genéticos distintos dos locais, além destes já serem selecionados para características importantes como alta produtividade, tolerância ou resistência a pragas e doenças e adaptação à certas condições ambientais.

A agricultura brasileira tem-se beneficiado com a introdução de germoplasma advindos de outros países, já que a maioria das espécies vegetais que fazem parte da alimentação dos brasileiros é exótica (CARVALHO et al., 2008b). Dessa forma, é essencial para o Brasil manter o fluxo de intercâmbio de recursos genéticos vegetais sempre em alta (VEIGA, 2008).

No entanto, contrapondo-se a necessidade de introduzir o máximo possível de variabilidade genética, vem a obrigatoriedade de evitar o ingresso simultâneo de pragas exóticas (VEIGA, 2006), considerando que a dispersão de pragas junto aos produtos comercializados ou intercambiados é um dos maiores desafios na troca de produtos agrícolas (OLIVEIRA et al., 2003).

O germoplasma introduzido de outras regiões do país, onde haja restrições de trânsito, e do exterior, precisam necessariamente passar por um rígido controle. Tal controle refere-se ao fiel cumprimento da legislação fitossanitária vigente, e se concretiza através de ações que incluem a quarentena doméstica (VEIGA, 2006).

Quarentena vegetal significa o isolamento de plantas por um período de incubação de 40 dias para o aparecimento e detecção de sinais e/ou sintomas de doenças. O seu principal objetivo é prevenir a introdução de organismos nocivos em áreas isentas, utilizando a exclusão como estratégia no controle contra pragas exóticas, sendo aplicada a produtos de importação e exportação (OLIVEIRA et al., 2003; WATERWORTH & WHITE, 1982).

O volume cada vez maior de troca internacional de recursos genéticos, juntamente com os recentes avanços da biotecnologia, criou necessidades urgentes de avaliações específicas relativas à segurança fitossanitária de transferência de germoplasma (SILVA, 2002).

Embora seja essencial para a utilização e melhoramento dos recursos genéticos, o movimento de germoplasma de coco também representa um risco de transferência de pragas e doenças, uma vez que algumas destas são isoladas geograficamente. A disseminação do amarelecimento letal do coqueiro, causado por fitoplasmas e Cadang-Cadang pelo vírus *Coconut cadang cadang viroid-CCCVd* demonstra que cuidados são necessários quando se transporta material vegetal de coqueiro (CUETO et al., 2012).

A coleta e o intercâmbio de germoplasma de coqueiro, pelo método convencional, é difícil e de alto custo devido ao volume e peso das sementes. Além disso, são recalcitrantes, não suportando o armazenamento, e na maioria das vezes ocorrendo contaminação (SILVA, 2002).

Existem poucos trabalhos na literatura que avaliaram a eficiência de diferentes métodos de intercâmbio de germoplasma de coqueiro. O primeiro relato foi em 1993, quando foram avaliadas diferentes formas de transporte de embriões e discos de endosperma de coqueiro gigante Gazelle e seus efeitos na contaminação das culturas. Segundo Ashburner e

Thompson (1993), o transporte de discos de endosperma em sacos plásticos alcançou 100% de contaminação, em contrapartida, embriões zigóticos excisados e inoculados em água estéril obteve 0% de contaminação e 86,7% de germinação.

Na mesma época, foi lançado o primeiro documento orientador para a cultura do coco proposto pela FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), em 1993, com ênfase aos procedimentos de intercâmbio utilizando sementes, pólen e embriões zigóticos extraídos ou não do endosperma (FRISON et al., 1993).

Segundo Marques et al. (1995), a introdução de germoplasma por cultura de tecidos é relativamente segura, pois a própria manipulação do explante pode eliminar pragas, fungos e bactérias. No entanto, o sucesso da tecnologia depende da situação no campo e no laboratório, assim como da política nos países envolvidos no programa de intercâmbio (CUETO et al., 2012).

O protocolo oficial da FAO proposto por Frison et al. (1993) para o intercâmbio seguro de germoplasma de coco por disco de endosperma, utilizado pela primeira vez no Brasil em 2008, e não foi eficiente para o controle contaminação por bactérias em onze acessos de coqueiro-anão e um acesso de coqueiro gigante, provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Ásia, Índia e Oceania, localizado na Costa do Marfim (LÉDO et al., 2011).

Na tentativa de identificar o método mais adequado para intercâmbio de embriões zigóticos maduros de coco para trabalhos de criopreservação, Bandupriya et al. (2010), relataram a importância da condição de transporte/armazenamento de embriões, enfatizando seu efeito significativo na recuperação de plúmulas. Os autores concluíram que embriões inoculados em ágar solidificado alcançaram uma taxa significativamente mais elevada de recuperação em relação aos demais tratamentos.

Em função da irregularidade nos rendimentos de germoplasma de coco introduzido por discos de endosperma e as altas porcentagens de contaminações devido o tempo entre a coleta, transporte e inoculação do embrião zigótico, foi proposto a partir de um workshop do COGENT/Bioversity International realizado nas Filipinas em 2008, uma padronização nos protocolos de introdução com prioridade para a adoção de técnicas de cultura de tecidos de plantas¹. Os protocolos recomendam diretrizes para o movimento seguro de germoplasma de coco o intercâmbio de discos de endosperma contendo o embrião zigótico ou embriões zigóticos *in vitro* com a finalidade de evitar a disseminação de doenças. As recomendações incluem desde a seleção e o preparo das plantas mães doadoras até a transferência dos embriões zigóticos para meio de germinação (CUETO et al., 2012).

3. CONCLUSÕES GERAIS

Com os avanços na área da biotecnologia vegetal torna-se possível a conservação de germoplasma de *Cocos nucifera* em bancos de germoplasma *in vitro*, utilizando a técnica da criopreservação, na qual surge como estratégia complementar às coleções de campo.

Ajustes nos protocolos de intercâmbio e padronização nos protocolos de introdução para a cultura do coqueiro com a adoção de técnicas de cultura de tecidos de plantas são prioritários.

A geração de conhecimento técnico-científico para estabelecer protocolos de criopreservação de coqueiro, como uma alternativa à conservação no campo, bem como estabelecer técnicas de intercâmbio de embriões zigóticos torna-se imprescindível para programas de recursos genéticos e melhoramento do coqueiro.

¹ Informações cedidas pela pesquisadora Ana da Silva Lédo da Embrapa Tabuleiros Costeiros em 04 de novembro de 2014.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, C.M.V.; MULLER, M.W.; GOMES, A.R.S.; MATOS, P.G.G. Sistemas Agroflorestais com o cacaueiro como alternativa sustentável para uso em áreas desmatadas, no estado de Rondônia, Brasil. **Agrotrópica**, p.109-120, 2002.

ANDRADE, A.M.; PASSOS, P.R.; MARQUES, L.G.C.; OLIVEIRA, L.B.; VIDAURRE, G.B.; ROCHA, J.D. Pirólise de resíduos do coco-da-baía (*Cocos nucifera* Linn.) e análise do carvão vegetal. **Revista Árvore**, v.28, n.5, p.707-714, 2004.

ARAGÃO, W.M. A cultura do coqueiro. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Coco/ACulturadoCoqueiro/cultivares.htm>>. Acesso em 22 de Setembro de 2012.

ARAGÃO, W.M.; SIQUEIRA, E.R. de; RIBEIRO, F.E.; TUPINAMBÁ, E. A. Melhoramento do coqueiro e híbridos. In: SÃO JOSÉ, A.R.; SOUZA, I. V. B.; MOURA, J. I. L.; REBOUÇAS, T. N. H. (Eds.) **Coco produção e mercado**. Vitória da Conquista, p. 44-68, 1999.

ASHBURMNER, G.R.; THOMPSON, W.K. Coconut embryo culture for the international transfer of germoplasm. In: NAIR, M.K. et al. **Advances in coconut research and development**. New Delhi: Oxford & IBH publishing Co. LTD. p.43-49, 1993.

ASSY-BAH, B.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of mature embryos of coconut (*Cocos nucifera* L.) and subsequent regeneration of plantlets. **Cryo-Letters**, v.13, p.117-126, 1992.

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**, v.18, n.1, p.135-137. 2010.

BANDUPRIYA, H.D.D.; FERNANDO, S.C.; VERDEIL, J.L.; MALAURIE, B. Cryopreserved plumule explants of coconut (*Cocos nucifera* L.). **Cocos**, v.18, p.58-66, 2007.

BENASSI, A.C. **Caracterização biométrica, química e sensorial de frutos de coqueiro variedade Anã verde**. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 97 p., 2006. (Tese de doutorado).

BENEDITO, M.E.G.; RAMÍREZ, C.; ARANDA, J.M.L. Review. The use of cryopreservation for germplasm conservation of vegetatively propagated crops. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v.2, n.3, p. 341-351, 2004.

BENELLI, C.; CARLO, A.; ENGELMANN, F. Recent advances in the cryopreservation of shoot-derived germplasm of economically important fruit trees of Actinidia, Diospyros, Malus, Olea, Prunus, Pyrus and Vitis. **Biotechnology Advances**, v.31, p.175–185, 2013.

BERJAK, P.; WALKER, M.; MYCOCK, D.J.; WESLEY-SMITH, J.; WATT, P.; PAMMENTER, N.W. Cryopreservation of recalcitrant zygotic embryos. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (Ed.). **Cryopreservation of tropical plant germplasm: current research progress and application**. Tsukuba: Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Japan/International; Rome: International Plant Genetic Resources Institute, v.2, n.3, p.140-155, 2000.

Brazilianfibres. Disponível em:
<<http://www.brazilianfibres.com/portal/index.php/pt/empresas/24-o-coco-produtos>>.
Acesso em 11 de Novembro de 2013.

CAMBUI, E.V.F.; ARAGÃO, W.M.; LEAL, M.L.S. Variabilidade genética entre cultivares de Coqueiro Anão (*Cocos nucifera* L. – Var. Nana). **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, supl. 1, p.165-167, jul. 2007.

CARVALHO, E.X.; CLODOALDO, J.A.F.; ARAGÃO, W.M.; MUSSER, R.S.; FERRAZ, L.G.; REIS, O.V.; BASTOS, G.Q.; OLIVEIRA, F.J. Variabilidade e comportamento de cultivares de coqueiro anão nos tabuleiros costeiros do norte de Sergipe. **Bragantia**, v.67, n.1, p.91-100, 2008a.

CARVALHO, J.M.F.C.; ARAÚJO, S.S.; SILVA, M.A. da. **Preservação e intercâmbio de germoplasma**. Embrapa algodão, Campina Grande, Paraíba, 24p., 2008b.

CARVALHO, L.R.; SILVA, E.A.A.; DAVIDE, A.C. Classificação de sementes florestais quanto ao comportamento no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, v.28, n.2, p.15-25, 2006.

CHAN, E.; ELEVITCH, C.R. *Cocos nucifera* (coconut), ver. 2.1. In: CHAN, E.; ELEVITCH, C.R. (Ed.) **Species Profiles for Pacific Island Agroforestry**. Permanent agriculture resources (PAR). Honolu. Abr. 2006. Disponível em: <http://www.tradicionaltree.org>. Acesso em 02/10/2013.

COGENT- Coconut genetic resources network. Disponível em:
<<http://www.cogentnetwork.org/index.php/about-cogent>>. Acesso em: 09 nov. 2012.

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

EMBRAPA1. Melhoramento genético. **Árvore do conhecimento Coco**. Disponível em:
<<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/coco/arvore/CONT000gl5m652b02wx5ok0xkgyq5dmanf8w.html>>. Acesso em: 15 nov. 2014.

EMBRAPA2. Banco ativo de germoplasma. **Árvore do conhecimento Coco**. Disponível em:
<<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/coco/arvore/CONT000giw3zt3v02wx5ok05vadr13f3ba09.html>>. Acesso em: 15 nov. 2014.

EMBRAPA3. Recursos Genéticos e Biotecnologia. **Intercâmbio de germoplasma**. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/recursos-geneticos-e-biotecnologia/pesquisa-e-desenvolvimento/intercambio-de-germoplasma> >. Acesso em: 30 out. 2014.

ENGELMANN, F. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm- a review. **Euphytica**, v.57, p.227-243, 1991.

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In vitro cellular developmental biology – plant**, v.47, p. 5-16, 2011.

FALEIRO, F.G.; ANDRADE, S.R.M.; JUNIOR, F.B.R. **Biotecnologia estado da arte e aplicações na agropecuária**. Embrapa cerrados, 730 p. 2011.

FAO – Food and Agriculture Organization. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>>. Acesso em 15 de janeiro de 2015.

FARIA, G.A.; COSTA, M.A.P.C.C.; JUNGHANS, T.G.; LÉDO, C.A.S.; SOUZA, A.S. Efeito da sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* de *Passiflora giberti* N. E. Brown. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.28, n.2, p. 267-270, 2006.

FERREIRA, R.A.; ESTRADA, L.H.C.; THIÉBAUT, J.T.L.; GRANADOS, L.B.C.; JUNIOR, V.R.S. Avaliação do comportamento de ovinos Santa Inês em sistema silvipastoril no norte fluminense. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, n.2, p.399-403, 2011.

FOALE, M.; HARRIES, H. Farm and Forestry Production and Marketing Profile for Coconut (*Cocos nucifera*). In: ELEVITCH, C.R. (ed.). **Specialty crops for Pacifics Island Agroforestry**. Permanent Agriculture Resources (PAR), Holualoa, Hamaii.<http://agroforestry.net/scps>. 2009.

FONTENELE, R.E.S. **Cultura do coco no Brasil**: Caracterização do mercado atual e perspectivas futuras. XLIII CONGRESSO DA SOBER “Instituições, Eficiência, Gestão e Contratos no Sistema Agroindustrial”. Ribeirão Preto, 2005.

FONTES, M.R.; FERREIRA, J.M.S.; SIQUEIRA, L.A. **Sistema de produção para a cultura do coqueiro**. Editores. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2002. 63p. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Sistemas de Produção, 01). Disponível em <http://www.cpatc.embrapa.br>

FRANKS, F. The properties of aqueous solutions at subzero temperatures. In F. Franks, ed., **Water: a comprehensive treatise**. Plenum Press, New York, p.215-218, 1982.

FRISON, E.A., PUTTER, C.A.J.; DIEKMANN, M. **FAO/IBPGR Technical guldelines for the safe movement of coconut germoplasm**. Rome: IBGR, 15p. 1993.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. London: Exegetics, v.1, 2. ed. 1993.

GOMES-COPELAND, K.K.P.G. **Estudos fisiológicos e bioquímicos para criopreservação de embriões zigóticos de coqueiro anão verde de Jiqui do Brasil**. 2010, 51p. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal de Sergipe, Sergipe, 2010.

GOMES-COPELAND. K.K.P.G.; LÉDO, A.S.; ALMEIDA, F.T.C.; MIRANDA, R.P.; SANTOS, I.R.I. Assessing the viability of cryopreserved coconut zygotic embryos by electrolytic conductivity and potassium leaching. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.47, n.1, p.8-13, 2012.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=1613&z=t&o=11&i=P>>. Acesso em: 10 dez. 2014.

JARAMILLO, S.; BAENA, M. **Manual de apoio à formação e treino em conservação ex situ de recursos fitogenéticos**. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, 2002.

KAVIANI, B. Conservation of plant genetic resources by cryopreservation. **Australian Journal of Crop Science**, v.5, n.6, p. 778-800, 2011.

KITTO, S.L.; JANICK, J. Production of synthetic seeds by uncapsulating assexual embryos of carrot. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.110, n.2, p.277-282, 1985.

LÉDO, A.S.; GOMES, K.K.P.; VIEIRA, G.S.S. Avanços no conhecimento técnico-científico da produção de mudas de coqueiro anão. **Anais... II Seminário de Pesquisa FAP-SE**, 2., p.3. 2004.

LÉDO, A.S.; RAMOS, S.R.R.; DINIZ, L.E.C.; KONAN, J.L.K.; GEORGE, M.L. Performance of coconut embryo culture accessions introduced at the International Coconut Genebank for Latin America and the Caribbean (ICG-LAC). **Acta Horticulturae**, n.918, p.177-182, 2011.

LOPES, K.P. **Criopreservação de germoplasma de oleaginosas de importância econômica para o nordeste brasileiro**. 2005. 113 F. (Tese, Agronomia Sementes). Universidade Federal da Paraíba, Areia, PB, 2005.

MACHADO, C.A.; MOURA, C.R.F.; RAMOS, S.R.R.; RIBEIRO, F.E.; LEDO, A.S. Pollen grains viability of coconut accessions at low temperatures. **Acta Scientiarum Agronomy** (Online), v. 36, p. 227-232, 2014.

MAHESWARI, C.U.; REDDY, K.O.; MUZENDA, E.; GUDURI, B.B.; RAJULU, A.V. Extraction and characterization of cellulose microfibrils from agricultural residue e *Cocos nucifera* L. **Biomass and Bioenergy**, p.9, 2012.

MALAUURIE, B.; N'NAN, O.; BORGES, M.; BANDUPRIYA, H.D.D.; PERERA, P.; FERNANDO, S.C.; VALÉRIE, H.; VERDEIL, J.L. **The use biotechnology for conservation and dissemination of coconut genetic resources**: An assessment of the IRD/CIRAD contribution. International conference. Sri Lanka, p. 233-253, 2004.

MALAUURIE, B.; TREGAR, 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**, v.908, p. 461-466, 2011.

MARQUES, A.S.A.; PARENTE, P.M.G.; MARINHO, V.L.A.; BUSO, G.S.C. A quarentena e o intercâmbio de germoplasma vegetal no Brasil: A atuação do Cenargen. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.30, n.2, p.143-154, 1995.

MMA – Ministério do meio ambiente. Disponível em: <www.mma.gov.br/biodiversidade/conserva%C3%A7%C3%A3o-e-promo%C3%A7%C3%A3o-do-uso-da-diversidade-gen%C3%A9tica/agrobiodiversidade/conserva%C3%A7%C3%A3o-in-situ,-ex-situ-eonfarm>. Acesso em: 16 nov. 2013.

N'NAN, O.; HOCHER, V.; VERDEIL, J.L.; KONAN, J.L.; BALLO, K.; MONDEIL, F.; MALAUURIE, B. Cryopreservation by encapsulation–dehydration of plumules of coconut (*Cocos nucifera* L.). **Cryoletters**, v.24, n.4, p.339-350, 2008.

N'NAN, O.; BORGES, M.; KONAN 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**, v.48, p.160-166, 2012.

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**, v.98, p.461-466, 2011.

OLIVEIRA, M.R.V.; MARTINS, O.M.; MARINHO, V.L.A.; MENDES, M.A.S.; TENENTE, R.C.V.; FONSECA, J.N.L.; BATISTA, M.F. **O mandato da quarentena vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, 61p. 2003.

PAIVA, J.R. Conservação ex situ de recursos genéticos de plantas na região tropical úmida. **Acta Amazonica**, v.24, n.1/2, p.63-80. 1994.

SAKAI A. Development of cryopreservation techniques. In: **Cryopreservation of tropical plant germplasm- Current research progress and application**. Japan Intl Res Cent AgricSci, Tsukuba/ IPGRI, Rome, 2000.

SANTANA, I.A. **Avaliação química e funcional de polpa de coco verde e aplicação em gelado comestível**. 2012, 107 p. Dissertação de mestrado (Mestrado em Engenharia de processos químicos e biológicos). Escola de Engenharia Mauá do Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia, São Caetano do Sul 2012.

SANTOS, I.R.I. Criopreservação de germoplasma vegetal. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.20, p.60-65. 2001.

SANTOS, I.R.I. Criopreservação: Potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12(Edição Especial), p.70-84, 2000.

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

SARTOR, F.R.; MORAES, A.M.; ALMEIDA, F.A.C. Técnicas para criopreservação de gemas de mangabeira. **Revista Agrotecnologia**, v.3, n.1, p.31-39, 2012.

SILVA, V.S. **Regeneração in vitro de embriões de Cocos nucifera L.** 2002, 87 p. Dissertação de mestrado (Fisiologia e Bioquímica de Plantas), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, 2002.

SISUNANDAR; SOPADE, P.A.; SAMOSIR, Y.M.S.; RIVAL, A.; ADKINS, S.W. Dehydration improves cryopreservation of coconut (*Cocos nucifera* L.). **Cryobiology**, v.61, p. 289-296, 2010.

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.

SOUTO, E. 2012. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2012/agosto/2a-semana/embrapa-publica-arvore-do-conhecimento-sobre-coco>>. Acesso em 02 out. 2013.

SOUZA, A.S.; SOUZA, F.V.D.; SANTOS-SEREJO, J.A.; JUNGHANS, T.G.; PAZ, O.P.; MONTARROYOS, A.V.V.; SANTOS, V.S.; MORAIS, L.S. **Preservação de germoplasma vegetal, com ênfase na conservação *in vitro* de variedades de mandioca**. Cruz das Almas: Embrapa CNPMF, p.24. 2009 (Circular Técnica, 90).

STUSHNOFF, C. Cryopreservation of apple genetic resources. **Canadian Journal of Plant Science**, p.1151-1154, 1987.

TAKAGI, H. THIN, T.N.; ISLAM, O.M.; SENBUKU, T. SAKAI, A. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of taro (*Colacasia esculenta* L.) by vitrification. **Plant Cell Reports**, v.16, p. 594-599, 1997.

TOUCHELL D.H.; DIXON K.W. **International workshop on the *in vitro* conservation of plant genetic resources**. Plant Biotechnology Laboratory, University Kebangsaan Malaysia, Kuala Lumpur, pp. 169-180, 1996.

VALOIS, A.C.C. Biodiversidade, biotecnologia e propriedade intelectual. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v.15, n. especial, p. 21-31, 1998.

VIEIRA, M.L.C. Conservação de germoplasma *in vitro*. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n.14, p. 18-20, 2000.

VEIGA, R.F.A. **Bancos de germoplasma**. 2008. Disponível em: <<http://www.biota.org.br/pdf/v72cap04.pdf>>. Acesso em: 30 out. 2014.

VEIGA, R.F.A. **Importação de oleráceas e ornamentais**. 2006. Disponível em:<http://www.infobibos.com/Artigos/importa_oleraceas/index.htm>. Acesso em: 30 out. 2014.

WATERWORTH, H.E.; WHITE, G.A. Plant introductions and quarantine: the need for both. **Plant Disease Journal**, 1982.

5. ARTIGO 1: CRIOPRESERVAÇÃO DE ACESSOS DE COQUEIRO (*Cocos nucifera* L.)

Periódico submetido (ou a ser submetido): Revista Ciência e Agrotecnologia

RESUMO

Usualmente a conservação *ex situ* de recursos genéticos de coqueiro é feita por meio de coleções de campo. A conservação do coqueiro via banco de sementes é inviável devido ao comportamento recalcitrante e do tamanho das suas sementes. Formas alternativas e complementares necessitam ser desenvolvidas para minimizar a perda de variabilidade da espécie. Desta forma, a criopreservação surge como uma técnica potencial para conservar a longo prazo os recursos genéticos do coqueiro. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de soluções crioprotetoras, tempos de imersão e meios de regeneração de embriões zigóticos criopreservados. Foram utilizados embriões zigóticos obtidos de frutos maduros provenientes de plantas matrizes de coqueiro gigante do Brasil da Praia do Forte (GBrPF) e anão verde do Brasil de Jiqui (AVeBrJ) do Banco Ativo de Germoplasma de Coco da Embrapa Tabuleiros Costeiros. Embriões de coqueiro AVeBrJ foram imersos em duas soluções crioprotetoras: C1 – meio Y3 + 1,75 M sacarose + 15% glicerol, C2 – meio Y3 + 3,33 M glicose + 15% glicerol e, embriões de coqueiro GBrPF nas soluções: C1 - meio Y3 + 3,33 M glicose e C2 – meio Y3 + 3,33 M glicose + 15% glicerol, ambos os acessos permaneceram imersos por 24, 48 e 72 horas. Posteriormente, os explantes foram desidratados em sílica gel por 34 (AVeBrJ) e 30 horas (GBrPF), e imersos em nitrogênio líquido a -196°C por 24 horas. Após esse período foram descongelados a $38 \pm 2^{\circ}\text{C}$. A umidade dos embriões foi determinada ao final da etapa de tratamentos crioprotetores e desidratação. Foi avaliada a porcentagem de sobrevivência e regeneração, após a transferência dos embriões para o meio de cultura Y3 suplementado ou não com $0,5\text{ }\mu\text{mol}$ de ácido giberélico. As soluções crioprotetoras compostas por meio Y3 + 1,75 M de sacarose + 15% de glicerol e meio Y3 + 3,33 M glicose + 15% glicerol reduzem a umidade de embriões do acesso AVeBrJ. As soluções crioprotetoras compostas por meio Y3 + 3,33 M de glicose e meio Y3 + 3,33 M de glicose + 15% de glicerol, reduzem a umidade de embriões do acesso GBrPF. O tempo de imersão de 24 horas promove maior sobrevivência de embriões zigóticos de acessos AVeBrJ e GBrPF criopreservados. A adição de $5\text{ }\mu\text{M}$ de GA3 não apresenta efeito na sobrevivência de embriões zigóticos criopreservados de AVeBrJ e GBrPF.

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

ABSTRACT

CRYOPRESERVATION OF COCONUT ACCESSIONS (*Cocos nucifera* L.)

Usually the ex situ conservation of genetic resources of coconut is performed through banks in the field. The conservation of coconut via seed bank is unfeasible due to the recalcitrant behavior and the size of their seeds. Complementary and alternative forms need to be developed to minimize the loss of species variability. Thus, cryopreservation technique arises with potential for long-term conserve the genetic resources of coconut. The aim of this study was to evaluate the effect of cryoprotectant solutions, immersion times and medium of regeneration of cryopreserved zygotic embryos. Zygotic embryos obtained from mature fruits of Brazil Green Dwarf (BGD) and Brazilian Tall (BRA) accessions from the active germplasm bank of Embrapa Coastal Tablelands were used. BGD Embryos were immersed in two cryoprotectant solutions: C1 - medium Y3 + 1.75 M sucrose + 15% glycerol, C2 - medium Y3 + 3.33 M glucose + 15% glycerol, and BRA embryos on solutions: C1 - medium Y3 + 3.33 M glucose and C2 - medium Y3 + 3.33 M glucose + 15% glycerol both accesses remained immersed for 24, 48 and 72 hours. Thereafter explants were dried on silica gel 34 (BGD) and 30 h (BRA), and immersed in liquid nitrogen at -196 °C for 24 hours. After this period were thawed at $38 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Moisture from embryos at the end of cryoprotectants and dehydration treatments step was determined. The percentage of survival and regeneration was evaluated after the transfer of embryos to the culture medium Y3 supplemented or not with 0.5 μmol of gibberellic acid. The cryoprotective solutions composed of Y3 medium +1.75 M sucrose + 15% glycerol and Y3 medium + Y3 + 3.33 M glucose + 15% glycerol reduced the moisture content on the coconut BGD zygotic embryos cryopreserved. The cryoprotective solutions composed of Y3 medium + 3.33 M de glicose and Y3 medium + 3.33 M de glicose + 15% de glicerol reduced the moisture content on the BGD zygotic embryos cryopreserved. The 24-hour immersion time promotes higher survival of BGD and BRA cryopreserved accessions. The addition of 5 μM of GA_3 has no effect on the survival of BGD and BRA cryopreserved zygotic embryos.

Key-words: *Cocos nucifera*, ex situ conservation, genetic resources, liquid nitrogen.

5.1. Introdução

Cocos nucifera é uma palmeira tropical originária do sudeste asiático (PURSEGLOVE, 1972) que apresenta relevância socioeconômica e ampla versatilidade de uso. É uma espécie que permite o consórcio com culturas agrícolas, florestais e pecuária, contribuindo com a permanência do homem no campo (PEZZOPANE et al., 2011; FERREIRA et al., 2011).

A conservação dos recursos genéticos vegetais tem papel fundamental para evitar a perda de espécies com importância econômica e ecológica (BENELLI et al., 2013). Esse reservatório de genes é essencial para o melhoramento genético das culturas, possibilitando o desenvolvimento de variedades adaptadas aos diversos ambientes e às demandas sociais e/ou econômicas (BANDUPRIYA et al., 2010).

A conservação das sementes do coco é inviável devido ao seu tamanho e pelo fato de apresentarem recalcitrância (BANDUPRIYA et al., 2007). Tradicionalmente, a conservação de germoplasma de coco é baseada em coleções de campo, porém, esse método demanda grandes áreas de cultivo, altos custos de manutenção, suscetibilidade a doenças e intempéries climáticas (BANDUPRIYA et al., 2010). Desta forma, a criopreservação, como estratégia de conservação complementar às coleções de campo, torna-se relevante para programas de conservação da espécie.

A criopreservação consiste na conservação em longo prazo de germoplasma vegetal armazenado em temperatura ultra baixa fornecida pelo nitrogênio líquido (NL) ou na fase de vapor (-196°C ou -150°C) (KAVIANI, 2011). Esta técnica requer espaço físico e manutenção reduzidos e é aplicável em uma ampla gama de genótipos (GALDIANO et al., 2012). O custo do armazenamento do material vegetal é baixo e apresenta segurança sanitária e genética (GANINO et al., 2012). Além disso, tem sido usada para preservação dos recursos genéticos de espécies que produzem sementes recalcitrantes, incluindo o coqueiro (SISUNANDAR et al., 2010).

Ainda são necessários alguns ajustes, principalmente quanto à recuperação do material congelado e à identificação da faixa ideal de umidade que o explante a ser criopreservado deve atingir, a fim de evitar a formação de cristais de gelo, e, dessa forma, minimizar as injúrias causadas pela desidratação, mantendo a viabilidade do material.

Ao longo das últimas décadas, vem surgindo novas técnicas de criopreservação, tais como a vitrificação e o encapsulamento-desidratação que tendem a evitar a cristalização da água intracelular (RABBA'A et al., 2012).

Um eficiente protocolo de criopreservação de embriões zigóticos de coqueiro, utilizando como crioprotetor a solução de 3,2 M de glicose, e a desidratação em sílica gel, foi desenvolvido por N'Nan et al. (2012). Esses autores obtiveram 91% de germinação para embriões do acesso anão amarelo da Malásia e, 33,3% para o gigante do Oeste Africano, desidratados por 34 e 30 horas em sílica gel, respectivamente.

Dentre as técnicas de criopreservação, tem sido aplicada para diversos genótipos de coqueiro, a vitrificação (KARUN & SAJINI, 2010; N'NAN et al., 2012) e, o encapsulamento-desidratação (N'NAN et al., 2008; BANDUPRIYA et al., 2010; MALAURIE et al., 2011). Entretanto, são escassos os protocolos de criopreservação de coqueiro que apresentem elevada regeneração de plântulas após o congelamento. N'Nan et al. (2008) observaram 18% de regeneração para o coqueiro anão amarelo da Malásia; Assy-Bah & Engelmann (1992), 33% para gigante de Rennel e, Bandupriya et al. (2007), 39% para o gigante do Sri Lanka.

Protocolos para as cultivares de coqueiro gigante do Brasil da Praia do Forte e Anão verde do Brasil de Jiqui ainda não foram definidos. Os primeiros trabalhos com criopreservação de coqueiro no Brasil foram desenvolvidos em 2010 pela Embrapa Tabuleiros Costeiros para o coqueiro AVEJBr, sendo possível selecionar a solução crioprotetora composta por 1,75 M de sacarose e 15% de glicerol e, a adaptação de testes de viabilidade

para estudos de embriões criopreservados (GOMES-COPELAND et al., 2012), entretanto, sem êxito na regeneração dos embriões.

Diante disso, os objetivos do presente trabalho foram: avaliar o efeito de diferentes soluções crioprotetoras e tempos de imersão nos acessos de coqueiro gigante do Brasil Praia do Forte e anão verde do Brasil de Jiqui, bem como o efeito do ácido giberélico no meio de regeneração após a criopreservação.

5.2. Material e Métodos

5.2.1. Coleta e esterilização do material

Para os estudos foram utilizados 600 embriões zigóticos oriundos de plantas adultas de acessos de coqueiro anão verde do Brasil de Jiqui (AVeBrJ) e de coqueiro gigante do Brasil da Praia do Forte (GBrPF), provenientes do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de coco da Embrapa Tabuleiros Costeiros. O acesso AVeBrJ foi coletado do BAG implantado em 2000, localizado no campo experimental de Itaporanga (11°07'S e 37°11'W), localizado no município de Itaporanga d'Ajuda, Sergipe e, o acesso GBrPF foi obtido do BAG implantado em 1982, localizado no campo experimental do Betume (10°26'S e 36°32'W), localizado no Platô de Neópolis, município de Ilha das Flores, Sergipe.

No local de coleta dos frutos maduros (10-11 meses de idade, Figura 1A) foram retirados os cilindros de endosperma (Figura 1B), contendo os embriões zigóticos (Figura 1C), esses foram submetidos à esterilização com imersão em hipoclorito de sódio comercial 2-2,5% por 30 minutos, seguido da tríplice lavagem em água potável. Posteriormente, o material foi acondicionado em recipientes estéreis (Figura 1D) 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 (Figura 1E). Em seguida foram submetidos à assepsia por meio da imersão em álcool etílico 70% por 30 segundos, em hipoclorito de sódio (2-2,5% v/v) por cinco minutos, seguida da tríplice lavagem em água destilada e estéril e, mantidos em frascos vedados (Figura 1F). Para avaliação da porcentagem de germinação dos embriões, amostras com 10 embriões foram inoculadas em meio Y3 (EEUWENS, 1976) suplementado com 60 g L⁻¹ de sacarose, 1 g L⁻¹ de carvão ativado e 5,8 g L⁻¹ de ágar na presença de 0,5 µM de ácido giberélico (GA₃). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 ± 0,1 e previamente autoclavado por 15 minutos em temperatura de 121 ± 1°C e pressão de 1,05 atm.

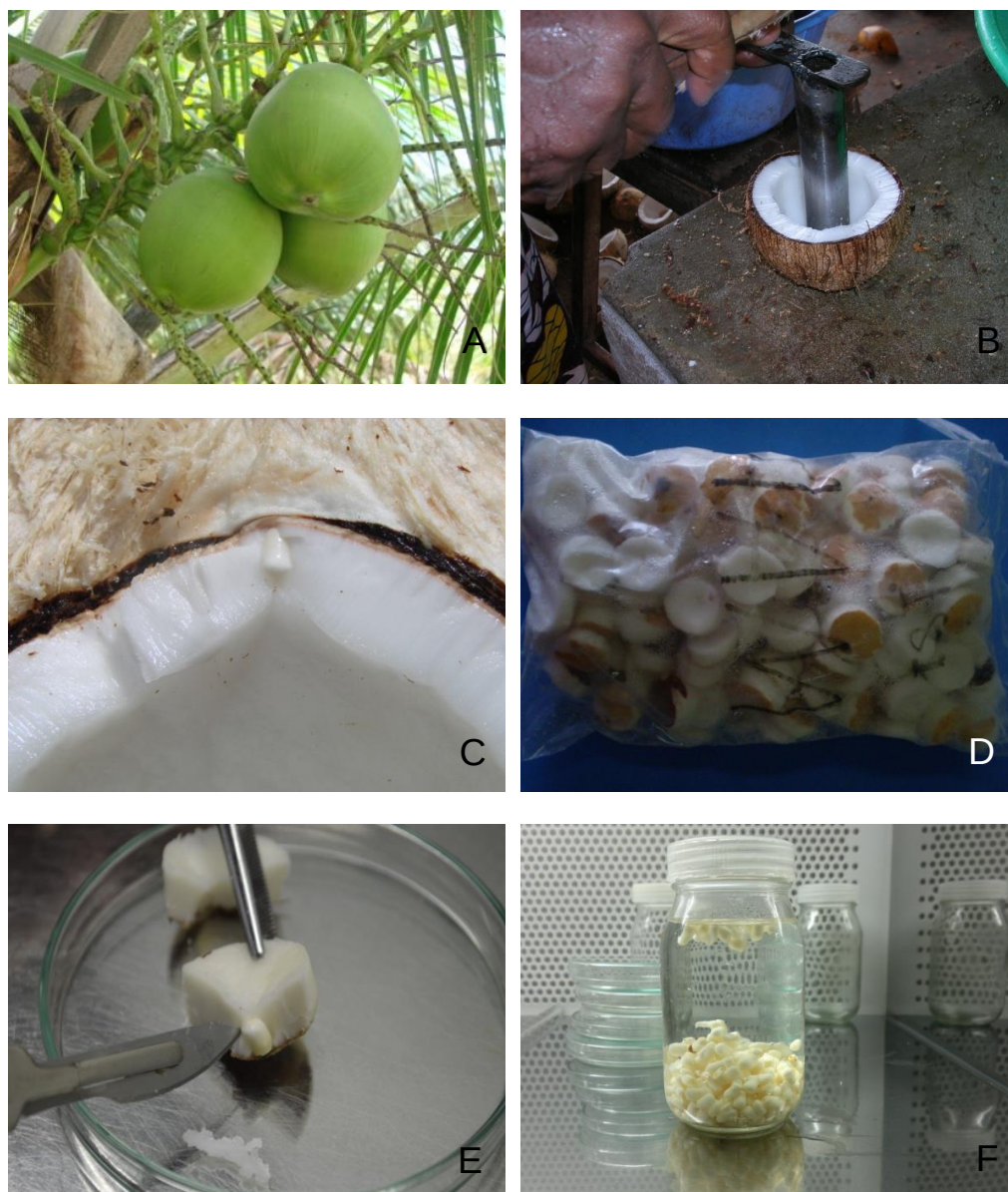


FIGURA 1. Etapas da extração e assepsia de embriões zigóticos de coqueiro: A- Fruto de coqueiro no estágio maduro na planta; B- Extração dos discos de endosperma contendo o embrião zigótico; C- Detalhe do embrião zigótico no endosperma do fruto; D- Discos de endosperma após pré-assepsia de campo; E- Excisão do embrião zigótico em câmara de fluxo laminar; F- Assepsia dos embriões em câmara de fluxo laminar. Fotos: Ana Lédo, Caroline Machado, Francielen Sá.

5.2.2. Avaliação de soluções crioprotetoras e tempos de imersão na desidratação de embriões zigóticos de coqueiro AVeBrJ e GBrPF

Os embriões zigóticos do acesso AVeBrJ foram imersos em duas soluções crioprotetoras: C1 - meio Y3 + 1,75 M sacarose + 15% glicerol (GOMES-COPELAND, 2010) e C2 - meio Y3 + 3,33 M glicose + 15% glicerol (ASSY-BAH & ENGELMANN, 1992) e os embriões do acesso GBrPF em C1 - meio Y3 + 3,33 M glicose e C2 - meio Y3 + 3,33 M glicose + 15% glicerol (ASSY-BAH & ENGELMANN, 1992), onde permaneceram imersos nas soluções crioprotetoras por 24, 48 e 72 horas sob agitação de 100 rpm em mesa orbital a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ na ausência de luz. Os embriões zigóticos AVeBrJ e GBrPF foram desidratados em 80 g de sílica gel por 34 e 30 horas, respectivamente, conforme metodologia de N'NAN et al. (2012)

Parte dos embriões (120) foi inoculada diretamente nos meios de regeneração, formado pelo meio de cultura Y3, suplementado com 60 g L⁻¹ de sacarose, 1 g L⁻¹ de carvão ativado e 5,8 g L⁻¹ de ágar na ausência ou presença de 0,5 µM de GA₃ (material não criopreservado, denominado - NL). O restante dos embriões (120) foi colocado em criotubos (5 embriões/criotubo) com capacidade de 4 mL e submetido a criopreservação a -196°C por 24 horas. Após esse período, os embriões foram descongelados em banho maria a 38±2°C por 3 minutos e, em seguida, inoculados nos meios de regeneração descritos anteriormente (material criopreservado, denominado +NL).

Após cada período de imersão nas soluções crioprotetoras (24, 48 horas ou 72 horas) e permanência em sílica gel, 72 embriões foram pesados em balança digital, para determinação da massa fresca (MF). Em seguida, os embriões foram colocados em recipientes de metal e mantidos em estufa a 105°C por 18 horas para a determinação da massa seca (MS) (GOMES-COPELAND, 2010). A umidade dos embriões foi determinada utilizando a fórmula: $TU = (MF-MS)/MF \times 100$ (RABBA'A et al., 2012) (Figura 2).

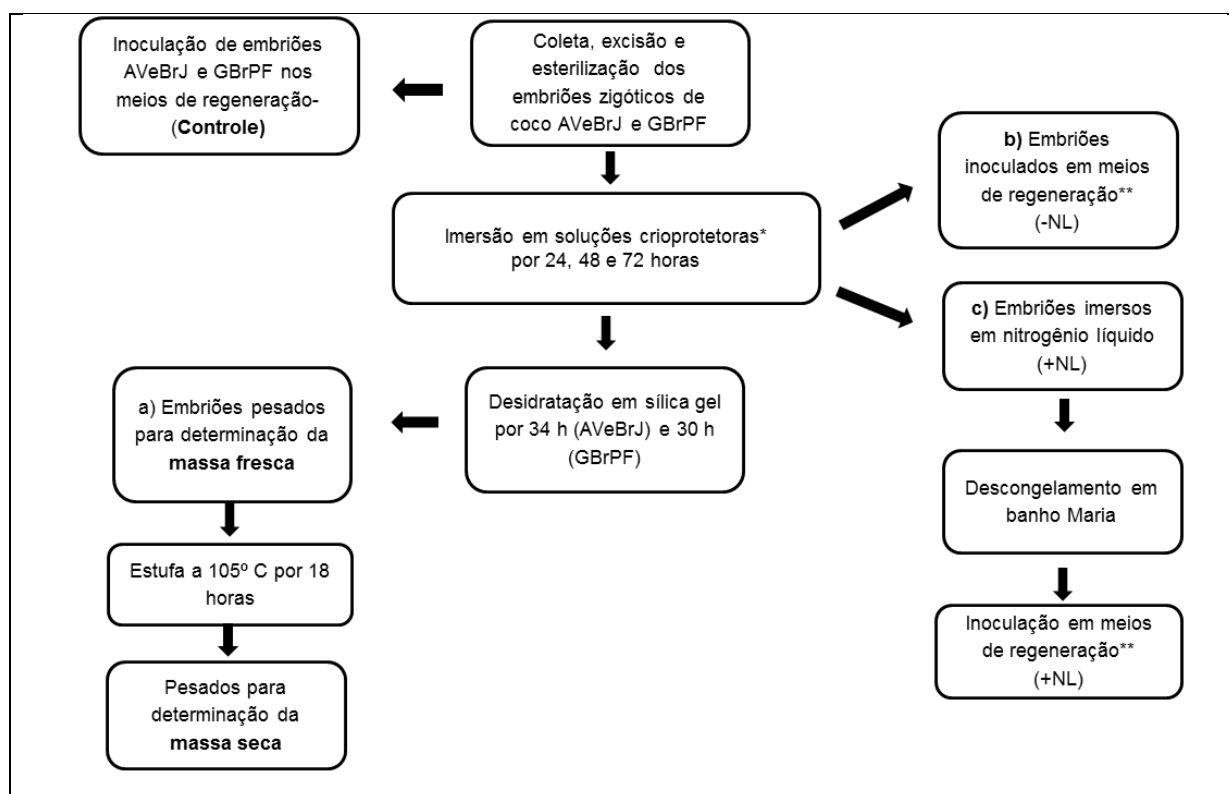


FIGURA 2. Fluxograma da avaliação dos embriões zigóticos dos acessos AVeBrJ e GBrPF submetidos a soluções crioprotetoras em diferentes tempos de imersão e meios de regeneração. a) Determinação da umidade (U), b) Avaliação do efeito do meio de regeneração em embriões não criopreservados (-NL), c) Avaliação do efeito do meio de regeneração em embriões criopreservados (+NL).

* AVeBrJ C1: meio Y3 + 1,75 M sacarose + 15% glicerol ; C2: meio Y3 + 3,33 M glicose + 15% glicerol.

GBrPF C1: meio Y3 + 3,33 M glicose; C2: meio Y3 + 3,33 M glicose + 15% glicerol.

** T1: Meio de cultura Y3 suplementado com 60 g L⁻¹ de sacarose, 1 g L⁻¹ de carvão ativado e 5,8 g L⁻¹ de ágar; T2: Meio de cultura Y3 suplementado com 60 g L⁻¹ de sacarose, 1 g L⁻¹ de carvão ativado, 5,8 g L⁻¹ de ágar e 0,5 µM de GA₃.

5.2.3. Efeito do ácido giberélico no meio de cultura de regeneração de embriões zigóticos de coqueiros AVeBrJ e GBrPF criopreservados

Para avaliação do efeito do ácido giberélico na regeneração de embriões zigóticos criopreservados e não criopreservados, foram utilizadas duas concentrações de GA₃ (0 e 0,5 µM) no meio de cultura Y3, suplementado com 60 g L⁻¹ de sacarose, 1 g L⁻¹ de carvão ativado e 5,8 g L⁻¹ de ágar.

As culturas foram mantidas na ausência de luz até o surgimento do primórdio foliar. Após esse período, foram transferidas para um ambiente com fotoperíodo de 16 h, temperatura de 25± 2° C, umidade relativa média do ar de 70% e intensidade luminosa de 60 µmol m⁻² s⁻¹.

Foram realizadas avaliações mensais até os sete meses de cultivo nos meios de regeneração, considerando a porcentagem de sobrevivência e de regeneração. Foram considerados sobreviventes os embriões que se apresentaram intumescidos e/ou com o haustório expandido e, embriões regenerados aqueles com emissão de parte aérea e raiz.

5.2.4. Delineamentos experimentais e análises estatísticas

Para cada acesso (-NL e +NL), os experimentos foram instalados em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 3 x 2 (duas soluções crioprotetoras x três tempos de imersão x duas concentrações de GA₃) com 10 repetições, sendo cada parcela composta por um embrião.

Os dados foram transformados em $(X + 0,5)^{1/2}$ e submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011).

5.3. Resultados e Discussão

5.3.1. Efeito das soluções crioprotetoras e dos tempos de imersão na desidratação de embriões zigóticos do acesso AVeBrJ

Os embriões zigóticos do acesso AVeBrJ apresentaram umidade inicial média de 80,3%, porém, após a imersão nas soluções crioprotetoras e desidratação em sílica gel, houve a redução de 66,9% do teor de água.

Não houve diferença entre os diferentes tempos de imersão (24, 48 e 72 horas) na umidade dos embriões AVeBrJ (Anexo 1A, Tabela 1), sendo que o valor médio obtido foi de 13,5% de umidade. Assy-Bah & Engelmann (1992) verificaram para o acesso anão vermelho dos Camarões que quanto maior o tempo de imersão na solução de sacarose (24 horas), menor a umidade alcançada (5,7%). Possivelmente, as diferentes respostas aos procedimentos de desidratação e umidades alcançadas podem ser atribuídas às diferenças entre os genótipos.

TABELA 1. Efeito de duas soluções crioprotetoras e tempos de imersão na umidade (%) de embriões zigóticos de coqueiro anão verde do Brasil de Jiqui (AVeJBr).

Tempo de imersão (h)	Soluções Crioprotetoras		Médias
	C1	C2	
	Umidade (%)		
24	12,39	14,12	13,26A
48	12,99	14,77	13,88A
72	11,37	14,90	13,38A
Médias	12,30b	14,60a	
CV (%)	7,17		

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. C1: meio Y3 + 1,75 M sacarose + 15% glicerol ; C2: meio Y3 + 3,33 M glicose + 15% glicerol

Houve efeito altamente significativo das soluções crioprotetoras na umidade dos embriões de coco AVeBrJ. Os embriões imersos na solução C1 (meio Y3 + 1,75 M de sacarose + 15% glicerol) apresentaram em média menor umidade (12,30%) quando comparado com a solução C2 (meio Y3 + 3,33 M de glicose + 15% glicerol) (14,60%).

Resultado semelhante foi observado por Gomes-Copeland (2010), para embriões zigóticos de AVeBrJ imersos por 16 horas na solução crioprotetora composta por meio Y3 com 1,75 M de sacarose + 15% glicerol apresentaram menor umidade ($23,48 \pm 1,94$) em relação a outros tratamentos crioprotetores.

Muitos fatores dificultam a criopreservação de embriões, principalmente de espécies recalcitrantes. As variações na umidade e sensibilidade diferenciada à dessecação e ao congelamento são atribuídas à complexidade de tecidos que constituem os embriões (ENGELMANN, 2011). Assay-Bah & Engelmann (1992) estudaram a criopreservação de diferentes variedades de coco (Híbrido PB 121, anão vermelho dos Camarões, gigante indiano e gigante de Rennel) utilizando como pré-tratamento a desidratação por quatro horas em câmara de fluxo laminar e imersão por 11 a 20 horas crioprotetor composto por 600 g L⁻¹ glicose e 15% de glicerol. Estes autores observaram que a umidade inicial foi similar em todas as variedades, em torno de 78,4% e após 15 horas de imersão na solução crioprotetora, os embriões alcançaram em média 11,4%, ou seja, redução em torno de 67,0% do teor de água.

Os procedimentos de desidratação prévios à criopreservação devem garantir a obtenção de uma umidade que evite a formação de cristais de gelo durante a exposição do material ao nitrogênio líquido (SANTOS, 2000). Estes causam a ruptura do sistema de membranas celulares, resultando em perda da permeabilidade e da compartimentação celular, acarretando no colapso e morte celular (SANTOS, 2001). Entretanto, deve-se assegurar a viabilidade do material vegetal após o descongelamento, pois a água desempenha funções essenciais nas células de organismos vivos (SANTOS & SALOMÃO, 2010).

Considerando que não há um valor específico de umidade, e sim, uma faixa aceitável a ser atingida antes da exposição do material vegetal ao congelamento, as duas soluções crioprotetores podem ser recomendadas para o acesso AVeBrJ.

5.3.2. Efeito de soluções crioprotetoras, de tempos de imersão e do ácido giberélico na sobrevivência de embriões zigóticos criopresevados do acesso AVeBrJ

Ocorreu interação altamente significativa entre as soluções crioprotetoras, tempos de imersão e meios de regeneração (S x T x M) (Anexo 2A). Observou-se 100% de sobrevivência para os embriões zigóticos de coco criopreservados, cultivados por 24 horas em

ambas as soluções crioprotetoras na ausência de GA₃ e em embriões imersos por 72 horas na solução C2 (meio Y3 + 3,33 M de glicose + 15% de glicerol).

TABELA 2. Porcentagem de sobrevivência de embriões zigóticos do coqueiro AVeBrJ criopreservados, pré-cultivados em duas soluções crioprotetoras em diferentes tempos de imersão, na ausência e presença de 0,5 µM ácido giberélico (GA₃).

Tempo de imersão (h)	Soluções Crioprotetoras	
	C1	C2
Sobrevivência na ausência de GA ₃ (%)		
24	100,00Aa	100,00Aa
48	75,00Aa	33,33Ba
72	0Bb	100,00Aa
Sobrevivência na presença de 0,5 µM GA ₃ (%)		
24	50,00Aa	67,70Aa
48	66,70Aa	50,00Aa
72	100,00Aa	16,70Bb
CV (%) 57,19		

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. C1: meio Y3 + 1,75 M sacarose + 15% glicerol ; C2: meio Y3 + 3,33 M glicose + 15% glicerol.

A maior sobrevivência (100%) na presença de ácido giberélico foi observada em embriões imersos por 72 horas na solução crioprotetora contendo sacarose. Porém, este valor não diferiu significativamente dos tempos 24 e 48 horas. Soluções com altas concentrações de sacarose reduzem o teor de água do material a ser criopreservado devido à ação osmótica e, aumenta a proteção das membranas celulares durante o resfriamento. Como resultado da absorção da sacarose, o ponto de congelamento é reduzido juntamente com a quantidade de água livre congelável presente nos tecidos. Desta forma, a possibilidade de formação de cristais de gelo durante o congelamento é reduzida (PANIS et al., 1996).

Em 1992, Assy-Bah & Engelmann estudaram a criopreservação de embriões de coqueiro anão vermelho dos Camarões (AVC) e, observaram 73% de sobrevivência para os embriões desidratados por quatro horas em câmara de fluxo laminar, seguido da imersão por 17 horas em solução com meio Y3 com 3,33 M glicose + 15% glicerol. Esses autores observaram que não houve sobrevivência do material não imerso na solução crioprotetora, porém, após 15 horas de imersão nesta solução a sobrevivência subiu de 0% para 61%.

Foi observado o efeito da redução da sobrevivência dos embriões zigóticos criopreservados na presença de ácido giberélico, entretanto em embriões não criopreservados de AVeBrJ a presença de GA₃ induziu maior germinação, formação de parte aérea e haustório (Santos et al., 2012). Pech y Aké et al. (2007) estudando o efeito do GA₃ na germinação de embriões zigóticos não criopresservados de coqueiro anão verde da Malásia e anão amarelo da Malásia, verificaram 85% de germinação no meio Y3 suplementado com 0,46 µM de ácido giberélico aos 6 meses de cultivo *in vitro*.

A giberelina é um importante regulador endógeno de crescimento, responsável por promover a germinação em sementes (PENG & HARBERD, 2002). Passos et al. (2004) obteve maior germinação de *Passiflora nitida* em meio de cultura contendo 1000 mg L⁻¹ de GA₃. O ácido giberélico também é um fator importante na germinação de *Passiflora alata* (ROSETO et al., 2000). Contudo, a aplicação do ácido giberélico não promoveu efeito na germinação de sementes de porta-enxertos citros (SOUSA et al., 2002).

Provavelmente o processo de congelamento dos embriões zigóticos tenha alterado o mecanismo de ação do GA₃. Estudos posteriores deverão ser conduzidos a fim de determinar

o meio de regeneração e concentrações de GA₃ que promovam maior sobrevivência e regeneração de embriões do acesso AveBrJ criopreservados.

Houve 100% de embriões germinados para aqueles imediatamente inoculados após a excisão (controle), sendo que os embriões inoculados no meio contendo ácido giberélico apresentaram desenvolvimento da parte aérea e da raiz aos dois meses de cultivo *in vitro*. Desta forma, verifica-se o alto vigor do material utilizado neste trabalho, possíveis reduções nos percentuais de sobrevivência/germinação são inerentes aos tratamentos e/ou processo de congelamento.

Do total de embriões sobreviventes (63,64%) tratados com a solução C1 (meio Y3 + 1,75 M de sacarose + 15% glicerol), 27,27% apresentaram haustório expandido (Figura 4A) e 36,36% apresentaram-se intumescidos (Figura 4B). Contudo, a solução C2 (meio Y3 + 3,33 M de glicose + 15% glicerol) proporcionou 58,14% de embriões sobreviventes sendo que 57,14% desenvolveram haustório e apenas 1% apresentaram-se intumescidos (Figura 3).

O processo de germinação dos embriões de coco pode ser distinguido visualmente em três fases: a primeira fase envolve o intumescimento dos embriões, a segunda é a expansão do haustório, seguido da emissão da raiz e parte aérea (LÉDO *et al.*, 2007).

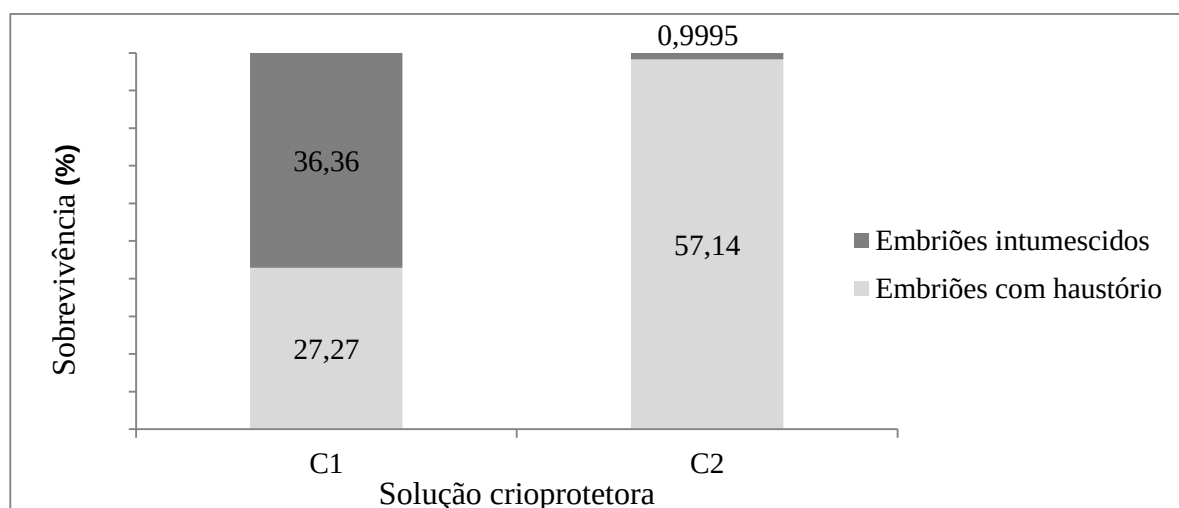


FIGURA 3. Porcentagem de sobrevivência de embriões zigóticos criopreservados (com formação de haustório e intumescidos) do acesso AveBrJ em função de soluções crioprotetoras.

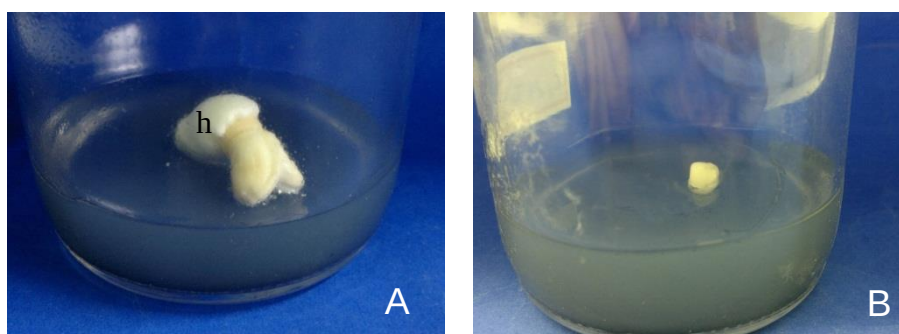


FIGURA 4. Desenvolvimento de embrião criopreservado aos sete meses de cultivo em meio de regeneração (A) Embrião com haustório (h); (B) Embrião intumescido sem formação de haustório. Fotos: Caroline Araújo

Foram observadas algumas alterações durante o desenvolvimento dos embriões na fase de recuperação, como escurecimento do haustório (Figura 5A) e hipertrofia da parte aérea (Figura 5B). Esses eventos não foram observados nos embriões imersos nas soluções crioprotetoras por até 24 horas e, no tratamento controle, ou seja, aqueles embriões imediatamente inoculados no meio de cultura após a excisão (-NL).

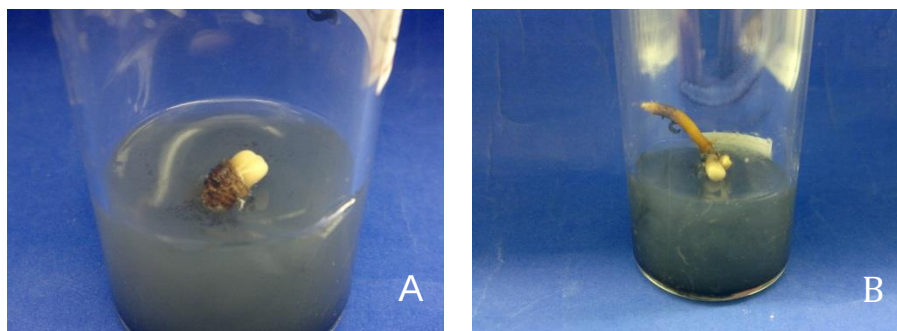


FIGURA 5. Alterações durante o desenvolvimento dos embriões zigóticos criopreservados do acesso AVeBrJ na fase de recuperação (A) Embriões com haustório escurecido; (B) Embrião com hipertrofia da parte aérea aos sete meses de cultivo *in vitro*.

Resultados semelhantes foram observados por Assy-Bah & Engelmann (1992) e por N'Nan et al. (2012), nos quais verificaram mal formação durante o desenvolvimento dos embriões após criopreservação.

De acordo com Gomes-Copeland (2010), o uso de altas concentrações de carboidratos nas soluções crioprotetoras pode ocasionar o escurecimento dos explantes em decorrência da oxidação dos embriões, com consequente redução da regeneração. Apesar dos açúcares não apresentarem fitotoxicidade é necessário determinar concentrações específicas para cada espécie, visto que diferentes tecidos de uma mesma planta possuem tolerâncias distintas à presença de sacarose (SANTOS, 2004).

5.3.3. Efeito de soluções crioprotetoras e de tempos de imersão na desidratação de embriões zigóticos do acesso GBrPF

Os embriões do acesso GBrPF apresentaram umidade inicial de 84,6%. Após a crioproteção e desidratação, a umidade final alcançada foi de 21,6%, ou seja, uma redução em torno 63% do teor de água. Não houve efeito significativo das soluções crioprotetoras e da interação solução crioprotetora e tempo de imersão na umidade dos embriões do acesso GBrPF (Anexo 3A). Os embriões imersos na solução C1 (meio Y3 + 3,33 M glicose) apresentaram umidade média de 20,06% e, na solução C2 (meio Y3 + 3,33 M glicose + 15% glicerol) 23,17%, conforme a Tabela 3.

Houve efeito significativo dos tempos de imersão, sendo que o tempo de 24 horas de imersão proporcionou menor umidade (11,8%) quando comparado com 72 horas (29,1%).

TABELA 3. Efeito de duas soluções crioprotetoras e tempos de imersão na umidade (%) de embriões zigóticos de coqueiro gigante do Brasil Praia do Forte (GBrPF).

Tempo de imersão (h)	Soluções Crioprotetoras		Médias
	C1	C2	
Umidade (%)			
24	9,07	14,59	11,80B
48	19,57	28,25	23,90AB
72	26,01	32,21	29,10A
Médias	20,06a	23,17a	
CV (%)	23,46		

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. C1: meio Y3 + 1,75 M sacarose + 15% glicerol ; C2: meio Y3 + 3,33 M glicose + 15% glicerol.

Verificou-se que quanto maior o tempo de imersão dos embriões na solução crioprotetora maior a embebição e, conseqüentemente, menor a desidratação dos embriões. Para fins de criopreservação o tempo de 24 horas poderá ser indicado, por proporcionar menor umidade, reduzindo os riscos de formação de cristais de gelo durante o congelamento.

5.3.4. Efeito de soluções crioprotetoras, de tempos de imersão e do ácido giberélico na sobrevivência de embriões zigóticos criopreservados do acesso GBrPF

Ocorreu interação altamente significativa entre soluções crioprotetoras e faixas de tempo de imersão (S x T) na sobrevivência de embriões zigóticos criopreservados de coqueiro do acesso GBrPF, aos sete meses de cultivo *in vitro* (Anexo 4A). Não houve efeito significativo do GA₃ e sua interação com os demais fatores.

Não houve diferenças estatísticas entre os tempos de imersão na solução crioprotetora C1 (meio Y3 + 3,33 M de glicose) na sobrevivência dos embriões criopreservados. A fim de reduzir o tempo de execução do protocolo de criopreservação o período de 24 horas de imersão dos embriões de coqueiro GBrPF na solução crioprotetora poderá ser recomendado por proporcionar a menor umidade aos embriões e sobrevivência superior a 80%.

TABELA 4. Porcentagem de sobrevivência de embriões zigóticos do coqueiro GBrPF criopreservados, pré-cultivados em duas soluções crioprotetoras em diferentes tempos de imersão.

Tempo de imersão (h)	Soluções Crioprotetoras	
	C1	C2
24	83,33Aa	72,70Aa
48	58,30Aa	33,33Aa
72	91,70Aa	0Bb
CV (%)	56,80	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. C1: meio Y3 + 1,75 M sacarose + 15% glicerol ; C2: meio Y3 + 3,33 M glicose + 15% glicerol.

Em estudos com eixos embrionários de *Citrus*, Malik et al. (2006) observaram que o maior tempo de imersão (40 h) na solução de 0,75 M de sacarose proporcionou menor umidade (14,9%) e maior viabilidade (30%), em relação aos menores tempos de exposição

(20 e 30 h). Provavelmente o comportamento diferenciado entre as duas espécies esteja ligado a fatores genéticos e tipo de explantes.

A solução crioprotetora contendo glicerol (C2) proporcionou em valores numéricos menor sobrevivência. Por se tratar de um crioprotetor químico, possivelmente pode ter causado estresse osmótico ou intoxicação aos embriões, resultando na morte celular ou em alterações morfogenéticas no material (SAKAI, 1995). Molina et al. (2006) trabalhando com a criopreservação de *Allium cepa*, verificaram que o uso de glicerol 50% como crioprotetor prejudicou à qualidade fisiológica e alterou a composição química das semente desta espécie.

A solução crioprotetora C1 proporcionou maiores numéricos para sobrevivência. De acordo com Barraco et al. (2012), açúcares solúveis, tais como a glicose, estabilizam as membranas celulares durante o congelamento e reduzem o teor de água congelável, prevenindo a formação de gelo intracelular.

Em estudos com embriões do acesso gigante do oeste da África (GOA) N'Nan et al. (2012) utilizaram a solução de 3,2 M de glicose, com posterior desidratação em 80 e 160 g de sílica gel em diferentes tempos. Após a criopreservação, estes autores obtiveram 33,25% de sobrevivência. Porém, foi verificada ausência de sobrevivência para os embriões desidratados por 24 horas em 80 e 160 g de sílica gel. Portanto, houve comportamento distinto quanto à regeneração de explantes de uma mesma espécie, porém de diferentes acessos.

Um dos principais entraves no desenvolvimento de protocolos com fins de conservação em longo prazo é o genótipo-dependência, ou seja, a elevada especificidade no comportamento das espécies quando submetidas às condições de ultracongelamento (ENGELMANN & TAKAGI, 2000).

Não houve efeito significativo da presença de ácido giberélico na sobrevivência do acesso GBrPF. Os embriões inoculados no meio contendo 0,5 μ M de GA₃ alcançaram 55,55% e na ausência obtiveram 57,14% (dados não apresentados).

A presença de GA₃ favoreceu o desenvolvimento dos embriões do coqueiro GBrPF durante o processo germinativo (BARIN, 2011). De acordo com Hooley (1994) o ácido giberélico promove a germinação das sementes através da produção de hidrolases que degradam a parede celular das estruturas que recobrem o embrião, facilitando a emissão da radícula. Contudo, os meios de regeneração influenciaram o acesso AVeBrJ, onde a ausência de AG₃ proporcionou maior sobrevivência (77,8%). Desta forma, o efeito dos reguladores de crescimento na sobrevivência de embriões de coqueiro também é dependente do genótipo.

O comportamento distinto entre duas cultivares de algodoeiro (BRS 200 e BRS 201) quando submetidas a criopreservação foi observado por Lopes et al. (2013). Esses autores afirmam que as diferenças apresentadas entre cultivares e/ou variedades de uma mesma espécie, quando submetidas à criopreservação, se devem, provavelmente, ao patrimônio genético de cada variante não havendo efeitos da criopreservação sobre a viabilidade e/ou vigor das cultivares estudadas.

5.3.5. Efeito dos procedimentos de desidratação e do meio de cultura na sobrevivência de embriões zigóticos de coqueiro AVeBrJ

Conforme apresentado na Tabela 5, observou-se que os embriões AVeJBr imersos na solução C1 (Meio Y3 + 1,75 M sacarose + 15% glicerol) e submetidos a posterior criopreservação (+LN), apresentaram sobrevivência superior a 60%, exceto para os embriões imersos por 72 horas e inoculados no meio de regeneração na ausência de ácido giberélico e, imersos por 24 horas no meio de contendo ácido giberélico.

Contudo, foram verificados percentuais de sobrevivência dos embriões não criopreservados (-NL) inferiores a 50%. Resultados semelhantes foram observados por N'Nan et al. (2012), onde percentuais de germinação de embriões criopreservado (+NL) de coco dos acessos anão amarelo da Malásia e anão Niu Leka foram superiores ao material não criopreservado (-NL). Para o primeiro acesso foi obtido 64,8% de sobrevivência (-NL) e,

74,7% (+NL) e para o segundo acesso foi alcançado 17,2% de sobrevivência (-LN) e 41,7% (+LN).

TABELA 5. Porcentagem de sobrevivência de embriões zigóticos de coqueiro AVeBrJ criopreservados (+NL) e não criopreservados (-NL) aos sete meses de cultivo *in vitro* em função das soluções crioprotetoras, faixas de tempo de imersão e ácido giberélico (GA₃).

Solução crioprotetora	Tempo de imersão (h)	Umidade %	GA ₃ (μM)	Sobrevivência (%)	
				-NL	+NL
Y3 + 1,75 M sacarose + 15% glicerol	24	12,39	0	100,00	100,00
			0,5	25,00	50,00
	48	12,99	0	25,00	75,00
			0,5	75,00	66,67
	72	11,37	0	50,00	0,00
			0,5	75,00	100,00
Y3 + 3,33 M glicose + 15% glicerol	24	14,12	0	100,00	100,00
			0,5	75,00	66,67
	48	14,77	0	50,00	33,33
			0,5	75,00	50,00
	72	14,90	0	100,00	100,00
			0,5	75,00	16,67

A maior sobrevivência dos embriões expostos ao nitrogênio líquido, possivelmente pode ter ocorrido devido à diferença de vigor entre os indivíduos das amostras ou, as diferenças de temperatura tenham provocado rompimento nos tecidos dos embriões, possibilitando maior absorção de água e, conseqüentemente maior velocidade de germinação.

Houve 30% de regeneração para os embriões não criopreservados (-NL) e 10% de regeneração para o material criopreservado (+NL), sem diferença estatística entre os tratamentos (dados não demonstrados) aos sete meses de cultivo *in vitro*. Chin et al. (1989) obteve a regeneração de apenas uma planta a partir da criopreservação de embrião de coco após 15 meses de cultivo *in vitro*. Lopes (2005) estudou a criopreservação das sementes de algodoeiro, utilizando como crioprotetores dimetilsulfóxido (DMSO) e sacarose e, não observou sinais de viabilidade pós-imersão em nitrogênio líquido independente da concentração utilizada.

Em estudos com criopreservação de plúmulas encapsuladas de coqueiro anão amarelo da Malásia, N'Nan et al. (2008) obtiveram 43% de sobrevivência, porém, após oito meses de cultivo a regeneração foi de 18%. Rabba'a et al. (2012) avaliaram o efeito de diferentes concentrações na sobrevivência e regeneração de gemas apicais de *Teucrium polium*. Estes autores observaram 60% de sobrevivência após o processo de vitrificação e, 28% de sobrevivência de gemas apicais vitrificadas e criopreservadas. Em embriões somáticos de *Bactris gasipaes*, Heringer et al. (2013) avaliando diferentes tempos de imersão em solução PVS3 e obtiveram após quatro meses, 37% de regeneração. Em eixos embrionários de duas espécies de *Citrus*, Malik & Chaudhury (2006) alcançaram 65,5% de viabilidade das cápsulas contendo os explantes, após a desidratação em imersão na solução de 0,30 M de sacarose por 40 horas, sendo que 62,7% da viabilidade foi mantida mesmo após a imersão em nitrogênio líquido.

5.3.6. Efeito dos procedimentos de desidratação e do meio de cultura na sobrevivência de embriões zigóticos de coqueiro GBrPF

Considerando as duas soluções crioprotetoras, observou-se que quanto maior o tempo de imersão maior a umidade obtida, possivelmente devido ao processo de embebição dos embriões durante a imersão (Tabela 6).

O tempo de 24 horas de imersão na solução contendo glicose e glicerol promoveu a menor umidade observada (9,07%), porém, não houve maior percentual de sobrevivência. Possivelmente este tratamento promoveu além da redução da água livre congelável, a remoção da umidade necessária para manter a viabilidade mínima do material após o congelamento.

TABELA 6. Porcentagem de sobrevivência de embriões zigóticos de coqueiro GBrPF criopreservados (+NL) e não criopreservados (-NL) aos sete meses de cultivo *in vitro* em função das soluções crioprotetoras, faixas de tempo de imersão e ácido giberélico (GA₃).

Solução crioprotetora	Tempo de imersão (h)	Umidade %	GA ₃ (μM)	Sobrevivência (%)	
				-NL	+NL
Y3 + 3,33 M glicose	24	14,59	0	88,89	66,67
			0,5	80,00	40,00
	48	19,57	0	100,00	100,00
			0,5	62,50	70,00
	72	26,02	0	70,00	70,00
			0,5	88,89	20,00
Y3 + 3,33 M glicose + 15% glicerol	24	9,07	0	30,00	70,00
			0,5	60,00	33,33
	48	28,25	0	90,00	100,00
			0,5	0,00	20,00
	72	32,21	0	100,00	70,00
			0,5	0,00	40,00

Apesar dos resultados de sobrevivência de embriões de coqueiro GBrPF serem satisfatórios após a criopreservação e cultivo *in vitro* por sete meses, estudos complementares devem ser conduzidos, variando as concentrações das soluções crioprotetoras, os meios de regeneração e procedimentos de descongelamento, a fim de promover a completa conversão de embrião à plântula.

5.4. Conclusões

1. As soluções crioprotetoras compostas por meio Y3 + 1,75 M de sacarose + 15% de glicerol e meio Y3 + 3,33 M glicose + 15% glicerol reduzem a umidade de embriões do acesso AVeBrJ;
2. As soluções crioprotetoras compostas por meio Y3 + 3,3 M de glicose e meio Y3 + 3,3 M de glicose + 15% de glicerol, reduzem a umidade de embriões do acesso GBrPF;
3. O tempo de imersão de 24 horas promove maior sobrevivência de embriões zigóticos de acessos AVeBrJ e GBrPF criopreservados.
4. A adição de 5 μ M de GA₃ não apresenta efeito na sobrevivência de embriões zigóticos criopreservados de AVeBrJ e GBrPF.

5.5. Referências Bibliográficas

ASSY-BAH, B.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of mature embryos of coconut (*Cocos nucifera* L.) and subsequent regeneration of plantlets. **CryoLetters**, v.13, p.117-126, 1992.

BANDUPRIYA, H.D.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**, v.18, n.1, p. 135-137, 2010.

BANDUPRIYA, H.D.D. FERNANDO, S.C.; VERDEIL, J.L.; MALAURIE, B. Effect of abscisic acid on survival and recovery of cryopreserved plumule explants of coconut (*Cocos nucifera* L.). **Cocos**, v.18, p.58-66, 2007

BARRACO, G.; CHATELET, P.; BALSEMIN, E.; DECOURCELLE, T.; SYLVESTRE, I.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of *Prunus cerasus* through vitrification and replacement of cold hardening with preculture on medium enriched with sucrose and/or glycerol. **Scientia Horticulturae**, v.148, p.104-108, 2012.

BARIN, L.B. **Aprimoramento do protocolo de cultura in vitro de embriões zigóticos de acessos de coqueiro**. Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Departamento de Ciências Florestais, Universidade Federal de Sergipe: São Cristovão-SE, 2011.

BENELLI, C.; CARLO, A.; ENGELMANN, F. Recent advances in the cryopreservation of shoot-derived germplasm of economically important fruit trees of Actinidia, Diospyros, Malus, Olea, Prunus, Pyrus and Vitis. **Biotechnology Advances. Biotechnology Advances**, n.31, p.175-185, 2013.

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.

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In vitro cellular developmental biology – plant**, v.47, p.5-16, 2011.

ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. **Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application.** Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba, Japan/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, p. 496. 2000.

FERREIRA, D.F. SISVAR: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, n.6, p.1039-1042, 2011.

FERREIRA, R.A.; ESTRADA, L.H.C.; THIÉBAUT, J.T.L.; GRANADOS, L.B.C.; JÚNIOR, V.R.S. Avaliação do comportamento de ovinos Santa Inês em sistema Silvipastoril no norte Fluminense. **Ciência Agrotecnologia**, v.35, n.2, p.399-403, 2011.

GALDIANO, R.F.; LEMOS, E.G.M.; FARIA, R.T.; VENDRAME, W.A. Cryopreservation of *Dendrobium* hybrid seeds and protocorms as affected by phloroglucinol and Supercool X1000. **Scientia Horticulturae**, v.148, p.154-160, 2012.

GANINO, T.; SILVANINI, A.; BEGHÉ, D.; BENELLI, C.; LAMBARDI, M.; FABBRI, A. Anatomy and osmotic potential of the *Vitis* rootstock shoot tips recalcitrant to cryopreservation. **Biologia Plantarum**, v.56, n.1, p.78-82, 2012.

GOMES-COPELAND, K.K.P.G. **Estudos fisiológicos e bioquímicos para criopreservação de embriões zigóticos de coqueiro anão verde de Jiqui do Brasil.** 2010, 51p. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal de Sergipe, Sergipe, 2010.

GOMES-COPELAND, K.K.P.; LÉDO, A.S.; ALMEIDA, F.T.C.; MIRANDA, R.P.; SANTOS, I.R.I. Assessing the viability of cryopreserved coconut zygotic embryos by electrolytic conductivity and potassium leaching. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.47, n.1, p.8-13, 2012.

HERINGER, A.S.; STEINMACHER, D.A.; SCHMIDT, E.C.; BOUZON, Z.L.; GUERRA, M.P. Survival and ultrastructural features of peach palm (*Bactris gasipaes*, Kunth) somatic embryos submitted to cryopreservation through vitrification. **Protoplasma**, v.250, p.1185-1193, 2013.

HOOLEY, R. Gibberellins: perception, transduction and responses. **Plant Molecular Biology**, v.26, p.1529-1555, 1994.

KARUN, A.; SAJINI, K.K. **Cryopreservation of coconut zygotic embryos and pollen.** Kasaragod: Central Plantation Crops Research Institute. 17p. 2010 (Technical Bulletin, 63).

KAVIANI, B. Conservation of plant genetic resources by cryopreservation. **Australian Journal of Crop Science**, v.5, n.6, p.778-800, 2011.

LEDO, A.S. et al. Cultivo in vitro de embriões zigóticos e aclimação de plântulas de coqueiro-anão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.2, p.147-154, 2007.

LOPES, K.P. **Criopreservação de germoplasma de oleaginosas de importância econômica para o nordeste brasileiro.** 2005. 113 F. (Tese, Agronomia Sementes). Universidade Federal da Paraíba, Areia, PB, 2005.

LOPES, K.P.; ALMEIDA, F.A.C.; CARVALHO, J.M.F.C.; BRUNO, R.L.A. Criopreservação de eixos embrionários zigóticos de algodoeiro. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.17, n.3, p.291-298, 2013.

MALAUURIE, B.; TREGGAR, J.; BANDUPRIYA, H.D.D.; VERDEIL, J.L.; N'NAN, O.; BORGES, M. Cryopreservation as a tool for the management of coconut germoplasn. **Acta Horticulturae**, 908, p.461-466, 2011.

MALIK, S.K, CHAUDHURY, R.; DHARIWAL, O.P.; KALIA, R.K. Collection and characterization of *Citrus indica* Tanaka and *C. macroptera* Montr.: wild endangered species of northeastern India. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.53, p.1485–1493, 2006.

MALIK, S.K., CHAUDHURY, R. Successful cryopreservation of embryonic axes of two wild and endangered *Citrus* species of north eastern India for long term conservation. **Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization**, v.4, p.204-209, 2006.

MOLINA, T.F.; TOLLMANN, M.A.A.; DODE, L.B.; VIEGAS, J. Crioconservação em sementes de cebola. **Revista Brasileira de Sementes**, v.28, n.3, p.72-81, 2006.

N'NAN, O.; BORGES, M.; KONAN, J.L.; HOCHER, V. VERDEIL, J.L.; TREGGAR, J.; N'GUETTA, A.S.P.; ENGELMANN, F.; MALAUURIE, B. A simple protocol for cryopreservation of zygotic embryos of ten accessions of coconut (*Cocos nucifera* L.). **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v.48, p.160-166, 2012.

N'NAN, O.; HOCHER, V.; VERDEIL, J.L.; KONAN, J.L.; BALLO, K.; MONDEIL, F.; MALAUURIE, B. Cryopreservation by encapsulation–dehydration of plumules of coconut (*Cocos nucifera* L.). **Cryoletters**, v.24, n.4, p.339-350, 2008.

PANIS, B.; TOTTE, N.; VAN NIMMÉN, K.; WITHERS, L.A. SWENNEN, R. Cryopreservation of banana (*Musa* spp.) meristem cultures after pre-culture on sucrose. **Plant Science**, v.121, p.95-106, 1996.

PASSOS, J.R.S.; MATOS, G.V.C.; MELETTI, L.M.M.; SCOTT, M.D.S.; BERNACCI, L.C.; VIEIRA, M.A.R. Utilização do ácido giberélico para a quebra de dormência de semente de *Passiflora nitida* KUNTH germinadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.26, n.2, p.380-381, 2004.

PECH Y AKÉ, A.; MANST, B.; OROZCO-SEGOVIA, A.; OROPEZA, C. The effect of gibberellic acid on the *in vitro* germination of coconut zygotic embryos and their conversion into plantlets. **In Vitro Cellular e Developmental Biology – Plant**, v.43, p.247-253, 2007.

PENG, J.; HARBERD, N.P. The role of GA-mediated signaling in the control of seed germination. **Current Opinion in Plant Biology**, v.5, p.376-381, 2002.

PEZZOPANE, J.R.M.; MARSETTI, M.M.S.; FERRARI, W.R.; PEZZOPANE, J.E.M. Alterações microclimáticas em cultivo de café conilon arborizado com coqueiro-anão-verde. **Revista Ciência Agronômica**, v.42, n.4, p.865-871, out-dez, 2011.

PURSEGLOVE, J. W. **Tropical crops monocotyledons**. Longman, London, 607p. 1972.

RABBA'A, M, M.; SHIBLI, R.A. SHATNAWI, M.A. Cryopreservation of *Teucrium polium* L. shoot-tips by vitrification and encapsulation-dehydration. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v.110, p.371-382. 2012.

ROSSETO, C.A.V.; CONEGLIAN, R.C.C.; NAKAGAWA, J.; SHIMIZU, M.K.; MARIN, V.A. Germinação de sementes de maracujá-doce (*Passiflora alata* Dryand) em função de tratamento pré-germinativo. **Revista Brasileira de Sementes**, v.22, n.1, p.247-252, 2000.

SAKAI, A. Cryopreservation of germplasm of woody plants. In: BAJAJ, Y.P.S. (ed.), **Biotechnology in agriculture and forestry**, v.32, Cryopreservation of plant germplasm I, Springer- Verlag, Berlin, 1995.

SANTOS, I.R.I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12, p.70-84, 2000.

SANTOS, I.R.I. Criopreservação de germoplasma vegetal. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.20, p.60-65. 2001.

SANTOS, I.R.I. **Criopreservação de eixos embrionários de espécies de citrus usando o encapsulamento e desidratação**. Brasília, 24 p., 2004, Documentos – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

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

SANTOS, J.E. dos; LÉDO, A.S.; MACHADO, C.A.; ARAUJO, A.G. de; QUIRINO, Z.B.R.; VILANOVA-NETA, J.L.; RIBEIRO, M.M.J.; ALMEIDA, C.S. **Ácido giberélico na cultura de embriões zigóticos de coqueiro anão verde**. III ciclo de palestras sobre cultivo in vitro de plantas, 2012.

SISUNANDAR, SOPADE, P.A.; SAMOSIR, Y.; RIVAL, A.; ADKINS, S.W. Dehydration improves cryopreservation of coconut (*Cocos nucifera* L.). **Cryobiology**, v.61, p.289-296, 2010.

SOUSA, H.U. de; RAMOS, J.D.; PASQUAL, M. FERREIRA, E.A. Efeito do ácido giberélico sobre a germinação de sementes de porta-enxertos cítricos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, n.2, p.496-499, 2002.

6. ARTIGO 2: AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS DE INTERCÂMBIO NA CONTAMINAÇÃO E GERMINAÇÃO DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE ACESSOS DE COQUEIRO

Periódico submetido (ou a ser submetido): Pesquisa Agropecuária Brasileira

RESUMO

A introdução de germoplasma por cultura de tecidos é relativamente segura, pois a própria manipulação do explante pode eliminar pragas, fungos e bactérias. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes procedimentos para o transporte e tempo de armazenamento sobre a contaminação e germinação de embriões zigóticos. Para os estudos foram utilizados embriões de coqueiro anão vermelho dos Camarões (AVC), anão amarelo da Malásia (AAM) e anão vermelho da Malásia (AVM). Foram avaliados cinco procedimentos; T1- Armazenamento do disco endosperma em sacos plásticos a $10 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 5 dias; T2- Armazenamento do disco endosperma em sacos plásticos a $10 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 8 dias; T3- Armazenamento do disco endosperma em sacos plásticos a $10 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 12 dias (antes da excisão de embrião e a inoculação no meio de cultura Y3); T4- embrião zigótico excisado e inoculado em microtubo de 5 mL com 3 mL de meio de cultura Y3 sem sacarose e depois de 2 dias transferidos para meio de cultura Y3; T5- cinco embriões zigóticos inoculados em meio de cultura Y3 sem sacarose em placa de Petri e depois de 2 dias transferidos para Y3 meio de cultura. O transporte de embriões zigóticos em placa de Petri com meio de cultura Y3 sem sacarose durante dois dias promove menor porcentagem de contaminação bacteriana. Todos os procedimentos estudados promovem baixa contaminação fúngica. O transporte de discos de endosperma em sacos plásticos e armazenados por cinco, oito e doze dias promove maior germinação de embriões zigóticos não contaminados dos acessos AVM e AAM. O transporte de embriões zigóticos isolados em microtubo de 5 mL com 3 mL de meio de cultura Y3 sem sacarose por dois dias e de discos de endosperma em sacos plásticos e armazenados por cinco e oito dias promovem maior germinação de embriões zigóticos não contaminados do acesso AVC.

Palavras-chave: *Cocos nucifera*, conservação *ex situ*, recursos genéticos, contaminação *in vitro*.

ABSTRACT

EVALUATION OF EXCHANGE TECHNICALS IN THE CONTAMINATION AND GERMINATION OF ZYGOTIC EMBRYOS COCONUT ACCESSIONS

The introduction of germplasm by tissue culture is relatively safe because proper handling of the explant can eliminate pests, fungi and bacteria. The objective of this study was to evaluate the effect of different procedures for packaging and storage time on the contamination of zygotic embryos. For studies of procedures for transporting and storing embryos of Cameroon red dwarf (CRD), Malayan yellow dwarf (MYD) and Malayan red dwarf (MRD) accessions were used. Five treatments were evaluated: T1- endosperm disc storage at $10\pm 2^{\circ}\text{C}$ for 5 days; T2- endosperm disc storage at $10\pm 2^{\circ}\text{C}$ for 8 days; T3- disc storage $10\pm 2^{\circ}\text{C}$ 1 for 12 days (before de embryo excision and inoculation in the Y3 culture medium); T4- individual zygotic embryo inoculated in the Y3 culture medium and storage in the microtube 5 mL and after 2 days transferred to Y3 cultured medium; T5- five zygotic embryos inoculated in Y3 culture medium in the Petri dish and after 2 days transferred to Y3 culture medium. The transport zygotic embryos in Petri plate with Y3 culture medium without sucrose for two days promotes low percentage of bacterial contamination. All procedures studied promote low fungal contamination. The transport endosperm discs in plastic bags and stored for five, eight, and twelve days promotes higher germination of zygotic embryos uncontaminated AVM and AAM accessions. The transport of isolated zygotic embryos in microtube with Y3 culture medium without sucrose for two days and endosperm discs in plastic bags and stored for five and eight days promote increased germination of zygotic embryos uncontaminated AVC accession.

Key-words: *Cocos nucifera*, *ex situ* conservation, genetic resources, *in vitro* contamination.

6.1. Introdução

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.) é a palmeira de maior importância socioeconômica das regiões intertropicais do globo terrestre (FONTENELE, 2005), permitindo o consórcio com a pecuária e com outras culturas agrícolas, constituindo-se como fonte de geração de renda e meio de fixação do homem no campo (PEZZOPANE et al., 2011; FERREIRA et al., 2011).

Com a expansão dos plantios a fim de suprir principalmente a demanda de água de coco, aliada à necessidade de atender aos programas de melhoramento genético, o intercâmbio de genótipos tem aumentado entre países para ampliar a variabilidade do coqueiro. No entanto, embora seja essencial para a utilização e melhoramento dos recursos genéticos, o movimento de germoplasma de coco também representa um risco de transferência de pragas e doenças, uma vez que algumas destas são isoladas geograficamente (CUETO et al., 2012). A disseminação do amarelecimento letal do coqueiro, causado por fitoplasmas e Cadang-Cadang pelo vírus *Coconut cadang cadang viroid-CCCVd* demonstra que precauções são necessárias quando se desloca material vegetal de coqueiro (CUETO et al., 2012).

Um dos principais objetivos do intercâmbio de germoplasma é enriquecer o patrimônio genético vegetal de um país ou organização, adotando-se primordialmente as precauções necessárias para evitar a entrada de pragas em locais isentos. Assim, a FAO em 1993 lançou o primeiro documento orientador para a cultura do coqueiro, com ênfase aos procedimentos de intercâmbio, utilizando sementes, pólen e embriões zigóticos extraídos ou não do endosperma (FRISON et al., 1993).

Contudo, a coleta e o intercâmbio de germoplasma de coqueiro, pelo método convencional, é inviável devido ao volume, peso e recalcitrância das sementes (SILVA, 2002). Além disso, estudos demonstram a irregularidade nos rendimentos de germoplasma de coco introduzido por discos de endosperma e as altas porcentagens de contaminações devido o tempo entre a coleta, transporte e inoculação do embrião zigótico (LÉDO et al., 2011; BANDUPRIYA et al., 2010).

Ajustes nos protocolos de intercâmbio tem sido alvo de estudos, e uma padronização nos protocolos de introdução com prioridade para a adoção de técnicas de cultura de tecidos de plantas tem sido recomendada. No intercâmbio de germoplasma o controle da contaminação é prioritário (PENCE & SANDOVAL, 2002). Dessa forma, a introdução por cultura de tecidos é relativamente segura, pois a própria manipulação do explante pode eliminar pragas, fungos e bactérias.

As recentes diretrizes do *Bioversity International* e da FAO recomendam para o movimento seguro de germoplasma de coqueiro o intercâmbio de discos de endosperma contendo o embrião zigótico ou embriões zigóticos *in vitro*. As recomendações incluem desde a seleção e o preparo das plantas mães doadoras até a transferência dos embriões zigóticos para meio de germinação (CUETO et al., 2012).

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes procedimentos no transporte, tipo de embalagem e tempo de armazenamento sobre a contaminação e o desenvolvimento de embriões zigóticos de acessos de coqueiro.

6.2. Material e Métodos

6.2.1. Coleta e pré-esterilização do material vegetal

Para os estudos de procedimentos de transporte e armazenamento foram utilizados 1200 embriões zigóticos oriundos de plantas adultas de acessos de coqueiro anão vermelho dos Camarões (AVC), anão amarelo da Malásia (AAM) e anão vermelho da Malásia (AVM)

(Figura 6), provenientes do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de coco da Embrapa Tabuleiros Costeiros, localizado no Campo experimental de Itaporanga d'Ajuda, Sergipe.

No local de coleta dos frutos maduros (10-11 meses de idade) foram retirados os cilindros de endosperma, contendo os embriões zigóticos. Esses foram 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. 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.



FIGURA 6. Acessos de coqueiro: A – frutos do acesso coqueiro anão amarelo da Malásia (AAM). B- frutos do acesso coqueiro anão vermelho da Malásia (AVM). C – frutos do acesso de coqueiro anão vermelho dos Camarões (AVC). Fotos: Ana Léo

6.2.2. Efeito de técnicas de intercâmbio na germinação *in vitro* de embriões zigóticos de acessos de coqueiro

Para a avaliação de diferentes técnicas de intercâmbio na contaminação e germinação *in vitro* de embriões zigóticos de acessos de coqueiro foram aplicados cinco procedimentos: T1- armazenamento do disco endosperma em sacos plásticos a $12 \pm 2^\circ\text{C}$ por cinco dias; T2- armazenamento do disco endosperma em sacos plásticos a $12 \pm 2^\circ\text{C}$ por oito dias; T3- armazenamento do disco endosperma em sacos plásticos a $12 \pm 2^\circ\text{C}$ por 12 dias; T4- cinco embriões zigóticos excisados e inoculados em placa de Petri com meio de cultura Y3 sem sacarose durante dois dias; T5- embrião zigótico excisado e armazenado individualmente em microtubo de 5 mL com 3 mL de meio de cultura Y3 sem sacarose durante dois dias. A temperatura de armazenamento para os tratamentos T1, T2 e T3 foi definida com base nas recomendações para armazenamento na parte inferior de geladeira com temperatura entre 10 a 15°C (CUETO et al., 2012).

Para os procedimentos T1, T2 e T3 os discos de endosperma foram submetidos, após os diferentes períodos de armazenamento, à assepsia por meio da imersão em álcool etílico 70% por 30 segundos, em hipoclorito de sódio (2-2,5% v/v) por cinco minutos (Figura 7A), seguida da tríplice lavagem em água destilada e estéril (Figura 7B).

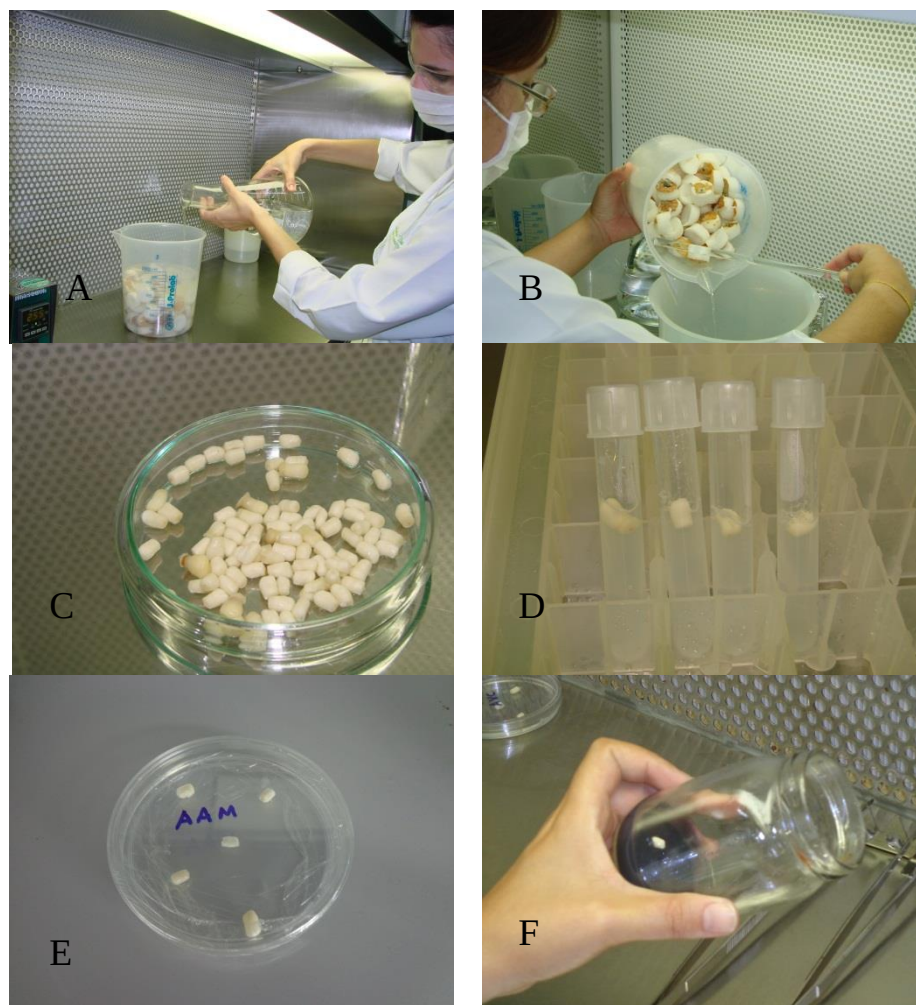


FIGURA 7. Etapas da assepsia de discos de endosperma, excisão e isolamento de embriões zigóticos de coqueiro: A- Imersão em álcool etílico dos discos de endosperma em câmara de fluxo laminar; B- Lavagem dos discos de endosperma com água autoclavada; C- Embriões zigóticos excisados; D- Embriões de coqueiro AAM inoculados em microtubo com capacidade de 5mL; E- Embriões de coqueiro AAM inoculados em placa de Petri; F- Inoculação de embriões zigóticos em meio de cultura Y3. Fotos: Ana Lédo, Caroline Machado.

Em seguida, os embriões foram excisados e inoculados em frascos com capacidade de 250 mL contendo 30 mL de meio de cultura Y3 (Eeweens, 1976) suplementado com 60 g L⁻¹ de sacarose, 1 g L⁻¹ de carvão ativado, 5,8 g L⁻¹ de ágar e 0,5 µM de GA₃ (meio de germinação). Nos procedimentos T4 (Figuras 7C e 7D) e T5 (Figura 7E), os discos de endosperma foram submetidos ao processo de assepsia conforme descrito anteriormente. Após a excisão dos embriões, os mesmos foram inoculados em meio de cultura Y3 modificado (sem sacarose) com 5,8 g L⁻¹ de ágar (meio de transporte). Após o período de armazenamento, foram transferidos diretamente para frascos com capacidade de 250 mL contendo 30 mL de meio de germinação (Figura 7F).

As culturas foram mantidas na ausência de luz até o surgimento do primórdio foliar. Posteriormente foram transferidas para um ambiente com fotoperíodo de 16 h, temperatura de 25± 2° C, umidade relativa média do ar de 70% e intensidade luminosa de 60 µmol m⁻² s⁻¹.

Aos 30 dias de cultivo *in vitro* foram determinadas a porcentagem de contaminação fúngica e bacteriana e aos 60 dias a porcentagem de germinação dos embriões não contaminados. Como embriões germinados foram considerados os que emitiram o haustório e/ou parte aérea e/ou raiz.

6.2. Delineamento experimental e análise estatística

Para a avaliação da porcentagem de contaminação fúngica e bacteriana foi considerado o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 5 (três acessos x cinco procedimentos de transporte e armazenamento) com 20 repetições, sendo cada parcela composta por um embrião. Para a avaliação da porcentagem germinação foi considerado o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 5 (três acessos x cinco procedimentos de transporte e armazenamento), sendo cada parcela composta por dois embriões.

Os dados foram transformados em $(X + 0,5)^{1/2}$ e submetidos à análise de variância, e as médias das variáveis comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011).

6.3. Resultados e Discussão

6.3.1. Efeito de técnicas de intercâmbio na contaminação *in vitro* de embriões zigóticos de acessos de coqueiro

Não houve diferença significativa em relação à porcentagem de contaminação fúngica entre os acessos de coqueiro e entre as técnicas de intercâmbio dos embriões zigóticos aos 30 dias após a inoculação (Anexo 5A), sendo que valores acima de 15% não foram detectados. Não foi observada contaminação fúngica no acesso AAM submetido aos procedimentos T2, T3, T4 e T5. Os acessos AVM e AVC obtiveram 5% de contaminação em T2, T3 e T5 e T1, T2, T4 e T5, respectivamente (Tabela 7).

Baixos índices de contaminação fúngica (1,38%) também foram observados por Léo et al. (2011) após nove dias de inoculação de embriões, transportados em discos de endosperma, armazenados em sacos plásticos a 17°C durante dois dias.

Para a contaminação bacteriana houve diferenças significativas entre os acessos e tratamentos e a interação dos fatores (Anexo 5A). Para os acessos AVC e AAM não houve efeito técnicas na contaminação, ou seja, o tempo de armazenamento dos discos em sacos plásticos (T1, T2 e T3) e a inoculação dos embriões excisados em meio de cultivo (T4 e T5) não influenciaram na contaminação. Já para o acesso AVM, o armazenamento de cinco embriões zigóticos em placa de Petri contendo meio de cultura Y3 durante dois dias (T4) alcançou menor taxa de contaminação dos embriões (5%) em relação aos demais. Não foi observada contaminação bacteriana no acesso AVC submetido ao T3 e no AVC ao T3 e T4 (Tabela 7).

Apesar de as novas diretrizes da FAO recomendarem para o transporte seguro de germoplasma de coco discos de endosperma mantidos em sacos plásticos e/ou embriões inoculados em meio Y3 e armazenados em criotubos, nesses tratamentos foram observadas as maiores porcentagens de contaminação bacteriana no acesso AVM.

Avaliando diferentes formas de transporte de embriões e discos de endosperma de coqueiro gigante Gazelle e seus efeitos na contaminação, Ashburner e Thompson (1993) concluíram que o transporte de discos de endosperma em sacos plásticos alcançou 100% de contaminação, em contrapartida, não foi observada a contaminação em embriões excisados e inoculados em água destilada estéril. Alta taxa de contaminação bacteriana (33,98%) também foi encontrada por Léo et al. (2011) quando utilizaram o protocolo oficial da FAO proposto por Frison et al. (1993) no intercâmbio de discos de endosperma de onze acessos de coqueiro-anão e um acesso de coqueiro gigante, da Costa do Marfim para o Brasil.

TABELA 7. Porcentagem de contaminação fúngica e bacteriana de embriões zigóticos de acessos de coqueiro anão vermelho da Malásia (AVM), anão vermelho dos Camarões (AVC) e anão amarelo da Malásia (AAM) em função de diferentes técnicas de intercâmbio aos 30 dias de cultivo *in vitro*.

Procedimentos	Acessos			Médias
	AVM	AVC	AAM	
Contaminação fúngica (%)				
T1	15 Aa	5 Aa	10 Aa	10
T2	5 Aa	5 Aa	0 Aa	3,33
T3	5 Aa	10 Aa	0 Aa	5
T4	10 Aa	5 Aa	0 Aa	5
T5	5 Aa	5 Aa	0 Aa	3,33
CV(%) 114,58				
Contaminação bacteriana (%)				
T1	25 BCa	20 Aab	5 Ab	16,67
T2	20 BCa	15 Aa	15 Aa	16,67
T3	30 Ba	0 Ab	0 Ab	10
T4	5 Ca	5 Aa	0 Aa	3,33
T5	55 Aa	15 Ab	5 Ab	25
CV(%) 104,27				

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. T1- armazenamento do disco endosperma em sacos plásticos a $12 \pm 2^\circ\text{C}$ durante cinco dias; T2- armazenamento do disco endosperma em sacos plásticos a $12 \pm 2^\circ\text{C}$ durante oito dias; T3- armazenamento do disco endosperma em sacos plásticos a $12 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 12 dias; T4- cinco embriões zigóticos excisados e inoculados em placa de Petri com meio de cultura Y3 sem sacarose durante dois dias; T5- embrião zigótico excisado e armazenado individualmente em microtubo de 5 mL com 3 mL de meio de cultura Y3 sem sacarose durante dois dias.

Uma das mais importantes fontes de contaminação é o explante durante o estabelecimento das culturas *in vitro*. Quando ineficientes, os pré-tratamentos utilizados para desinfestação do material vegetal obtido em campo e no seu transporte, podem manter microrganismos dentro dos tecidos vegetais e consequentemente causar perdas severas nos estágios posteriores da cultura de tecidos (COSTA et al., 2010).

É possível utilizar fungicidas e antibióticos para o controle de microrganismos durante a desinfestação ou adicionados ao meio nutritivo (Pasqual et al., 2010). No entanto, ainda não há protocolos na cultura de embriões de coco que recomendem o uso de antibióticos no meio de cultivo para evitar a contaminação bacteriana (LÉDO et al., 2011).

Não houve diferença significativa entre os acessos submetidos aos tratamentos T2 e T4. No entanto, em T1, T3 e T5 o acesso AVM obteve maiores porcentagem de contaminação

quando comparado com AAM e AVC. Tal fato pode estar atribuído às características e fatores endógenos de cada genótipo.

6.3.2 Efeito de técnicas de intercâmbio na germinação *in vitro* de embriões zigóticos de acessos de coqueiro

Para a germinação *in vitro* houve diferenças significativas entre os acessos e tratamentos e a interação dos fatores (Anexo 6A). Embriões dos acessos AVM e AAM submetidos aos procedimentos com discos de endosperma armazenados sob diferentes tempos em sacos plásticos (T1, T2, T3) apresentaram maior germinação e não diferiram do T5 para os acessos AVM e AVC (Tabela 8).

Apesar de o procedimento T4 (cinco embriões zigóticos excisados e inoculados em placa de Petri com meio de cultura Y3 durante dois dias) apresentar baixos valores de contaminação bacteriana (Tabela 3) nos três acessos, neste tratamento houve menor germinação. Resultados semelhantes foram observados por Ashburner e Thompson (1993) com coqueiro gigante de Gazelle, onde embriões transportados em meio de cultivo obtiveram também menor germinação quando comparado com o transporte em água estéril. Os menores valores observados para os procedimentos T4 na germinação podem estar atribuídos à exposição do embrião nas condições de transporte por dois dias, mesmo em condições assépticas.

TABELA 8. Porcentagem de germinação de embriões zigóticos não contaminados de acessos de coqueiro anão vermelho da Malásia (AVM), anão vermelho dos Camarões (AVC) e anão amarelo da Malásia (AAM) em função de diferentes técnicas de intercâmbio aos 60 dias de cultivo *in vitro*.

Procedimentos	Acessos			Médias
	AVM	AVC	AAM	
Germinação (%)				
T1	78,57 Aa	87,50 Aa	88,88 Aa	85,42
T2	94,11 Aa	84,21 Aa	100 Aa	92,45
T3	87,50 Aa	44,44 Bb	94,73 Aa	75,47
T4	36,84 Ba	42,10 Ba	44,44 Ba	41,07
T5	63,63 ABa	82,35 Aa	47,37 Bb	63,83
Médias	71,43	67,42	71,43	
CV(%) 51,43				

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. T1- armazenamento do disco endosperma em sacos plásticos a 12±2°C durante cinco dias; T2- armazenamento do disco endosperma em sacos plásticos a 12 ± 2°C durante oito dias; T3- armazenamento do disco endosperma em sacos plásticos a 12 ± 2°C durante 12 dias; T4- cinco embriões zigóticos excisados e inoculados em placa de Petri com meio de cultura Y3 sem sacarose durante dois dias; T5- embrião zigótico excisado e armazenado individualmente em microtubo de 5 mL de 3 mL de meio de cultura Y3 sem sacarose durante dois dias.

Considerando a variação nas respostas em função dos genótipos e técnicas de intercâmbio, estudos posteriores para validação das técnicas deverão ser conduzidos e outros fatores como época de coleta do material vegetal, condições de transporte deverão ser considerados para a seleção de métodos mais eficientes para o intercâmbio de recursos genéticos de coqueiro.

6.4. Conclusões

- 1- O transporte de discos de endosperma em sacos plásticos e armazenados por oito e doze dias (T2 e T3), de embriões zigóticos em placa de Petri contendo meio de cultura Y3 sem sacarose durante dois dias (T4) e embriões zigóticos isolados em microtubo com meio de cultura Y3 sem sacarose por dois dias (T5) inibem a contaminação fúngica no acesso AAM;
- 2- O transporte de discos de endosperma em sacos plásticos e armazenados por oito dias (T2) e embriões zigóticos isolados em microtubo com meio de cultura Y3 sem sacarose por dois dias (T5) resultam em baixa porcentagem de contaminação fúngica (5%) nos acessos AVM;
- 3- O transporte de embriões zigóticos em placa de Petri contendo meio de cultura Y3 sem sacarose durante dois dias (T4) promove baixa porcentagem de contaminação bacteriana (5%) nos acessos AVM e AVC, e ausência de contaminação bacteriana no acesso AAM;
- 4- O transporte de discos de endosperma em sacos plásticos e armazenados por doze dias (T3) inibe a contaminação bacteriana nos acessos AVC e AAM;
- 5- O transporte de discos de endosperma em sacos plásticos e armazenados por cinco, oito e doze dias (T1, T2 e T3) promove maior germinação de embriões zigóticos não contaminados dos acessos AVM e AAM;
- 6- O transporte de embriões zigóticos isolados em microtubo com meio de cultura Y3 sem sacarose por dois dias (T5) e de discos de endosperma em sacos plásticos e armazenados por cinco e oito dias (T1 e T2) resultam em maior germinação de embriões zigóticos não contaminados do acesso AVC.

6.5. Referências Bibliográficas

- BANDUPRIYA, H.D.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**, v.18, n.1, p. 135-137, 2010.
- COSTA, M.G.C.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E.; OTONI, W.C. Importância das contaminações e dos microrganismos endêmicos na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas. In: **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas**. Brasília-DF: Embrapa Informação tecnológica, 446p, 2010.
- CUETO, C.A., JOHNSON, V.B.; ENGELMANN, F.; KEMBU, A.; KONAN, J.L.; KAN, M. K.; RIVERA, R.L.; VIDHANARACHCHI, V.; BOURDEIX, R.; WEISE, S.F. **Technical**

guidelines for the safe movement and duplication of Coconut (*Cocos nucifera* L.) germoplasm using embryo culture transfer protocols. COGENT; Bioversity International, Montpellier, France, 2012.

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.

FERREIRA, D.F. SISVAR: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, n.6, p.1039-1042, 2011.

FERREIRA, R.A.; ESTRADA, L.H.C.; THIÉBAUT, J.T.L.; GRANADOS, L.B.C.; JÚNIOR, V.R.S. Avaliação do comportamento de ovinos Santa Inês em sistema Silvipastoril no norte Fluminense. **Ciência Agrotecnologia**, v.35, n.2, p.399-403, 2011.

FONTENELE, R.E.S. **Cultura do coco no Brasil:** Caracterização do mercado atual e perspectivas futuras. XLIII CONGRESSO DA SOBER “Instituições, Eficiência, Gestão e Contratos no Sistema Agroindustrial”. Ribeirão Preto, 2005.

FRISON, E.A., PUTTER, C.A.J.; DIEKMANN, M. **FAO/IBPGR Technical guldelines for the safe movement of coconut germoplasm.** Rome: IBGR, 15p. 1993.

LÉDO, A.S.; RAMOS, S.R.R.; DINIZ, L.E.C.; KONAN, J.L.K.; GEORGE, M.L. Performance of coconut embryo culture accessions introduced at the International Coconut Genebank for Latin America and the Caribbean (ICG-LAC). **Acta Horticulturae**, n.918, p.177-182, 2011.

PASQUAL, M.; DUTRA, L.F.; ARAUJO, A.G. de; PEREIRA, A.R. Prevenção de contaminações na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas. In: **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas.** Brasília-DF: Embrapa Informação tecnológica, 446p, 2010.

PENCE, V.C.; SANDOVAL, J.A. Controlling contamination during in vitro collecting. In: PENCE, V. C.; SANDOVAL, J. A.; VILLALOBOS, V. M.; ENGELMANN, F. (Eds). **In vitro collecting techniques for germplasm conservation.** IPGRI technical bulletin no. 7. Rome: International Plant Genetic Resources Institute; 2002:30 – 40.

PEZZOPANE, J.R.M.; MARSETTI, M.M.S.; FERRARI, W.R.; PEZZOPANE, J.E.M. Alterações microclimáticas em cultivo de café conilon arborizado com coqueiro-anão-verde. **Revista Ciência Agronômica**, v.42, n.4, p.865-871, out-dez, 2011.

SILVA, V.S. **Regeneração in vitro de embriões de *Cocos nucifera* L.** 2002, 87 p. Dissertação de mestrado (Fisiologia e Bioquímica de Plantas), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, 2002.

ANEXOS

ANEXO 1A. Resumo da análise de variância da umidade de embriões zigóticos de coqueiro AVeBrJ, em função de duas soluções crioprotetoras (S), durante três faixas de tempo de imersão (T)¹.

Fonte de variação	GL	QM
Tempo (T)	2	0,8628 ns
Solução (S)	1	29,4844**
Solução x Tempo	2	2,0886 ns
Resíduo	17	0,9379
CV%	7,17	

** Significativo a 1% de probabilidade, * significativo a 5% de probabilidade; ns Não significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Dados transformados em $(X + 0,5)^{1/2}$.

ANEXO 2A. Resumo da análise de variância da sobrevivência de embriões zigóticos criopreservados de coqueiro AVeBrJ em função de duas soluções crioprotetoras (S), três tempos de imersão (T), aos 7 meses de cultivo *in vitro* em dois meios de regeneração (M) após criopreservação¹.

Fonte de variação	GL	QM
Solução (S)	1	0,70 ns
Tempo de imersão (T)	2	48,51*
Meio de cultivo (M)	1	32,89 ns
S x T	2	29,51 ns
S x M	1	56,83*
T x M	2	32,61 ns
S x T x M	2	145,74**
Resíduo	54	13,80
CV%	57,19	

** Significativo a 1% de probabilidade, * significativo a 5% de probabilidade; ns Não significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ¹ Dados transformados em $(X + 0,5)^{1/2}$.

ANEXO 3A. Resumo da análise de variância da umidade de embriões zigóticos de coqueiro GBrPF, em função de duas soluções crioprotetoras (S), durante três faixas de tempo de imersão (T)¹.

Fonte de variação	GL	QM
Solução	1	0,36 ns
Tempo	2	6,87*
Solução x Tempo	2	1,31 ns
Resíduo	12	1,12
CV%	23,46	

** Significativo a 1% de probabilidade, * significativo a 5% de probabilidade; ns Não significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ¹ Dados transformados em $(X + 0,5)^{1/2}$.

ANEXO 4A. Resumo da análise de variância da sobrevivência de embriões zigóticos criopreservados de coqueiro GBrPF em função de duas soluções crioprotetoras (S), três tempos de imersão (T), aos 7 meses de cultivo *in vitro* em dois meios de regeneração (M) após criopreservação¹.

Fonte de Variação	GL	QM
Solução (S)	1	291,45**
Tempo de imersão (T)	2	70,98*
Meio de cultivo (M)	1	0,39 ns
S x T	2	92,22**
T x M	1	4,58 ns
S x T x M	2	4,61 ns
S x T	2	9,64 ns
Resíduo	92	14,91
CV%	56,8	

** Significativo a 1% de probabilidade, * significativo a 5% de probabilidade; ns Não significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ¹ Dados transformados em $(X + 0,5)^{1/2}$.

ANEXO 5A. Resumo da análise de variância da porcentagem de contaminação fúngica (QMF) e bacteriana (QMB) de embriões zigóticos de acessos de coqueiro em função dos procedimentos de transporte e tempos de armazenamento aos 30 dias de cultivo *in vitro*.

Fonte de variação	GL	QMF	QMB
Acessos (A)	2	7,87 ns	104,98**
Procedimentos (P)	4	4,40 ns	32,86**
A x P	8	1,46 ns	20,11**
Resíduo	285	4,16	8,77
CV%		136,58	128,32

** Significativo a 1% de probabilidade, * significativo a 5% de probabilidade; ns Não significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ¹ Dados transformados em $(X + 0,5)^{1/2}$.

ANEXO 6A. Resumo da análise de variância da porcentagem de germinação de embriões zigóticos de acessos de coqueiro em função dos procedimentos de transporte e tempos de armazenamento aos 60 dias de cultivo *in vitro*.

Fonte de variação	GL	QM
Acessos (A)	2	10,46**
Procedimentos (P)	4	190,99**
A x P	8	42,41**
Resíduo	242	14,26
CV%	51,43	

** Significativo a 1% de probabilidade, * significativo a 5% de probabilidade; ns Não significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ¹ Dados transformados em $(X + 0,5)^{1/2}$.