

CONTROLE DE OXIDAÇÃO NA CULTURA DE TECIDOS DO COQUEIRO¹

EDMAR RAMOS DE SIQUEIRA² e MARIO TAKAO INOUE³

RESUMO - A pesquisa teve como objetivo obter uma metodologia para contornar o problema de oxidação em culturas de tecidos do coqueiro (*Cocos nucifera* L.). Foram utilizados os ácidos cítrico e ascórbico (folha de planta jovem) e polivinilpirrolidone (PVP), para a folha de planta adulta e inflorescência. Os ácidos cítrico e ascórbico controlam 50% da incidência de oxidação. A cultura inicial, em meio líquido, é altamente eficiente no controle deste processo, propiciando altas taxas de obtenção de explantes saudáveis.

Termos para indexação: *Cocos nucifera*, antioxidante, ácido ascórbico, ácido cítrico, polivinilpirrolidone.

BROWNING CONTROL IN COCONUT PALMS TISSUE CULTURE

ABSTRACT - The purpose of this study was to develop technology in order to avoid browning in tissue culture of coconut (*Cocos nucifera* L.) tree. In the antioxidant treatments citric and ascorbic acids were used for explants of young plant leaves, and polyvinylpyrrolidone (PVP) for explants of adult leaves and inflorescence. Citric and ascorbic acids control 50% of browning incidence. The initial culture in liquid media was increasingly efficient in the control of this process, resulting in high rates of healthy explants obtention.

Index terms: *Cocos nucifera*, antioxidant, ascorbic acid, citric acid, polyvinylpyrrolidone.

INTRODUÇÃO

A propagação vegetativa do coqueiro por meio da cultura de tecidos poderá permitir significantes aumentos de produtividade pela propagação de indivíduos de alta produção. Da mesma forma, é óbvio o interesse de se propagarem indivíduos resistentes a certas doenças, ou com uma particular adaptação a condições adversas de ambiente (Pannetier & Buffard-Morel 1986).

A abordagem principal que vem sendo utilizada, na tentativa de propagação vegetativa do coqueiro, é a que envolve a produção de calos, numa tentativa de néo-formação de ge-

mas ou embriões somáticos de fragmentos de caules, folhas, raízes e inflorescências (Pannetier & Buffard-Morel 1984).

A oxidação é um problema grave na cultura de tecidos do coqueiro. Em tentativas de se propagar vegetativamente o coqueiro por meio da cultura de tecidos, nos laboratórios do Centro Nacional de Pesquisa de Floresta da EMBRAPA, em Colombo, Paraná, observou-se que nos primeiros sete dias do isolamento dos tecidos não se detecta nenhum sintoma de oxidação. Entre a primeira e a segunda semana, tem início um amarelecimento do material, agravado entre a segunda e a terceira semana; no final desta, todos os explantes estão oxidados. Ao final de 30 dias, todo o material está morto.

A gravidade do processo é tão grande, que sem uma boa técnica antioxidante fica impossível a cultura desses tecidos.

Não existe, na literatura, registro de uma metodologia para se evitar o processo de oxidação, com exceção do trabalho de Reynolds

¹ Aceito para publicação em 29 de novembro de 1990

² Eng. - Florestal, Dr., EMBRAPA/Centro Nacional de Pesquisa de Cocco (CNPc), Caixa Postal 44, CEP 49001 Aracaju, SE.

³ Eng. - Florestal, Dr., Prof. - Titular, Univ. Fed. do Paraná (UFPR), Bolsista do CNPq, Caixa Postal 2959, CEP 80000 Curitiba, PR.

& Murashige (1979), que abordam o uso dos ácidos cítrico e ascórbico, e do PVP. A observação de Pannetier & Buffard-Morel (1986), de que problemas de oxidação haviam sido relatados nas primeiras culturas *in vitro*, sem contudo dar detalhes de sua incidência, continua válida. É evidente que este problema deve ter sido contornado, pois fases mais avançadas de pesquisas nesta área são registradas. O grande interesse comercial envolvido e a preocupação de obtenção de patentes nos avanços tecnológicos, como registra Branton & Blake (1983), podem ser uma explicação para o fato.

Este trabalho foi realizado visando a obtenção de uma metodologia para contornar o problema de oxidação em culturas de tecidos provenientes de coqueiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Para o desenvolvimento da pesquisa, foram utilizadas plantas jovens e adultas da variedade Anão Verde. O material vegetal de planta adulta foi recebido do Centro Nacional de Pesquisa de Coco, localizado em Aracaju, SE. O material jovem foi obtido de mudas produzidas no Centro Nacional de Pesquisa de Floresta, em Colombo, PR, onde foi realizado o trabalho.

Origem dos explantes

Os explantes provenientes de plantas jovens e adultas foram preparados conforme a metodologia de Eeuwens (1976, 1978).

As inflorescências jovens foram lavadas, externamente, com hipoclorito de sódio (6% v/v). Após a remoção das espátas externa e interna, os ramos florais (de 8,0-50,0 mm de comprimento) foram cortados transversalmente em segmentos de, aproximadamente, 0,25 a 1,0 mm de espessura.

Meio básico

O meio básico utilizado foi constituído dos macroelementos de Murashige & Skoog (1962) e dos microelementos de Eeuwens (1976), acrescido dos componentes orgânicos e carvão ativado (0,25%), conforme Branton & Blake (1983). A esterilização foi feita em autoclave a 120°C, por dez minutos. O pH do meio foi ajustado em 5,8, antes da esterilização.

Antioxidantes

Os métodos de pré-tratamento com antioxidantes envolveram a realização de dois tipos de experimentos. O primeiro consistiu da utilização das soluções aquáticas dos ácidos ascórbico ($5,7 \times 10^{-4}$ M) e cítrico ($7,8 \times 10^{-4}$ M), para a folha de planta jovem. Os tratamentos foram, então, os seguintes: 1) ácido cítrico, sem mudança de local dos explantes no meio de cultura; 2) ácido ascórbico, sem mudança de local; 3) ácido ascórbico, com mudança de local dos explantes, no mesmo frasco, a intervalos de dois dias; 4) ácido cítrico, com mudança de local dos explantes no mesmo frasco, a intervalos de dois dias; 5) imersão em água, com mudança de local dos explantes no mesmo frasco, a intervalos de dois dias; 6) imersão em água.

Os tratamentos consistiram da imersão dos explantes nestas soluções, por 30 minutos, antes da inoculação em meio básico.

No segundo experimento, testou-se a eficiência do polivinilpirrolidone (PVP) e da inoculação inicial em meio líquido, para explantes da folha de planta adulta e inflorescência. Os explantes foram isolados e cultivados neste meio, durante uma semana; após este período, foram transferidos para meio sólido. Os dois tipos de meios tiveram a mesma composição química; a única diferença foi o emprego de ágar, a 5%, no meio sólido.

Os tratamentos foram os seguintes: 1) meio sólido sem PVP; 2) meio líquido sem PVP; 3) meio sólido com PVP; e 4) meio líquido com PVP.

A concentração de PVP foi de 1,0 g/l.

Os tratamentos tiveram um número inicial de 60 repetições e foram inoculados no escuro, a uma temperatura de 30°C \pm 1.

A variável foi a presença de oxidação; o desvio-padrão foi calculado pela fórmula da distribuição binomial, e o teste estatístico utilizado no primeiro experimento foi o teste exato de Fisher e, no segundo, o qui-quadrado.

RESULTADOS

Folha de planta jovem

Pela análise da Tabela 1, pode-se observar um efeito benéfico dos ácidos cítrico e ascórbico, no controle das oxidações de explantes provenientes da folha de planta jovem. Apesar disto, persiste uma incidência relativamente alta de oxidações.

A remoção (com mudança de local) a intervalos de dois dias não diminuiu a taxa de oxidação. Ao contrário, agravou-a, chegando a anular o efeito benéfico dos antioxidantes.

Folha de planta adulta

A inoculação direta em meio sólido causa uma oxidação significativa em explantes provenientes da folha de planta adulta, que não é amenizada pela presença de PVP (Tabela 2). O meio líquido, independentemente da presença do PVP, diminui significativamente a incidência de oxidação. Pelo seu comportamento, tanto no meio sólido como no líquido, fica evidenciado que o PVP, na concentração usa-

da, não tem nenhum efeito no controle das oxidações.

Inflorescência

O comportamento dos explantes de inflorescência, submetidos aos tratamentos antioxidantes, é idêntico ao da folha de planta adulta (Tabela 3). Neste caso, também verificaram-se altas taxas de explantes sadios.

DISCUSSÃO

No experimento realizado com explantes da folha de planta jovem, contornou-se, de ma-

TABELA 1. Efeito de antioxidantes em explantes da folha de planta jovem, após três semanas de cultivo.

Tratamentos	Total de explantes	% de oxidados	Explantes sadios		
			Total	%	s
1. Ácido cítrico	45	46,7	24	53,3 a	7,4
2. Ácido ascórbico	50	54,0	23	46,0 a	7,0
3. Ácido ascórbico, com remoção	30	90,0	03	10,0 b	5,5
4. Ácido cítrico, com remoção	25	100,0	00	00,0	-
5. Imersão em água, com remoção	15	100,0	00	00,0	-
6. Imersão em água	40	100,0	00	00,0	-

Valores seguidos pela mesma letra não diferem pelo teste exato de Fisher ($P > 0,05$).
s - Desvio-padrão.

TABELA 2. Efeito de antioxidantes em explantes da folha de planta adulta, após três semanas de cultivo.

Tratamentos	Total de explantes	% de oxidados	Explantes sadios		
			Total	%	s
1. Meio sólido sem PVP	59	42,0	34	58,0 b	6,4
2. Meio líquido sem PVP	52	3,8	50	96,2 a	2,6
3. Meio sólido com PVP	55	54,5	25	45,5 b	6,7
4. Meio líquido com PVP	50	8,0	46	92,0 a	3,8

Valores seguidos pela mesma letra não diferem pelo teste qui-quadrado ($P > 0,05$).
s - Desvio-padrão.

TABELA 3. Efeito de antioxidantes em explantes de inflorescência, após três semanas de cultivo.

Tratamentos	Total de explantes	% de oxidados	Explantes sadios		
			Total	%	s
1. Meio sólido sem PVP	35	45,7	19	54,3 b	8,4
2. Meio líquido sem PVP	43	9,3	39	90,7 a	4,4
3. Meio sólido com PVP	45	40,0	27	60,0 b	7,3
4. Meio líquido com PVP	41	7,3	38	92,7 a	4,1

Valores seguidos pela mesma letra não diferem pelo teste qui-quadrado ($P > 0,05$).

s - Desvio-padrão.

neira significativa, em relação à testemunha, o processo de oxidação. Entretanto, ainda persiste uma taxa elevada de explantes oxidados (em torno de 50%).

A técnica antioxidante mais adequada, que se infere daquele experimento, é a seguinte: explantes prontos para a inoculação são imersos em soluções de ácido cítrico ($7,8 \times 10^{-4}$ M) ou de ácido ascórbico ($5,7 \times 10^{-4}$ M) por, no mínimo, 30 minutos, antes da colocação definitiva no meio de cultura.

É importante salientar que estes ácidos não são termoestáveis; portanto, não podem ser submetidos ao processo de autoclavagem. Suas soluções devem, então, ser esterilizadas por outros processos que não envolvam a utilização de calor; por exemplo, filtração por meio de microporos.

Para se tentar baixar ainda mais a taxa de incidência da oxidação, realizou-se o segundo tipo de experimento, com folha de planta adulta e inflorescência, para identificar uma técnica antioxidante. Testou-se a eficiência de um terceiro antioxidante, o PVP. Considerando que o processo de oxidação se deve principalmente à intoxicação dos tecidos por fenóis liberados por tecidos recém-feridos, testou-se um segundo fator, que foi o meio líquido. A hipótese era que esses fenóis se difundiriam no meio líquido, ao contrário de sua localização fixa, próxima aos explantes, no meio sólido.

As altas taxas de obtenção de explantes sadios mostraram que a permanência em meio lí-

quido, por uma semana, antes da inoculação em meio sólido, é altamente eficiente no controle deste processo.

CONCLUSÕES

1. As fontes de explantes pesquisadas (folha de planta jovem e adulta e inflorescência) são altamente suscetíveis ao processo de oxidação. A cultura destes tecidos só é possível com o emprego de uma técnica antioxidante.

2. Os ácidos cítrico e ascórbico são eficientes no controle do processo de oxidação. Apesar disso, quando utilizados, ainda persiste uma incidência relativamente alta, em torno de 50%.

3. A remoção dos explantes, com mudança de local, não diminui a taxa de oxidação; ao contrário, agrava o processo.

4. O PVP, na concentração analisada, não foi eficiente no controle da oxidação.

5. A inoculação inicial em meio líquido, por uma semana, é altamente eficiente no controle da oxidação, proporcionando elevadas taxas de explantes sadios.

6. O comportamento de explantes da folha de planta adulta, em relação aos tratamentos antioxidantes, é idêntico ao da inflorescência.

REFERÊNCIAS

- BRANTON, R.L.; BLAKE, J. Development of organized structures in callus derived from explants of *Cocos nucifera* L. *Annals of Botany*, London, v.52, n.5, p.673-678, 1983.

- EEUWENS, C.J. Effects of organic nutrients and hormones on growth and development of tissue explants from coconut (*Cocos nucifera*) palms cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.42, n.1, p.73-78, 1978.
- EEUWENS, C.J. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera*) and cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.36, n.1, p.23-28, 1976.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, n.1, p.47-57, 1962.
- PANNETIER, C.; BUFFARD-MOREL, J. Coconut palm (*Cocos nucifera* L.). In: BAJAJ, Y.P.S. **Biotechnology in agriculture and forestry**. Berlin: Springer Verlag, 1986. p.430-458.
- PANNETIER, C.; BUFFARD-MOREL, J. First results for somatic embryo production from leaf tissue of coconut (*Cocos nucifera*). **Oléagineux**, Paris, v.37, n.7, p.349-354, 1984.
- REYNOLDS, J.F.; MURASHIGE, T. Asexual embryogenesis in callus of palms. *In vitro*, v.5, p.383-387, 1979.