

Biologia Geral e Experimental

Universidade Federal de Sergipe

São Cristóvão, SE 3 (2): 41- 46

26.iii.2003

EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE *COCOS NUCIFERA* L. (ARECACEAE)

Marlucia Cruz de Santana¹

Silvio Lopes Teixeira²

José Everaldo Gomes³

RESUMO

Temperatura afeta a germinação *in vitro* de embriões zigóticos do coqueiro *Cocos nucifera*. A temperatura de 39°C inibiu a germinação. Nos tratamentos submetidos às temperaturas de 24 °C, 29°C e 34°C as diferenças não foram significativas.

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

ABSTRACT

Temperature affects *in vitro* germination of zygotic embryos of the palm *Cocos nucifera*. The temperature of 39°C inhibited germination. In treatments under temperatures of 24°C, 29°C and 34°C the differences were not significant.

Key-words: *Cocos nucifera*, temperature, zygotic embryos, *in vitro* germination.

INTRODUÇÃO

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.), com mais de 11 milhões de hectares plantados em 86 países, é a mais importante palmeira cultivada nos trópicos, envolvendo cerca de 10 milhões de pequenos proprietários e famílias de meeiros. Mais de 80 milhões de pessoas dependem diretamente do coqueiro e dos subprodutos para o seu sustento (Frison et al., 2000).

Na indústria o coqueiro desempenha importante papel econômico como alimento e como matéria prima na fabricação de cosméticos, remédios,

plásticos, álcool e óleos, entre outros produtos; na economia rural ele garante a sobrevivência do agricultor (Ménon e Pandallai, 1958; Ohler, 1984). No Brasil, a cultura do coqueiro ocupa principalmente terras arenosas situadas ao longo da faixa litorânea que se estende do Pará ao Rio de Janeiro (Ferreira et al., 1998).

A produção de coco está diminuindo no mundo todo. O declínio na produtividade das culturas é causado pelo envelhecimento das palmeiras, calamidades naturais, erosão genética e carência de variedades que associem adaptação com alta produtividade (Hocher et al., 1999; Magat, 1996;

¹ Departamento de Biologia, Universidade Federal de Sergipe. Av. Marechal Rondon s/n; Jardim Rosa Elze, São Cristóvão, SE. 49100-000.

² Laboratório de Fitotecnia, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense.

³ Secretaria de Estado da Educação do Desporto e Lazer de Segipe.

Sáenz et al., 1999).

A estabilidade temporal da produção do coqueiro depende da disponibilidade e acesso à diversidade genética pelos melhoristas e produtores, para superar alguns dos principais problemas. O desenvolvimento sustentável de *C. nucifera* está sendo promovido através de várias atividades; dentre estas é relevante a coleta e conservação de germoplasma em várias partes do mundo. Entretanto, fatores como o grande volume da semente do coco e o alto custo do seu transporte dificultam esse trabalho. A cultura *in vitro* de embriões zigóticos representa uma solução rápida e econômica desses problemas pois além de permitir o transporte barato de embriões, que são pouco volumosos, podem originar mudas para transplante no campo (Cogent Newsletter, 2000). Nos casos em que o intercâmbio de germoplasma é necessário para incrementar programas de melhoramento, a cultura de embriões adquire especial importância. Ainda não existe um protocolo de alta eficiência para a cultura de embriões de coco, porque é necessário superar algumas dificuldades, como a baixa taxa de germinação dos embriões (Batugal & Engelmann, 1997).

Com o objetivo de colaborar para a resolução destes problemas sobre germinação, este trabalho verifica a influência da temperatura sobre a germinação *in vitro* dos embriões de *C. nucifera*.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos de cultivo *in vitro* foram conduzidos no Setor de Cultura de Tecidos do Laboratório de Fitotecnia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense.

Sementes maduras (*Cocos nucifera*) com cerca de 11 meses de idade, foram obtidas na Estação Experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio de Janeiro (PESAGRO) em Campos, RJ.

Extração e Desinfestação dos Embriões: Após

descascados e acondicionados em caixas de colheita, as sementes foram quebradas na região mediana e retirados cilindros de endosperma com embriões, utilizando-se um vazador com cerca de 1,5 cm de diâmetro. Os endospermas foram embalados em sacos plásticos.

No laboratório os cilindros foram lavados com água autoclavada e detergente neutro, enxaguados e imersos em álcool (95%) por um minuto. A desinfestação foi feita utilizando-se uma solução comercial de hipoclorito de sódio (2% de cloro ativo) por 30 minutos, após os quais foram enxaguados cinco vezes com água autoclavada. Os embriões foram extraídos dos cilindros em câmara de fluxo laminar, desinfestados com solução de hipoclorito de sódio (0,1% de cloro ativo) e enxaguados abundantemente com água.

Meio de Cultura: O meio básico utilizado para germinação dos embriões foi o Y3 de Eeuwens (1976), com vitaminas de Morel e Wetmore (1951), caseína hidrolisada (100 mg L⁻¹), sacarose (6%), mio-inositol (100 mg L⁻¹), carvão ativado (1 mg L⁻¹) e ágar (0,6%); o pH foi ajustado em 5,8 antes da autoclavagem. Os embriões excisados foram cultivados em tubos de ensaio (15 cm x 2,50 cm) contendo 20 ml de meio de cultura.

Neste experimento foi avaliado o efeito da temperatura sobre a germinação dos embriões com os tratamentos: T1: 24±1°C; T2: 29 ±1°C; T3:34±1°C e T4:39±1°C, em câmaras climatizadas FANEN, modelo 347.

Inicialmente a incubação foi realizada no escuro. Trinta dias após a inoculação as plântulas foram transferidas para um fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 30 μmol.m⁻².s⁻¹., fornecida por lâmpadas Gro-Lux. Sessenta dias após a inoculação, foram avaliadas as percentagens de embriões: germinados (presença de plúmula e radícula); com plúmula; com radícula; não germinados, e deformados. Noventa dias após a inoculação foram avaliados os comprimentos da

folha, da raiz primária e da plântula.

Foram utilizados delineamentos estatísticos inteiramente casualizados, com 4 tratamentos e 5 repetições; a unidade experimental foi composta por 10 tubos de ensaio com um embrião/tubo. A significância das Anovas foram verificadas pelo teste de Tukey. Os níveis de significância foram 1% e 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de variância foi significativa para as variáveis germinação do embrião, emissão de plúmula, número médio de embriões não germinados, embriões deformados e emissão de radícula (Tabela 1).

Não foram observadas diferenças significativas entre os percentuais de germinação (emissão de plúmula + radícula) nos tratamentos com temperaturas de 24°C, 29°C e 34°C. O efeito foi inibidor sob temperatura de 39°C e após 30 dias de cultivo nesse tratamento, a inibição da germinação foi praticamente total (Tabela 2). O maior dano da alta temperatura foi na região radicular; as diferenças entre o percentual de emissão da radícula entre os demais tratamentos neste período não foram significativas.

A irregularidade na emissão da radícula é observada com frequência na cultura *in vitro* de embriões de coqueiro. Em algumas plântulas a emissão da radícula é o primeiro sinal da germinação, neste caso a raiz tem maior desenvolvimento do que as partes aéreas ou as raízes primárias crescem em extensão sem ramificar, o que também não é funcional porque a área de absorção fica reduzida.

A qualidade das partes aéreas determina o sucesso do enraizamento (Gratapaglia & Machado, 1998). O pouco desenvolvimento da parte aérea é acompanhado por crescimento lento das raízes, assim é necessário que as plantas passem por uma fase de alongamento. As partes aéreas com rápido crescimento são fontes de intensa produção de auxina e outros fatores de enraizamento, os quais são translocados para a base, estimulando a rizogênese. Em plântulas de coqueiro cultivadas *in vitro* nem sempre isto ocorre, ocorrendo com frequência um desequilíbrio observado entre o crescimento da parte aérea e do sistema radicular.

Durante a germinação da semente do coco em natureza a plúmula rompe o exocarpo em cerca de dois meses. Essa estrutura protege as primeiras folhas do contato direto com o sol, da baixa umidade e das temperaturas altas. No presente estudo as diferenças entre os percentuais de emissão de plúmula nas temperaturas de 24°C e 39°C não foram

Tabela 1. ANOVA: Influência da temperatura na germinação *in vitro* de embriões zigóticos de *Cocos nucifera* 30 dias após a inoculação no meio de cultura.

Quadrados médios

FV	GL	Emissão da plúmula e radícula (%)	Emissão da plúmula (%)	Emissão da radícula (%)	Embriões não germinados (%)	Embriões deformados (%)
Tratamento	3	34,13**	13,52**	4,10*	35,10**	10,16**
Erro	16	1,17	1,61	1,22	1,36	1,78
Média		5,30	3,56	1,71	5,62	3,00
CV(%)		20,32	35,64	64,71	20,74	44,30

FV = fonte de variação, GL = graus de liberdade, CV = coeficiente de variação, + = dados transformados $\sqrt{x+1}$.

**significante ao nível de 1%, *significante ao nível de 5%

Tabela 2. Influência da temperatura na germinação *in vitro* de embriões zigóticos de *Cocos nucifera*, 30 dias após a inoculação no meio de cultura.

Temperatura (°C)	Emissão da plúmula e radícula+	Emissão da plúmula +	Emissão da radícula +	Embriões não germinados +	Embriões deformados+
24	6,05a*	2,64b	2,89a	3,61b	3,56a
29	7,00a	4,02ab	1,00a	4,69b	3,15ab
34	6,81a	5,65a	1,00a	4,67b	1,00b
39	1,46b	1,92b	1,93a	9,53a	4,33a
DMS	1,96	2,29	1,99	2,11	2,41

Tukey, médias iguais nas colunas são representadas pelas mesmas letras.

+, dados transformados $\sqrt{x+1}$

DMS, diferença mínima significativa

significantes. O maior percentual de embriões deformados (4,33%), foi encontrado na temperatura de 39°C, entretanto não foi estatisticamente diferente da temperatura de 24°C (3,56%). No cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de coqueiro é comum a ocorrência de embriões deformados. Estes embriões apresentam um crescimento exagerado do cotilédone, sem que haja emissão da plúmula e da radícula. O fenômeno foi relacionado com a temperatura e observamos que houve maior incidência nas temperaturas de 24°C e 39 ° C, seguidos pela temperatura de 29°C . Na temperatura de 34°C o número de embriões deformados foi o menor, o que pode indicar um ótimo de temperatura para a maturação de alguns embriões que possivelmente ainda estavam imaturos na época da colheita. Os resultados encontrados também apontam para os limites de temperatura adequados para germinação *in vitro*.

A análise de variância, foi significativa para as variáveis comprimento médio da parte aérea, comprimento médio da raiz e da planta e número médio de embriões não germinados (Tabela 3).

Sessenta dias após a inoculação, os valores médios encontrados para as variáveis comprimento da plântula e da parte aérea, tiveram resultados semelhantes em relação aos tratamentos (Tabela 4); as maiores médias foram encontradas nos Tratamentos 2 (29°C) e 3 (34°C), seguidos dos Tratamentos 1 (24°C) e 4 (39°C). No Tratamento 1 o percentual de germinação não diferiu entre os

Tratamentos 2 e 3, mas houve pouco crescimento da parte aérea, em relação aos outros dois tratamentos, mostrando que a temperatura de 24°C não é recomendável para o crescimento. O comprimento médio da raiz (0,05 cm) foi menor sob temperatura de 39°C, enquanto que na temperatura de 29°C foram obtidos maior valor médio (1,32cm). Durante a germinação em natureza a raiz primária atravessa o mesocarpo, rompe o exocarpo e alcança o solo, encontrando aí temperaturas mais amenas do que as suportadas pela plúmula. Provavelmente a radícula não tenha suportado a temperatura de 39°C, evidenciado por manchas escuras nestas regiões e nos embriões cultivados.

A temperatura recomendada para o cultivo de embriões de coco *in vitro* é de 27°C embora sejam citados na literatura que o crescimento ocorre na faixa de 27°C a 31°C (Verdeil *et al.* 1997; Batugal e Engelmann, 1997). Os resultados encontrados neste trabalho mostram que a germinação dos embriões de coco ocorre no intervalo de 24°C a 34°C. O baixo número de embriões deformados e o maior percentual de germinação, sugerem que sob a temperatura de 34°C o embrião completa o seu amadurecimento.

Não houve diferença do número médio de embriões germinados às temperaturas de 24°C, 29°C e 34°C. O mesmo não ocorreu na fase de crescimento, durante o qual os maiores valores para comprimento médio das plântulas foram obtidos para aquelas cultivadas sob temperatura de 29°C e 34°C.

Tabela 3. ANOVA: Influência da temperatura na germinação *in vitro* de embriões zigóticos de *Cocos nucifera*, 60 dias após a inoculação no meio de cultura.

FV	GL	Quadrados médios				Embriões não germinados ⁺ (%)
		Parte Aérea	Raiz	Planta		
Tratamento	3	23,65**	1,53**	36,59**		27,96**
Erro	16	0,51	0,15	0,93		1,43
Média		2,52	0,85	3,39		6,64
CV(%)		28,47	45,42	28,40		18,01

FV = fonte de variação, GL = graus de liberdade, + = dados transformados em $\sqrt{x+1}$
 **significante ao nível de 1%

Tabela 4. Influência da temperatura na germinação *in vitro* de embriões zigóticos *Cocos nucifera*, 60 dias após inoculação no meio de cultura.

Temperatura (°C)	Comprimento médio (cm)			Embriões não germinados (%)
	Parte Aérea	Raiz	Planta	
24	1,40b	0,95a	2,35b	7,44ab
29	4,66a	1,32a	6,07a	4,07c
34	3,99a	1,07a	5,05a	5,53bc
39	0,03c	0,05b	0,08c	9,53a
DMS	1,29	0,69	1,74	2,17

Tukey, médias iguais nas colunas são representadas pelas mesmas letras.
 +, dados transformados $\sqrt{x+1}$
 DMS, diferença mínima significativa

Agradecimentos: A Capes e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ) financiaram a pesquisa.

REFERÊNCIAS

- Batugal, P.A., F. Engelmann. 1997. **Coconut embryo *in vitro* culture. Proceedings of the first workshop on embryo culture.** Banao, Guinobatan, Albay, Philippines, IPGRI. 164p.
- Cogent Newsletter. 2000 **Improved *in vitro* techniques benefit other R&D activities on coconut.** IPGRI, 4:18.
- Eeuwens, C.J. 1976. Mineral requirement for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera*) and cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum.** 36:23-28.
- Ferreira, J.M.S., D.R.N. Warwick, L.A. Siqueira. 1998. **Cultura do coqueiro no Brasil.** 2. ed. Aracaju, EMBRAPA-SPI. 292 p.
- Frison, E. A., H.Omont, F.Rognon, P. Batugal. 2000 **Prococos: a global programme for coconut research.** 37th COCOTECH/International Coconut Conference of APCC. Chennai 24 à 28 July .
- Grattapaglia, D., M.A. Machado. 1998. Micropropagação, pp. 183-260. *In: Cultura de tecidos e transformação genética de plantas* (A. C.Torres, L.S.Caldas & J.A.Busos, Eds.) Brasília, Embrapa-SPI/Embrapa-CNPB.
- Hoher, V., J.L.Verdeil, A.Rival, S.Hamon. 1999. Application of *in vitro* techniques to the conservation and propagation of coconut palms, pp.267-278. *In: Current advances in coconut biotechnology. Current plant science and biotechnology in agriculture.* (C.J. Oropeza, L.Verdeil, G.R.Ashburner, R.Cardena & J.M.Santamaría, Eds). Dordrecht, Kluwer

Academic Publishers.

Magat, S.S. 1996. Search for a better understanding of the mineral nutrition and fertilizer needs of coconuts in the Philippines towards a reliable nutrition management and fertilizer recommendation: from 1964 to 1996 and beyond. **Coconut R & D Symposium, 30 years founding anniversary of the PCA-Davao Research Center, Bago-Oshiro, Davao City**, 6^h February, 38p.

Ménon, K.P.V., K.M. Pandalai. 1958. **The coconut palm: a monograph**. Indian Central Coconut Committee, Ernakulan, Índia, 383p.

Morel, G.M., R.H. Wetmore. 1951. Fern callus tissue culture. **Am. J. Botany**, 38:141-143.

Ohler, J.G. 1984. **Coconut, tree of life**. FAO, Rome, Italy. 437p.

Sáenz, L., J.L.Chan, R.Souza, R.Hornung, E.Rillo, J.L.Verdeil, C. Oropeza. 1999. Somatic embryogenesis and regeneration in coconut from plumular explants pp 309–320. *In: **Current advances in coconut biotechnology. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture***.(C. Oropeza, J.L.Verdeil, G.R.Ashburner, R.Cardena & J.M Santamaría, Eds).Dordrecht, Kluwer Academic Publishers.

Verdeil, J.L., J.L.Hocher, A.Rival, S.Hamon. 1997. Improving the efficiency on coconut zygotic embryo culture: a physiological and biochemical approach, pp112-117.*In: **Coconut embryo in vitro culture*** (P.A. Batugal & F. Engelmann. Eds). Proceedings of the first workshop on embryo culture, Banao, Philippines, IPGRI.