

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA**

**CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE MANGABEIRA NATIVA  
DA REGIÃO NORDESTE DO BRASIL**

**MICAELE DA COSTA SANTOS**

**SÃO CRISTOVÃO  
2010**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

C837c Santos, Micaele da Costa  
Conservação *in vitro* de mangabeira nativa da Região Nordeste do Brasil / Micaele da Costa Santos. – São Cristóvão, 2010.  
55 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Recursos Naturais) – Núcleo de Pós- Graduação em Biotecnologia, Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Universidade Federal de Sergipe, 2009.

Orientador: Pesq. Dr<sup>a</sup>. Ana da Silva Lédo.

1. Mangabeira. 2. *Hancornia speciosa* Gomes. 3. Conservação *in vitro*. I. Título.

CDU 582.937

**MICAELE DA COSTA SANTOS**

**CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE MANGABEIRA NATIVA DA REGIÃO  
NORDESTE DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Sergipe como requisito à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia na área de concentração Biotecnologia em Recursos Naturais.

Orientadora  
Pesq. Dr<sup>a</sup>. Ana da Silva Léo

SÃO CRISTOVÃO  
SERGIPE - BRASIL  
2010

**MICAELE DA COSTA SANTOS**

**CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE MANGABEIRA NATIVA DA REGIÃO  
NORDESTE DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia na área de concentração Biotecnologia em Recursos Naturais.

APROVADA em 31 de março de 2010

Pesq. Dra. Ana Veruska Cruz da Silva – Embrapa Tabuleiros Costeiros/UFS

Pesq. Dra. Fernanda Vidigal Duarte Souza – Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical

Pesq. Dra. Ana da Silva Lédo  
Embrapa Tabuleiros Costeiros  
(Orientadora)

SÃO CRISTOVÃO  
SERGIPE - BRASIL

Você não sabe o quanto eu caminhei  
Pra chegar ate aqui  
Percorri milhas e milhas antes de dormir  
Eu não cochilei  
Os mais belos montes escalei  
Nas noites escuras de frio chorei  
A Vida ensina e o tempo traz o tom  
Pra nascer uma canção  
Com a fé do dia-a-dia  
Encontro a solução

(A estrada – Toni Garrido)

A Deus, o criador, por me dar forças a cada momento em que achei não ser capaz de concluir mais essa etapa.

Aos meus pais, José Antônio e Maria, por serem meu alicerce e incentivadores da minha caminhada.

À Sarah Brandão (*in memoriam*), por sempre acreditar em mim com entusiasmo e por toda sua amizade e ensinamentos.

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela dádiva da vida, pelas oportunidades e pela coragem e forças para persistir e lutar por seus objetivos.

Aos meus pais, os quais tenho como referência e exemplo em tudo e que me dedicam carinho, compreensão e amor incondicional. Amo vocês!

Aos meus irmãos por compreenderem minha ausência em certos momentos, por sempre estarem dispostos a ajudar e contribuir em tudo e por fazerem minha vida mais feliz. Amo vocês!

À Dra. Sarah Brandão (*in memoriam*), que muito mais que uma orientadora foi uma amiga, torceu e vibrou a cada conquista e sempre acreditou que eu era capaz mesmo nos momentos em que eu mesma descreditava. Você sempre estará em minha lembrança.

À Dra. Ana Lédo, pela orientação, ensinamentos, paciência, compreensão e confiança. Sabemos que ao longo desse período e diante das circunstâncias que a vida nos impôs, ambas conseguimos concretizar os objetivos que também eram de Sarah. Obrigada por tudo.

Ao Dr. Antônio Souza, por se mostrar uma pessoa sempre acessível, pelos ensinamentos transmitidos e por sua disposição em contribuir em tudo que foi necessário. O convívio com você foi valioso.

Ao Dr. Carlos Lédo, pela receptividade, ensinamentos e sua disposição em responder minhas dúvidas.

Aos amigos do mestrado. Em especial a Nadjma, Flávio e Gustavo, que além das madrugadas de estudos compartilhamos muitas risadas e momentos que para sempre serão inesquecíveis. Vocês seguirão em meu coração.

À Kicia Karinne que se transformou em uma amiga irmã, companheira de todos os momentos, confiante que por tantas vezes viu meu pranto e sempre teve uma palavra de consolo. Adoro você.

À Aline Sá, amiga maravilhosa a quem admiro e respeito muito. Obrigada pelo apoio e carinho.

À Inácio Roque, técnico do laboratório que se tornou amigo e também um orientador durante minha passagem pela Embrapa.

À Dona Conceição, pela sua alegria contagiante, carinho, abraços e constante sorriso no rosto capaz de amenizar todos os problemas.

Aos estagiários do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, Caroline, Lucas, Zilná, Rodrigo e Karla que sem vocês meus dias não teriam sido os mesmos.

À Bruno Trindade, pelo auxílio, ensinamentos e palavras de incentivo.

À Embrapa Tabuleiros Costeiros e ao Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas por possibilitarem o desenvolvimento dessa pesquisa.

À Dra. Ana Veruska e a Dra. Fernanda Vidigal, membros da banca examinadora que tanto contribuíram para o aprimoramento deste trabalho.

À Universidade Federal de Sergipe e aos professores membros do Núcleo de Pós-Graduação em Biotecnologia pela oportunidade de acesso a novos conhecimentos.

A Embrapa, FAPITEC-SE ao CNPq, pela liberação de recursos financeiros e concessão de bolsa de estudo.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão desse trabalho.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1 INTRODUÇÃO	01
2 REVISÃO DE LITERATURA	02
2.1 Ocorrência, origem botânica e importância econômica da mangabeira	02
2.2 Biotecnologia e recursos genéticos	04
2.3 Recursos genéticos da mangabeira na região Nordeste	06
2.4 Conservação <i>in vitro</i>	06
2.4.1 Conservação <i>in vitro</i> por crescimento lento	07
2.5 Prolina livre	09
3 MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1 Conservação <i>in vitro</i> de explantes de mangabeira	11
3.1.1 Efeito da sacarose e do sorbitol na conservação <i>in vitro</i> de segmentos nodais de mangabeira	11
3.1.2 Efeito do ácido abscísico, tipo de recipiente e vedação na conservação <i>in vitro</i> de segmentos nodais de mangabeira	11
3.1.3 Efeito do manitol, do acesso e tempo de cultivo na conservação <i>in vitro</i> de plântulas de mangabeira	12
3.1.4 Quantificação de prolina em microestacas submetidas à conservação <i>in vitro</i> por crescimento lento	13
3.2 Retomada do crescimento de mangabeira após a conservação <i>in vitro</i>	13
3.2.1 Retomada do crescimento de explantes provenientes de meio de conservação com sorbitol e sacarose	13
3.2.2 Retomada do crescimento de explantes provenientes de meio de conservação com ABA em diferentes recipientes e tipos de vedação	14
3.3 Análises estatísticas	14
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
4.1 Conservação <i>in vitro</i> de explantes de mangabeira	15
4.1.1 Efeito da sacarose e do sorbitol na conservação <i>in vitro</i> de segmentos nodais de mangabeira	15
4.1.2 Efeito do ácido abscísico, tipo de recipiente e vedação na conservação <i>in vitro</i> de segmentos nodais de mangabeira	20
4.1.3 Efeito do manitol, do acesso e tempo de cultivo na conservação <i>in vitro</i> de plântulas de mangabeira	25
4.1.4 Quantificação de prolina em microestacas submetidas à conservação <i>in vitro</i> por crescimento lento	28
4.2 Retomada do crescimento de mangabeira após a conservação <i>in vitro</i>	29
4.2.1 Retomada do crescimento de explantes provenientes de meio de conservação com sorbitol e sacarose	29
4.2.2 Retomada do crescimento de explantes provenientes de meio de conservação com ABA	31
5 CONCLUSÕES	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
ANEXOS	41

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Aspectos da planta e frutos da mangabeira ( <i>Hancornia speciosa</i> Gomes) variedade botânica do Nordeste	03
Figura 2	Acessos de mangabeira de populações nativas do Campo Experimental de Itaporanga, SE da Embrapa Tabuleiros Costeiros. A- MGB-1; B- MGB-2	12
Figura 3	Médias do número de brotações por segmento nodal (NBS), número de nós por brotação adventícia (NNB) e porcentagem de abscisão foliar (PAF) dos tratamentos do fatorial sacarose x sorbitol com a testemunha adicional MS Padrão	16
Figura 4	Número de brotações por segmento nodal (NBS) em função do tempo de cultivo <i>in vitro</i> e da concentração de sacarose	17
Figura 5	Número de brotações por segmento nodal (NBS) em função do tempo de cultivo <i>in vitro</i> e da concentração de sorbitol	17
Figura 6	Número de nós por brotação adventícia (NNB) em função do tempo de cultivo <i>in vitro</i> e da concentração de sorbitol	18
Figura 7	Efeito deletério do sorbitol em segmentos nodais de mangabeira mantidas sob crescimento lento. A- 0 sacarose + 40 g.L <sup>-1</sup> sorbitol; B- 15 g.L <sup>-1</sup> sacarose + 40 g.L <sup>-1</sup> sorbitol	19
Figura 8	Porcentagem de abscisão foliar (PAF) em função do tempo de cultivo <i>in vitro</i> e da concentração de sacarose	19
Figura 9	Porcentagem de abscisão foliar (PAF) em função do tempo de cultivo <i>in vitro</i> e da concentração de sorbitol	20
Figura 10	Número de brotações por segmento nodal (NBS) em função do tempo de cultivo <i>in vitro</i> e do tipo de recipiente	21
Figura 11	Número de brotações por segmento nodal (NBS) em função do tempo de cultivo <i>in vitro</i> e do tipo de vedação	21
Figura 12	Número de nós por brotação adventícia (NNB) em função do tempo de cultivo <i>in vitro</i> e do tipo de vedação	22
Figura 13	Efeito do tipo de vedação no número de nós por brotação adventícia em segmentos nodais de mangabeira na presença de 0,5 mg.L <sup>-1</sup> de ABA	22
Figura 14	Número de nós por brotação adventícia (NNB) em função do tempo de cultivo <i>in vitro</i> , do tipo de recipiente e concentração de ABA	23
Figura 15	Porcentagem de abscisão foliar (PAF) em função do tempo de cultivo <i>in vitro</i> , do tipo de recipiente e tipo de vedação	24
Figura 16	Porcentagem de abscisão foliar (PAF) em função do tempo de cultivo <i>in vitro</i> , do tipo de recipiente e da concentração de ABA	25
Figura 17	Altura de plântulas de mangabeira em função da concentração de manitol (mg.L <sup>-1</sup> ) e do tempo de cultivo <i>in vitro</i>	26
Figura 18	Número de folhas de plântulas de mangabeira em função do tempo de cultivo <i>in vitro</i> na presença de manitol	26
Figura 19	Porcentagem de abscisão foliar (PAF) de plântulas de mangabeira em função de da concentração de manitol (g.L <sup>-1</sup> ) e do tempo de cultivo <i>in vitro</i>	27
Figura 20	Número de raízes (NR) em plântulas de mangabeira em função da concentração de manitol (g.L <sup>-1</sup> ) e do tempo de cultivo <i>in vitro</i>	28
Figura 21	Teores médios de prolina em amostras foliares e de entre-nós de microestacas de mangabeira mantidas sob crescimento lento na presença de 10 e 20 g.L <sup>-1</sup> de sorbitol	29
Figura 22	Viabilidade de explantes de mangabeira aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i> em meio de crescimento A- após conservação na ausência de sacarose e na presença de 10 g.L <sup>-1</sup> sorbitol; B- após conservação na ausência de sacarose e presença de 40 g.L <sup>-1</sup> sorbitol.	30

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1	Médias do número de brotações por segmento nodal (NBS), número de nós por brotação adventícia (NNB) e porcentagem de abscisão foliar (PAF) de explantes de mangabeira em função da concentração de sorbitol e de sacarose	15
Tabela 2	Viabilidade de brotações de mangabeira em meio de crescimento após a conservação <i>in vitro</i> em diferentes concentrações de sacarose	29
Tabela 3	Viabilidade de brotações de mangabeira em meio de crescimento após a conservação <i>in vitro</i> em diferentes concentrações de sorbitol	30
Tabela 4	Viabilidade de brotações de mangabeira em meio de crescimento após a conservação <i>in vitro</i> em função do tempo de cultivo <i>in vitro</i>	31
Tabela 5	Desdobramento do tempo de cultivo <i>in vitro</i> dentro de tipo de recipiente-vedação para a viabilidade de brotações de mangabeira após a conservação <i>in vitro</i> na presença de ABA	31

**RESUMO**

SANTOS, MICAEL DA COSTA. **Conservação *in vitro* de mangabeira nativa da Região Nordeste do Brasil**. Sergipe: UFS, 2010. 55p. (Dissertação – Mestrado em Biotecnologia)

A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) é uma frutífera tropical encontrada em diferentes regiões do país, sendo mais abundante em áreas de tabuleiros costeiros e baixadas litorâneas da Região Nordeste, onde é explorada de forma extrativista e vem sofrendo acelerado processo de erosão genética. O desenvolvimento de métodos de conservação dos recursos genéticos ainda disponíveis torna-se imprescindível. Este trabalho teve como objetivo o aprimoramento técnico-científico da conservação *in vitro* por crescimento lento de mangabeira. Os trabalhos foram desenvolvidos no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Tabuleiros Costeiros. Para avaliar o efeito da sacarose e sorbitol segmentos nodais foram inoculados em tubos de ensaio com 25 mL de meio de cultura MS suplementado com 1 mg.L<sup>-1</sup> de ácido indol acético (AIA) e 1 mg.L<sup>-1</sup> de benzilaminopurina (BAP) e diferentes concentrações de sorbitol (10; 20 e 40 g.L<sup>-1</sup>), combinadas com 0 e 15 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. Para avaliar o efeito do ácido abscísico (ABA), do tipo de recipiente e vedação os segmentos nodais foram inoculados em frascos tipo “maionese” e em tubos de ensaio com 25 mL de meio MS, suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, contendo 0 ou 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de ABA combinadas com tampa plástica e tampa de papel alumínio. Para o estudo do efeito do manitol e tempo de cultivo dois acessos de mangabeira foram inoculados em meio MS combinados com 0; 5; 10; 15 e 20 g.L<sup>-1</sup> de manitol. Foi realizada a quantificação da prolina em microestacas provenientes de meio de conservação contendo 10 e 20 g.L<sup>-1</sup> de sorbitol. Na etapa de recuperação do crescimento explantes conservados *in vitro* por 120 dias, nos experimentos anteriores foram inoculados em meio de cultura MS sendo a viabilidade das culturas avaliadas aos 30 e 60 dias. É viável a manutenção de segmentos nodais na ausência de sacarose e na presença de 10 ou 20 g.L<sup>-1</sup> de sorbitol assim como de segmentos nodais na presença de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de ABA em tubos de ensaio vedados com tampa de papel alumínio por 120 dias. É viável a conservação de plântulas germinadas *in vitro* em meio com 15 e 20 g.L<sup>-1</sup> de manitol por 180 dias. Observa-se maior acúmulo de prolina em entre-nós do que em folhas de mangabeira. Explantes mantidos na presença de 10 g.L<sup>-1</sup> de sorbitol e na ausência de sacarose e na presença de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de ABA na fase de conservação apresentam maior viabilidade na recuperação do crescimento.

Palavras-chave: *Hancornia speciosa* Gomes, crescimento lento e reguladores osmóticos.

Comitê de Orientação: Ana da Silva Léo – Embrapa Tabuleiros Costeiros

**ABSTRACT**

SANTOS, MICAEL DA COSTA. *In vitro* conservation of native mangaba tree native of northeast of Brazil. Sergipe: UFS, 2010. 55p. (Dissertation – Master of Science in Biotechnology)

Mangaba tree (*Hancornia speciosa* Gomes) is a tropical fruit found in different regions of the country, being more abundant in areas of coastal tablelands and lowlands of Northeast region, where it is explored in an extractive way and it is suffering an accelerated process of erosion genetics. The development of methods for conservation of genetic resources still available it is essential. This work aimed at improving technical and scientific *in vitro* conservation by slow growth of mangaba tree. The work was done at the Laboratory of Plant Tissue Culture of Embrapa Coastal Tablelands. To evaluate the effect of sucrose and sorbitol nodal segments were inoculated in test tubes with 25 mL of MS medium supplemented with 1 mg.L<sup>-1</sup> of indol acetic acid (IAA) and 1 mg.L<sup>-1</sup> of benzylaminopurine (BAP) and different sorbitol concentrations (10; 20 and 40 g.L<sup>-1</sup>) combined with 0 and 15 g.L<sup>-1</sup> of sucrose. To evaluate the effect of abscisic acid (ABA) and the recipient and sealing types, nodal segments were inoculated in "mayonnaise" flasks and in test tubes with 25 mL of MS medium supplemented with 30 g.L<sup>-1</sup> of sucrose, containing 0 or 0.5 mg.L<sup>-1</sup> of ABA combined with plastic lid and aluminum foil. To study the effect of the mannitol and cultivation time two mangaba accessions were inoculated on MS medium supplemented with 0; 5; 10; 15 and 20 g.L<sup>-1</sup> of mannitol. The proline quantification was done in mangaba microcuttings from conservation medium containing 10 and 20 g.L<sup>-1</sup> of sorbitol. In the recovery stage of the growth explants conserved *in vitro* for 120 days, in the previous experiments were inoculated on MS medium and the viability of crops evaluated at 30 and 60 days. It is feasible to maintain nodal segments in the absence of sucrose in the presence of 10 or 20 g.L<sup>-1</sup> of sorbitol and nodal segments in the presence of 0.5 mg.L<sup>-1</sup> of ABA in test tubes sealed with aluminum foil lid for 120 days. It is possible the conservation of seedlings germinated *in vitro* in MS culture medium with 15 and 20 g.L<sup>-1</sup> of mannitol for 180 days. Larger proline accumulation is observed in stem than in leaves of mangaba tree. Explants maintained in the presence of 10 g.L<sup>-1</sup> of sorbitol and sucrose absence and in the presence of 0.5 mg.L<sup>-1</sup> of ABA at conservation present higher viability in the growth recovery.

Key words: *Hancornia speciosa* Gomes, slow-growth and osmotic regulators.

Advisor: Ana da Silva Lédo – Embrapa Tabuleiros Costeiros

## 1 INTRODUÇÃO

A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) é uma fruteira tropical encontrada vegetando espontaneamente desde o cerrado da região Centro-Oeste até as regiões Norte e Sudeste, sendo mais abundante nas áreas de tabuleiros costeiros e baixadas litorâneas da Região Nordeste, onde é colhida quase toda mangaba produzida no Brasil. É uma das frutas mais apreciadas no Nordeste apresentando boa digestibilidade e valor nutritivo, e tem larga utilização como polpa congelada para produção de sucos, sorvetes, doces, geleias, além da fabricação de vinhos licores e vinagres.

No Nordeste a mangabeira é explorada de forma extrativista e vem sofrendo acelerado processo de erosão genética em razão da grande expansão imobiliária na baixada litorânea. A perda de plantas elites, agravando esse panorama, demanda o desenvolvimento de métodos de conservação, para que se elimine o risco de extinção dos bancos naturais de germoplasma da fruteira.

A mangabeira foi selecionada entre as dez espécies de altíssima prioridade pelo programa Plantas do Futuro do CNPq/Banco Mundial/Global Environment Facility /Ministério do Meio Ambiente (MMA)/Probio coordenado pelo MMA, com maior potencial de uso imediato entre as fruteiras nativas da região Nordeste. Dentre as estratégias de conservação de germoplasma, a biotecnologia desponta como ferramenta de impacto na área de recursos genéticos.

Entre as técnicas biotecnológicas a cultura de tecidos apresenta-se como uma das de maior êxito, pois inclui métodos de propagação e conservação de germoplasma. A manutenção de coleções *in vitro* vem sendo considerada como um método alternativo e complementar à conservação de germoplasma, principalmente para as espécies propagadas vegetativamente e para as espécies que são recalcitrantes e não pode ter suas sementes conservadas a baixas temperaturas e umidade, como a mangabeira. O método de conservação por crescimento lento baseia-se na redução do metabolismo da planta, sem afetar sua viabilidade. Essa redução metabólica pode ocorrer através de diminuição na intensidade de luz ou temperatura, acréscimo de retardadores de crescimento ao meio de cultura; ou redução da concentração dos componentes do meio de cultura.

Existem poucos trabalhos sobre conservação *in vitro* de fruteiras nativas do Brasil. Para a variedade botânica de mangabeira da região Nordeste apenas um trabalho recentemente foi conduzido pela Embrapa Tabuleiros Costeiros. Dentre os problemas para a conservação *in vitro* de mangabeira, pode-se destacar a alta abscisão foliar das culturas devido ao acúmulo de etileno nos frascos. O aprimoramento de protocolos para melhorar o vigor das culturas e aumentar o tempo de manutenção das mesmas sob crescimento lento são necessários.

Este trabalho teve como objetivo geral o aprimoramento do conhecimento técnico-científico para a conservação *in vitro* de genótipos de mangabeira das áreas litorâneas do Estado de Sergipe. Para tanto foram conduzidos estudos sobre o efeito de retardantes osmóticos e hormonais na desaceleração do crescimento *in vitro*, tipos de vedação e de recipientes na fase de crescimento lento e o desempenho das culturas na etapa de retomada do crescimento.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Ocorrência, origem botânica e importância econômica da mangabeira

A mangabeira é uma planta frutífera de clima tropical, nativa do Brasil e encontrada em várias regiões do País, desde os tabuleiros costeiros e baixada litorânea do Nordeste até os cerrados das regiões Centro-Oeste, Norte e Sudeste (MONACHINO, 1945; VIEIRA NETO, 2002). A temperatura média ideal para a espécie está entre 24 e 26°C, embora se encontre em zonas com temperaturas mínimas e máximas de 15 e 43°C, respectivamente. Apresenta maior desenvolvimento vegetativo nas épocas de temperatura mais elevadas, e é encontrada em várias altitudes, desde o nível do mar até em áreas com 1.500 m. A pluviosidade ideal pode estar entre 750 e 1.600 mm anuais, sendo tolerante a períodos de déficit hídrico. Os solos nos quais se desenvolve são pobres e de textura arenosa, predominantes da região de cerrados, tabuleiros costeiros e baixada litorânea, desde os neossolos quartzarênicos (areias quartzosas) até os argissolos e latossolos (WISNIEWSKI & MELO, 1982; LEDERMAN et al., 2000).

A mangabeira está entre as primeiras espécies frutíferas cuja ocorrência foi relatada pelos exploradores da costa do Brasil no século XVI (SILVA JUNIOR & LEDO, 2006). Segundo Ferreira (1973) a palavra “mangaba” é de origem indígena (mã'gawa) e, significa “coisa boa de comer”. Além da denominação “mangaba”, existem outras variantes usadas para nomear o fruto e a árvore no Brasil: mangabeira, mangaíba, mangabiba, mangaúva, mangareíba, mangava, manguba, mangabeira-agreste, mangabeira-brava, mangaba-das-caatingas, mangabinha-das-caatingas, mangabeira-do-norte, mangabeira-mansa, mangabeira-ovo, mangabeira-rana, mangabeira-branca, mangabeira-vermelha, mangabeira-de-goiás, mangabeira-de-minas, tembiú, tembiucatinga e catu (MONACHINO, 1945; BLOSSFELD, 1967; PIO CORRÊA, 1969; BAHIA, 1979).

Na classificação de Cronquist (1988), está agrupada botanicamente nos seguintes táxons: Reino Plantae, Divisão Magnoliophyta, Classe Magnoliopsida, Subclasse Asteridae, Ordem Gentianales, Família *Apocynaceae* e Gênero *Hancornia*. A família *Apocynaceae* no Brasil comporta em torno de 95 gêneros e 850 espécies (SOUZA & LORENZI, 2008). O gênero *Hancornia* é considerado monotípico e por isso, sua única espécie, identificada pelo botânico português Bernardino Antônio Gomes, é *Hancornia speciosa*.

Conforme descrição botânica de Monachino (1945) a mangabeira é uma árvore de porte médio com 4 a 7 m de altura, podendo chegar até 15 m, de crescimento lento, copa ampla, às vezes mais espalhada que alta (Figura 1A). O tronco é geralmente único, tortuoso ou reto, com 0,2 a 0,3 m de diâmetro. Os ramos são inclinados, numerosos, separados e bem formados, de córtice levemente suberoso. Os ramos jovens são de coloração violácea, lisos até um ano de idade, meio angulosos, curtos, com poucas folhas, floríferos no ápice. Caule rugoso e áspero com 2 a 3 bifurcações na altura média de 40 a 50 cm da base. Toda a planta exsuda látex de cor branca ou róseo-pálida.

As folhas, geralmente decíduas, são opostas, simples, uniformemente espaçadas, coriáceas, elípticas, oblongo ou elíptico-lanceoladas nas duas extremidades, às vezes obtuso-subacuminadas no ápice, possuindo de 3,5 a 10 cm de comprimento e 1,5 a 5 cm de largura, glabras ou pubescentes, oliváceo-negrescentes na face ventral, mais descoradas na dorsal; pecíolo de 3 a 15 mm, axilar, fino, glabro ou pubescente, biglanduloso. A inflorescência em dicásio terminal em ramos novos do ano, com 2 a 4 ou até 5 flores hermafroditas em forma de campânula, ocasionalmente flores isoladas; corola hipocatenforme, de pré-floração contorcida, branca e posteriormente rósea ou amarela, tubulosa, perfumada; tubo polínico de 3 a 4 cm de comprimento, lobos de 1,0 a 1,5 cm de comprimento; pedicelos de 6 a 8 mm, desaparecendo junto a um cálice de 1 a 2 mm de

comprimento, que é glabro ou pubescente, com 5 lacínios ovais, obtusos, de margem ciliada. O androceu possui 5 estames, epipétalos; anteras lanceoladas com aproximadamente 2 mm de comprimento, de filetes curtos e deiscência rimosa. O gineceu possui ovário pequeno (aproximadamente 2 mm de comprimento), unilocular, pluriovular e glabro; estilete longo (2,5 cm de comprimento) com estigma típico da família (em carretel) (MONACHINO, 1945).

O fruto do tipo baga é elipsóide ou arredondado (Figura 1B), com 2 a 6 cm, exocarpo amarelo, com manchas avermelhadas, polpa bastante doce, carnosu-viscosa, ácida, contendo geralmente 2 a 15 sementes discóides, com 7 a 8 mm de diâmetro, castanho claras, delgadas e rugosas. O peso de 100 sementes com 50% de umidade é de aproximadamente 18 g. Apresenta, normalmente, na região dos cerrados, floração durante o período de agosto a novembro, com pico em outubro. A frutificação pode ocorrer em qualquer época do ano, mas concentra-se principalmente de julho a outubro ou de janeiro a abril (SOARES et al., 2009).

O fruto verde é venenoso e impróprio para o consumo, causando intoxicações que podem levar à morte. O látex extraído do tronco da mangabeira é utilizado para a produção de borracha. Algumas partes da planta têm aplicação na medicina popular, como a casca, que possui propriedades adstringentes e o látex, que é empregado contra doenças pulmonares, tuberculose, úlceras e herpes (MONACHINO, 1945; BRAGA, 1960; BAHIA, 1979), enquanto que o chá das folhas é usado para cólica menstrual (RIZZO et al., 1990) e a madeira aproveitada como lenha de boa qualidade.



**Figura 1.** Aspectos da planta e frutos da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) variedade botânica do Nordeste.

A mangabeira inicia a sua produção entre o terceiro e o quinto ano após o plantio, sendo que, a partir do quinto ano, a cultura pode alcançar produtividades de 10 a 12 t.ha<sup>-1</sup> (SILVA JUNIOR, 2004).

A produção do fruto é quase que totalmente extrativista e em 2008 a região Nordeste produziu 707 toneladas de frutos (IBGE, 2010). O Estado de Sergipe foi o maior produtor da fruta com uma produção de 397 toneladas, seguido por Bahia, Paraíba e Rio Grande do Norte, com 142, 99 e 60 toneladas, respectivamente. A produção de borracha a partir da extração do seu látex atingiu sua época áurea na Segunda Guerra Mundial, entretanto, o excelente desempenho técnico da borracha de *Hevea* fez com que essa atividade fosse abandonada.

O mercado para mangaba encontra-se principalmente nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. Em Sergipe, é uma das frutas mais abundantes e procuradas nas feiras livres, atingindo preço superior ao da uva e de outras frutas nobres. Atualmente já ocorre a comercialização em supermercados, de frutos em bandejas de isopor revestidas

com filme de PVC com capacidade para 500g e de polpa congelada. Além do consumo *in natura*, o maior aproveitamento da mangaba se dá na forma de sucos, doces, sorvetes e geléias, além da fabricação de vinhos, licores e vinagres, sendo esse processamento feito por pequenas empresas e também por uma grande empresa produtora de sorvetes da região Nordeste (LEDERMAN et al., 2000; ALOUFA, 2003).

## 2.2 Biotecnologia e recursos genéticos

A atual biodiversidade é o resultado de 3,5 milhões de anos de evolução, onde todos os organismos vivos hoje conhecidos, bem como todos aqueles que viveram antes e ainda são desconhecidos, desenvolveram-se a partir de um microrganismo primitivo por meio de processos de mutação e seleção (BRAUN, 2001). Então, de uma forma ampla biodiversidade é definida como, a variabilidade de organismos vivos de todas as origens, compreendendo a totalidade de genes, espécies, ecossistemas e complexos ecológicos, e é expressa em termos de diferenças entre ecossistemas; entre espécies e entre seres da mesma espécie. A biodiversidade é uma das propriedades fundamentais da natureza, responsável pelo equilíbrio e estabilidade dos ecossistemas, tendo, por isso, valor intrínseco, além de fonte de imenso potencial de uso econômico (BARBOSA, 2001).

Recursos genéticos é uma fração da biodiversidade, os quais são definidos como espécies de plantas, animais e microrganismos de valor atual ou potencial, e são usados pelo homem para promover o desenvolvimento sustentável da agricultura e produção de alimentos. Os recursos genéticos tratam da variabilidade genética entre as espécies (variabilidade interespecífica) de grupos de espécies de plantas de interesse agrícola para as suas regiões de origem, e da variabilidade dentro de cada espécie (variabilidade específica), com fins de utilização para a pesquisa em melhoramento genético e em biotecnologia (GOEDERT, 2007).

No mundo estão identificadas, descritas e catalogadas cerca de 250 mil espécies de plantas superiores, destas aproximadamente 30 mil são comestíveis e 7 mil cultivadas ou coletadas pelo homem para a alimentação, vestuário, moradia e saúde (GOEDERT, 2007). O Brasil possui um grande manancial de recursos genéticos, capaz de assegurar o uso sustentável do capital biótico e abiótico de forma vantajosa, com o emprego consciente do capital intelectual. Trata-se de um país que ostenta os cinco principais biomas implantados em seus 851 milhões de hectares, o quinto maior em extensão do globo terrestre, onde somente para plantas o montante de 55 mil espécies, muitas delas endêmicas do país, corresponde a 21% do total mundial catalogado (VILELA-MORALES & VALOIS, 2000).

Apesar de toda essa riqueza, o Brasil é altamente dependente dos produtos exóticos, onde o intercâmbio de forma sistemática e crescente desses recursos é de suma importância para o desenvolvimento sustentável de um país (GOEDERT, 2007). E essa dependência continuará, pois a pesquisa voltada para o desenvolvimento de novas variedades vegetais e raças animais necessitará de materiais genéticos que apresentam características de adaptação ecológica, como resistência às pragas e doenças que ocorram no País e a adaptação às condições adversas do ambiente (GIACOMETTI, 1993).

As atividades antrópicas (desenvolvimento tecnológico e industrial, expansão das fronteiras agrícolas, uso irrestrito de pesticidas, devastação das florestas, aumento das espécies em extinção, dentre outros) estão mudando fundamentalmente e, em muitos casos, de forma irreversível, a diversidade da vida no planeta (BOFF, 2009; MCT, 2009).

Diante da problemática da extinção de espécies criou-se o modelo de uso sustentável da biodiversidade, onde uma parcela significativa da sociedade acredita que a biotecnologia utilizada criteriosamente como instrumento de promoção do desenvolvimento sustentável contribuirá para a solução de problemas que hoje

representam riscos potenciais à sociedade e ao ambiente. A biotecnologia poderá promover o aumento da produtividade agrícola, gerar novas técnicas de controle biológico, melhorar o teor nutritivo dos alimentos e possibilitar avanços no setor da terapêutica (MCT, 2009).

A aplicação dos princípios genéticos tem possibilitado progressos significativos na geração de genótipos superiores de plantas ao longo dos anos. Nas últimas quatro décadas, as ciências biológicas lograram avanços consideráveis como desenvolvimento de uma série de técnicas que tem permitido estudar as plantas aos níveis celular e molecular. Esses novos enfoques compõem o que se denomina de biotecnologia (SOUZA et al., 2006).

A conservação de recursos genéticos pelos processos tradicionais é feita por meio da preservação *in situ* (proteção no hábitat), no local de origem das espécies ou em centros de biodiversidade genética. Utilizando-se a biotecnologia é possível preservar plantas pela conservação *ex situ* de recursos genéticos de sementes, coleções vivas, coleções *in vitro*, banco de germoplasma fora de seu hábitat natural, entre outras. No futuro, recursos genéticos poderão ser conservados como DNA puro, ao invés de sementes ou tecidos, e já é realidade a conservação de embriões, tecidos, óvulos e de pólen. Ambas as conservações, *in situ* e *ex situ*, podem ser facilitadas e expandidas com o desenvolvimento de técnicas biotecnológicas (GARCIA, 1995).

Biotecnologia refere-se a qualquer técnica que utilize organismos vivos ou suas partes para fazer ou modificar produtos, melhorar plantas e animais, ou desenvolver microrganismos para fins específicos (RAMALHO et al., 2000). O termo geral, biotecnologia também é usado para incluir as aplicações dos atuais métodos científicos e técnicas de modificações, bem como melhoramento de sistemas biológicos em plantas, animais, microrganismos ou cultura de células (LEWIN, 2000; MANTELL et al., 1994).

Entre os diversos procedimentos biotecnológicos, sem dúvida alguma, o ramo da biologia celular e particularmente a cultura de tecidos é o que mais êxito alcançou, inclusive por ser o que vem sendo estudado há mais tempo. A cultura de tecidos envolve um grupo heterogêneo de técnicas que têm sido empregadas não apenas em estudos básicos da biologia das plantas como também abrange recentes e importantes métodos que permitem a propagação de plantas isentas de vírus e outros patógenos sistêmicos ou não e a geração de novos genótipos em laboratório (SOUZA et al., 2006). Permite ainda aperfeiçoar a interação entre fatores abióticos (nutricionais, luminosos, temperatura etc.) e bióticos (hormonais e genéticos), resultando em plantas saudáveis, vigorosas e geneticamente superiores, que podem ser multiplicadas massivamente.

Dentro desse contexto, a depender do explante, o crescimento pode ocorrer de forma organizada ou desorganizada (SOUZA et al., 2006). A técnica é baseada na totipotencialidade da célula vegetal, ou seja, na sua capacidade de, por si só, originar uma nova planta, devido às mesmas encerrarem em seu núcleo, toda informação genética para isto (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Mas para George & Sherrington (1984), embora o termo cultura de tecidos seja empregado de forma coletiva para descrever todos os tipos de cultivo *in vitro* de plantas, deveria se referir apenas à cultura de calos e tecidos desorganizados.

O domínio das técnicas de cultura *in vitro* de tecidos contribuiu não apenas para a aplicação prática, mas também para a solução de questões básicas relacionadas com a biologia, fisiologia, bioquímica e genética de plantas (WITHERS, 1982). O emprego racional dessa técnica propicia a produção comercial de milhares de muda de alta qualidade e com manutenção de fidelidade genética, aspecto fundamental para a conservação *in vitro* de germoplasma, como também gera a variabilidade tão importante para o de melhoramento genético.

### 2.3 Recursos genéticos da mangabeira na região Nordeste

A diversidade vegetal brasileira abrange cerca de 60 mil espécies, incluindo entre elas 500 espécies de frutíferas nativas, na maioria pouco estudada. Dentro dessas espécies, a mangabeira, de ocorrência natural nos tabuleiros costeiros, baixada litorânea e cerrados do Brasil, tem quase sua totalidade de recursos genéticos completamente desconhecida (SILVA JUNIOR, 2003; SOUSA et al., 2007). A mangabeira está entre as dez espécies selecionadas como de altíssima prioridade pelo programa Plantas do Futuro do CNPq/Banco Mundial/Global Environment Facility /Ministério do Meio Ambiente (MMA)/Probio coordenado pelo MMA, sendo considerada a fruteira de maior potencial para uso imediato entre as fruteiras nativas da Região Nordeste (FERREIRA et al., 2005; ROMERO, 2009).

No Nordeste as áreas mais densamente povoadas e de maior antropização são as baixadas litorâneas e os tabuleiros costeiros, bem como as áreas de uso agrícola mais intensificado, exploradas desde a época do Descobrimento; inicialmente por meio do extrativismo e, em seguida, pelas monoculturas, entre outras atividades como a pecuária, que transformaram drasticamente a paisagem da região (SILVA JUNIOR, 2003).

A ocupação da região e a exploração desordenada desses cultivos e criações levaram à extinção de espécies nativas, à perda irreparável de variabilidade genética e à degradação de grande parte dos recursos naturais existentes, sobretudo a cobertura vegetal (SILVA JUNIOR & LEDO, 2006). A mangabeira configura entre as espécies que estão sendo afetadas por essa perda e, apesar de não constar em nenhuma lista de espécies em extinção, apresenta o seu germoplasma bastante ameaçado em diversos estados do Nordeste (LEMOS et al., 1989).

As coleções de germoplasma dessa espécie no Nordeste pertencem a Embrapa Tabuleiros Costeiros, na Reserva do Caju no Município de Itaporanga d'Ajuda – SE com 23 acessos, e a Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba - EMEPA-PB, esta última com 324 acessos oriundos da Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte e instalada em João Pessoa – PB. A Universidade Federal de Alagoas – UFAL em parceria com a Secretaria de Agricultura, Abastecimento e Pesca de Alagoas – SEAP-AL também detém uma coleção de acessos coletados no litoral de Alagoas (SILVA JUNIOR et al., 2006).

A conservação a campo de *H. speciosa*, apresenta várias limitações (VALOIS, 1994), como: a) ocupação de áreas extensas por longos períodos; b) disponibilidade de recursos humanos, financeiros e materiais para a sua implantação, condução e manutenção; c) duplicação das coleções para evitar riscos provenientes de fatores bióticos e abióticos. A manutenção *in vitro* é atraente por motivos econômicos e práticos, pois o tamanho do espaço físico utilizado para a conservação é pequeno (laboratório) quando comparado a conservação *in vivo*, implicando em redução de despesas. Oferece a possibilidade de perpetuar material sadio, já que diminui a probabilidade de contaminação através de patógenos durante os sucessivos plantios do material na manutenção da espécie, além de o material ficar protegido contra as intempéries climáticas e poder ser utilizado sempre que necessário (ALOUFA, 2003).

### 2.4 Conservação *in vitro*

A conservação de plantas *in vitro* se baseia no cultivo das coleções em laboratório, a partir da técnica de cultura de tecidos, sendo este um método alternativo à conservação de germoplasma, especialmente para as espécies propagadas vegetativamente e para as espécies que possuem sementes classificadas como recalcitrantes (GEORGE, 1993). Essa conservação pode ser obtida por meio de

mudanças no ambiente de cultivo, visando desacelerar ou suprimir totalmente o crescimento das células e dos tecidos (ROCA et al., 1991). No desenvolvimento desse método, duas técnicas têm sido adotadas: o crescimento lento e a criopreservação (LEMOS, 2002).

A conservação *in vitro* foi proposta como alternativa à conservação em campo (DE LANGHE, 1984; WITHERS, 1980, 1992, 1993; WITHERS & ENGLES, 1990; WITHERS & WILLIAMS, 1986), especialmente para espécies propagadas vegetativamente e para as espécies que possuem sementes classificadas como recalcitrantes.

A manutenção *in vivo* é onerosa, essa estratégia apresenta como uma das principais desvantagens a vulnerabilidade das plantas, que ficam expostas ao ataque de patógenos, a intempéries climáticas ou ao vandalismo. Aliado a isso a manutenção pode ser paralisada em períodos de dificuldade econômica. A possibilidade da utilização da conservação *in vitro* é atraente tanto por motivos econômicos quanto práticos (WITHERS & WILLIAMS, 1998).

O método do crescimento lento consiste em reduzir o metabolismo da planta, aumentando ao máximo os intervalos de subcultivos ou estendendo-o indefinidamente, sem afetar a viabilidade das plântulas. Na estratégia de redução do metabolismo das plantas, têm-se utilizado diversos fatores físicos e químicos (ROCA et al., 1991; CANTO et al., 2004). Embora não haja procedimento padrão para todos os genótipos de todas as espécies, os sucessos obtidos têm sido animadores, e é possível desenvolver um método adequado de crescimento lento para uma nova espécie que exija menos manipulação (WITHERS & WILLIAMS, 1998).

Para a manutenção de culturas sob crescimento mínimo são utilizadas as seguintes técnicas: a) de alteração nas condições ambientais, como a redução da temperatura da sala de crescimento para 0-6 °C (espécies de clima temperado) e para 15-20 °C (espécies de clima tropical e subtropical); b) modificação no meio básico de cultura, pela retirada ou redução de alguns componentes essenciais para o crescimento normal, como o fornecimento de apenas metade da concentração dos sais do meio de cultura; c) uso de retardadores de crescimento, como o ácido abscísico ou composto de efeito osmótico, como o manitol e o sorbitol, os quais são adicionados ao meio, para reduzir o potencial hídrico; d) recobrimento das estruturas com uma camada de óleo mineral reduz a taxa de crescimento e a necessidade de subcultivos (PASQUAL et al., 2008).

Protocolos de conservação *in vitro* só serão considerados eficientes se as etapas de recuperação do crescimento e multiplicação forem bem estabelecidas. Existem poucos trabalhos publicados sobre a recuperação do crescimento de culturas mantidas sob crescimento lento. Alguns autores relatam a eficiência de algumas espécies nessa etapa (MAULARIE et al., 1998; NEGASH et al., 2001; LEMOS et al., 2002).

#### 2.4.1 Conservação *in vitro* por crescimento lento

Existem poucos trabalhos na literatura a cerca da conservação por crescimento lento de espécies tropicais e o desempenho das plantas conservadas na fase de retomada do crescimento. Entretanto, resultados promissores para algumas espécies têm sido obtidos utilizando retardantes osmóticos, inibidores de crescimento ou alterando condições físicas como luz e temperatura.

O cultivo de inhame (*Dioscorea* spp.) em condições de crescimento lento, pela redução nas concentrações de sais e de sacarose, tem possibilitado a conservação de mais de 14 espécies em laboratório, com eficiência na fase de recuperação do crescimento e aclimação (MALAURIE et al., 1998).

Culturas *in vitro* de bananeira-da-abissínia (*Ensete ventricosum*) têm sido mantidas por seis meses em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) suplementado com 10 µM de benzilaminopurina (BAP), na presença de 0,1 e 2% de manitol, em

temperatura de 15 e 18°C. As brotações são rapidamente recuperadas em meio de multiplicação MS com 2,25 e 4,5 mg.L<sup>-1</sup> BAP a 25°C (NEGASH et al., 2001).

Brotações de cultivares de oliva (*Olea europaea* L.) apresentaram excelente potencial de conservação por oito meses em meio de cultura sem reguladores de crescimento, mantidas na ausência de luz em temperatura de 4°C (LAMBARDI et al., 2002).

O uso de sacarose foi eficiente como fonte de carbono e regulador osmótico na manutenção da viabilidade de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) (LE MOS et al., 2002). Os autores observaram que concentrações de 1 mg.L<sup>-1</sup> de ABA e de 20 g.L<sup>-1</sup> de sacarose associadas às condições de temperatura reduzida promoveram a conservação de plantas viáveis por um ano no mesmo meio de cultura sem a necessidade de serem subcultivadas.

Em estudos com quatro acessos de *Mentha* spp., Islam et al. (2003) observaram que segmentos apicais mantidos sob crescimento lento em meio MS sem reguladores por seis meses e provenientes anteriormente de tratamentos em temperaturas de 20 e 10°C por uma e três semanas, respectivamente, apresentaram menor crescimento *in vitro* da parte aérea do que explantes nodais mantidos nas mesmas condições.

Estudos sobre o efeito do paclobutrazol (PBZ) na conservação *in vitro* de germoplasma de abacaxi (*Ananas comosus*) indicaram que os melhores resultados foram obtidos na ausência de reguladores ou na presença de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de PBZ (CANTO et al., 2004). O PBZ é um retardante de crescimento usado como alternativa aos reguladores de crescimento convencionais.

Resultados obtidos por Faria et al. (2006), mostraram ser possível conservar no período de quatro meses, microplantas de maracujazeiro (*Passiflora giberti* N. E. Brown) em meio de cultura MS suplementado com 10 ou 20 g.L<sup>-1</sup> de sorbitol, na ausência de sacarose, e mantidas sob condições de fotoperíodo de 16 h e temperatura de 27 ± 1°C.

Utilizando diferentes concentrações de sacarose e manitol em meio de cultura Y3 na conservação *in vitro* de coqueiro anão (*Cocos nucifera* L.) Lédo et al. (2007) constataram efeito retardante sob o crescimento do sistema radicular e parte aérea das plântulas em meio com 24,65 e 32,87 mg.L<sup>-1</sup> de manitol aos 365 dias de cultivo. No entanto, nas mesmas concentrações observou-se a necrose das culturas com redução na sobrevivência das plântulas. Nas concentrações de 40 e 60 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, os autores observaram um crescimento mínimo da parte aérea e 100% de sobrevivência das plântulas aos 365 dias de cultivo, podendo essas concentrações de sacarose ser promissoras para a conservação *in vitro* de coqueiro.

Plantas de caroá (*Neoglaziovia variegata* (Arr. Cam.) Mez) mantidas em baixas temperaturas apresentam menor desenvolvimento quando comparadas com culturas controle (SILVEIRA et al., 2009).

Plantas do banco de germoplasma de abacaxizeiro e bromeliáceas da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical têm sido mantidas sob temperatura de 21 ± 2°C e fotoperíodo de 12 horas, com intensidade luminosa de 22 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> (SOUZA et al., 2006) e para as espécies utilizadas o período de conservação considerado ideal para garantir a retomada do crescimento depende do acesso conservado.

Embora ainda sejam poucos os trabalhos sobre conservação *in vitro* de mangabeira, Sá et al. (2009) avaliando a eficiência do ABA e do manitol na conservação de microestacas, observaram que na presença de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de ABA foi possível a conservação por um período de 90 dias. Nas concentrações de 0, 5, 10, 15 e 20 g.L<sup>-1</sup> de manitol, observou-se que o comprimento da parte aérea apresentou valores numéricos inferiores ao da testemunha. Entretanto, mesmo apresentando uma resposta positiva na redução do alongamento das microestacas aos 90 dias de cultivo *in vitro* foi observado efeito tóxico do manitol e morte das mesmas.

Alguns fatores alvo de estudos na cultura de tecidos de diversas espécies têm sido pouco considerados em trabalhos de conservação *in vitro*, como tipo de recipiente, vedação e a quantidade de meio. Esses fatores afetam diretamente a área superficial da

interface meio-atmosfera, o volume do ar sobre o meio e a profundidade do meio influenciando a composição da fase gasosa e, conseqüentemente, o crescimento e desenvolvimento das culturas (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

O acúmulo de etileno no recipiente de cultivo *in vitro* corresponde a um dos principais problemas encontrados na propagação *in vitro* de mangabeira. O etileno é um gás produzido pelos vegetais e influencia o desenvolvimento das culturas *in vitro* e os efeitos deletérios causados pelas altas concentrações podem ser controlados pelo tipo de vedação dos frascos, e que é mais relevante do que a composição do meio de cultura (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Segundo Pereira Netto & McCown (1999; 2006), o crescimento de partes aéreas de mangabeira em atmosfera enriquecida com 5 ou 10  $\mu\text{L.L}^{-1}$  de etileno resulta em inibição do alongamento de ramos laterais e o ramo principal e a concentração de 1  $\mu\text{L.L}^{-1}$  de etileno resulta em redução da ordem de 50% na proliferação de ramos laterais.

O aumento de trocas gasosas pelo uso de vedação adequada pode minimizar os efeitos deletérios do acúmulo de etileno no vigor das culturas. Sá (2009) observaram a viabilidade da conservação *in vitro* de segmentos apicais de mangabeira na presença de 0,5  $\text{mg.L}^{-1}$  de ABA por um período de 90 dias quando mantidos em frascos tipo “maionese” vedados com papel alumínio.

Outro aspecto pouco estudado é a quantificação de metabólitos secundários produzidos quando as culturas são submetidas ao crescimento mínimo.

## 2.5 Prolina livre

A prolina é um dos 20 aminoácidos presentes nas proteínas de todos os organismos vivos, e possui um grupo amino ligado a dois átomos de carbono, o qual confere características de neutralidade à molécula. O acúmulo deste aminoácido pode ocorrer por duas vias paralelas nas plantas, uma direta, dependente do glutamato, e outra indireta, dependente da ornitina (KAVI KISHOR et al., 2005).

A prolina é um aminoácido que presente em pequenas quantidades nas plantas sob estresse se acumula nas células e tem função osmoprotetora, protegendo as membranas de efeitos deletérios, prevenindo a desnaturação de proteínas, preservando a estrutura de enzimas e atuando como tampão para regular o potencial redox celular (NOGUEIRA et al., 2001; MARIN, 2003; GIANNAKOULA et al., 2008).

Plantas em condições normais possuem menos de 5% dos aminoácidos totais livres, mas sob várias formas de estresse a concentração de prolina pode chegar a 80% do conjunto total de aminoácidos (MATYSIK et al., 2002; GUBIS et al.; 2007). Este aminoácido em sua forma pura apresenta-se como substância incolor, com alta solubilidade em água, mediana em alcoóis e razoável em benzeno e acetona e insolúvel em outros compostos (MILNER-WHITER et al., 1992).

A prolina é especialmente reconhecida pela efetiva participação como soluto compatível (VERSLUES & BRAY, 2006). Em condições de estresse as enzimas citosólicas de células vegetais podem ser severamente inibidas por altas concentrações de íons. A acumulação de íons parece ser restrita aos vacúolos durante o ajustamento osmótico, onde os íons são impedidos de entrar em contato as enzimas no citosol ou organelas subcelulares, por causa dessa concentração de íons outros solutos devem se acumular no citoplasma para manter o equilíbrio do potencial hídrico dentro da célula (TAIZ & ZEIGER, 2004).

Os solutos compatíveis são compostos orgânicos que não interferem na função das enzimas. Os solutos normalmente são o aminoácido prolina, alcoóis de açúcar (manitol, sorbitol) e uma amina quaternária (glicina bataína) (TAIZ & ZEIGER, 2004), que são considerados osmólitos chave para o ajustamento osmótico de plantas sob deficiência hídrica e toxicidade de alumínio (GIANNAKOULA et al., 2008).

O aumento dos teores de prolina pode ativar várias funções celulares: ajustamento osmótico, reserva de carbono e nitrogênio utilizado no crescimento para restabelecimento após estresse, desintoxicação do excesso de amônia, estabilizador de proteínas e membranas e eliminadores de radicais livres. Adicionalmente, existem evidências de que a biossíntese desse aminoácido poderia estar também associada à regulação do pH citosólico ou mediação do incremento da razão  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ , influenciando o fluxo de carbono devido à via oxidativa da pentose fosfato (SILVEIRA et al., 2002; KAVI KISHOR et al., 2005). Além disso, pode atuar ainda como fonte acessível de energia, em que uma única molécula oxidada é capaz de produzir 30 ATP (KAVI KISHOR et al., 2005).

O ajustamento osmótico é importante para evitar a diminuição do potencial hídrico celular mediante a biossíntese de solutos compatíveis intracelulares, os quais têm baixo peso molecular, se acumulam em altas quantidades, no vacúolo ou no citosol, mantendo a turgidez e o volume celular, preservando a integridade de compostos e estruturas celulares, fundamentais para o adequado metabolismo vegetal (ABDUL JALEEL et al., 2007).

Os efeitos associados do estresse hídrico e de alumínio causam aumento nos teores de prolina, tanto na parte aérea quanto no sistema radicular de gramíneas, entretanto, para uma melhor compreensão desses efeitos ainda são necessárias muitas pesquisas em plantas agronomicamente importantes, pois são raras as informações na bibliografia pertinente (ZAIFNEJAD et al., 1997).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos foram desenvolvidos no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Tabuleiros Costeiros, em Aracaju, SE. Foram utilizadas sementes de dois acessos oriundos da população nativa de mangabeira do Campo Experimental de Itaporanga, SE da Embrapa Tabuleiros Costeiros, segmentos nodais com um nó e microestacas com dois nós de plântulas germinadas *in vitro* (Figura 2).

As sementes provenientes de frutos de mangaba no estágio de maturação VI foram submetidas à desinfestação através da seguinte seqüência de tratamentos: a) lavagem com solução detergente; b) enxágüe em água destilada para remoção de detergente; c) lavagem em solução com antibiótico rifampicina 300 mg.L<sup>-1</sup> por 10 minutos em câmara de fluxo laminar; d) três lavagens com água destilada estéril; e) imersão em álcool etílico 70% por 10 segundos; f) imersão em solução de hipoclorito de sódio 1% por 20 minutos e g) três enxágües finais com água destilada estéril.

Os meios de cultura tiveram o pH ajustado em torno de 5,8 e foram esterilizados em autoclave a 121 °C, sob pressão 1,05 kg.cm<sup>-2</sup> por 15 minutos. Todos os experimentos foram mantidos em sala de crescimento sob condições de fotoperíodo de 12 horas (52 µmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> de irradiância) e temperatura de 27 ± 1 °C.

#### 3.1 Conservação *in vitro* de explantes de mangabeira

##### 3.1.1 Efeito da sacarose e do sorbitol na conservação *in vitro* de segmentos nodais de mangabeira

Os segmentos nodais foram inoculados em tubos de ensaio (35 mm x 127 mm) com tampa plástica contendo 25 mL de meio de cultura de Murashige & Skoog – MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), suplementado com 1 mg.L<sup>-1</sup> de ácido indol acético (AIA) e 1 mg.L<sup>-1</sup> de benzilaminopurina (BAP) e gelificado com 3 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel®.

Foram avaliadas diferentes concentrações de sorbitol (10; 20 e 40 g.L<sup>-1</sup>), combinadas com 0 e 15 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, mais uma testemunha adicional composta de meio MS e 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 2 x 3 +1 (duas concentrações de sacarose, três concentrações de sorbitol, mais uma testemunha (MS padrão com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose), totalizando sete tratamentos com 20 repetições, sendo cada repetição constituída por um tubo de ensaio com um explante.

As avaliações foram realizadas aos 30, 60, 90, 120 dias da inoculação, observando-se número de brotações adventícias por segmento nodal; número de segmentos nodais por brotação adventícia e porcentagem de abscisão foliar (calculada em função da diferença entre número total de folhas e número de folhas caídas).

##### 3.1.2 Efeito do ácido abscísico, tipo de recipiente e vedação na conservação *in vitro* de segmentos nodais de mangabeira

Segmentos nodais foram inoculados em frascos tipo “maionese” (capacidade máxima 250 mL) e em tubos de ensaio (35 mm x 127 mm) com 25 mL de meio de cultura MS suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 1 mg.L<sup>-1</sup> de AIA e 1 mg.L<sup>-1</sup> de BAP. Foram avaliadas as seguintes concentrações de ABA 0 e 0,5 mg.L<sup>-1</sup>, combinadas com vedações

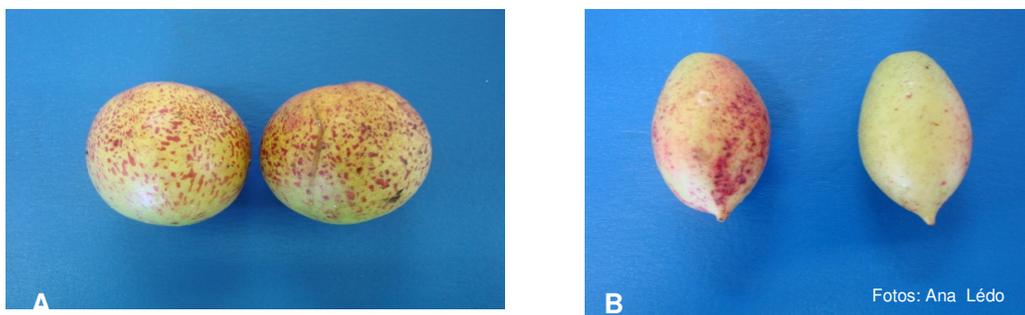
por tampa plástica e papel alumínio. Todos os tratamentos foram gelificados com 3 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel®.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 2 x 2 x 2 (duas concentrações de ABA, dois tipos de recipientes e dois tipos de vedação), totalizando oito tratamentos com 12 repetições, sendo a repetição constituída por um recipiente com um explante.

As avaliações dos experimentos foram realizadas aos 30, 60, 90, 120 dias da inoculação, observando-se números de brotações adventícias por segmento nodal; número de segmentos nodais por brotação adventícia e porcentagem de abscisão foliar (calculada em função da diferença entre número total de folhas e número de folhas caídas).

### 3.1.3 Efeito do manitol, do acesso e tempo de cultivo na conservação *in vitro* de plântulas de mangabeira

Foram utilizadas sementes de dois acessos (MGB-1 e MGB-2) oriundos da população nativa de mangabeira do Campo Experimental de Itaporanga, SE da Embrapa Tabuleiros Costeiros (Figura 2).



**Figura 2.** Acessos de mangabeira de populações nativas do Campo Experimental de Itaporanga, SE da Embrapa Tabuleiros Costeiros. A- MGB-1; B- MGB-2.

Após a desinfestação as sementes foram inoculados em frascos tipo “maionese” com tampa plástica contendo 30 mL do meio de cultura MS gelificado com 6 g.L<sup>-1</sup> de agar e suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. Foram avaliadas as seguintes concentrações de manitol: 0; 5; 10; 15 e 20 g.L<sup>-1</sup>.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 5 x 2 (cinco concentrações de manitol x dois acessos), totalizando 10 tratamentos com três repetições, sendo a parcela experimental composta de três frascos com duas sementes cada.

As avaliações foram realizadas aos 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias da inoculação, observando-se o número de folhas, porcentagem de abscisão e número de raízes, sendo os dados de altura das plântulas tomados até 150 dias.

### 3.1.4 Quantificação de prolina em microestacas submetidas à conservação *in vitro* por crescimento lento

Para a quantificação de prolina em explantes de mangabeira submetidas à conservação *in vitro*, foram utilizadas microestacas contendo dois segmentos nodais e quatro folhas. Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio de cultura MS, suplementado com 1 mg.L<sup>-1</sup> de AIA e 1 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, gelificado com 3 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel® em combinação com 10 e 20 g.L<sup>-1</sup> de sorbitol.

Aos 30 dias após a inoculação foi realizada a quantificação da prolina em µmol.g<sup>-1</sup> de massa fresca de folha e caule. Os teores de prolina foram determinados pelo método de BATES modificado (BATES et al., 1973) com a maceração de aproximadamente 0,2 g de massa fresca de folhas e de entre-nós de cada tratamento com 10 mL de ácido sulfosalicílico 3%. O macerado foi centrifugado a 2000 rpm durante 15 minutos. A uma alíquota de 2 mL do sobrenadante adicionou-se 2 mL de ácido acético glacial PA (CH<sub>3</sub>COOH) e 2 mL de ninidrina ácida em tubos, os quais foram colocados em banho-maria por uma hora à temperatura de 100°C. A ninidrina foi preparada por do aquecimento (60°C) de 1,25 g de ninidrina (C<sub>9</sub>H<sub>4</sub>O<sub>3</sub>.H<sub>2</sub>O) em 30 mL de ácido acético glacial e 20 mL de ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 6 M. Após o banho-maria os tubos foram mergulhados em banho de gelo por 10 minutos para finalizar a reação, em seguida foram adicionados 4 mL de tolueno (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>3</sub>) e a solução foi homogeneizada em vórtex por 25 segundos para que as duas fases se separassem bem. A leitura de absorvância das amostras foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda 520 nm.

A curva de padronização foi determinada para quantificar a prolina, utilizando-se solução estoque na concentração de 1 µmol de prolina PA e diluições em água destilada, conforme a metodologia descrita. Os teores de prolina foram calculados com base na massa fresca, segundo a fórmula:  $[(\mu\text{g prolina/mL} \times \text{mL tolueno})/115,5 \mu\text{g}/\mu\text{mol}] / [(g \text{ massa fresca})/5] = \mu\text{mol de prolina/g massa fresca}$ . Os tratamentos contendo 10 e 20 g.L<sup>-1</sup> de sorbitol foram realizados em triplicata.

## 3.2 Retomada do crescimento de mangabeira após a conservação *in vitro*

### 3.2.1 Retomada do crescimento de explantes provenientes de meio de conservação com sorbitol e sacarose

Segmentos nodais com brotações adventícias de mangabeira conservadas *in vitro* por 120 dias, em meio de cultura MS com diferentes combinações de sorbitol (10; 20 e 40 g.L<sup>-1</sup>) e sacarose (0 e 15 g.L<sup>-1</sup>) foram transferidos para o meio de crescimento.

Os explantes foram inoculados em frascos tipo “maionese” (capacidade máxima 250 mL) com tampa plástica contendo 30 mL de meio de cultura MS, suplementado com 1 mg.L<sup>-1</sup> de AIA e 1 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose; e gelificado com 3 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel® (meio de crescimento).

O delineamento experimental considerou os fatores aplicados na etapa de conservação *in vitro* e foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 2 (três concentrações de sorbitol x duas sacarose), totalizando seis tratamentos com 20 repetições, sendo a parcela experimental composta por um explante por frasco.

As avaliações foram realizadas na implantação do experimento e aos 30 e 60 após a inoculação atribuindo uma escala de notas adaptada de Lemos et al. (2002) para a viabilidade das culturas, onde as notas correspondem: 5- folhas e brotos totalmente verdes; 4- início do secamento e morte das folhas; 3- secamento e morte das folhas e dos brotos entre 30 e 50%; 2- mais de 50%

de secamento e morte de folhas e brotos e 1- folhas e brotos totalmente mortos.

### **3.2.2 Retomada do crescimento de explantes provenientes de meio de conservação com ABA em diferentes recipientes e tipos de vedação**

Segmentos nodais com brotações adventícias de mangabeira conservadas *in vitro* por 120 dias, em meio de cultura MS com  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de ABA foram transferidos para meio de crescimento.

Os explantes foram inoculados em frascos tipo “maionese” (capacidade máxima 250 mL) com tampa plástica contendo 30 mL de meio de cultura MS, suplementado com  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIA,  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP e  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose; e gelificado com  $3 \text{ g.L}^{-1}$  de Phytigel® (meio de crescimento).

O delineamento experimental considerou os fatores aplicados na etapa de conservação *in vitro* e foi inteiramente casualizado em esquema fatorial  $2 \times 2$  (dois tipos de recipiente  $\times$  dois tipos de vedação) totalizando quatro tratamentos com 12 repetições, sendo a parcela experimental composta por um explante por frasco.

As avaliações foram realizadas na implantação do experimento e aos 30 e 60 após a inoculação atribuindo uma escala de notas adaptada de Lemos et al. (2002) para a viabilidade das culturas.

### **3.3 Análises estatísticas**

Todos os experimentos foram instalados em delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial. Como foram realizadas avaliações sucessivas em diferentes tempos de cultivo *in vitro*, para a análise de variância foi considerado o DIC em parcela subdividida no tempo, sendo o fatorial nas parcelas e os tempos de cultivo *in vitro* e suas respectivas interações nas subparcelas.

As médias dos fatores estudados foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade e para a comparação da testemunha adicional (item 3.1.1) com demais tratamentos o teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

Para as interações significativas dos fatores estudados com o tempo de cultivo *in vitro* foram ajustadas equações de regressão polinomial. Foram utilizados os programas estatísticos SAS (SAS INSTITUTE INC, 2000) e SISVAR (FERREIRA, 2000). Para o experimento de quantificação de prolina foi calculado desvio padrão das médias e intervalos de confiança.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Conservação *in vitro* de explantes de mangabeira

#### 4.1.1 Efeito da sacarose e do sorbitol na conservação *in vitro* de segmentos nodais de mangabeira

As interações sacarose x sorbitol e fatorial x testemunha adicional foram significativas para o número de brotos por segmento nodal e número de nós por brotação adventícia (Anexo A). Na ausência de sacarose e presença de 10 g.L<sup>-1</sup> de sorbitol observou-se menor crescimento *in vitro* dos explantes em número de brotações adventícias por segmento nodal (1,92). A presença de sacarose induziu maior formação de nós por brotação adventícia com 10 (6,90) e 20 g.L<sup>-1</sup> de sorbitol (5,92) quando comparado aos tratamentos com as mesmas concentrações de sorbitol na ausência de sacarose (Tabela 1).

**Tabela 1.** Médias do número de brotações por segmento nodal (NBS), número de nós por brotação adventícia (NNB) e porcentagem de abscisão foliar (PAF) de explantes de mangabeira em função da concentração de sorbitol e de sacarose.

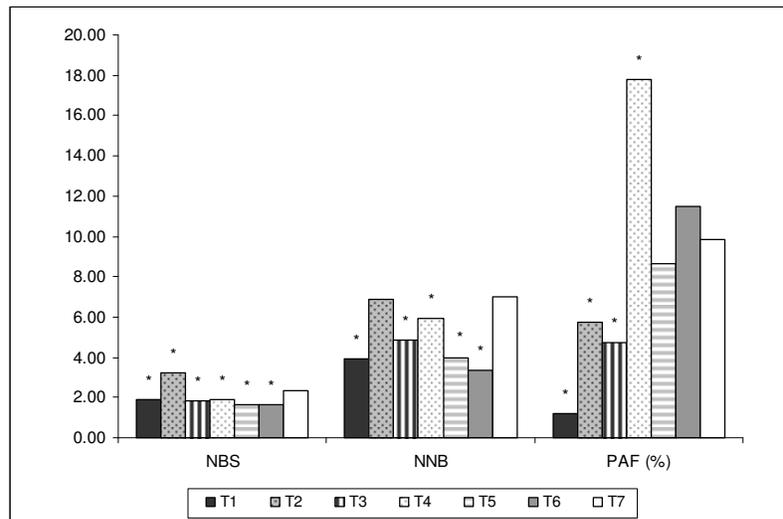
Sorbitol (g.L <sup>-1</sup> )	Sacarose (g.L <sup>-1</sup> )	
	0	15
<b>NBS</b>		
10	1,92aB	3,20aA
20	1,84aA	1,88bA
40	1,64aA	1,65bA
Testemunha	2,35	
<b>NNB</b>		
10	3,92aB	6,90aA
20	4,85aB	5,92aA
40	3,99aA	3,32bA
Testemunha	7,03	
<b>PAF (%)</b>		
10	1,20aA	5,71aA
20	4,72aA	17,78aA
40	8,62aA	11,51aA
Testemunha	9,84	

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A combinação de menor concentração de sacarose (10 g.L<sup>-1</sup>) com temperatura de incubação de 18 °C em diferentes cultivares de amarílis (*Hippeastrum* Herb.) mantidas em meio de cultura ½ MS foi mais efetiva na conservação *in vitro* das cultivares, as quais se mantiveram viáveis por 90 dias sem a necessidade de subcultivos (AMARAL, 2005).

Trabalhando com conservação *in vitro* de *Passiflora giberti* N. E. Brown, Faria et al. (2006) observaram respostas semelhantes a do presente trabalho quanto ao incremento significativo para as variáveis analisadas, quando os tratamentos eram compostos da combinação sacarose e sorbitol indicando que a presença de sacarose no meio promove um maior desenvolvimento *in vitro*, já que este é uma fonte de carbono prontamente disponível.

Todas as combinações de sacarose e sorbitol diferiram da testemunha (MS Padrão + 30 g.L<sup>-1</sup> sacarose) sendo inferiores quanto ao número de brotações por segmento nodal e para o número de nós por brotação adventícia, com exceção da combinação 15 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 10 g.L<sup>-1</sup> de sorbitol (T2). Para a porcentagem de abscisão foliar as combinações 0 e 15 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 40 g.L<sup>-1</sup> de sorbitol (T5 e T6, respectivamente) não diferiram da testemunha (Figura 3, Anexo B).

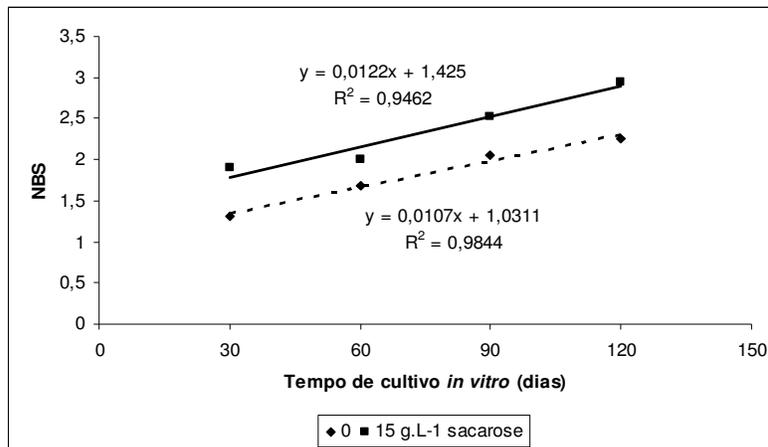


T1 - 0 sacarose + 10 sorbitol (g.L<sup>-1</sup>); T2 - 15 sacarose + 10 sorbitol (g.L<sup>-1</sup>); T3 - 0 sacarose + 20 sorbitol (g.L<sup>-1</sup>); T4 - 15 sacarose + 20 sorbitol (g.L<sup>-1</sup>); T5 - 0 sacarose + 40 sorbitol (g.L<sup>-1</sup>); T6 - 15 sacarose + 40 sorbitol (g.L<sup>-1</sup>) e T7 - MS Padrão 30 g.L<sup>-1</sup> sacarose.

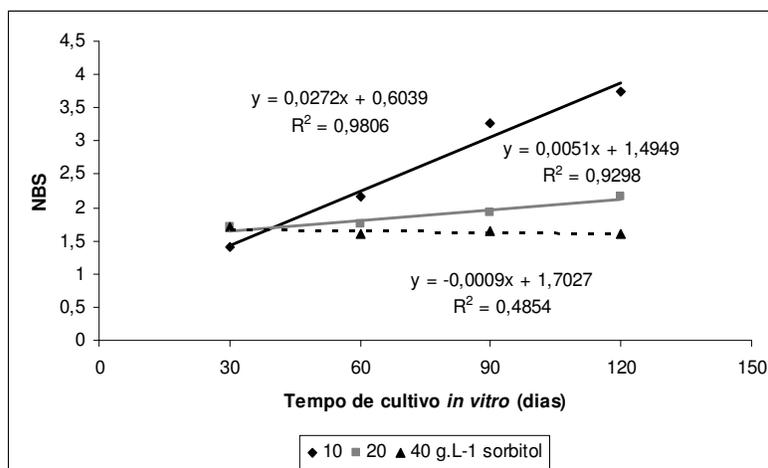
**Figura 3.** Médias do número de brotações por segmento nodal (NBS), número de nós por brotação adventícia (NNB) e porcentagem de abscisão foliar (PAF) dos tratamentos do fatorial sacarose x sorbitol com a testemunha adicional MS Padrão. Médias com asterisco diferem da testemunha (Dunnett, P= 0,05).

A interação dos fatores sorbitol x tempo de cultivo *in vitro* foi significativa para todas as variáveis avaliadas. A interação sacarose x tempo de cultivo *in vitro* foi significativa para o número de brotações adventícias por segmento nodal e porcentagem de abscisão foliar (Anexo A).

O número de brotações adventícias por segmento nodal variou segundo uma regressão linear com acréscimo em função do aumento do tempo de cultivo *in vitro* nas concentrações de 0 e 15 g.L<sup>-1</sup> de sacarose indicando que as concentrações testadas não inibiram a formação de brotações adventícias (Figura 4). Entretanto, na concentração de 20 g.L<sup>-1</sup> de sorbitol observou-se uma desaceleração no crescimento, sendo que na concentração de 40 g.L<sup>-1</sup> obteve-se uma regressão linear negativa, provavelmente, devido ao efeito tóxico da alta concentração de sorbitol (Figura 5).



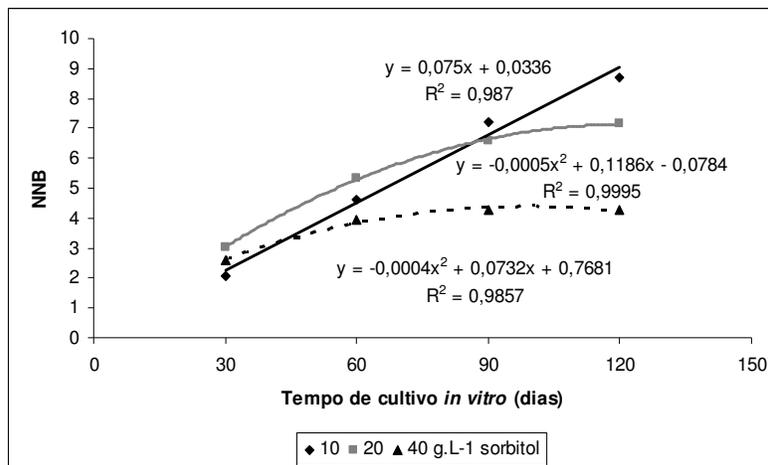
**Figura 4.** Número de brotações por segmento nodal (NBS) em função do tempo de cultivo *in vitro* e da concentração de sacarose.



**Figura 5.** Número de brotações por segmento nodal (NBS) em função do tempo de cultivo *in vitro* e da concentração de sorbitol.

Avaliando o efeito dos carboidratos sacarose e manitol combinados com o ácido acetilsalicílico (AAS) na conservação *in vitro* de batata (*Solanum tuberosum* L.), Fortes & Pereira (2001) também observaram que o uso da sacarose mesmo na presença de concentrações elevadas de AAS, proporcionou maior desenvolvimento das brotações do que na presença manitol.

O número de nós por brotação adventícia na concentração de 10 g.L<sup>-1</sup> de sorbitol variou segundo uma regressão linear com acréscimo em função do aumento do tempo de cultivo *in vitro*. Entretanto, nas concentrações de 20 e 40 g.L<sup>-1</sup> de sorbitol foi observada uma regressão quadrática negativa (Figura 6). O valor máximo de número de nós encontrado, por meio da derivada da equação, para 20 e 40 g.L<sup>-1</sup> de sorbitol foi de 6,96 e 4,11 aos 118,6 e 91,5 dias de tempo de cultivo, respectivamente. Esses dados demonstram que maiores concentrações de sorbitol (20 e 40 g.L<sup>-1</sup>) promoveram um menor crescimento em número de nós. Shibli et al. (1999) relatam que o aumento das concentrações de sacarose (ao contrário do presente trabalho), sorbitol ou manitol reduziram significativamente o crescimento de microbrotos de amêndoa amarga (*Amygdalus communis* L.) e estendeu o tempo de subcultivo para quatro meses.

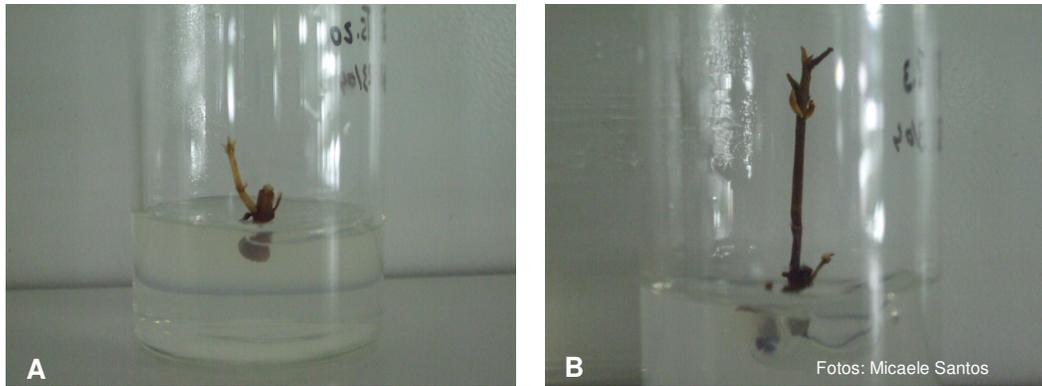


**Figura 6.** Número de nós por brotação adventícia (NNB) em função do tempo de cultivo *in vitro* e da concentração de sorbitol.

Entretanto, no presente trabalho, na presença de 40 g.L<sup>-1</sup> de sorbitol observou-se efeito deletério nos segmentos nodais independente da concentração de sacarose (Figura 7). Efeitos tóxicos devido à altas concentrações de reguladores osmóticos foram relatados por Lédo et al. (2007) e Sá (2009) em coqueiro e mangabeira, respectivamente. O sorbitol é um açúcar álcool que geralmente não é metabolizado pelas plantas e sua ação está relacionada a modificar o potencial osmótico do meio, removendo o excesso de água intracelular, por gradiente osmótico e assim desacelerando o crescimento vegetal, mas dependendo da concentração ou da espécie em estudo o sorbitol pode ter efeito nocivo, como o que foi observado nesse trabalho (CHARRIER et al., 1991; DUMET et al., 1993; SHIBLI et al., 2006).

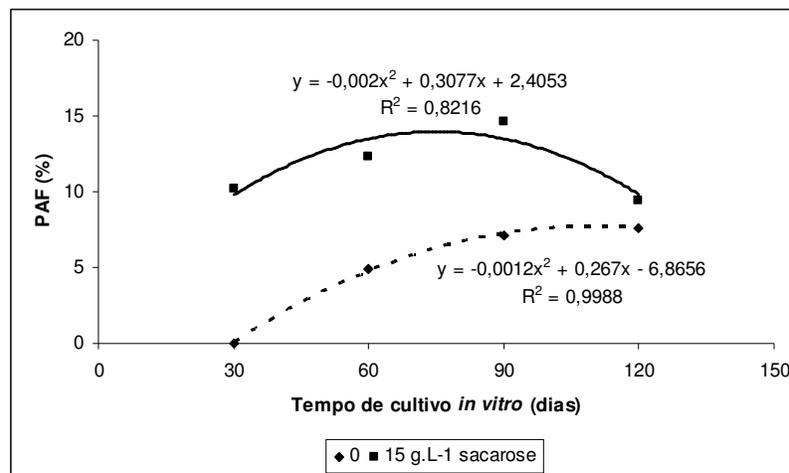
A deficiência hídrica pode induzir padrões similares de resposta que podem ser: osmorregulação, síntese de proteínas, acúmulo de solutos compatíveis, redução no crescimento, alterações nas propriedades das membranas celulares, inibição da fotossíntese, aumento da respiração, redução da produção de matéria seca, senescência e abscisão foliar (JONES & JONES, 1992; LARCHER, 2000).

A senescência é um processo codificado geneticamente e segue um curso previsível de eventos celulares, onde o cloroplasto é a primeira organela a se deteriorar no início da senescência foliar, com a destruição de componentes protéicos dos tilacóides e de enzimas do estroma. Os cloroplastos têm rápida deterioração, já os núcleos permanecem estrutural e funcionalmente intactos, até os estádios mais tardios da senescência. Os tecidos senescentes realizam processos catabólicos que exigem a síntese de novo de várias enzimas hidrolíticas, tais como proteases, nucleases, lípases e enzimas degradadoras de clorofila. A síntese destas enzimas específicas da senescência envolve a ativação de genes específicos (TAIZ & ZEIGER, 2004).



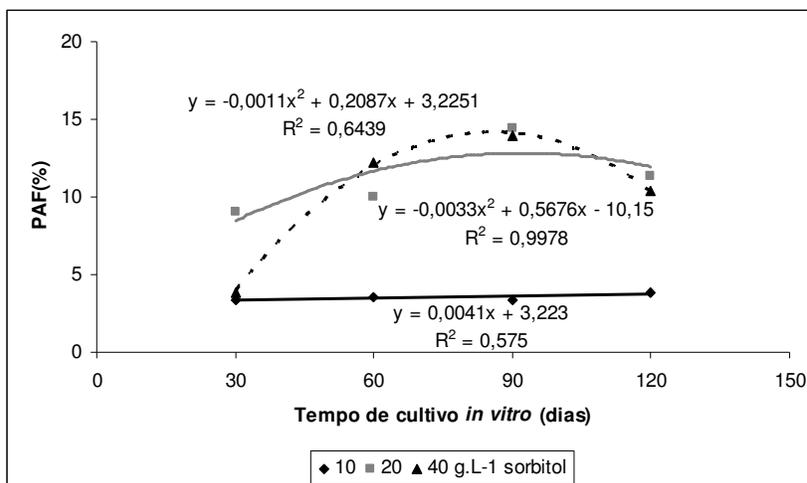
**Figura 7.** Efeito deletério do sorbitol em segmentos nodais de mangabeira mantidas sob crescimento lento. A- 0 sacarose + 40 g.L<sup>-1</sup> sorbitol; B- 15 g.L<sup>-1</sup> sacarose + 40 g.L<sup>-1</sup> sorbitol.

A porcentagem de abscisão foliar apresentou um comportamento quadrático em relação ao tempo de cultivo de *in vitro* nas concentrações de 0 e 15 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, sendo que na presença de sacarose observou-se maior abscisão foliar, devido possivelmente a disponibilização no meio de cultura de fonte de carbono aumentando o metabolismo *in vitro* e o acúmulo de etileno (Figura 8).



**Figura 8.** Porcentagem de abscisão foliar (PAF) em função do tempo de cultivo *in vitro* e da concentração de sacarose.

A abscisão foliar na concentração de 10 g.L<sup>-1</sup> de sorbitol foi linear com coeficiente angular da reta de 0,0041, mantendo-se quase constante (Figura 9). Um comportamento quadrático foi obtido para 20 e 40 g.L<sup>-1</sup> de sorbitol. O valor máximo da abscisão foliar para 40 g.L<sup>-1</sup> de sorbitol, por meio da derivada da equação, foi de 14,26% aos 86 dias de tempo de cultivo, ocorrendo a partir daí a redução da perda de folhas.



**Figura 9.** Porcentagem de abscisão foliar (PAF) em função do tempo de cultivo *in vitro* e da concentração de sorbitol.

Autores têm relatado que algumas substâncias apresentam a capacidade de inibir a ação do etileno *in vitro* e interferirem no processo de abscisão foliar (RADEMACHER, 2000; NEPOMUCENO et al., 2007). Segundo Rademacher (2000), os compostos que atuam inibindo o crescimento vegetal induzem aumento no conteúdo de citocininas, e os níveis de etileno são diminuídos, tendo como consequência um retardo na senescência. A redução da abscisão foliar em altas concentrações de manitol foi observada por Sá (2009) em microestacas de mangabeira, embora as mesmas tenham evidenciado seu efeito nocivo ao explante.

A manutenção da viabilidade de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) em crescimento lento por um ano foi possível quando se utilizou apenas 20 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, resultando em maior viabilidade dos explantes do que na presença de sacarose combinada com manitol ou sorbitol (LEMOS et al., 2002). Segundo os autores esse fato pode ser explicado devido à cana-de-açúcar não possuir mecanismos necessários para metabolizar os açúcares alcoóis.

#### 4.1.2 Efeito do ácido abscísico, tipo de recipiente e vedação na conservação *in vitro* de segmentos nodais de mangabeira

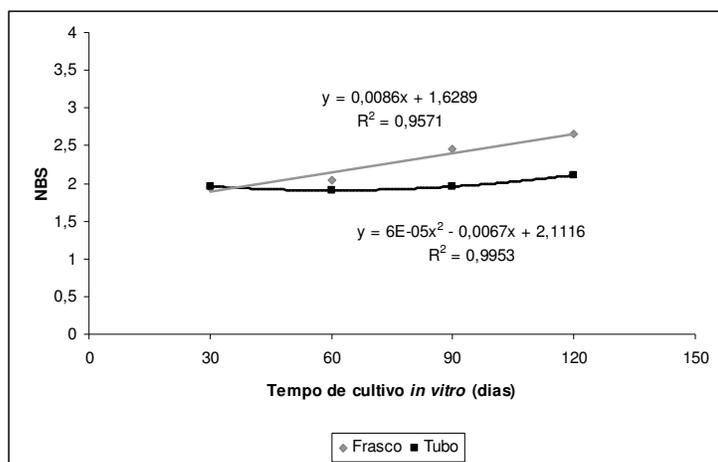
De acordo com o quadro resumo da análise de variância houve interação significativa para os fatores tipo de recipiente x tempo de cultivo *in vitro* e tipo de vedação x tempo de cultivo *in vitro* para o número de brotações por segmento nodal (Anexo C).

O número de brotações por segmento nodal variou segundo uma regressão linear para o frasco tipo “maionese” e para tubo de ensaio apresentou comportamento quadrático, com um número máximo brotos (1,925) aos 55,38 dias pela derivada da equação (Figura 10). O tubo de ensaio apresentou um menor aumento de número de brotos por segmento nodal em relação ao tempo de cultivo *in vitro*, o que provavelmente pode ser explicado pelo volume do tubo ser menor e influenciar na qualidade do microambiente *in vitro* com relação a trocas gasosas CO<sub>2</sub> e etileno.

Conforme relatos de Grattapaglia & Machado (1998), o tipo de recipiente e a quantidade de meio afetam diretamente a área superficial da interface meio-atmosfera, o volume do ar sobre o meio e a profundidade do meio influenciando a composição da fase gasosa e, conseqüentemente, o crescimento e desenvolvimento das culturas. Pasqual et al. (1992), avaliando diferentes recipientes na micropropagação da amora-preta (*Rubus*

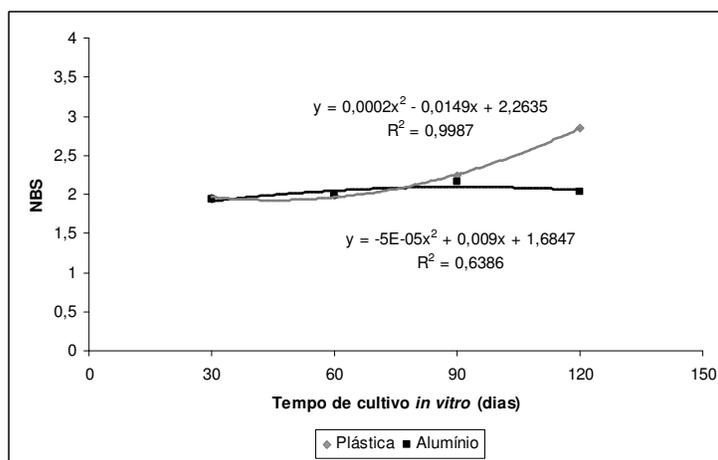
*idaeus* L.), obtiveram maior número de brotos em tubo de ensaio de 100 x 13 mm quando comparado com tubo de ensaio de 150 x 25 mm.

O tamanho do recipiente não influenciou o número médio de brotações, número total de segmentos nodais por plântula e número médio de segmentos nodais por brotação de plântulas de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen) multiplicadas em tubos de ensaio com menor volume (NICOLOSO & ERIG, 2002). A divergência entre os resultados obtidos no presente trabalho e dos autores acima mencionados indica que as respostas *in vitro* em função de fatores como o tipo de recipiente variam com a espécie e as condições de cultivo.



**Figura 10.** Número de brotações por segmento nodal (NBS) em função do tempo de cultivo *in vitro* e do tipo de recipiente.

Para o número de brotos por segmento nodal em função do tempo de cultivo *in vitro* e do tipo de vedação foi observado um comportamento quadrático tendo os explantes cultivados em recipientes com vedação de papel alumínio apresentado uma redução no número de brotos (Figura 11).

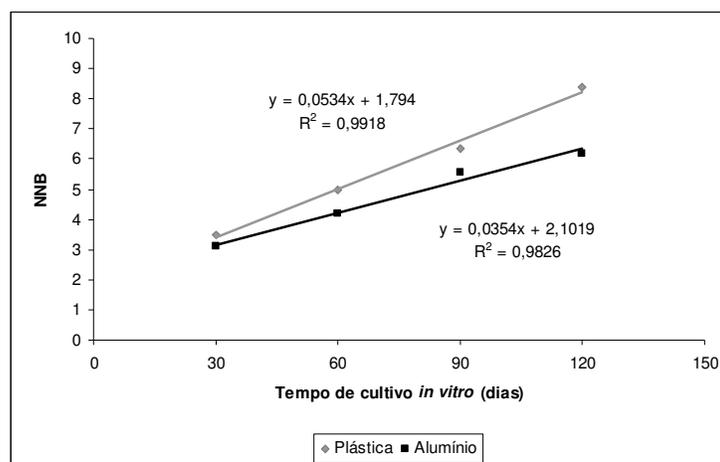


**Figura 11.** Número de brotações por segmento nodal (NBS) em função do tempo de cultivo *in vitro* e do tipo de vedação.

Diversos trabalhos com diferentes tipos de vedação nas mais variadas etapas do cultivo *in vitro* têm sido conduzidos. Em trabalho de controle da vitrificação *in vitro* de carvo (*Dianthus caryophyllus* L.) Cuzzuol et al. (1995) observaram que a taxa de propagação e o comprimento das brotações mantidas em recipientes com tampa de algodão foram menores do que em recipientes com tampa de papel alumínio. Na micropropagação de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) Bandeira et al. (2007) obtiveram melhor resultado em frascos vedados com algodão, relatando que os resultados são justificados pela maior aeração, maior troca gasosa entre o ar atmosférico e o ambiente do interior dos frascos e maior incidência de luminosidade para as plantas.

No estudo de estímulo de enraizamento fotoautotrófico de araticum-bravo (*Annona glabra* L.) Santana et al. (2008) notaram visivelmente maior crescimento das raízes em recipientes com tampa plástica sem película PVC.

O número de nós por brotação adventícia apresentou um comportamento de regressão linear ascendente indicando que o tipo de vedação não inibiu a formação de nós por brotação. Entretanto, explantes inoculados em frascos vedados com papel alumínio apresentaram, em média, um menor acréscimo de nós por brotação adventícia (Figuras 12 e 13).



**Figura 12.** Número de nós por brotação adventícia (NNB) em função do tempo de cultivo *in vitro* e do tipo de vedação.



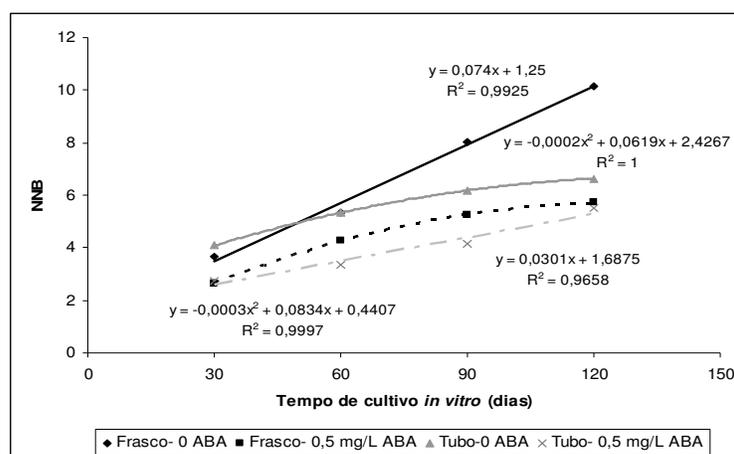
Foto: Micaele Santos

**Figura 13.** Efeito do tipo de vedação no número de nós por brotação adventícia em segmentos nodais de mangabeira na presença de  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de ABA.

A interação tripla tipo de recipiente x concentração de ABA x tempo de cultivo *in vitro* foi significativa para o número de nós por brotação adventícia (Anexo C). Segmentos nodais mantidos em frasco tipo “maionese” na ausência de ABA apresentaram regressão linear positiva para o número de nós por brotação. O mesmo comportamento foi observado em tubo de ensaio na presença de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de ABA, com redução no número médio de nós. Nas demais combinações houve comportamento quadrático (Figura 14). Sá (2009) também obteve redução do crescimento em microestacas de mangabeira na presença de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de ABA.

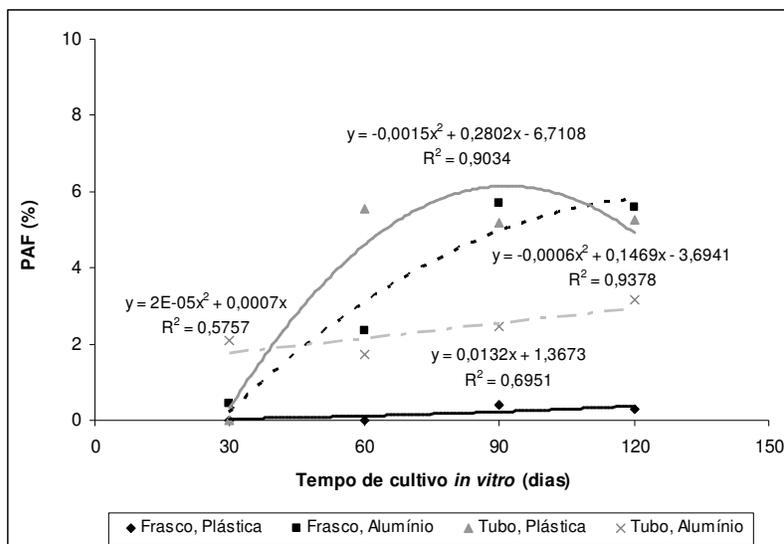
O ABA devido a associação com a dormência e a abscisão é sempre identificado como um inibidor, mas de fato ele apresenta efeitos fisiológicos variados e tem ações tanto de inibição quanto promotoras do desenvolvimento vegetal (BARRUETO CID, 2000). O principal papel do ABA é controlar o início e a manutenção da dormência de sementes e de gemas e as respostas do vegetal ao estresse, em particular o estresse hídrico (TAIZ & ZEIGER, 2004). Na cultura de tecidos esse efeito vai ser direcionado dependendo da espécie em questão, da sua concentração e da relação entre os diferentes reguladores de crescimento aplicados (FOSKET, 1994).

Na conservação *in vitro* de cana-de-açúcar a concentração de 1 mg.L<sup>-1</sup> de ABA foi a que proporcionou a maior longevidade e viabilidade dos explantes, sendo os mesmos mantidos por 12 meses sem a necessidade de subcultivos (LEMOS et al., 2002).



**Figura 14.** Número de nós por brotação adventícia (NNB) em função do tempo de cultivo *in vitro*, do tipo de recipiente e concentração de ABA.

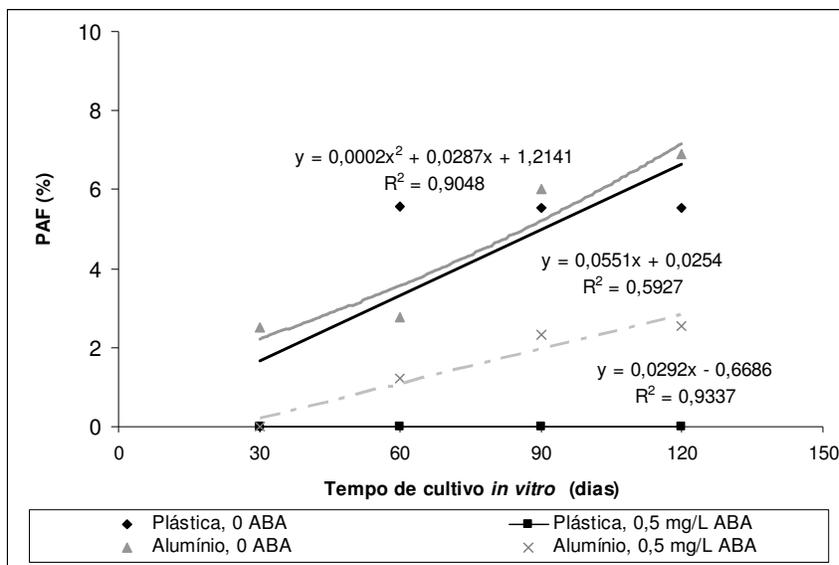
Houve efeito significativo da interação tipo de recipiente x tipo de vedação para a porcentagem de abscisão foliar (Anexo C). A porcentagem de abscisão foliar variou segundo uma regressão linear em função do tempo de cultivo *in vitro* para frasco tipo “maionese” combinado com tampa plástica e para tubo de ensaio com tampa de papel alumínio. Para as outras combinações de tipo de recipiente x tipo de vedação como mostrado na Figura 15 foram observadas regressões quadráticas com as derivadas de equação máximas de 6,38% de abscisão aos 93,4 dias para o tubo de ensaio x vedação plástica e de 5,30% aos 122,42 dias para o frasco tipo “maionese” x vedação de papel alumínio.



**Figura 15.** Porcentagem de abscisão foliar (PAF) em função do tempo de cultivo *in vitro*, do tipo de recipiente e tipo de vedação.

A interação tripla tempo de cultivo *in vitro* x tipo de vedação x concentração de ABA também foi significativa para a porcentagem de abscisão foliar e variou conforme uma regressão linear para a vedação tampa plástica na ausência de ABA e tampa de papel alumínio combinado com  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de ABA (Figura 16). A vedação de papel alumínio na ausência de ABA variou conforme uma regressão quadrática. Não houve abscisão foliar nos explantes mantidos em tampa plástica e  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de ABA, entretanto, nessas condições foi observado 26,70% de morte dos explantes (dado não apresentado).

Explantes mantidos em recipientes com vedação de papel de alumínio na presença de  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de ABA em função do tempo apresentaram menores valores de abscisão foliar. Provavelmente a concentração de etileno nos recipientes vedados com papel alumínio foi menor, reduzindo o processo de abscisão das folhas, devido a maior troca gasosa. Essas variáveis afetam a composição da fase gasosa do frasco e, conseqüentemente, o crescimento e desenvolvimento das culturas (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Associado a este fato, a presença de ABA também reduziu o metabolismo e a abscisão foliar. Trabalhando também com conservação de mangabeira Sá (2009) obteve viabilidade para a conservação das microestacas por um período de três meses em frasco vedados com tampa de papel alumínio.

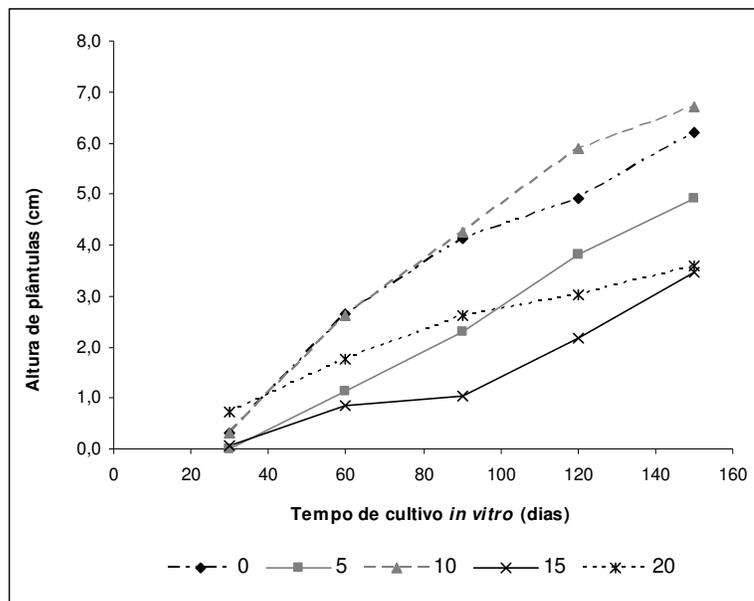


**Figura 16.** Porcentagem de abscisão foliar (PAF) em função do tempo de cultivo *in vitro*, do tipo de recipiente e da concentração de ABA.

#### 4.1.3 Efeito do manitol, do acesso e tempo de cultivo na conservação *in vitro* de plântulas de mangabeira

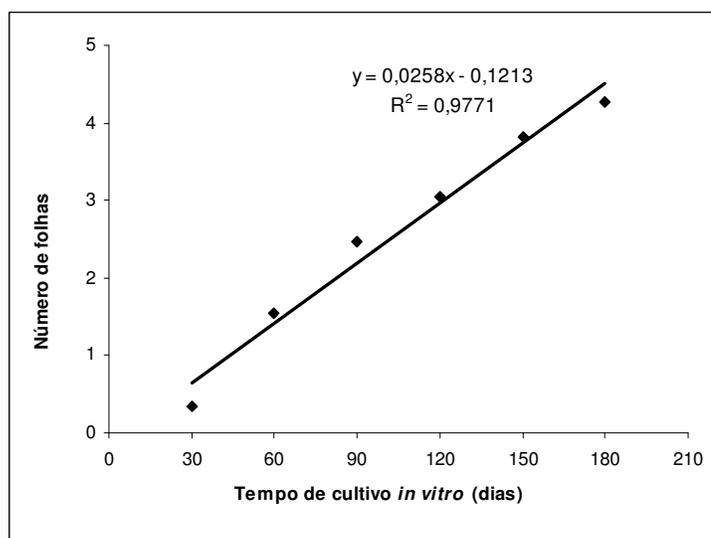
De acordo com a análise de variância, houve efeito significativo do tempo de cultivo *in vitro* para todas as variáveis analisadas, do manitol para a porcentagem de abscisão foliar, da interação manitol x tempo de cultivo *in vitro* para altura da plântula, abscisão foliar e número de raízes e da interação manitol x acesso x tempo de cultivo *in vitro* para a altura de plântulas. Não foi observado efeito significativo da concentração de manitol, do acesso e da interação manitol x acesso para as variáveis: altura da plântula, número de folhas e número de raízes (Anexo D).

Não foi possível estabelecer um modelo de regressão com significado biológico para altura das plântulas, abscisão foliar e número de raízes. Foram observados acréscimos significativos para altura da plântula (Figura 17) em função do tempo de cultivo *in vitro* nas concentrações 0, 5, 10 e 15 g.L<sup>-1</sup> de manitol indicando que nessas concentrações não houve redução no crescimento. Nas concentrações de 15 e 20 g.L<sup>-1</sup> de manitol foram observados os menores valores na altura das plântulas aos 150 dias (3,47; 3,59 cm, respectivamente) de cultivo *in vitro* (dados não apresentados).



**Figura 17.** Altura de plântulas de mangabeira em função da concentração de manitol (mg.L<sup>-1</sup>) e do tempo de cultivo *in vitro*.

O número de folhas de plântulas de mangabeira variou segundo uma regressão linear com acréscimo em função do aumento do tempo de cultivo *in vitro* indicando que as concentrações de manitol testadas não influenciaram na formação de folhas das plântulas (Figura 18).



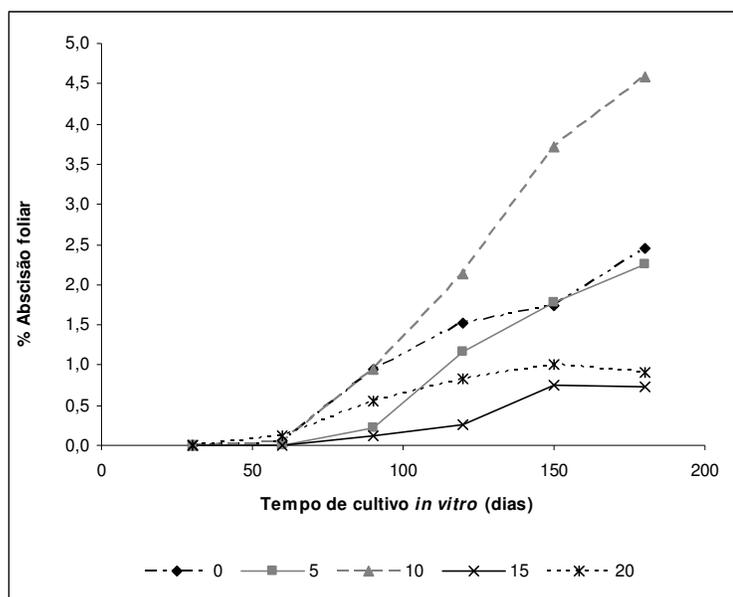
**Figura 18.** Número de folhas de plântulas de mangabeira em função do tempo de cultivo *in vitro* na presença de manitol.

O manitol apresenta um efeito retardante no crescimento e desenvolvimento de um grande número de espécies, e é utilizado com bastante freqüência na conservação *in vitro*. Léo et al. (2007) observaram que a adição de manitol a 24,65 e 32,87 mg.L<sup>-1</sup> promoveu um menor crescimento da parte aérea de plântulas de coqueiro anão verde do

Brasil de Jiqui. Fortes & Pereira (2001) em estudos de conservação de hastes de batata (*Solanum tuberosum* L.) relataram que o manitol reduziu efetivamente o crescimento das hastes, porém apenas 37% dos explantes sobreviveram em três meses de cultivo. Resultado semelhante foi obtido por Sarkar & Naik (1998), que ao adicionar manitol ao meio reduziu o crescimento de hastes de batata, quando comparado com o meio com somente a sacarose como fonte de carboidrato. Provavelmente a ação de inibição do crescimento pelo manitol possa variar em função da espécie e do explante utilizado.

A redução da sacarose para  $20 \text{ g.L}^{-1}$  tornou possível a conservação dos explantes de cana-de-açúcar em crescimento lento por mais tempo do que os reguladores osmóticos manitol e sorbitol combinados com diferentes concentrações de sacarose (LEMOS et al., 2002). Este fato pode ser explicado pela possibilidade da cana-de-açúcar não possuir mecanismos necessários para metabolizar os açúcares alcoóis (sorbitol e manitol), ao contrário de outras espécies vegetais.

A porcentagem de abscisão foliar variou para cada concentração de manitol segundo as médias apresentadas na Figura 19, com acréscimo em função do aumento do tempo de cultivo *in vitro*. As concentrações de 15 e  $20 \text{ g.L}^{-1}$  de manitol induziram menor abscisão foliar nas plântulas de mangabeira e aos 150 e 180 dias de cultivo *in vitro* mantiveram suas médias praticamente constantes. Algumas substâncias químicas apresentam capacidade de inibir a ação do etileno e podem interferir no processo de abscisão foliar (NEPOMUCENO et al., 2007). É provável que o manitol ( $15 \text{ e } 20 \text{ g.L}^{-1}$ ) tenha apresentado o mesmo efeito nas plântulas de mangabeira *in vitro*. Nepomuceno et al. (2007) testando várias concentrações de paclobutrazol (inibidor de crescimento sintético) observaram que o maior número de folhas senescentes ocorreu na ausência do paclobutrazol, e o menor número foi encontrado com a maior ( $13,6 \mu\text{M}$ ) concentração desse composto. Segundo Rademacher (2000), os compostos que atuam inibindo o crescimento vegetal induzem aumento no conteúdo de citocininas, e os níveis de etileno são diminuídos, tendo como conseqüência um retardo na senescência.

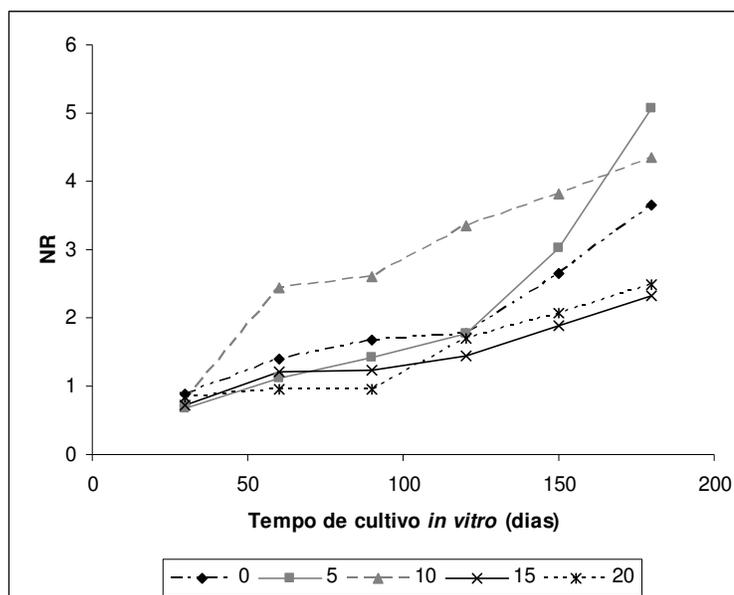


**Figura 19.** Porcentagem de abscisão foliar (PAF) de plântulas de mangabeira em função de da concentração de manitol ( $\text{g.L}^{-1}$ ) e do tempo de cultivo *in vitro*.

A interação manitol x tempo de cultivo *in vitro* foi significativa para o número de raízes. O número de raízes variou para cada concentração de manitol com acréscimo em função do aumento do tempo de cultivo *in vitro* (Figura 20). Aos 30 dias de cultivo *in vitro*

houve pouca variação nas médias observadas para as concentrações de manitol. Aos 180 dias de cultivo *in vitro* o maior número de raízes ocorreu na presença de 5 g.L<sup>-1</sup> de manitol e o menor número de raízes nas concentrações de 15 e 20 g.L<sup>-1</sup>. A inibição da rizogênese pode ser favorável para a manutenção de plântulas de mangabeira *in vitro* em condições de crescimento lento por diminuir a área e capacidade de absorção de nutrientes do meio de cultura.

Estudando o efeito de sacarose e manitol na conservação *in vitro* de coqueiro anão Lédo et al. (2007) observaram aos 365 dias de cultivo o efeito retardante sob o crescimento do sistema radicular das plântulas mantidas em meio de cultura com 0,3 e 0,4 M de manitol, entretanto, nestas concentrações foi observada a necrose das culturas com redução na sobrevivência das plântulas.



**Figura 20.** Número de raízes (NR) em plântulas de mangabeira em função da concentração de manitol (g.L<sup>-1</sup>) e do tempo de cultivo *in vitro*.

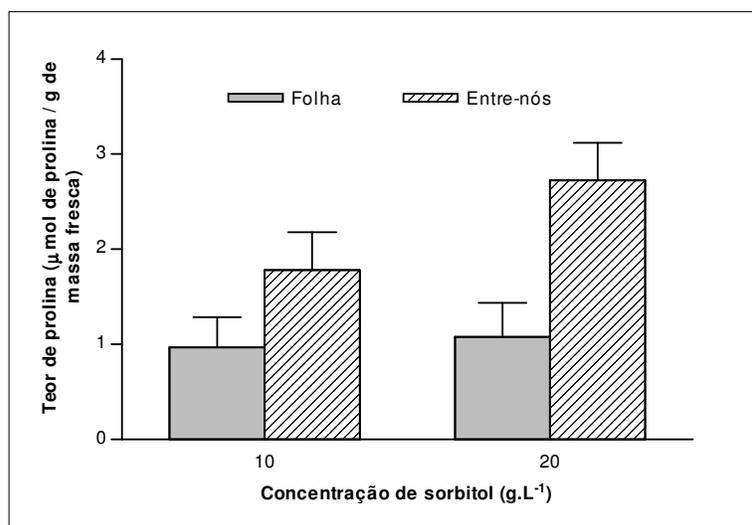
#### 4.1.4 Quantificação de prolina em microestacas submetidas à conservação *in vitro* por crescimento lento

Foram verificadas diferenças significativas nos teores de prolina de explantes mangabeira submetidas à conservação *in vitro* por crescimento lento em função do tipo de amostra vegetal (folhas e entre-nós) e concentração de sorbitol (ANEXO E). Amostras obtidas das folhas de microestacas apresentaram menor teor de prolina em meio de cultura com 10 g.L<sup>-1</sup> (0,97 μmol /g de massa fresca) e 20 g.L<sup>-1</sup> (1,08 μmol /g de massa fresca) de sorbitol. Na presença de 20 g.L<sup>-1</sup> de sorbitol o teor de prolina foi maior nos entre-nós de microestacas (2,73 μmol /g de massa fresca) conforme Figura 21.

A prolina é um aminoácido que presente em pequenas quantidades nas plantas sob estresse se acumula nas células e tem função osmoprotetora, protegendo as membranas de efeitos deletérios, prevenindo a desnaturação de proteínas, preservando a estrutura de enzimas e atuando como tampão para regular o potencial redox celular (NOGUEIRA et al., 2001; MARIN, 2003; GIANNAKOULA et al., 2008). Provavelmente a alta concentração de sorbitol no meio promoveu maior estresse às microestacas e maior acúmulo de prolina nos entre-nós do que nas folhas. Este resultado concorda com o obtido por Potluri Sasikaka & Devi Prasad (1994) que avaliando o efeito do estresse

salino *in vitro* em 10 cultivares de batata, observaram maior acúmulo de prolina no caule das plântulas, discordando dos resultados obtidos em condições de campo onde o maior acúmulo é nas folhas.

Para gramíneas ZEIFNEJAD et al., 1997 relatam que os efeitos associados do estresse hídrico e de altas concentrações de alumínio dos solos causam aumento nos teores de prolina, tanto na parte aérea quanto no sistema radicular, mas que para uma melhor compreensão desses efeitos ainda necessita-se de muitas pesquisas em plantas agronomicamente importantes, pois são raras as informações na bibliografia pertinente.



**Figura 21.** Teores médios de prolina em amostras foliares e de entre-nós de microestacas de mangabeira mantidas sob crescimento lento na presença de 10 e 20 g.L<sup>-1</sup> de sorbitol.

## 4.2 Retomada do crescimento de mangabeira após a conservação *in vitro*

### 4.2.1 Retomada do crescimento de explantes provenientes de meio de conservação com sorbitol e sacarose

Houve efeito significativo da sacarose e do sorbitol na retomada do crescimento dos explantes até os 60 dias (Anexo F). Explantes mantidos na ausência de sacarose na fase de conservação apresentaram maior viabilidade com menor secamento das brotações e morte de folhas (Tabela 2, Figura 22A).

**Tabela 2.** Viabilidade de brotações de mangabeira em meio de crescimento após a conservação *in vitro* em diferentes concentrações de sacarose.

Sacarose (g.L <sup>-1</sup> )	Viabilidade
0	2,96a
15	1,99b

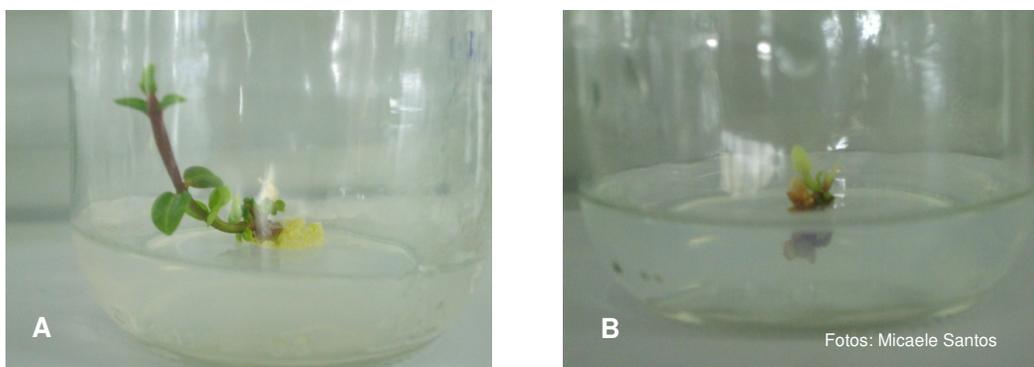
Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Houve efeito significativo da interação entre sorbitol e tempo de cultivo *in vitro* no crescimento dos explantes (Anexo F). Na presença de baixa concentração de sorbitol ( $10 \text{ g.L}^{-1}$ ), os explantes apresentaram maior viabilidade (Tabela 3, Figura 22B) aos 30 e 60 dias de cultivo *in vitro*. Com o aumento do tempo de cultivo *in vitro* os explantes mantidos anteriormente em meio com 20 e  $40 \text{ g.L}^{-1}$  de sorbitol apresentaram crescimento comprometido, com aumento do secamento das brotações e morte das folhas. Esse resultado pode ser explicado pelo efeito deletério do sorbitol observado na fase de conservação quando se utilizou a concentração de  $40 \text{ g.L}^{-1}$ .

**Tabela 3.** Viabilidade de brotações de mangabeira em meio de crescimento após a conservação *in vitro* em diferentes concentrações de sorbitol.

Sorbitol ( $\text{g.L}^{-1}$ )	Tempo de cultivo <i>in vitro</i> (dias)		
	0	30	60
10	3,17aA	3,07aA	2,85aA
20	2,87abA	2,57bA	2,17bB
40	2,65bA	1,52cB	1,37cB

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



**Figura 22.** Viabilidade de explantes de mangabeira aos 60 dias de cultivo *in vitro* em meio de crescimento A- após conservação na ausência de sacarose e na presença de  $10 \text{ g.L}^{-1}$  sorbitol; B- após conservação na ausência de sacarose e presença de  $40 \text{ g.L}^{-1}$  sorbitol.

Os explantes mantidos na presença de  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  de sorbitol apresentaram menor crescimento *in vitro* e menor abscisão foliar na fase de conservação (Tabela 1) e melhor desempenho na retomada do crescimento. Isso pode ser explicado pelo fato de que as culturas com maior crescimento *in vitro* na fase de conservação por apresentar maior metabolismo e abscisão foliar, ao serem submetidas à retomada do crescimento estavam com sua viabilidade parcialmente comprometida.

#### 4.2.2 Retomada do crescimento de explantes provenientes de meio de conservação com ABA

Houve efeito significativo do tempo de cultivo *in vitro* na retomada do crescimento de explantes na presença de ABA (Anexo G). Observou-se que aos 60 dias houve menor viabilidade (1,94) com maior secamento das brotações e morte de folhas (Tabela 4). A aplicação de técnicas de conservação *in vitro* por crescimento lento deve ser eficiente tanto na redução como também na posterior retomada do crescimento para a disponibilidade de material quando necessário. Conforme dados apresentados na Tabela 4, subcultivos a partir dos 30 dias na fase de retomada do crescimento proporcionam melhor viabilidade das culturas.

**Tabela 4.** Viabilidade de brotações de mangabeira em meio de crescimento após a conservação *in vitro* em função do tempo de cultivo *in vitro*.

Tempo de cultivo <i>in vitro</i>	Viabilidade
0	2,62a
30	2,50a
60	1,94b

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Houve interação tripla significativa entre o tipo de recipiente, tipo de vedação e o tempo de cultivo *in vitro* para a retomada do crescimento de explantes (Anexo G). O desdobramento do tempo de cultivo *in vitro* dentro de tipo de recipiente e vedação é apresentado na Tabela 5.

**Tabela 5.** Desdobramento do tempo de cultivo *in vitro* dentro de tipo de recipiente-vedação para a viabilidade de brotações de mangabeira após a conservação *in vitro* na presença de ABA.

Recipiente-Vedação	Tempo de cultivo <i>in vitro</i> (dias)		
	0	30	60
Frasco tipo "maionese"-Tampa Plástica	2,25A	2,25A	2,00A
Frasco tipo "maionese"-Papel Alumínio	2,75A	2,08A	1,25B
Tubo de ensaio - Tampa Plástica	2,75AB	2,83A	2,08B
Tubo de ensaio- Papel Alumínio	2,75A	2,83A	2,42A

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas linhas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Observou-se uma redução significativa na retomada do crescimento dos explantes mantidos em frasco tipo maionese (1,25) vedados com alumínio aos 60 dias. Explantes mantidos em tubos de ensaio com vedação plástica aos 60 dias de cultivo apresentaram menor retomada do crescimento (2,08) quando comparada com 30 dias de cultivo (2,83). Estes resultados reforçam que o primeiro subcultivo deverá ser realizado aos 30 dias após a transferência para meio de retomada do crescimento.

## 5 CONCLUSÕES

- A conservação *in vitro* de segmentos nodais de mangabeira na ausência de sacarose e na presença de 10 ou 20 g.L<sup>-1</sup> de sorbitol é viável sob condições de crescimento lento por 120 dias.

- A conservação *in vitro* de segmentos nodais de mangabeira na presença de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de ácido abscísico em tubos de ensaio vedados com tampa de papel alumínio é viável sob condições de crescimento lento por 120 dias.

- As concentrações de 15 e 20 g.L<sup>-1</sup> de manitol favorecem a conservação por crescimento lento de plântulas de mangabeira germinadas *in vitro* por 180 dias.

- Ocorre maior acúmulo de prolina em entre-nós do que em folhas de microestacas de mangabeira na presença de 10 e 20 g.L<sup>-1</sup> de sorbitol.

- Houve maior acúmulo de prolina em folhas e entre-nós de microestacas de mangabeira na presença de 20 g.L<sup>-1</sup> de sorbitol.

- Explantes mantidos na ausência de sacarose ou na presença de 10 g.L<sup>-1</sup> de sorbitol na fase de conservação apresentam maior viabilidade na retomada do crescimento até os 60 dias de cultivo.

- Explantes mantidos na presença de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de ABA na fase de conservação apresentam maior viabilidade na retomada do crescimento aos 30 dias de cultivo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL JALEEL, C.; MANIVANNAN, P. KISHOREKUMAR, A.; SANKAR, B; GOPI, R.; SOMASUNDARAM, R.; PANEERSELVAM, R. Alterations in osmoregulations, antioxidant enzymes and indole alkaloid levels in *Catharanthus roseus* exposed to water deficit. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 59, n.2, p. 150-157, 2007.

ALOUFA, M. A. I. Multiplicação e conservação *in vitro* de mangabeira. Simpósio Brasileiro sobre a cultura da mangaba, 1., 2003, Aracaju, SE. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DA MANGABA, 1. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2003. Disponível em CD-ROM.

AMARAL, L. **Conservação e propagação *in vitro* de três cultivares híbridas de Amarilis**. 2005. 119 p. Dissertação (Mestrado) Instituto Agrônomo (IAC). Campinas.

BAHIA. **Inventário de plantas medicinais e do estado da Bahia**. Salvador, 1979, p. 679-680.

BANDEIRA, J. de M.; LIMA, C. S. M.; RUBIN, S.; RIBEIRO, M. V.; FALQUETO, A. R.; PETERS, J. A.; BRAGA, E. J. B. Diferentes tipos de vedações dos frascos e concentrações de sacarose na micropropagação de *Thymus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 472-474, jul. 2007.

BARBOSA, F. B. C. A biotecnologia e a conservação da biodiversidade amazônica, sua inserção na política ambiental. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, Brasília, v.18, n.2, p.69-94, mai./ago. 2001.

BARRUETO CID, L. P. **Introdução aos hormônios vegetais**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, 2000. 180 p.

BATES, L. S.; WALDREN, R. P.; TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil**, v. 39, p. 205-207, 1973.

BLOSSFELD, H. **Mangabeira-de-goiás**. Chácaras e Quintais, São Paulo, v. 116, n.1, p.14, jul. 1967.

BOFF, L. Biodiversidade e novo paradigma. <http://www.terrazul.m2014.net/spip.php?article339>. Acessado em 25 mai. 2009.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. 4. ed. Natal, RN: Universitária UFRN, 1960. 540 p.

BRAUN, R. Biodiversidade: o impacto da biotecnologia. Federação Européia de Biotecnologia. **Boletim Informativo**, n. 11, out. 2001.

CANTO, A. M. M. E.; SOUZA, F. V. D.; COSTA, M. A. C. SOUZA, A. S.; LEDO, C. A. S.; CABRAL, J. R. S. Conservação *in vitro* de germoplasma de abacaxi tratado com paclobutrazol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 7, p. 717-720, jun. 2004.

CHARRIER, A., DEREUDDRE, J., ENGELMANN, F. The implications of biotechnology in germplasm conservation and utilization. *Crop Genetic Resources of Africa*. v.2. N.Q. Ng ,P. Perrino, F. Attere, H. Zedan ed., Ibadan, Nigeria, IITA/IBPGR/UNEP/CNR, In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON CROP GENETIC RESOURCES OF AFRICA. **Proceedings...** pp. 279-286. 1991.

CRONQUIST, A. **The evolution in classification of flowering plants**. 2. ed. Bronx: The New York Botanical Garden, 1988. 555 p.

CUZZUOL, G. R. F.; GALLO, L. A.; ALMEIDA, M. de; CROCOMO, O. J. Controle da vitrificação do cravo (*Dianthus caryophyllus* L.) *in vitro*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 52, n. 3, p. 604-614, set./dez. 1995.

DE LANGHE, E. A. L. The role of *in vitro* techniques in germplasm conservation. In: HOLDEN, J. H. W.; WILLIAMS, J.T. (Ed.). **Crop genetic resources: conservation and evaluation**. London: Allen and Unwin, 1984. p. 131-137.

DUMET, D; ENGELMANN, F.; CHABRILLANGE, N.; DUVAL, Y.; DEREUDDRE, J. Importance of source for the acquisition of tolerance to desiccation and cryopreservation of oil palm somatic embryos. **Cryo-Letters**, London, n. 14, p. 243-250, 1993.

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

FERREIRA, E. G.; LEMOS, E. E. P.; SOUZA, F. X. ; LOURENCO, I. P.; LEDERMAN, I. E.; BEZERRA, J. E. F.; SILVA JUNIOR, J. F. da; BARROS, L. M.; RUFINO, M. S. M.; OLIVEIRA, M. E. B. Frutíferas. In: SAMPAIO, E. V. S. B.; PAREYN, F. G. C.; FIGUEIRÔA, J. M.; SANTOS JUNIOR, A.G. (Org.). **Espécies da flora nordestina de importância econômica potencial**. Recife: Associação Plantas do Nordeste, 2005, p. 49-100.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., **Anais...** UFSCar, São Carlos, SP, jul. 2000. p. 255-258.

FERREIRA, M. B. Frutos comestíveis do Distrito Federal. III. Pequi, mangaba, marolo e mamãozinho. **Cerrado**, Brasília, v.5, n.20, p. 22-25, 1973, EMBRAPA-SPI, EMBRAPA-CNPq, 1998.

FOSKET, D. E. **Plant growth and development: a molecular approach**. San Diego: Academic, 1994. 580 p.

FORTES, G. R. L.; PEREIRA, J. E. S. Preservação *in vitro* da batata com ácido salicílico e duas concentrações de carboidrato. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 10, p. 1261-1264, out. 2001.

GARCIA, E. S. Biodiversidade, biotecnologia e saúde. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 3, p. 491-494, jul./set. 1995.

GOEDERT, C. O. **Histórico e avanços em recursos genéticos no Brasil**. In: NASS, L. L. (Ed.). Recursos genéticos vegetais, Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 25-60, 2007.

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

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P.D. Plant tissue culture. In: GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P.D. (Ed.). **Plant propagation by tissue culture**: handbook and directory of commercial laboratories. Eversley: Exegetics, 1984. p. 1-38.

GIACOMETTI, D. C. The management of genetic resources as a component of biological diversity. **Diversity**, Bethesda, v. 8, n. 3, p. 10-13, 1993.

GIANNAKOULA, A.; MOUSTAKAS, M.; MYLONA, P.; PAPADAKIS, I.; YUPSANIS, T. Aluminum tolerance in maize is correlated with increased levels of mineral nutrients, carbohydrates and proline, and decreased levels of lipid peroxidation and al accumulation. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 165, n. 4, p. 385-396, 2008.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C. e CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**, Brasília, EMBRAPA-SPI, EMBRAPA-CNPq, 1998, v. 1, p. 183-260.

GUBIS, J.; VANKOVÁ, R.; CERVENÁ, V.; DRAGÚNOVÁ, M.; HUDCOVICOVÁ, M.; LICHTNEROVÁ, H.; DOKUPIL, T.; JUREKOVÁ, Z. Transformed tobacco plants with increased tolerance to drought. **South African Journal of Botany**, Pretoria, v. 73, n. 4, p. 505-511, 2007.

IBGE. **Produção da extração vegetal e da silvicultura - 2007**. Rio de Janeiro. <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=289&z=t&o=18&i=P>. Acessado em 16 mar. 2010.

ISLAM, M.T.; LEUNUFA, S.; DEMBELE, P.; KELLER J. E. R. *In vitro* conservation of four mint (*Mentha* spp.) accessions. **Plant Tissue Culture**, v.13, n.1 p. 37-46, 2003.

JONES, H. G.; JONES, M. B. Introduction: some terminology and common mechanisms. In: JONES, H. G.; FLOWERS, T. J.; JONES, M. B. (Org.). **Plants under stress**. Cambridge University Press, 1992. cap. 1, p. 1-10.

KAVI KISHOR, P. B.; SANGAM, S.; AMRUTHA, R. N.; SRI LAXMI, P.; NAIDU, K. R.; RAO, K. R. S. S.; RAO, S.; REDDY, K. J.; THERIAPPAN, P.; SREENIVASULU, N. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. **Current Science**, v. 88, n. 3, p. 424-438, 2005.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: RiMa Artes e Textos, 2000. 531 p.

LEDERMAN, I. E.; SILVA JÚNIOR, J. F.; BEZERRA, J. E. F.; ESPÍNDOLA, A. C. M. **Mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes)**. Jaboticabal: Ed. São Paulo, 2000. 35 p. (Série frutas nativas, 2).

LÉDO, A. S.; CUNHA, A. O.; ARAGÃO, W. M.; TUPINAMBÁ, E. A. Efeito da sacarose e do manitol na conservação *in vitro* por crescimento lento de coqueiro anão. **Magistra**, Cruz das Almas, BA, v.19, n. 4, p. 346-351, out./dez., 2007.

LEMOS, E. E. P.; FERREIRA, M. S.; ALENCAR, L. M. C.; NETO, C. E. R.; ALBUQUERQUE, M. M. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 10, p. 1359-1364, out. 2002.

LEMOS, R.P.; ALVES, E.F.; SILVA, H. et al. Características pomológicas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomez) da Paraíba In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 10, Fortaleza, 1989. **Anais...** Fortaleza: SBF, p.346-351, 1989.

LEWIN, B. **Genes VII**. New York: Oxford University Press, 2000. 990p.

LAMBARDI M.; BENELLI C.; DE CARLO A.; FABBRI A.; GRASSI S.; LYNCH, P.T. Medium- and long-term *in vitro* conservation of olive germplasm (*Olea europea* L.). **Acta Horticulture**, v. 586, p. 109-112, 2002.

MANTELL, S.H.; MATHEWS, J.A.; MCKEE, R.A. **Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1994. 344p.

MALAURIE, B.; TROUSLOT, M. F.; BERTHAUD, J.; BOUSALEM, M.; PINEL, A.; DUBERN, J. Medium-term and long-term *in vitro* conservation and safe international exchange of yam (*Dioscorea* spp.) germplasm. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaiso, Chile, v. 1, n. 3. 1998, Disponível em: <http://www.ejb.org/content/vol1/issue3/full/3/index.html>. Acesso em: 22 jan. 2010.

MARIN, A. **Influência associada do estresse hídrico e do alumínio na germinação e crescimento inicial de guandu (*cajanus cajan* (L.) Millsp)**. 2003. 87 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2003.

MATYSIK, J.; ALIA; BHALU, B.; MOHANTY, P. Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. **Current Science**, Bangalore, v. 82, n. 5, p. 525-532, 2002.

MCT, Ministério da Ciência e Tecnologia. Programa de biotecnologia e recursos genéticos. Definição de Metas. [http://www.ctnbio.gov.br/upd\\_blob/0000/9.pdf](http://www.ctnbio.gov.br/upd_blob/0000/9.pdf). Acessado em 25 mai. 2009.

MILNER-WHITE, E. J.; BELL, L.H.; MACCALUM, P. H. Pyrrolidine ring puckering in *cis* and *trans*-proline residues in proteins and polypeptides: Different puckers are favoured in certain situations. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 228, n. 3, p. 725-734, 1992.

MONACHINO, J.A. A revision of *Hancornia* (Apocynaceae). **Lilloa**, Tucumán, v. 11, p. 19-48. 1945.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

NEGASH, A.; KRENS, F.; SCHAART, J.; VISSER, B. *In vitro* conservation of enset under slow-growth conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 66, n. 2, p. 107-111, 2001.

NEPOMUCENO, C. F.; RIOS, A. P. S.; QUEIROZ, S. R. O. D.; PELACANI, C. R.; SANTANA, J. R. F. Controle da abscisão foliar e morfogênese *in vitro* em culturas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb) Altschuh. **Revista Árvore**, Viçosa, v.31, n. 5, p. 967-975, 2007.

NICOLOSO, F. T.; ERIG, A. C. Efeito do tipo de segmento nodal e tamanho do recipiente no crescimento de plantas de *Pfaffia glomerata in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras. Edição Especial, p. 1499-1506, dez., 2002.

NOGUEIRA, R. J. M. C.; MORAES, J. A. P.; BURITY, H. A.; BEZERRA NETO, E. Alterações na resistência à difusão de vapor das folhas e relações hídricas em aceroleiras submetidas a déficit de água. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campinas, v. 13, n. 1, p. 755-787, 2001.

PASQUAL, M.; REZENDE, R. K. S.; VILLA, F.; CHAGAS, E. A. Biotecnologia aplicada ao melhoramento de fruteiras. In: BRUCKNER, C. H. (Ed.). **Fundamento de melhoramento de Fruteiras**. Viçosa: Editora Universidade Federal de Viçosa, 2008, p. 117-170.

PASQUAL, M.; RIBEIRO, V. G.; BARROS, I. de; RAMOS, J. D. Propagação "*in vitro*" da amora-preta (*Rubus idaeus* L.) cv. Ébano: influência do fotoperíodo e tamanho do recipiente. **Ciência e Prática**, Lavras, v. 16, n. 2, p. 270-274, 1992.

PEREIRA-NETTO, A. B. de; MCCOWN, B. H. Reguladores de crescimento *in vitro*. In: SILVA JUNIOR, J. F. da; LÉDO, A. da. (Ed.). **A cultura da mangaba**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2006. p. 135-152.

PEREIRA-NETTO, A. B. de; MCCOWN, B. H. Thermally induced changes in shoot morphology of *Hancornia speciosa* microcultures: evidence of mediation by ethylene. **Tree Physiology**, Victoria, Canada, v. 19, p. 733-740, 1999.

PIO CORRÊA, M. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: IBDF, 1969. v. 5, p. 82.

POTLURI SASIKALA, D. P.; DEVI PRASAD, P. V. Salinity effects on *in vitro* performance of some cultivars of potato. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 6, n. 1, p.1-6, 1994

RADEMACHER, W. Growth retardants: effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 51, p.501-531, 2000

RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B.; PINTO, C.A.B. **Genética na agropecuária**. Lavras: Editora UFLA, 2000. 472p.

RIZZO, J.A.; MONTEIRO, M.S.R.; BITENCOURT, C. Utilização de plantas medicinais em Goiânia. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 36., 1985, Curitiba, PR. **Anais...** Brasília: Sociedade Botânica do Brasil/ IBAMA, 1990, v. 2, p. 691-707.

ROCA, W. M.; ARIAS, D. I.; CHAVÉZ, R. Métodos de conservación *in vitro* del germoplasm. In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. (Ed.). **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali: CIAT, 1991. p. 697-712.

ROMERO, T. Plantas do Futuro. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento. <http://www.cenargen.embrapa.br/cenargenda/noticias2007/biotecnologia100107.pdf> . Acessado em 06 mai. 2009.

SÁ, A. J. de. **Avanços na propagação e conservação *in vitro* da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) nativa da região Nordeste.** São Cristóvão, 2009, 67 p. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas). Núcleo de Pós-Graduação e Estudos em Recursos Naturais, Universidade Federal de Sergipe.

SÁ, A. de J.; LÉDO, A. S. da; SILVA JUNIOR, J. F. da. Efeito do manitol na conservação *in vitro* de microestacas de mangabeira nativa da região Nordeste. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 17.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 4. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. **Anais...**, 2009.

SANTANA, J. R. F. de; PAIVA, R.; RESENDE, R. K. S.; CASTRO, E. M. de; PEREIRA, F. D.; OLIVEIRA, L. M. Estímulo do comportamento fotoautorófico durante o enraizamento *in vitro* de *Annona glabra* L. , II. Aspectos da anatomia da folha antes do aclimatização. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 2, p. 640-644, mar./abr., 2008.

SAS INSTITUTE INC. SAS/STAT User's Guide. v. 8.0. Vol. I. Cary NC: SAS Institute, Inc., 2000.

SARKAR, D.; NAIK, P. S. Factors affecting minimal growth conservation of potato microplants *in vitro*. **Euphytica**, Dordrecht, v. 102, n. 2, p. 275-280, 1998.

SHIBLI, R. A; SHATNAWI. M. A.; SUBAIH. W. S.; AJLOUOMI, M. M. *In vitro* conservation and cryopreservation of plant genetic resources: A review. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 2, n. 4, p. 372-382, 2006.

SHIBLI, R. A; SHATNAWI. M. A.; SUBAIH. W. S.; AJLOUOMI, M. M.; JARADAT, A.; ADHAM, Y. Slow growth *in vitro* conservation of bitter almond (*Amygdalus communis* L.). **Advances in Horticultural Science**, v. 13, p. 133-134, 1999.

SILVA JUNIOR, J. F.; LEDO, A. S. Botânica. In: SILVA JUNIOR, J. F.; LEDO, A. S. (Ed) **A cultura da mangaba.** Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2006, p.25-33.

SILVA JUNIOR, J. F.; ARAÚJO, I. A. de; BARREIRO NETO, M.; ESPÍNDOLA, A. C. de M.; CARVALHO, N. S. G. de; MOTA, D. M.. Recursos genéticos nos Tabuleiros Costeiros e Baixada Litorânea do Nordeste. In: SILVA JUNIOR, J. F.; LEDO, A. S. (Ed.) **A cultura da mangaba.** Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2006, p.57-74.

SILVA JUNIOR, J. F. A cultura da mangaba. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 1, p. 1-192. 2004.

SILVA JUNIOR, J. F. Recursos genéticos da mangabeira nos tabuleiros costeiros e baixada litorânea do Nordeste do Brasil. Simpósio Brasileiro sobre a cultura da mangaba, 1., 2003, Aracaju, SE. **Anais...** Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2003. Disponível em CD-ROM.

SILVEIRA, D. C.; SOUZA, F. V. D.; PELACANI, C. R.; SOUZA, A. da S.; LEDO, C. A. da; SANTANA, J. R. F. de. Micropropagation and *in vitro* conservation of *Neoglaziovia variegata* (Arr. Cam.) mez, a fiber producing bromeliad from Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 4, p. 923-932, 2009.

SILVEIRA, J. A. G.; ROCHA, I. M. A.; VIÉGAS, R. A. **Metabolic responses of cowpea and cashew plants exposed to salt and water stress: new aspects on proline accumulation.** 2002. Disponível em: <sbbrq.iq.usp.br/arquivos/regional/2002/cdresumo/Palestras/016.pdf>.

SOARES, F. P.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R. C. OLIVEIRA, L. M. SILVA, D. R.; PAIVA, P. D. O. Cultura da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). Boletim Agropecuário. [http://www.editora.ufla.br/BolTecnico/pdf/bol\\_67.pdf](http://www.editora.ufla.br/BolTecnico/pdf/bol_67.pdf). Acessado em 31 mar. 2009.

SOUSA, C. S.; MOREIRA, M. J. S.; BASTOS, L. P.; COSTA, M. A. P. C.; ROCHA, M. A. C.; HANSEN, D. S. Germinação e indução de brotações *in vitro* utilizando diferentes reguladores vegetais em mangabeira (*Hancornia speciosa*). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 276-278, jul. 2007.

SOUZA, F. V. D.; SOARES, T. L.; CABRAL, J. R. S.; CARDOSO, J. L.; BENJAMIN, D. A. Slow-growth conditions for the *in vitro* conservation of pineapple germplasm. **Acta Horticulturae**, v. 702, p. 41-47, 2006.

SOUZA, A. da S.; COSTA, M. A. P. de C.; SANTOS-SEREJO, J. A. dos.; JUNGHANS, T.G.; SOUZA, F. V. D. Introdução à cultura de tecidos de plantas. In: SOUZA, A. da S.; JUNGHANS, T. G. **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas. Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. p. 11-37, 2006.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2ª edição, Nova Odessa, São Paulo. Instituto Plantarum, 2008. 703 p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Trad. Eliane Romanato Santarém et al. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas** v. 2,1ed. Brasília: Embrapa SPI/ Embrapa-CNPQ, 1999. 355p.

VALOIS, A. C. C. Conservação de germoplasma vegetal "*ex situ*". In: **CURSO DE CONSERVACAO DE GERMOPLASMA**, 1994, Brasília. Brasília: EMBRAPA, 1994. n.p.

VERSLUES, P. E., BRAY, E. A. Role of abscisic acid (ABA) and Arabidopsis thaliana ABA-insensitive loci in low water potential-induced ABA and proline accumulation. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 1, p. 201-212, 2006.

VIEIRA NETO, R. D. Mangaba. In: VIEIRA NETO, R. D. **Fruteiras potenciais para os tabuleiros costeiros e baixada litorânea**. Aracaju: Embrapa-CPATC/Emdagro. p. 115-140, 2002.

VILELA-MORALES, E. A.; VALOIS, A. C. C. Recursos genéticos vegetais autóctones e seus usos no desenvolvimento sustentável. Caderno de ciência e tecnologia, Brasília, v. 17, n. 2, p. 11-42, mai/ago 2000.

ZAFNEJAD, M.; CLARK, R.B.; SULLIVAN, C.Y. Aluminum and water stress effects on growth and proline of sorghum. **Journal of Plant Physiology**, v.150, n.3, p.338-344, 1997.

WISNIEWSKI, A.; MELO, C.F.M. de. **Borrachas naturais brasileiras. III. Borracha de mangabeira**. Belém, PA: EMBRAPA-CPATU, 1982. 59p. (EMBRAPA-CPATU. Documentos, 8).

WITHERS, L. A. *In vitro* conservation. In: HAMMERSCHLAG, F. A.; LITZ, R. A. (Ed.). **Biotechnology of perennial fruit crops**. Wallingford: CAB International, 1992. p. 160-200.

WITHERS, L. A. New technologies for the conservation of plant genetic resources. In: INTERNATIONAL CROP SCIENCE CONGRESS, 1992, Ames, Iowa. **Proceeding...** Madison: CSSA, 1993.

WITHERS, L. A. Questionnaire circulated to workers and institutes. In: WITHERS, L. A. (Ed.). **Institutes working on tissue culture for genetic conservation**. Rome: International Board for Plant Genetic Resources, 1982. p. 41-43.

WITHERS, L. A. **Tissue culture storage for genetic conservation**. Rome: IBPGR, 1980.

WITHERS, L. A.; ENGELS, J. M. M. The test tube genebank: a safe alternative to field conservation. **IBPGR Newsletter for Asia and the Pacific**, v. 3, p. 1-2, 1990.

WITHERS, L. A.; WILLIAMS, J. T. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas. In: Torres, A. C.; Caldas, L. S.; Buso, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI, 1998. p. 297-330.

WITHERS, L. A.; WILLIAMS, J. T. *In vitro* conservation of plant genetic resources: the IBPGR Programme. In: DAMBROTH, M. (Ed.). Fifteen years of collection and utilization of plant genetic resources by the Institute of Crop Science and Plant Breeding. **Proceedings of a symposium...** Braunschweig: FAL, 1986. p. 59-76.

**ANEXOS**

Anexo A	Resumo do quadro de análise de variância do efeito do sorbitol, sacarose e tempo de cultivo no número de brotações adventícias por segmento nodal (NBS), número de nós por brotação adventícia (NNB) e porcentagem de abscisão foliar (PAF) em segmentos nodais de mangabeira	42
Anexo B	Contrastes entre a média dos tratamentos e a testemunha para número de brotações adventícias por segmento nodal (NBS), número de nós por brotação adventícia (NNB) e porcentagem de abscisão foliar (PAF)	42
Anexo C	Resumo do quadro de análise de variância do efeito do ácido abscísico (ABA), tipo de recipiente, tipo de vedação e tempo de cultivo <i>in vitro</i> no número de brotações adventícias por segmento nodal (NBS), número de nós por brotação adventícia (NNB) e porcentagem de abscisão foliar (PAF) em segmentos nodais de mangabeira	43
Anexo D	Resumo do quadro de análise de variância do efeito do manitol, acesso e tempo de cultivo <i>in vitro</i> na altura (ALT), número de folhas (NF), porcentagem de abscisão foliar (PAF) e número de raízes (NR) de plântulas de mangabeira germinadas <i>in vitro</i>	43
Anexo E	Médias, desvio da média e intervalos de confiança dos teores de prolina quantificados em tecidos foliares e entre-nós de microestacas de mangabeira sob crescimento lento na presença de sorbitol	44
Anexo F	Resumo do quadro de análise de variância da viabilidade de explantes na retomada do crescimento em função da concentração de sorbitol, de sacarose e do tempo de cultivo <i>in vitro</i> utilizados na conservação	44
Anexo G	Resumo do quadro de análise de variância da viabilidade de explantes na retomada do crescimento em função do tipo de recipiente, tipo de vedação e tempo de cultivo <i>in vitro</i> utilizados na conservação na presença de ácido abscísico	44

**Anexo A.** Resumo do quadro de análise de variância do efeito do sorbitol, sacarose e tempo de cultivo no número de brotações adventícias por segmento nodal (NBS), número de nós por brotação adventícia (NNB) e porcentagem de abscisão foliar (PAF) em segmentos nodais de mangabeira.

FV	GL	QM		
		NBS <sup>1</sup>	NNB <sup>1</sup>	PAF <sup>2</sup>
Sacarose (Sac)	1	1,9433**	8,1488**	1,8208**
Sorbitol (Sorb)	2	2,5344**	5,9790**	0,8625**
Sac x Sorb	2	1,5709**	5,5785**	0,2411
Fatorial x Testemunha	1	1,0941**	13,3670**	0,1689
Erro a	130	0,1540	0,4271	0,0968
Tempo	3	1,2557**	19,3174**	0,6518**
Sac x Tempo	3	0,1279*	0,2495	0,0980**
Sorb x Tempo	6	1,0526**	1,968**	0,0425*
Sac x Sorb x Tempo	6	0,0617	0,1517	0,0467
Erro	332	0,0415	0,0997	0,0197
CV %		13,00	13,78	70,78

<sup>1</sup> Dados transformados para  $\sqrt{x + 0,5}$ ; <sup>2</sup> Dados transformados para  $\arcsen \sqrt{x}$   
\* e \*\* significativo a 5 e 1 % de probabilidade, respectivamente, pelo teste de F.

**Anexo B.** Contrastes entre a média dos tratamentos e a testemunha para número de brotações adventícias por segmento nodal (NBS), número de nós por brotação adventícia (NNB) e porcentagem de abscisão foliar (PAF).

Contraste	NBS <sup>1</sup>	NNB <sup>1</sup>	PAF (%) <sup>2</sup>
T1 – T7	-0,1760*	-0,7269*	-0,2044*
T2 – T7	0,1800*	-0,0664	-0,0851*
T3 – T7	-0,1769*	-0,4566*	-0,1059*
T4 – T7	-0,1429*	-0,1874*	0,1340*
T5 – T7	-0,2329*	-0,6408*	-0,0573
T6 – T7	-0,2222*	-0,7577*	0,0041

\* significativo a 5% de probabilidade pelo teste de Dunnett. T7-Testemunha (MS Padrão); T1-0 sacarose + 10 sorbitol (g.L<sup>-1</sup>); T2 - 15 sacarose + 10 sorbitol (g.L<sup>-1</sup>); T3- 0 sacarose + 20 sorbitol (g.L<sup>-1</sup>); T4- 15 sacarose + 20 sorbitol (g.L<sup>-1</sup>); T5- 0 sacarose + 40 sorbitol (g.L<sup>-1</sup>); T6- 15 sacarose + 40 sorbitol (g.L<sup>-1</sup>).

<sup>1</sup> Dados transformados para  $\sqrt{x + 0,5}$ ; <sup>2</sup> Dados transformados para  $\arcsen \sqrt{x}$ .

**Anexo C.** Resumo do quadro de análise de variância do efeito do ácido abscísico (ABA), tipo de recipiente, tipo de vedação e tempo de cultivo *in vitro* no número de brotações adventícias por segmento nodal (NBS), número de nós por brotação adventícia (NNB) e porcentagem de abscisão foliar (PAF) em segmentos nodais de mangabeira.

FV	GL	QM		
		NB	NSB	PAF
Recipiente (Rec)	1	0,4834*	2,2687*	0,1078
Vedação	1	0,2545	3,3239**	0,0178
ABA	1	0,1453	10,2875**	0,5588**
Rec x Vedação	1	0,0001	0,1213	0,2157*
Vedação	1	0,0817	0,3587	0,0784
Tampa x ABA	1	0,0092	0,3494	0,0288
Rec x Vedação x ABA	1	0,0396	1,1837	0,2630*
Erro a	88	0,0974	0,3555	0,0384
Tempo	3	0,0838	6,5147**	0,0926**
Rec x Tempo	3	0,1360*	0,9546	0,0098
Vedação x tempo	3	0,1452**	0,2970*	0,0103
ABA x Tempo	3	0,0597	0,1144	0,0289*
Rec x Vedação x Tempo	3	0,0279	0,01442	0,0585**
Rec x ABA x Tempo	3	0,0415	0,3902**	0,0090
Vedação x ABA x Tempo	3	0,0454	0,0418	0,0303*
Rec x Vedação x ABA x Tempo	3	0,0648	0,2903	0,0575
Erro b	210	0,0373	0,0985	0,0086
CV %		12,11	13,74	148,90
Média Geral		1,59	2,28	0,06

\* e \*\* significativo a 5 e 1 % de probabilidade, respectivamente, pelo teste de F.

**Anexo D.** Resumo do quadro de análise de variância do efeito do manitol, acesso e tempo de cultivo *in vitro* na altura (ALT), número de folhas (NF), porcentagem de abscisão foliar (PAF) e número de raízes (NR) de plântulas de mangabeira germinadas *in vitro*.

FV	GL	QM			
		ALT (cm)	NF	PAF	NR
Manitol	4	61,3818	24,3507	17,9798*	16,2579
Acesso	1	31,0320	0,6407	4,1607	9,2042
Manitol x Acesso	4	40,7126	13,8193	1,5761	2,9293
Erro a	30	49,1220	17,8913	5,4455	8,8780
Tempo	5	157,3358**	85,6119**	33,4765**	39,6230**
Manitol x Tempo	20	4,7884*	3,3504	3,4668**	2,0626*
Acesso x Tempo	5	0,8056	2,0280	0,5860	2,3750
Manitol x Acesso x Tempo	20	5,0637*	3,0994	0,5065	0,4648
Erro b	150	2,6741	2,5690	0,9115	1,1440
CV%		50,61	62,02	99,36	53,21
Média Geral		32,313	25,842	0,9608	20,100

\* e \*\* significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste de F.

**Anexo E.** Médias, desvio da média e intervalos de confiança dos teores de prolina quantificados em tecidos foliares e entre-nós de microestacas de mangabeira sob crescimento lento na presença de sorbitol.

Tratamentos	Médias	Desvio Padrão	Intervalo de confiança inferior*	Intervalo de confiança superior*
Folhas + 10 g L <sup>-1</sup> sorbitol	0,97	0,32	0,17	1,77
Entre-nós + 10 g L <sup>-1</sup> sorbitol	1,78	0,40	0,79	2,77
Folhas + 20 g L <sup>-1</sup> sorbitol	1,08	0,36	0,20	1,96
Entre-nós + 20 g L <sup>-1</sup> sorbitol	2,73	0,39	1,56	3,70

**Anexo F.** Resumo do quadro de análise de variância da viabilidade de explantes na retomada do crescimento em função da concentração de sorbitol, de sacarose e do tempo de cultivo *in vitro* utilizados na conservação.

FV	GL	QM
Sacarose (Sac)	1	85,07**
Sorbitol (Sorb)	2	42,41**
Sacarose x Sorbitol	2	9,55
Erro a	114	4,62
Tempo	2	18,26**
Sacarose x Tempo	2	0,69
Sorbitol x Tempo	4	3,60**
Sac x Sorb x Tempo	4	0,88
Erro b	228	0,562
CV%		30,29
Média Geral		2,47

\* e \*\* significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste de F.

**Anexo G.** Resumo do quadro de análise de variância da viabilidade de explantes na retomada do crescimento em função do tipo de recipiente, tipo de vedação e tempo de cultivo *in vitro* utilizados na conservação na presença de ácido abscísico.

FV	GL	QM
Recipiente	1	9,51
Vedação	1	0,01
Recipiente x Vedação	1	0,56
Erro a	44	5,47
Tempo	2	6,44**
Recipiente x Tempo	2	0,63
Vedação x tempo	2	0,67
Recipiente x Vedação x Tempo	2	1,89*
Erro b	89	0,53
CV%		30,95
Média Geral		2,35

\* e \*\* significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste de F.