

**CRIOPRESERVAÇÃO E PRODUÇÃO DE
SEMENTES SINTÉTICAS *in vitro* DE
MANGABEIRA**

GABRIELA FERREIRA NOGUEIRA

2010

GABRIELA FERREIRA NOGUEIRA

**CRIOPRESERVAÇÃO E PRODUÇÃO DE SEMENTES
SINTÉTICAS *in vitro* DE MANGABEIRA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de "Mestre".

Orientador

Prof. Renato Paiva, PhD

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Nogueira, Gabriela Ferreira.

Criopreservação e produção de sementes sintéticas *in vitro* de mangabeira / Gabriela Ferreira Nogueira. – Lavras : UFLA, 2010.
72 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.
Orientador: Renato Paiva.
Bibliografia.

1. *Hancornia speciosa*. 2. Crioprotetor. 3. Viabilidade celular. 4. Microscopia eletrônica. 5. Unidade encapsulável. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 631.523

GABRIELA FERREIRA NOGUEIRA

CRIOPRESERVAÇÃO E PRODUÇÃO DE SEMENTES SINTÉTICAS *in vitro* DE MANGABEIRA

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 23 de fevereiro de 2010

Profa. Dr^a. Fernanda Carlota Nery

UFSJ

Dr^a. Fernanda Pereira Soares

MAPA

Dr^a. Daiane Peixoto Vargas

UFLA

Prof. Renato Paiva, PhD

UFLA

(Orientador)

LAVRAS

MINAS GERAIS – BRASIL

A Deus e aos meus pais Wagner Nogueira e Clara Ferreira Nogueira,

OFEREÇO

Ao meu irmão, Eugênio.

A minha família.

Ao meu namorado, Luca.

Aos grandes amigos do LCTP.

Ao meu orientador, Renato Paiva.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar meu caminho e me dar forças para seguir sempre em frente.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia pela oportunidade concedida para a realização da Pós-Graduação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos meus pais, Wagner e Clara, pela força, amor e por tudo que representam na minha vida. Amo muito vocês!

Ao meu irmão e todos os familiares que muito me apoiaram e sempre acreditaram em mim.

Ao meu orientador Prof. Renato Paiva por todos os conselhos, ensinamentos e confiança durante todos esses anos.

Aos membros da banca examinadora Profa. Fernanda Carlota Nery, Dra. Fernanda Pereira Soares, Dra. Daiane Peixoto Vargas e Dr. João Maurício Cavalcante.

A todos os professores, servidores e amigos do Departamento de Agricultura pela atenção sempre dispensada.

Aos professores e funcionários do Setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia pela amizade e convivência.

Ao Professor Eduardo Alves, pela disponibilidade do Laboratório de Microscopia Eletrônica.

Ao Prof. Wagner Campos Ottoni da Universidade Federal de Viçosa pelo auxílio e contribuição.

Aos amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas: Camila, Douglas, Fabi, Luciano, Máisa, Marcelo Rodrigues, Mariana, Michelle, Milene, Padô, Tina e Vanessa pela ajuda e companheirismo todos esses anos.

A Dai e Diogo pela amizade, conselhos e valiosa ajuda na minha formação profissional.

As companheiras Carol, Fran, Fúlvia, Lucila e Rairys pelo apoio em todos os momentos.

Ao Luca por todo apoio, carinho, incentivo e paciência todos esses anos.

As minhas queridas amigas biólogas, Ana Carla, Grazi e Karla por serem pessoas mais que especiais em minha vida.

As grandes amigas Polly, Joyce e ao Fausto pela alegria, apoio e estarem sempre presentes em minha vida.

As minhas irmãs de coração Ana Luiza, Dallyane, Flávia, Marina e Raquel pela amizade de todas as horas, pelo apoio em todos os momentos e principalmente pelo amor incondicional.

A todos que, de uma forma ou de outra, colaboraram para o encerramento desta etapa importante da minha vida.

Muito Obrigada!

BIOGRAFIA

Gabriela Ferreira Nogueira, filha de Wagner Nogueira e Clara Ferreira Nogueira, nasceu em 12 de setembro de 1985 em Campo Belo – MG. Em 1992, mudou-se para Lavras onde cursou o ensino fundamental e médio no Instituto Presbiteriano Gammon, concluindo o segundo grau em 2003. Em março de 2004, iniciou o curso de graduação em Ciências Biológicas, na Universidade Federal de Lavras, finalizando em fevereiro de 2008. Neste período, desenvolveu projetos de pesquisa no Setor de Fisiologia Vegetal, sob orientação do Prof. Renato Paiva, como bolsista de iniciação científica da FAPEMIG. Em março de 2008, iniciou o curso de mestrado em Agronomia/Fitotecnia na UFLA, concluindo-o em fevereiro de 2010

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	i
GENERAL ABSTRACT	iii
CAPÍTULO 1: Introdução geral.....	1
1 Introdução.....	2
2 Referencial teórico	4
2.1 Plantas lenhosas nativas do Cerrado	4
2.2 Descrição da espécie	5
2.3 Conservação da variabilidade genética	6
2.4 Criopreservação.....	7
2.5 Crioproteção	9
2.6 Técnicas de determinação da viabilidade celular após a criopreservação.....	10
2.7 Produção de sementes sintéticas.....	11
2.8 Avanços científicos na conservação de espécies nativas	14
3 Referências bibliográficas	15
CAPÍTULO 2: Criopreservação de calos de mangabeira	20
1 Resumo	21
2 Abstract	22
3 Introdução.....	23
4 Material e métodos	24
4.1 Indução de calos em explantes foliares de mangabeira.....	25
4.2 Efeito das soluções crioprotetoras no crescimento dos calos.....	25
4.2.1 Teste de viabilidade celular.....	26
4.3 Tolerância de calos friáveis ao congelamento.....	27
4.3.1 Viabilidade celular após exposição ao nitrogênio líquido.....	29
4.3.2 Análise ultra-estrutural dos calos criopreservados	30
5 Resultados e discussão	30
5.1 Influência de diferentes soluções crioprotetoras no crescimento de calos mangabeira	30
5.2 Efeito da criopreservação em calos friáveis de mangabeira.....	35
6 Conclusões.....	43
7 Referencial bibliográfico	43
CAPÍTULO 3: Semente sintética a partir de gemas apicais de mangabeira: caracterização nutricional e armazenamento	48
1 Resumo	49
2 Abstract	50

3	Introdução.....	51
4	Material e métodos.....	52
4.1	Características nutricionais da matriz de encapsulamento e meio de cultura na produção de sementes sintéticas de mangabeira.....	53
4.1.1	Enraizamento das brotações oriundas da germinação das sementes sintéticas.....	55
4.2	Armazenamento das sementes sintéticas.....	56
5	Resultados e discussão.....	57
5.1	Características nutricionais da matriz de encapsulamento e meio de cultura na produção de sementes sintéticas de mangabeira.....	57
5.2	Enraizamento das brotações oriundas da germinação das sementes sintéticas.....	61
5.3	Conservação das sementes sintéticas a curto e longo prazo.....	62
6	Conclusões.....	68
7	Referencial bibliográfico.....	68

RESUMO GERAL

NOGUEIRA, Gabriela Ferreira. **Criopreservação e produção de sementes sintéticas *in vitro* de mangabeira**. 2010. 72 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

A mangabeira é uma espécie medicinal e frutífera do Cerrado que apresenta dificuldades de propagação por meio de sementes, devido, principalmente à baixa taxa de germinação e à recalcitrância. Além disso, vem sofrendo acelerado processo de erosão genética em consequência da exploração extrativista. Torna-se relevante o desenvolvimento de metodologias alternativas para a conservação *in vitro* da espécie. Objetivou-se neste trabalho o estudo de aspectos da criopreservação e da produção de sementes sintéticas de mangabeira, a partir de explantes obtidos *in vitro*. Quanto ao crescimento e a viabilidade celular de calos friáveis de mangabeira, observou-se diferença significativa entre as soluções crioprotetoras utilizadas no pré-tratamento desses calos. As soluções de vitrificação PVS2 e PVS2 modificado inibiram o crescimento dos calos e reduziram a viabilidade desses em, pelo menos, 80%. Calos expostos a solução B (8% DMSO + 0,4M sacarose) foram os que apresentaram melhores resultados quanto à viabilidade celular (110%) e aumento de matéria fresca (45%). Para a criopreservação, o teste de tetrazólio mostrou-se eficiente na determinação da viabilidade dos calos de mangabeira. Observou-se uma redução da viabilidade entre o 10° e 30° dia de cultivo e por meio da análise ultra-estrutural pôde-se constatar a presença de células plasmolisadas e rompidas além de um grande acúmulo das soluções crioprotetoras. Em relação à produção de sementes sintéticas a partir de gemas apicais foi determinada a constituição ideal de sais associada à matriz de alginato de sódio assim como o armazenamento dessas em diferentes temperaturas. Para a regeneração das gemas apicais verificou-se que, quanto maior os níveis de sais disponíveis no meio de cultura, menor é a necessidade de sais associados à matriz de encapsulamento. Aos 45 dias de cultivo, a taxa de regeneração foi de 70% e o comprimento das brotações apresentou média de 2,25 cm. Quanto ao armazenamento, observou-se maior tolerância das sementes sintéticas à temperatura de ± 4 °C quando adicionou-se sacarose (1 e 3%) à matriz de alginato de sódio, atingindo média de 60% de regeneração.

* Comitê Orientador: Renato Paiva – UFLA (Orientador), Daiane Peixoto Vargas – UFLA.

Termos para indexação: *Hancornia speciosa*, crioprotetor, viabilidade celular, microscopia eletrônica, unidade encapsulável.

GENERAL ABSTRACT

NOGUEIRA, Gabriela Ferreira. **Cryopreservation and *in vitro* synthetic seed production of mangabeira**. 2010. 72 p. Dissertation (Master in Crop Science) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.[†]

The mangabeira is a medicinal and fruit species of the Brazilian Cerrado that presents propagation difficulties through seeds, due, mainly to the low germination rate and recalcitrance. Furthermore, it undergoes an accelerated genetic erosion process as a consequence of the extractivist exploitation. As a result, the development of alternative methodologies for the *in vitro* conservation of the species becomes relevant. The aim of this work was to study the cryopreservation aspects and synthetic seeds production of mangabeira, starting from *in vitro* obtained explants. As a result for the growth and the cellular viability of the mangabeira friable calli, a significant difference was observed among the cryoprotectant solutions used in the pre-treatment of these calli. The vitrification solutions PVS2 and modified PVS2 inhibited the calli growth and reduced their viability by at least 80%. Calli exposed to the solution B (8% DMSO + 0.4M sucrose) were those which presented better results related to the cellular viability (110%) and fresh matter increase (45%). For the cryopreservation, the tetrazolium test was shown efficient in the determination of the mangabeira calli viability. A viability reduction was observed between the 10th and 30th day of cultivation. Through the ultra-structural analysis it was possible to observe the presence of plasmolyzed and broken cells besides a high accumulation of the cryoprotectant solutions. Related to the production of synthetic seeds originated from apical buds, the optimum salt constitution associated to the sodium alginate matrix was determined as well as their storage at different temperatures. For the regeneration of the apical buds it was verified that the higher levels of available salts in the culture medium, the less the need of salts associated to the encapsulation matrix. At 45 days of cultivation, the regeneration rate was 70% and the length of the shoots presented an average of 2.25 cm. For the storage, the highest tolerance of the synthetic seeds was observed at the temperature of ± 4 °C when sucrose was added (1 and 3%) to the sodium alginate matrix, reaching an average of 60% regeneration.

Index terms: *Hancornia speciosa*, cryoprotectant, cell viability, electronmicroscopy, encapsulable unit.

[†] Guidance Committee: Renato Paiva - UFLA (Adviser), Daiane Peixoto Vargas – UFLA.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

Com uma extensa superfície de terras e uma grande parte dessas terras apropriadas para o cultivo, o Brasil tem à disposição, recursos hídricos abundantes, um clima tropical e subtropical e é considerado um dos países com maior diversidade biológica no mundo. Fato que confere ao país uma responsabilidade global maior em proteger seus recursos genéticos (Rylands & Brandon, 2005).

Os recursos genéticos são a base da subsistência da humanidade, utilizados há milênios tanto na alimentação *in natura*, como também pelo uso de seus subprodutos. Suprimem as necessidades básicas e ajudam a resolver problemas como a fome e a pobreza. Dada a sua vital importância é necessário conservá-los para benefícios das gerações presentes e futuras (Santos & Bettencourt, 2001).

A conservação pode ser realizada dentro ou fora do habitat natural. Entretanto, a vulnerabilidade das plantas, as intempéries climáticas e os ataques de patógenos em condições de campo têm dificultado a conservação dos recursos genéticos *in situ*.

A conservação *ex situ* é, muitas vezes, a única opção viável para evitar a extinção de espécies nativas e de grande interesse econômico. De acordo com Veiga et al. (2006), essa conservação desdobra-se em várias modalidades entre as quais destaca-se a conservação *in vitro*, as coleções de campo, em câmaras frias e em nitrogênio líquido (-196° C).

Nas últimas décadas, a tecnologia de criopreservação de plantas tem evoluído rapidamente como a maneira mais promissora no armazenamento a longo prazo dos recursos genéticos vegetais. Além disso, tem sido considerada a técnica de maior potencial para preservar espécies que se propagam

vegetativamente ou que possuem sementes inviáveis, intermediárias ou recalcitrantes (Santos, 2000).

A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomez) é uma importante espécie do Cerrado e apresenta potencial para ser utilizada no estudo da conservação *in vitro*. Seus frutos são amplamente comercializados além de apresentarem aplicação medicinal, melífera e ornamental. No entanto, a recalcitrância de suas sementes inviabiliza a conservação da espécie pelos métodos tradicionais.

A criopreservação da mangabeira surge como uma alternativa de conservação *in vitro* da espécie, tornando viável sua utilização comercial por meio da micropropagação, pesquisa com fitoterápicos para elaboração de novos produtos e o condicionamento a longo prazo em criobancos.

Por meio dos avanços tecnológicos, protocolos de micropropagação foram otimizados para a mangabeira (Soares et al., 2007) e através da sua reprodutibilidade, garantem a obtenção de plantas uniformes, com fidelidade genética da planta-mãe e isentas de contaminantes. Fatores esses que são essenciais para escolha do explante a ser criopreservado.

Contudo a diversidade de respostas entre os diferentes tecidos de uma mesma espécie, ou mesmo os distintos comportamentos citológicos e morfoanatômicos ressaltam a necessidade do aprimoramento das ferramentas tecnológicas que viabilizem a criopreservação da mangabeira e permitam o uso de suas potencialidades.

Objetivou-se, no presente trabalho, o estudo de aspectos da criopreservação e da produção de sementes sintéticas de mangabeira, a partir de explantes obtidos *in vitro*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Plantas lenhosas nativas do Cerrado

Com quase 55.000 espécies nativas, o Brasil é considerado o país com a maior biodiversidade do planeta. Essas espécies estão distribuídas em seis biomas distintos: Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pantanal e os Pampas.

O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, sendo superado em área apenas pela Amazônia. É a mais diversificada savana tropical do mundo. Apresenta grande diversidade de habitats e 44% da flora é endêmica (Klink & Machado, 2005). Ocupa 23% do território nacional, porém 55% do Cerrado já foram desmatados ou transformados pela ação humana (Machado et al., 2004).

Em função da riqueza biológica e da alta pressão antrópica a que vem sendo submetido, o Cerrado é considerado um dos Hotspots mundiais, ou seja, considerado uma área crítica para conservação (Conservation International, 2009).

As espécies frutíferas nativas do Cerrado ocupam lugar de destaque no ecossistema brasileiro com grande aceitação popular no âmbito industrial, medicinal e alimentar. Contudo, somente 2,2% do bioma estão legalmente protegidos e existem estimativas indicando que, pelo menos, 20% das espécies endêmicas e ameaçadas permanecem fora dos parques e reservas existentes (Klink & Machado, 2005).

Neste contexto insere-se a mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), pertencente à família da *Apocynaceae* que se destaca como importante frutífera nativa do Cerrado. Contudo, a dificuldade de propagação pela via convencional e os impactos causados pela exploração extrativista têm colocado a espécie em risco eminente de extinção.

2.2 Descrição da espécie

A mangabeira é uma planta arbórea de porte médio, que atinge de 5 a 10 metros de altura. É encontrada em várias regiões do país, desde os Tabuleiros Costeiros e Baixadas Litorâneas do Nordeste, onde é mais abundante, até as áreas sob Cerrado da Região Centro-Oeste; verifica-se ainda sua ocorrência nas Regiões Norte e Sudeste.

Apresenta frutos aromáticos ricos em vitaminas A, B1, B2 e C, saborosos e nutritivos, com ampla aceitação de mercado, tanto para o consumo *in natura* quanto para fabricação de doces, compotas, geléias, licores, xaropes, vinhos e vinagres (Ledo et al., 2007). A palavra mangaba é de origem indígena e significa “coisa boa de comer”.

A casca, devido à propriedade adstringente, e o látex exudado por toda a planta são também empregados na medicina popular contra a tuberculose, úlceras e herpes. A árvore é ainda melífera e ornamental (Soares et al., 2007).

No Nordeste, é uma das mais requisitadas produtoras de matéria-prima para a indústria entre as frutas nativas dessa região, entretanto, é explorada de forma extrativista e por isso, vem sofrendo acelerado processo de erosão genética (Pinheiro et al., 2001).

Além disso, as sementes da mangabeira pertencem à categoria de sementes recalcitrantes que apresentam grande sensibilidade ao dessecamento e ao frio. Para que mantenham sua viabilidade durante o armazenamento a curto prazo, devem ser conservadas com conteúdo de 50% umidade e temperaturas de 15° C e 20° C (Salomão et al., 2004).

Devido ao curto período de armazenamento das sementes e o insucesso da sua propagação por estaquia, metodologias de micropropagação foram desenvolvidas recentemente, visando à produção de mudas dessa espécie de maneira uniforme e independente da época do ano (Bastos et al., 2007; Soares et

al, 2008). De acordo com Salomão et al. (2004), não há estratégias para conservação *in situ* dessa espécie.

Diante do exposto, verifica-se que a mangabeira é uma boa opção no âmbito da fruticultura, porém há a necessidade de desenvolvimento de protocolos para a conservação da espécie.

2.3 Conservação da variabilidade genética

Diante da destruição em ritmo acelerado das vegetações nativas, a conservação dos recursos genéticos de plantas tornou-se uma questão de interesse global. É uma medida de prevenção à erosão genética e tem por objetivo promover a preservação com a menor perda possível da integridade genética.

Os recursos genéticos são conservados em bancos e coleções de germoplasma, que são unidades conservadoras de material genético de uso imediato ou com potencial de uso futuro. Podem-se conservar nos seus habitats naturais (*in situ*), em condições diferentes às do seu habitat natural (*ex situ*), ou combinando os métodos de maneira complementar. A seleção de um ou vários métodos depende das necessidades, possibilidades e da espécie em foco (Santos & Bettencourt, 2002).

A conservação *ex situ* desdobra-se em várias modalidades como: a conservação a campo, em câmaras frias, em laboratórios *in vitro* e em botijões de nitrogênio líquido (Veiga et al., 2006).

Atualmente, a maneira mais eficiente de conservação é sob a forma de sementes. No entanto, esse tipo de armazenamento nem sempre é viável, porque algumas plantas não produzem sementes e, portanto, elas só são propagadas vegetativamente; as sementes de certas espécies deterioram-se rapidamente devido à ação de patógenos; sementes intermediárias e recalcitrantes

permanecem viáveis apenas por um período limitado, como é o caso da mangabeira (Bekheet, 2007).

A preservação de material genético *in vitro* é uma técnica promissora de manutenção de genes. Entretanto a manutenção da cultura necessita de subcultivos periódicos, há risco de perda por contaminação e possibilidade de variação genética ao longo do cultivo (Carvalho & Vidal, 2003). Para a conservação do material *in vitro* existem dois métodos principais: o crescimento lento (períodos médios) e a criopreservação (períodos longos).

Dentre esses métodos, a criopreservação vem se destacando no cenário mundial. Essa técnica caracteriza-se pela manutenção da estrutura vegetal em nitrogênio líquido, seja em estado líquido (-196° C) ou em vapor (aproximadamente -150° C).

2.4 Criopreservação

A conservação a longo prazo das espécies nativas do Cerrado pode ser obtida através de metodologias de criopreservação.

A criopreservação a -196° C no nitrogênio líquido apresenta diversas vantagens de armazenamento em relação às condições *in vitro*: o risco de contaminação e de erro humano é menor, não há necessidade de subcultivos periódicos, o tempo de armazenamento pode ser prolongado e há um menor custo de manutenção (Winkelmann et al., 2004). A técnica é capaz de garantir a utilização segura e eficiente de conservação a longo prazo de diversos tipos de explantes (Engelmann, 2004).

A criobiologia, ao proporcionar uma redução drástica do metabolismo celular, mantém intacto o material biológico conservado, assegurando-lhe alta estabilidade genética e fisiológica (Engelmann, 2004).

Diferentes métodos de criopreservação têm sido utilizados especificamente para cada material biológico, como por exemplo; protoplastos, suspensões celulares, calos, gemas apicais e laterais, meristemas, sementes recalcitrantes e ortodoxas, embriões somáticos e zigóticos.

Os métodos de criopreservação podem ser desdobrados em etapas conhecidas como: pré-crescimento, crioproteção, resfriamento, armazenamento, descongelamento e recuperação do crescimento (Withers & Williams, 1998).

Na etapa de pré-crescimento as condições de cultivo são manipuladas para melhorar a tolerância ao congelamento, adicionando-se compostos com atividade osmótica ou outros aditivos ao meio de cultura (Carvalho & Vidal, 2003). Panis et al. (2005) afirmaram que a chave para o sucesso da criopreservação não está com a tolerância ao congelamento, mas com a tolerância à desidratação e sua indução.

É fato que o elevado teor de água intracelular pode resultar na formação de cristais de gelos e, conseqüentemente causar danos celulares irreversíveis. A formação de gelo causa ruptura do sistema de membranas celulares, resultando em perda da semipermeabilidade e da compartimentação celular, levando à morte da célula. Portanto, a água precisa ser removida antes do congelamento, para evitar as injúrias (Engelmann et al., 1997)

Por isso, as técnicas de criopreservação desenvolvidas mais recentemente são mais simples e estão baseadas na vitrificação (Santos, 2000), que pode ser definida como a passagem de água diretamente da fase líquida para a fase amorfa ou de vidro, evitando a formação de gelo cristalino (Fahy et al., 1984).

A vitrificação pode ser obtida por meio da desidratação dos tecidos para um teor de umidade em que não exista água livre para a cristalização antes de mergulhá-lo em nitrogênio líquido. Essa desidratação pode ser obtida por

evaporação da água ou por tratamento com soluções concentradas de crioprotetores químicos (Santos, 2001)

Diferentes soluções de vitrificação têm sido desenvolvidas com sucesso por diversos grupos de pesquisas na área de criobiologia (Gonzalez-Arnão et al., 2008), entretanto estudos referentes ao mecanismo de ação dessas soluções ainda são incipientes.

2.5 Crioproteção

Os crioprotetores são compostos químicos capazes de proteger os tecidos vegetais dos efeitos danosos causados pelos cristais de gelo, formados dentro e fora da célula durante o processo de congelamento. São capazes de baixar a temperatura na qual o congelamento ocorre reduzindo assim, o tamanho dos cristais de gelo formados (Withers, 1998 citado por Carvalho & Vidal 2003)

Essas substâncias devem possuir, como propriedades essenciais, uma baixa toxicidade para as células e alta solubilidade em água. Contudo, a exposição direta de amostras para qualquer solução de vitrificação muitas vezes leva a efeitos prejudiciais devido à toxicidade causada pela sua elevada concentração (Gonzalez- Arnão et al., 2008).

Veiga et al. (2006) ressaltaram que, poucos tecidos vegetais são capazes de sobreviver em temperaturas ultra-baixas sem a proteção proporcionada por tratamentos químicos especiais. Especialmente quando se trata de espécies de origem tropical, pois essas não desenvolvem mecanismos de tolerância ao frio, e são, portanto, altamente sensíveis à baixas temperaturas (Engelmann, 2000).

Os crioprotetores podem ser classificados como intracelulares ou permeáveis e extracelulares ou impermeáveis. De acordo com Felizardo et al. (2007), os crioprotetores intracelulares são substâncias químicas que retiram a água da célula durante o processo de congelamento; já os crioprotetores

extracelulares como a sacarose, manitol, trealose recobrem a superfície celular e estabilizam a membrana, ajudando, portanto, a minimizar e reparar os possíveis danos celulares causados pelo processo de congelamento. Entre os crioprotetores intracelulares mais utilizados podem ser citados dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, metanol e etileno glicol.

A crioproteção tem sido aplicada a uma ampla variedade de tecidos vegetais como calos, ápices caulinares, suspensões celulares, embriões zigóticos com a vantagem principal de não ser necessária a utilização de congeladores programáveis, sendo possível a imersão direta em nitrogênio líquido (Sakai & Engelmann, 2007)

2.6 Técnicas de determinação da viabilidade celular após a criopreservação

Atualmente, existem diversos testes qualitativos e quantitativos disponíveis para estudar o efeito de vários tipos de estresse na sobrevivência de células e tecidos vegetais (Verleysen et al., 2004).

A redução do cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio (CTT) é descrito como um dos testes mais confiáveis para medir a viabilidade dos tecidos vegetais (Mikula et al., 2006). Baseia-se na atividade enzimática de células vivas demonstrando o nível respiratório da amostra testada (Whiters, 1985). A atividade de enzimas desidrogenases mitocondriais reduz o CTT ao trifetil formazan, de coloração vermelha (Steponkus & Lanphear, 1967).

De acordo com Verleysen et al. (2004), o CTT é um método de referência da ISTA (International Seed Testing Association) utilizado em ensaios de viabilidade de sementes. Porém, também pode ser aplicado para testar a atividade bioquímica dos tecidos vegetais após a criopreservação. Esse teste permite que os pesquisadores avaliem a eficácia e/ou letalidade da técnica de

congelamento ou crioprotetores utilizados para a proteção do material vegetal (Joshi & Teng, 2000).

Outras tecnologias têm se mostrado eficientes na avaliação dos tecidos após criopreservação. No entanto, poucos trabalhos encontrados na literatura têm relatado análises genéticas ou morfológicas dos tecidos após congelamento.

A análise ultra-estrutural por meio do microscópio eletrônico de varredura vem auxiliar os estudos relacionados à criopreservação. Devido às características peculiares do MEV, como largo aumento e aspecto tridimensional das imagens, é possível realizar um exame mais detalhado da superfície das amostras e a integridade das células (Alves, 2004).

O estudo da viabilidade celular e análise ultra-estrutural dos explantes, após a criopreservação, possui caráter inédito e essencial para que se possa recomendar a criopreservação como um método seguro e eficaz na conservação do germoplasma de espécies nativas.

2.7 Produção de sementes sintéticas

Muitas frutíferas tropicais apresentam características que dificultam a sua conservação por meio dos métodos tradicionais. Espécies intermediárias e recalcitrantes podem ser armazenadas por curto período de tempo. Os bancos de germoplasma *in situ* estão continuamente expostos aos desastres naturais, ataques de patógenos e microrganismos. E, o intercâmbio desses genes apresentam alto risco de transferência das doenças (Rai et al., 2009).

Em decorrência destes problemas, o uso da tecnologia denominada de sementes encapsuladas ou sementes sintéticas, tem-se destacado na conservação e intercâmbio de germoplasma dessas espécies. É análoga à semente verdadeira ou botânica, e consiste de um propágulo (embriões somáticos, ápices caulinares

ou gemas axilares) envolto por uma ou mais camadas de compostos artificiais, formando uma cápsula – o endosperma sintético (Diniz, 2004).

O conceito foi estabelecido por Murashige em 1977, porém o primeiro trabalho publicado com sementes sintéticas foi desenvolvido por Kitto & Janick (1982). Esses autores produziram sementes sintéticas a partir de embriões somáticos de cenoura utilizando uma resina solúvel de polietileno-óxido – Polyox. Posteriormente, outros trabalhos obtiveram resultados relevantes no encapsulamento de propágulos utilizando hidrogel de alginato (Rai et al., 2009).

O alginato de sódio é o principal gel para o encapsulamento devido as suas propriedades geleificantes, baixo custo, facilidade de uso e ausência de toxicidade (Redenbaugh et al., 1986; Guerra et al., 1999).

A matriz alginato envolvendo os propágulos proporciona resistência para sua manipulação e transporte, e também preserva a viabilidade caso a matriz seja enriquecida com substâncias nutritivas (Prewin & Wilhelm 2003 citado por Pintos et al., 2008). Vários podem ser os elementos incorporados à matriz de encapsulamento como macro, micronutrientes, vitaminas, carboidratos e fitorreguladores (Guerra et al., 2001).

É uma tecnologia de baixo custo e rápida multiplicação dos propágulos, apresenta baixo risco de variações somaclonal e facilidade de manuseio, além de permitir o intercâmbio de germoplasmas (Santos, 2004; Raí, et al., 2009) . O encapsulamento tem se destacado como uma excelente ferramenta em trabalhos de conservação de genótipos *in vitro*, principalmente por meio da criopreservação (Pereira et al., 2008; Wang, et al., 2005) (Figura 1).

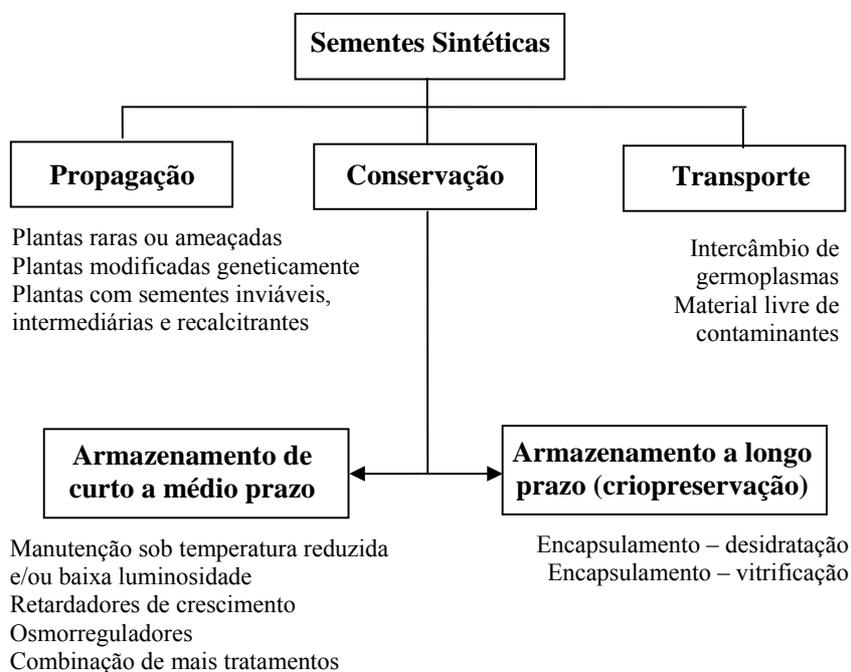


FIGURA 1 Esquema da tecnologia de sementes sintéticas e suas aplicações (adaptado de Rai et al., 2009)

Para aprimorar a conservação, a longo prazo, das sementes sintéticas diferentes técnicas têm sido desenvolvidas (Rai et al., 2009), com destaque para o encapsulamento-desidratação e encapsulamento-vitrificação (Santos, 2000; Wang et al., 2005; Pintos et al., 2008). Na temperatura do nitrogênio líquido, as reações metabólicas são praticamente inexistentes, garantindo conservação a longo prazo e com alta integridade genética.

Apesar de todo o potencial da técnica, os estudos relacionados ao tipo de explante, constituição e consistência da cápsula, condição de cultivo e armazenamento ainda são incipientes (Guedes et al., 2007).

2.8 Avanços científicos na conservação de espécies nativas

O aumento da ação antrópica, em consequência do avanço da fronteira agrícola, vem colocando em risco várias espécies de plantas nativas e exóticas. Ações e esforços contínuos devem ser desenvolvidos para que o máximo de material genético de valor atual ou potencial seja conservado (Wetzel et al., 2007).

O emprego de um sistema de manutenção, a médio e longo prazo, para conservação de estruturas organizadas com alta estabilidade genética e biológica de espécies com sementes recalcitrantes ou intermediárias é de fundamental importância para armazenamento dos acessos num Banco de Germoplasma (Carvalho & Vidal, 2003).

Na atualidade, a criopreservação é a técnica de maior potencial para assegurar a conservação *ex situ* do germoplasma dessas espécies, por longos períodos de tempo e com controle sanitário, porém ainda é um grande desafio.

Os protocolos de criopreservação exigem a otimização de inúmeras variáveis, incluindo o tamanho da amostra, o tipo e a concentração do crioprotetor, o teor de água da amostra durante congelamento e descongelamento (Bekheet et al., 2007).

Recentemente, diversas técnicas de criopreservação têm sido desenvolvidas com sucesso para todos os tipos de explantes, incluindo suspensões de células e calos, ápices e embriões somáticos e zigóticos, tanto de espécies de clima temperado como tropical.

A criopreservação também pode ter outros usos que não a conservação de germoplasma, como crioseleção, ou seja, seleção através do congelamento de amostras com propriedades especiais, ou crioterapia com eliminação de vírus de plantas infectadas por meio de criopreservação do ápice (Engelmann, 2004).

Devido ao elevado potencial, a criopreservação pode se tornar a técnica mais frequentemente empregada para conservação a longo prazo dos recursos genéticos vegetais.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, E. **Curso introdutório à microscopia eletrônica de varredura**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2004. 43 p. Apostila.

BASTOS, L. P.; MOREIRA, M. J. S.; COSTA, M. A. P. de C.; ROCHA, M. C. da; HANSEN, D. de S.; SILVA, S. A.; DANTAS, A. C. V. L.; SOUSA, C. da S. Cultivo *in vitro* de Mangabeira (*Hancornia speciosa*). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 1122-1124, jul. 2007. Suplemento.

BEKHEET, S. A.; TAHA, H. S.; SAKER, M. M.; SOLLIMAN, M. E. Application of cryopreservation technique for *in vitro* grown date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultures. **Journal of Applied Sciences Research**, Punjab, v. 3, n. 9, p. 859-866, Sept. 2007.

CARVALHO, J. M. F. C.; VIDAL, M. S. **Crioconservação no melhoramento vegetal**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2003. (Boletim Técnico; Documento, 115).

CONSERVATION INTERNATIONAL. **Biodiversity hotspots: cerrado**. Arlington, 2010. Disponível em: <<http://www.biodiversityhotspots.org/xp/hotspots/cerrado/Pages/default.asp>>. Acesso em: 15 dez. 2009.

DINIZ, F. Sementes sintéticas: o desenvolvimento de sementes encapsuladas. **Biociência, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 7, v. 32, p. 4-7, jan./jun. 2004.

ENGELMANN, F. Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (Ed.). **Cryopreservation of tropical plant germplasm: current research progress and application**. Rome: IPGRI, 2000. p. 8-20.

ENGELMANN, F. Plant cryopreservation: progress and prospects. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 40, n. 5, p. 427-433, Sept./Oct. 2004.

FAHY, G. M.; MACFARLANE, D. R.; ANGELL, C. A.; MERYMAN, H. T. Vitrification as an approach to cryopreservation. **Cryobiology**, San Diego, v. 21, n. 4, p. 407-426, July/Aug. 1984.

FELIZARDO, V. O.; DRUMOND, M. M.; MURGAS, L. D. S.; ANGERONIMO, M. G.; SILVA, J. M. de A.; PEREIRA, G. J. M.; CARVALHO, A. F. S. Avaliação da eficiência de diferentes soluções crioprotetoras no congelamento de sêmen de Piracanjuba *Brycon orbignyanus*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PRODUÇÃO DE PEIXES NATIVOS DE ÁGUA DOCE, 2007, Dourado. **Anais...** Dourado: Embrapa, 2007. 7 p.

GONZALEZ-ARNAO, M. T.; PANTA, A.; ROCA, W. M.; ESCOBAR, R. H.; ENGELMANN, F. Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 92, n. 1, p. 1-13, Jan. 2008.

GUEDES, R. da S.; COSTA, F. H. da S.; PEREIRA, J. E. S. Características físicas e nutricionais da matriz de encapsulamento na produção de sementes sintéticas de pimenta-linga (*Piper hispidinervum* C. DC). **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 31, n. 6, p. 1005-1011, dez. 2007.

GUERRA, M. P.; DAL VESCO, L. L.; DU CROQUET, P. H. J.; NODARI, R.; REIS, M. S. dos. Somatic embryogenesis in goiabeira serrana: genotype response, auxinic shock and synthetic seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 13, n. 2, p. 117-128, jul. 2001.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Culturas de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, 1999. v. 2, p. 533-568.

JOSHI, A.; TENG, W. L. Cryopreservation of *Panax ginseng* cells. **Plant Cell Reports**, Berlim, v. 19, n. 12, p. 971-977, July 2000.

KITTO, S. L.; JANICK, J. Polyox as an artificial seed coat for a sexual embryos. **Horticultural Science**, Alexandria, v. 17, n. 3, p. 448, Mar. 1982.

- KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado Brasileiro. **Megadiversidade**, Belo Horizonte, v. 1, n. 1, p. 147-155, jul. 2005.
- LEDO, A. da S.; SILVA JÚNIOR, J. F. S.; BARBOZA, S. B. S. C. **Germinação *In Vitro* da mangabeira**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2007. 16 p. (Boletim Técnico).
- MACHADO, R. B.; RAMOS NETO, M. B.; PEREIRA, P. G. P.; CALDAS, E. F.; GONÇALVES, D. A.; SANTOS, N. S.; TABOR, K.; STEININGER, M. **Estimativas de perda da área do cerrado brasileiro**. Brasília: SAUS, 2004. 26 p. Relatório Técnico.
- MIKULA, A.; NIEDZIELSKI, M.; RYBCZYNSKI, J. J. The use of TTC reduction assay for assessment of *Gentiana* spp. cell suspension viability after cryopreservation. **Acta Physiologiae Plantarum**, Poland, v. 28, n. 4, p. 315-324, Apr. 2006.
- PANIS, B.; PIETTE, B.; SWENNEN, R. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all Musaceae. **Plant Science**, Amsterdam, v. 168, n. 1, p. 45-55, Jan. 2005.
- PEREIRA, J. E. S.; GUEDES, R. S.; COSTA, F. H. S.; SCHMITZ, G. C. B. Composição da matriz de encapsulamento na formação e conversão de sementes sintéticas de pimenta-longa. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 1, p. 93-96, jan./mar. 2008.
- PINHEIRO, C. S. R.; MEDEIROS, D. N. de; MACÊDO, C. E. C. de; ALLOUFA, M. A. I. Germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomez) em diferentes meios de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 413-416, ago. 2001.
- PINTOS, B.; BUENO, M. A.; CUENCA, B.; MANZANERA, J. A. Synthetic seed production from encapsulated somatic embryos of cork oak (*Quercus suber* L.) and automated growth monitoring. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 95, n. 2, p. 217-225, Nov. 2008.
- RAI, M. K.; ASTHANA, P.; SINGH, S. K.; JAISWAL, V. S.; JAISWAL, U. The encapsulation technology in fruit plants: a review. **Biotechnology Advances**, New York, v. 27, n. 6, p. 671-679, June 2009.

REDENBAUGH, K.; NICHOL, J.; KOSSLER, M. E.; PAASCH, B. D. Encapsulation of somatic embryos for artificial seed production. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 20, n. 1, p. 256-257, Jan./Feb. 1984.

RYLANDS, A. B.; BRANDON, K. Unidades de conservação brasileira. **Megadiversidade**, Belo Horizonte, v. 1, n. 1, p. 181-188, jul. 2005.

SAKAI, A.; ENGELMANN, F. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. **Cryo-letters**, London, v. 28, n. 3, p. 151-172, May/June 2007.

SALOMÃO, A. N.; SANTOS, I. R. I.; MUNDIM, R. C. **Conservação, manejo e uso de sementes de *Hancornia speciosa* Gomez (Apocynaceae)**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. (Boletim Técnico; Documentos 0102-0110, 126).

SANTOS, I. R. I. **Criopreservação de eixos embrionários de espécies de *Citrus* usando encapsulamento e desidratação**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. (Boletim Técnico; Documentos, 115).

SANTOS, I. R. I. Criopreservação de germoplasma vegetal. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 4, n. 20, maio/jun. 2001.

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

SANTOS, E.; BETTENCOURT, E. **Manual de apoio à formação e treino em conservação *ex situ* de recursos fitogenéticos**. Lisboa: Instituto Nacional de Investigação Agrária, 2002, 207 p.

SOARES, F. P.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A. A de; NOGUEIRA, R. C.; EMRICH, E. B.; MARTINOTTO, C. Organogênese direta em explantes caulinares de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1048-1053, jul./ago. 2007.

STEPONKUS, P. L.; LANPHEAR, F. O. Refinement of the triphenyl tetrazolium chloride method of determining cold injury. **Plant Physiology**, Washington, v. 42, n. 10, p. 1423-1426, Oct. 1967.

VEIGA, R. F. de A.; MELETTI, L. M. M.; BARBOSA, W.; TOMBOLATO, A. F. C. A criopreservação de sementes de recursos genéticos hortícolas no Instituto Agronômico (IAC). **O Agrônomo**, Campinas, v. 58, n. 1/2, p. 19-21, jan. 2006.

VERLEYSSEN, H.; SAMYN, G.; VAN BOCKSTAELE, E.; DEBERGH, P. Evaluation of analytical techniques to predict viability after cryopreservation. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 77, n. 1, p. 11-21, Apr. 2004.

WANG, Q.; LAAMANEN, J.; UOSUKAINEN, M., VALKONEN, J.P.T. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of raspberry (*Rubus idaeus* L.) by encapsulation-vitrification and encapsulation-dehydration. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 24, n. 1-2, p. 280-288, Aug. 2005.

WETZEL, M. M.V da S.; SILVA, D. B. da; GOEDERT, C. O. Conservação de germoplasma-semente a longo prazo no Brasil. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 19, n. 4, p. 393-398, out./dez., 2007.

WINKELMANN, T.; MUBMANN, V.; SEREK, M. Cryopreservation of embryogenic suspension cultures of *Cyclamen persicum* Mill. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 23, n. 6, p. 1-8, Jan. 2004.

WITHERS, L. A.; WILLIAMS, J. T. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, 1998. p. 297-330.

WITHERS, L. A. Cryopreservation of cultured plant cells and protoplasts. In: VASIL, J. K. (Ed.). **Cell culture and somatic cell genetics of plants**. Orlando: Academic, 1985. p. 253-316.

CAPÍTULO 2

CRIOPRESERVAÇÃO DE CALOS DE MANGABEIRA

1 RESUMO

A mangabeira vem se destacando no cenário nacional por possuir frutos nutritivos e saborosos. Devido ao alto valor econômico, a recalcitrância das sementes e a exploração extrativista tem se intensificado a necessidade de conservação *in vitro* dessa espécie. A criopreservação é capaz de garantir a conservação a longo prazo de germoplasmas vegetais e tem sido aplicada com sucesso em diversos tipos de explantes. No entanto, poucos são os entendimentos quanto à influência dos pré-tratamentos e da temperatura de -196° C nos tecidos vegetais. Objetivou-se, neste trabalho, verificar o efeito das soluções crioprotetoras e da criopreservação em calos de mangabeira.. Os calos de mangabeira foram desidratados e pré-tratados com diferentes soluções crioprotetoras (solução A, solução B, PVS2 e PVS2 modificado) por 20 minutos e em seguida, inoculados em meio de cultivo WPM + 8,28 µM de Picloram + 0,46 µM de Cinetina A matéria fresca e a viabilidade celular por meio do teste CTT foram determinados ao 30° dia de cultivo. Quanto à criopreservação, os calos foram desidratados, pré-tratados com os crioprotetores e rapidamente imersos em nitrogênio líquido (NL) onde permaneceram por 24 horas. Após o descongelamento, os calos foram inoculados no meio de indução contendo 6% de manitol por 48 horas e posteriormente, transferidos para novo meio, contendo 3% de sacarose. Amostras foram coletadas para a determinação da viabilidade celular e também para análise ultra-estrutural em microscópio eletrônico de varredura. Observou-se comportamento distinto dos calos após tratamento com as soluções crioprotetoras. Os calos expostos à solução B demonstraram alta viabilidade celular (68,8%) e aumento de matéria fresca (45%); o contrário foi observado para os calos pré-tratados com as soluções de vitrificação PVS2 e PVS2 modificado, que não apresentaram sinal de recuperação. Ambos os tratamentos apresentaram queda de aproximadamente 63% na viabilidade celular, ao 10° dia de cultivo. Em relação aos calos criopreservados, constatou-se redução da viabilidade celular entre o 30° dia e 60° dia de cultivo e, por meio da análise ultra-estrutural, verificou-se a presença de células plasmolisadas e um grande acúmulo das soluções crioprotetoras nos calos após a criopreservação.

Termos para indexação: *Hancornia speciosa*, *in vitro*, vitrificação, nitrogênio líquido.

2 ABSTRACT

The mangabeira has become a fruit of interest on the national scene for possessing nutritious and tasty fruits. Due to its high economic value, the recalcitrance of its seeds and the extractivist exploitation, it has intensified the need of *in vitro* conservation of this species. Cryopreservation is a technique capable of ensuring the long-term conservation of plant germplasm and has been applied successfully in several explants types. However, there are few insights about the influence of the pre-treatments and the temperature of -196°C on the plant tissues. The aim, in this work, was to verify the effect of the cryoprotectant solutions and the cryopreservation on mangabeira calli. The mangabeira calli were dehydrated and pre-treated with different cryoprotectant solutions (solution A, solution B, PVS2 and modified PVS2) for 20 minutes and then, inoculated in WPM + $8.28\ \mu\text{M}$ Picloram + $0.46\ \mu\text{M}$ Kinetin culture medium. The fresh matter and cellular viability were determined through the TTC test on 30th day of cultivation. For the cryopreservation, the calli were dehydrated, pre-treated with the cryoprotectants and quickly immersed in liquid nitrogen (LN) where they remained for 24 hours. After thawing, the calli were inoculated on the induction medium containing 6% mannitol for 48 hours and later, transferred to a new medium, containing 3% sucrose. Samples were collected for the determination of the cellular viability and also for ultra-structural analysis under scanning electron microscopy. Distinct calli behavior was observed after treatment with the cryoprotectant solutions. The calli exposed to solution B demonstrated high cellular viability (68.8%) and fresh matter increase (45%); the opposite was observed for the calli pre-treated with the PVS2 and modified PVS2 vitrification solutions, that did not present recovery signs. Both treatments presented a decline of approximately 63% in the cellular viability, on the 10th day of cultivation. Related to the cryopreserved calli, a cellular viability reduction was verified between the 30th and 60th day of cultivation and, through ultra-structural analysis, the presence of plasmolyzed cells and a high accumulation of the cryoprotectant solutions was verified in the calli after the cryopreservation.

Index terms: *Hancornia speciosa*, *in vitro*, vitrification, liquid nitrogen.

3 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, as tecnologias de criopreservação de plantas têm evoluído rapidamente, abrindo portas à possibilidade de armazenamento, a longo prazo, de valiosos recursos genéticos de diversas culturas e espécies florestais (Panis & Lambradi, 2005).

A criopreservação é definida como a conservação de material biológico em nitrogênio líquido a -196° C. Nessa temperatura, todas as divisões celulares e processos metabólicos são interrompidos, o que permite a conservação por um período ilimitado de tempo, exigindo um mínimo de espaço e manutenção (Engelmann, 2004).

No entanto, a maioria dos tecidos empregados na criopreservação de células (calos, ápices caulinares, embriões, entre outros) contém grande quantidade de água livre. E a formação de gelo no meio intracelular causa ruptura do sistema de membranas celulares, resultando em perda da semi-permeabilidade e da compartimentação celular (Santos, 2001).

As técnicas de criopreservação desenvolvidas mais recentemente estão baseadas na vitrificação, processo pelo qual a água sofre uma transição da fase líquida para um estado sólido amorfo e metaestável (Sakai & Engelmann, 2007), e é obtida por meio da desidratação dos tecidos através de tratamento com soluções concentradas de crioprotetores (Santos, 2001).

Com auxílio de algumas tecnologias é possível analisar o estresse e os danos causados aos tecidos após exposição ao nitrogênio líquido. Tem-se destacado os testes de viabilidade que permitem um prognóstico rápido e preciso dos efeitos da criopreservação (Verleysen, 2004), além da análise ultra-estrutural por meio do microscópio eletrônico de varredura, capaz de produzir imagens tridimensionais e de alta resolução da superfície da amostra.

De acordo com Engelmann (2004), existem grupos de plantas potenciais para conservação a longo prazo em temperatura ultra-baixa, na qual se destacam as espécies que apresentam sementes intemediárias ou recalcitrantes, que não toleram o armazenamento por meio da metodologia convencional (bancos de germoplasma).

Dentre elas está a mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomez), árvore pertencente à família das Apocináceas encontrada naturalmente no Brasil. Os frutos são ricos em nitrogênio, vitamina C e lipídeos e são consumidos *in natura* e no preparo de sorvete, pudim, suco, geléia entre outros. A madeira é empregada na carpintaria, produção de lenha e carvão e, na medicina popular, o látex é utilizado no tratamento de doenças venéreas, tuberculose e verrugas (Salomão et al., 2004).

No Nordeste, onde é explorada de forma extrativista, essa espécie vem sofrendo acelerado processo de erosão genética (Pinheiro et al., 2001). Além disso, as sementes da mangabeira são recalcitrantes, isso é, perdem rapidamente o poder germinativo assim que são retiradas dos frutos, inviabilizando a sua conservação por longos períodos de tempo (Soares et al., 2007).

Objetivou-se, com este trabalho, verificar o efeito das soluções crioprotetoras e da criopreservação em calos de mangabeira.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, Setor de Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia na Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG.

4.1 Indução de calos em explantes foliares de mangabeira

Segmentos foliares foram excisados de plântulas preestabelecidas *in vitro*. Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio, contendo meio de cultura WPM (Lloyd & McCown, 1980), suplementado com 8,28 μM de Picloram e 0,46 μM de Cinetina e acrescido de 3% de sacarose, de acordo com protocolo estabelecido em testes preliminares. O meio foi solidificado com 0,6% de ágar e o pH ajustado em 5,8, antes da autoclavagem a 121° C, por 20 minutos.

Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento sob irradiância de 43 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 \pm 2° C, para obtenção dos calos.

Os subcultivos foram realizados a cada 60 dias e os calos oriundos do segundo subcultivo serviram como fonte de explantes para os experimentos subsequentes, pois apresentaram melhores resultados de viabilidade em testes realizados anteriormente.

4.2 Efeito das soluções crioprotetoras no crescimento dos calos

Calos de mangabeira com aspecto friável e coloração variando do verde ao vermelho-escuro, estabelecidos no item 4.1, foram desidratados por 72 horas em meio de cultura WPM, suplementado com 8,28 μM de Picloram e 0,46 μM de Cinetina acrescido de 6% de manitol e solidificado com 0,6% de ágar. Após inoculação, permaneceram por 48 horas na presença de luz.

Após o período de desidratação, os calos foram tratados com diferentes soluções químicas – crioprotetores – Solução A (meio de cultura + 2,0M glicerol + 0,4M sacarose), Solução B (meio de cultura + 0,4M sacarose + 8% DMSO), PVS2 (3,26M glicerol + 2,42M etileno glicol + 1,9M DMSO + 0,4M sacarose) e PVS2 modificado (40% glicerol + 45% sacarose + 10% etileno glicol + 10%

DMSO) (Sakai et al., 1990) e incubados em gelo durante 20 minutos . As soluções foram esterilizadas em filtro Millipore 0,22 μM e o pH ajustado para 5,8.

O excesso dos crioprotetores foi retirado por meio de papel filtro autoclavado e os calos inoculados em meio de cultura WPM, suplementado com 8,28 μM de Picloram e 0,46 μM de Cinetina e acrescido de 3% de sacarose e 0,6% de ágar. .

No tratamento controle, os calos foram desidratados por 72 horas em meio de cultura WPM, suplementado com 8,28 μM de Picloram e 0,46 μM de Cinetina acrescido de 6% de manitol e solidificado com 0,6% de ágar, porém não foram expostas as soluções crioprotetoras.

Posteriormente, foi estabelecido 300 mg de matéria fresca de calo, por tubo ensaio, para todos os tratamentos analisados. Os calos foram mantidos em sala de crescimento sob irradiância de 43 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $25 \pm 2^\circ \text{C}$, e a matéria fresca determinada após um mês de cultivo.

O experimento foi conduzido segundo um delineamento inteiramente casualizado, constituído de 10 repetições por tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2000), sendo as médias comparadas pelo Teste de Scott-Knott, a 5% de significância.

4.2.1 Teste de viabilidade celular

Para verificar a viabilidade celular dos calos de mangabeira, antes e depois dos pré-tratamentos com crioprotetores (item 4.2), amostras foram recolhidas e quantificadas, através do corante cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio (CTT).

Em cada tratamento, a amostragem foi feita de maneira aleatória coletando-se pequenas porções dos calos que foram subdivididas em 5 amostras, de 100 mg cada.

Em tubos de ensaio, cada amostra foi homogeneizada em 3 mL do reagente de CTT 0,6% (p/v) preparado em solução-tampão fosfato pH 7,4. A mistura foi incubada por 24 h no escuro, à 28° C. Após esse período, foram adicionados 7 mL de etanol 95% (v/v) e o composto colorido, formazan, extraído mediante incubação dos tubos em água fervente durante cinco minutos (Benson, 1994).

O material foi centrifugado a 6000 rpm, durante 10 minutos, para a separação dos sólidos. O sobrenadante foi reservado para as leituras de absorvância no espectrofotômetro Beckman modelo DU®640B, a 490 nm de comprimento de onda.

O experimento foi instalado segundo um delineamento inteiramente casualizado com 5 repetições de 100 mg de calo por coleta. A produção de formazan foi expressa em porcentagem em relação ao tratamento controle, calculado como (absorvância dos tratamentos/ absorvância do controle) x 100 (Mikula et al., 2006), sendo um indicativo da viabilidade celular.

Os dados foram analisados pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, no Programa Estatístico SISVAR (Ferreira, 2000).

4.3 Tolerância de calos friáveis ao congelamento

Calos de mangabeira com aspecto friável estabelecidos no item 4.1 foram inoculados em meio de cultura WPM, suplementado com 8,28 µM de Picloram e 0,46 µM de Cinetina acrescido de 6% de manitol, permanecendo por 48 horas na presença de luz.

Após o período de desidratação, os calos foram pré-tratados com diferentes soluções crioprotetoras – Solução A, Solução B, PVS2 (Sakai et al., 1990) e incubados em gelo por 20 minutos. Os calos foram colocados em criotubos (capacidade de 2,0 mL) com nova solução crioprotetora previamente resfriada, e imersos diretamente em nitrogênio líquido (NL) por um período de 24 horas.

Os calos criopreservados foram descongelados mergulhando os criotubos em banho-maria por 5 minutos, à temperatura de $37 \pm 2^\circ \text{C}$ e posteriormente, colocados sobre papel-filtro para retirar o excesso de solução.

Após a criopreservação, os calos foram inoculados em meio de cultura WPM, suplementado com $8,28 \mu\text{M}$ de Picloram e $0,46 \mu\text{M}$ de Cinetina contendo 6% manitol e solidificado com 0,6% de ágar, permanecendo por mais 48 horas na presença de luz.

Quanto ao tratamento controle, os calos foram inoculados no mesmo meio de cultura contendo 6% de manitol por 48 horas, porém não foram expostos ao NL.

Transcorridas as 48 horas, os calos foram transferidos para novo meio de cultura, contendo 3% de sacarose e mantidos em sala de crescimento sob irradiância de $43 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $25 \pm 2^\circ \text{C}$.

O experimento foi conduzido segundo um delineamento inteiramente casualizado, constituído de 10 repetições por tratamento e resultados analisados pelo Programa Estatístico SISVAR (Ferreira, 2000).

4.3.1 Viabilidade celular após exposição ao nitrogênio líquido

Para verificar a viabilidade celular dos calos no período de 30 e 60 dias de cultivo após tratamentos, amostras foram recolhidas e quantificadas através do corante cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio (CTT).

A amostragem foi feita de maneira aleatória coletando-se pequenas porções dos calos e subdividindo-as em 5 amostras de 100 mg cada.

Em tubos de ensaio, cada amostra foi homogeneizada em 3 mL do reagente de CTT 0,6% (p/v) preparado em solução-tampão fosfato pH 7,4. A mistura foi incubada por 24 h no escuro, a 28° C. Após esse período, foram adicionados 7 mL de etanol 95% (v/v) e o composto colorido, formazan, extraído mediante incubação dos tubos em água fervente, durante cinco minutos (Benson, 1994)..

O material foi centrifugado a 6000 rpm durante 10 minutos para a separação dos sólidos. O sobrenadante foi reservado para as leituras de absorvância no espectrofotômetro Beckman modelo DU®640B, a 490 nm de comprimento de onda.

O experimento foi instalado segundo um delineamento inteiramente casualizado com 5 repetições de 100 mg de calo, por coleta. A produção de formazan foi expresso em porcentagem em relação ao tratamento controle, calculado como (absorvância dos tratamentos/ absorvância do controle) x 100 (Mikula et al., 2006), sendo um indicativo da viabilidade celular.

Os dados foram analisados pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, no Programa Estatístico SISVAR (Ferreira, 2000).

4.3.2 Análise ultra-estrutural dos calos criopreservados

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Microscopia e Análise Ultra-estrutural, no Departamento de Fitopatologia, na Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Para microscopia eletrônica de varredura, amostras de calos criopreservados foram coletadas no período de 48 horas e 30 dias após exposição ao NL, além do tratamento controle. Esses foram imersos em solução fixadora (Karnovisk) pH 7,2 por um período mínimo de 24 h, lavados em tampão cacodilato por três vezes, pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% por 1 hora, à temperatura ambiente. Após esse período, os calos foram lavados por três vezes em água destilada e, em seguida, desidratados em gradiente de acetona (25%, 50%, 75%, 90% e 100% por três vezes).

Posteriormente, o material foi levado ao aparelho de ponto crítico para completar a secagem, montado em *stubs* e coberto com ouro. Os espécimes foram observados no Microscópio Eletrônico de Varredura LEO Evo 40, segundo metodologia descrita por Alves, 2004.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Influência de diferentes soluções crioprotetoras no crescimento de calos mangabeira

Os calos de mangabeira oriundos do 2º subcultivo que foram utilizados como fonte de explantes nos experimentos subseqüentes (origem), apresentaram alta viabilidade celular, com média de 0,4249 de absorbância. Entretanto, quando inoculados em meio de desidratação, contendo 6% de manitol, observou-se uma perda significativa de viabilidade (0,2660 de absorbância) (Figura 1).

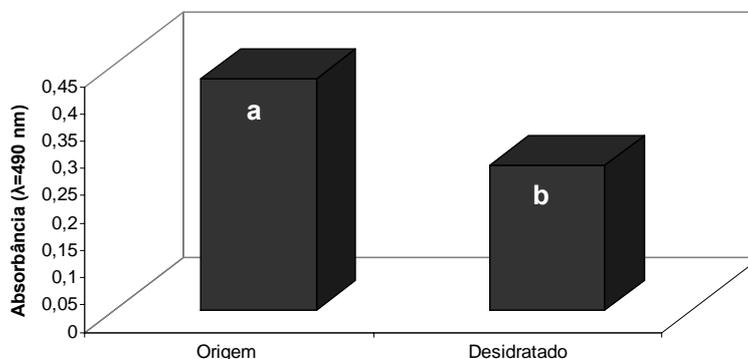


FIGURA 1 Média de absorvância dos calos utilizados como fonte de explante (origem) e após 48 horas em meio de desidratação contendo 6% de manitol. Barras seguidas de mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5% de significância pelo Teste Scott-Knott.

Na redução do metabolismo das plantas tem-se utilizado como estratégia modificações nas condições físicas (temperatura) ou químicas do meio de cultivo, adicionando nutrientes orgânicos e inorgânicos, reguladores osmóticos ou inibidores de crescimento (Roca et al., 1991).

O manitol apresenta um efeito retardante no crescimento e desenvolvimento de um grande número de espécies e é utilizado com bastante frequência na conservação *in vitro*. Normalmente, este carboidrato é adicionado ao meio para redução do seu potencial hídrico, impedindo a absorção de sais e nutrientes do meio (Ledo et al., 2007).

Sendo considerada uma fase crítica, o insucesso na criopreservação causada por danos nos tecidos possivelmente pode estar relacionado à fase de desidratação, ou seja, antes mesmo da exposição dos explantes ao NL.

O manitol remove o excesso de água intracelular através do gradiente osmótico fazendo com que o crescimento da cultura ocorra mais lentamente (Dumet et al., 1993). Esse fato pode explicar o efeito altamente estressante do manitol sobre as culturas (Ledo et al., 2007).

Outros carboidratos têm sido utilizados no pré-cultivo dos explantes a serem criopreservados como, por exemplo, a sacarose, manose, frutose e sorbitol os quais são adicionados isoladamente ou em combinação. Bekheet et al. (2007) estudaram diversos açúcares no pré-cultivo de *Phoenix dactylifera* e constaram que a sacarose foi o crioprotetor mais eficaz no aumento da tolerância ao congelamento. Resultados semelhantes foram encontrados por Fang et al. (2004) e Danso & Ford-Lloydna (2004) na criopreservação de embriões somáticos de cacau e aipim, respectivamente.

Seguindo os passos convencionais da criopreservação, após o período de desidratação, os calos friáveis de mangabeira passaram por diferentes pré-tratamentos com as soluções crioprotetoras a fim de determinar a influência dessas soluções químicas no crescimento dos calos da espécie estudada.

Na análise da viabilidade celular dos calos ao 10° e 30° dia de cultivo, após o pré-tratamento com as soluções crioprotetoras, verificaram-se diferenças significativas entre os diferentes tratamentos (Tabela 1).

TABELA 1 Viabilidade celular de calos de mangabeira, expressa em porcentagem de formazan produzido em relação ao controle, ao 10° e 30° dia de cultivo após o pré-tratamento com diferentes soluções crioprotetoras.

Tratamentos	Dias de cultivo	
	10	30
Controle	100,0 a*	100,0 a
Solução A	54,2 c	72,2 b
Solução B	68,8 b	110,0 a
PVS 2	37,0 c	14,67 c
PVS 2 modificado	37,9 c	22,33 c

* Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem estatisticamente entre si ($P < 0,05$), pelo Teste de Scott-Knott.

Observou-se que, ao décimo dia de cultivo, os calos de mangabeira expostos à solução B apresentaram maior viabilidade (68,8%) em relação aos

outros crioprotetores e, igualaram-se ao tratamento controle quanto à produção de formazan no 30º dia de cultivo.

Apesar das soluções de vitrificação, PVS2 e PVS2 modificado, serem utilizadas com bastante frequência na criopreservação de um grande número de espécies, observou-se neste trabalho um efeito negativo no crescimento dos calos de mangabeira. Ao 10º e 30º dia de cultivo, ambos os tratamentos apresentaram queda na viabilidade celular em relação ao tratamento controle.

A solução B possui o DMSO como componente em maior quantidade. Esse crioprotetor é permeável à membrana celular e é amplamente utilizado nas pesquisas da criobiologia por promover maior estabilidade da membrana celular, durante todo processo de congelamento (Rodrigues et al., 2001). O que possivelmente ocorreu neste trabalho, em que a alta capacidade de penetração do DMSO e a maior estabilidade das células resultaram em melhor recuperação dos calos pré-tratados com a solução B (Tabela 1). Chenshun et al. (2003) observaram maior sobrevivência dos calos de *Artimisia annua* quando foram pré-tratados com 5% (v/v) de DMSO.

Os agentes crioprotetores penetrantes diminuem as lesões de origem química ou mecânica que o congelamento causa sobre a célula. Essas soluções possuem estruturas que lhes permitem fazer ligações de hidrogênio com as moléculas de água, diminuindo a água livre à cristalização (Molina et al., 2006). Entretanto, os crioprotetores podem ser tóxicos ou podem causar estresse osmótico, levando à morte as células ou modificando sua resposta morfogênética em cultura (Sakai, 1995; Santos, 2001).

Matsumoto et al.(2004) avaliaram os efeitos de crioprotetores na criopreservação de calos embriogênicos de *D. longan* e constataram que a mistura de 5% de glicerol + 5% de DMSO proporcionou a maior quantidade de matéria fresca dos calos, enquanto a solução de vitrificação PVS2 foi tóxica para os calos dessa espécie.

Em relação à matéria fresca dos calos de mangabeira, após um mês em meio de cultivo, observou-se média final de 0,73 gramas no tratamento em que os calos não foram pré-tratados com as soluções crioprotetoras (controle), sendo estatisticamente superior aos demais tratamentos (Figura 2).

Não houve diferenças significativas quanto à matéria fresca dos calos após pré-tratamento com as diferentes soluções crioprotetoras. Entretanto, os calos submetidos ao pré-tratamento com soluções A e B obtiveram um aumento de matéria fresca de aproximadamente 45% em relação à matéria fresca inicial. O contrário foi observado para os calos pré-tratados com as soluções de vitrificação PVS2 e PVS2 modificado, em que esses não obtiveram ganhos de matéria, após 30 dias de cultivo.

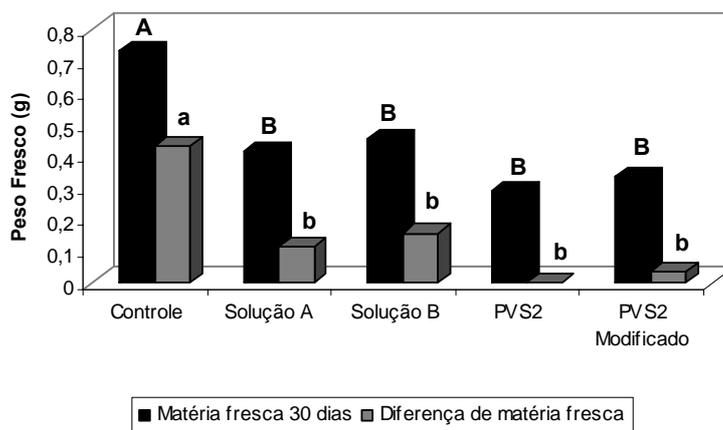


FIGURA 2 Matéria fresca dos calos de mangabeira 30 dias após pré-tratamento com diferentes soluções crioprotetoras e a diferença de peso em relação à matéria fresca inicial (0,3 gramas). Barras seguidas de mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5% de significância pelo Teste Scott-Knott.

Esses resultados obtidos para massa fresca confirmam o comportamento da viabilidade celular dos calos apresentados na Tabela 1 por meio do teste de

CTT, demonstrando mais uma vez que as soluções PVS2 e PVS2 modificado são prejudiciais aos calos de mangabeira.

A redução do CTT é descrito como um dos testes mais confiáveis para medir a viabilidade das culturas de tecidos vegetais. O teste é baseado na atividade enzimática de células vivas demonstrando o nível respiratório da amostra testada (Whiters, 1985). De acordo com Silva (2009), quanto maior o número de células vivas e maior sua atividade metabólica, maior será a quantidade de Formazan produzida.

Recentemente, o teste de CTT tem se destacado em múltiplas finalidades. Block & Brouwer (2002) relacionaram o vigor de algumas linhagens e híbridos de *B. napus* baseado na capacidade do material (explante) em reduzir o CTT. Silva (2009) utilizou o teste CTT na quantificação da viabilidade celular de calos de *Byrsonima intermedia*. Enquanto, Verleysen et al. (2004) e Mikula et al. (2006) avaliaram a viabilidade de ápices caulinares de *Azalea* e suspensões de *Gentiana* após a criopreservação.

5.2 Efeito da criopreservação em calos friáveis de mangabeira

Os calos de mangabeira selecionados para o processo de criopreservação apresentavam aspecto friável e coloração variando desde o verde-claro ao vermelho-escuro. Entretanto, após a exposição ao NL o aspecto desses calos passou a uma coloração marron-escuro conforme a Figura 3.

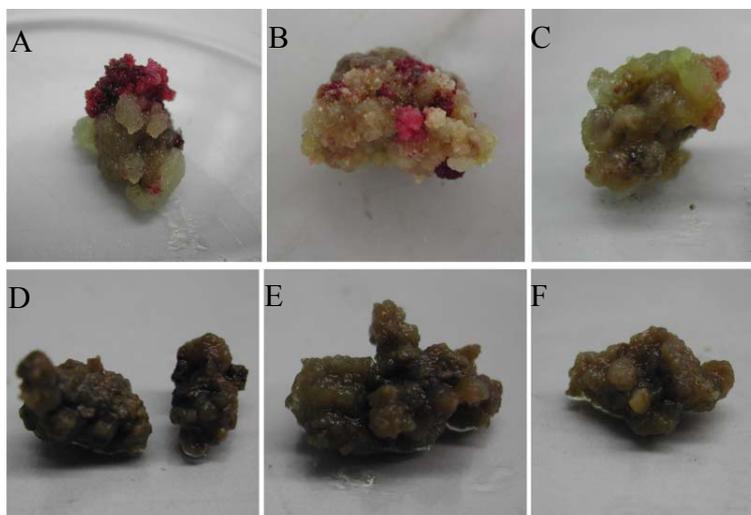


FIGURA 3 Aspecto visual dos calos de mangabeira utilizados para a criopreservação (A, B e C) e após a exposição ao nitrogênio líquido (-196°C) (D, E e F).

Após a criopreservação, a viabilidade celular, analisada por meio do Teste com CTT indicou diferenças significativas entre os diferentes tratamentos (Tabela 2). Observou-se uma redução considerável da viabilidade dos calos criopreservados entre o 30° dia e o 60° dia de cultivo.

TABELA 2 Viabilidade celular de calos de mangabeira, expressa em porcentagem de formazan produzido em relação ao controle, ao 10° e 30° dia de cultivo após exposição ao nitrogênio líquido (-196°C)

Tratamentos	Dias de cultivo	
	30	60
Controle	100,0 a	100,0 a
Solução A	65,4 b	18,3 b
Solução B	36,9 c	5,45 c
PVS 2	36,8 c	6,62 c

* Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem estatisticamente entre si ($P < 0,05$), pelo Teste de Scott-Knott.

Dentre todas as soluções crioprotetoras utilizadas, a solução A foi a que manteve a maior viabilidade celular dos calos de mangabeira criopreservados, atingindo uma média de 65% de produção de formazan ao 30º dia de cultivo. O glicerol, principal componente da solução A, destaca-se por ser um composto não tóxico, osmorregulador, sendo capaz de manter a estabilidade da parede celular e a vitalidade da mesma durante o processo de congelamento (Arruda et al., 2007).

Os crioprotetores (DMSO, etileno glicol, glicerol entre outros) são compostos químicos utilizados para proteção do material biológico, porém podem ser responsáveis pela baixa viabilidade e menor taxa de regeneração após período de armazenamento (Verleysen et al., 2004), como pode ser observado neste trabalho.

Após exposição à temperatura de -196° C, o material biológico tem células vivas, enfraquecidas e mortas o que, possivelmente, pode fornecer informações errôneas sobre a viabilidade celular (Mikula et al., 2006). De acordo com Santos (2000) as células podem dar reação de coloração positiva imediatamente depois do descongelamento.

Mikula et al. (2006), observaram uma redução significativa na viabilidade das suspensões celulares de *Gentiana* spp, 24 horas após a criopreservação. Os mesmos autores recomendaram que o teste CTT deva ser realizado 48 horas após descongelamento a fim de extinguir a atividade enzimática das células danificadas. Assim, neste trabalho as análises foram realizadas em intervalos de tempo maiores a fim de obter resultados mais confiáveis da viabilidade dos calos criopreservados.

Além da viabilidade celular, foi realizada uma análise ultra-estrutural nos calos de mangabeira criopreservados 24 horas e 30 dias após o descongelamento a fim de compreender melhor os efeitos do NL e a ação das soluções crioprotetoras nas células.

Observou-se uma predominância de células isodiamétricas nos calos de mangabeira em todos os tratamentos analisados (Figura 4 a 7). No tratamento controle as células apresentaram-se íntegras, porém verificou-se a presença de aglomerados de células plasmolisadas que não se recuperaram, mesmo 30 dias após o período de desidratação (Figura 4 A-D).

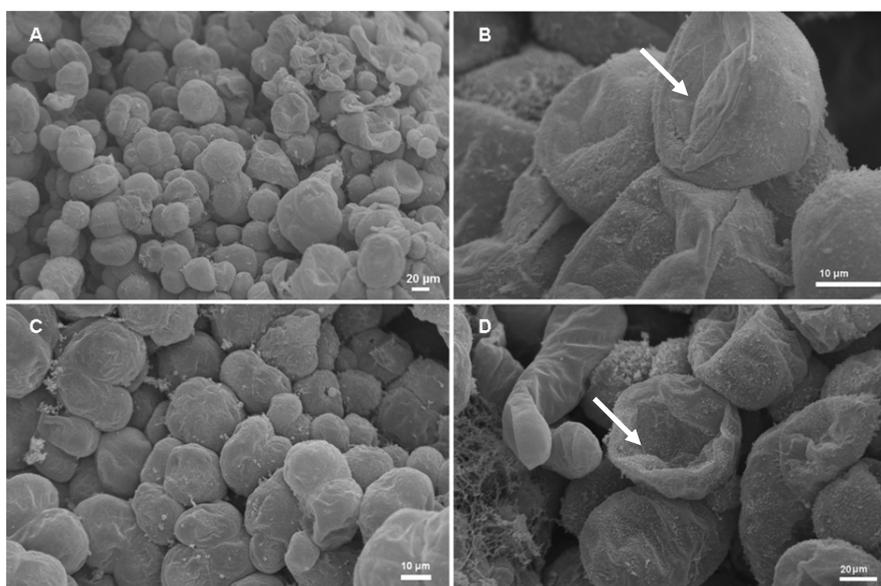


FIGURA 4 Análise ultra-estrutural dos calos de mangabeira provindos do tratamento controle. Após o período de desidratação (A = 20 μ m e B = 10 μ m), 30 dias em meio de cultivo (C = 10 μ m e D = 20 μ m) e aspecto geral das células plasmolisadas (setas em B e D).

Provavelmente, a perda da integridade celular e os danos irreversíveis em algumas células podem estar relacionados à concentração ou tempo de exposição do tecido ao manitol.

A desidratação que, a princípio parece uma etapa simples, não é um processo trivial, pois a água tem muitas funções biológicas fundamentais nas células de organismos vivos. É importante solvente, meio de transporte e um

constituente essencial e estabilizador da estrutura das macromoléculas e organelas (Santos, 2001).

Volk & Caspersen (2007) observaram que a extensão da plasmólise nas células em resposta à desidratação é altamente dependente do tipo de célula, tamanho e outras características fisiológicas. Esses autores demonstraram que células menores, vacúolos pequenos e citoplasma denso apresentam menor retração do volume celular.

Embora os mecanismos fisiológicos subjacentes à tolerância à dessecação não tenham sido completamente esclarecidos, o acúmulo de açúcares solúveis e outros solutos, é amplamente reconhecido como uma parte importante da proteção do estresse celular (Crowe et al., 1992 citado por Hinch et al., 1999). As plantas utilizam adaptações bioquímicas para lidar com situações de estresse de forma a não afetar a integridade celular.

Pelas observações no MEV verificou-se a formação de um envoltório em torno das células para todas as soluções crioprotetoras utilizadas (Figuras 5, 6 e 7). Essa capa protetora, possivelmente, permite maior integridade celular e mantém a viabilidade do calo quando exposto à temperatura ultrabaixa de -196°C .

Os calos criopreservados na presença da solução A apresentaram, em sua grande maioria, células íntegras, porém observou-se a presença de algumas células plasmolisadas e rompidas (Figura 5 A-B). Constatou-se a permanência da capa protetora por até 30 dias após o descongelamento (Figura 5 C-D).

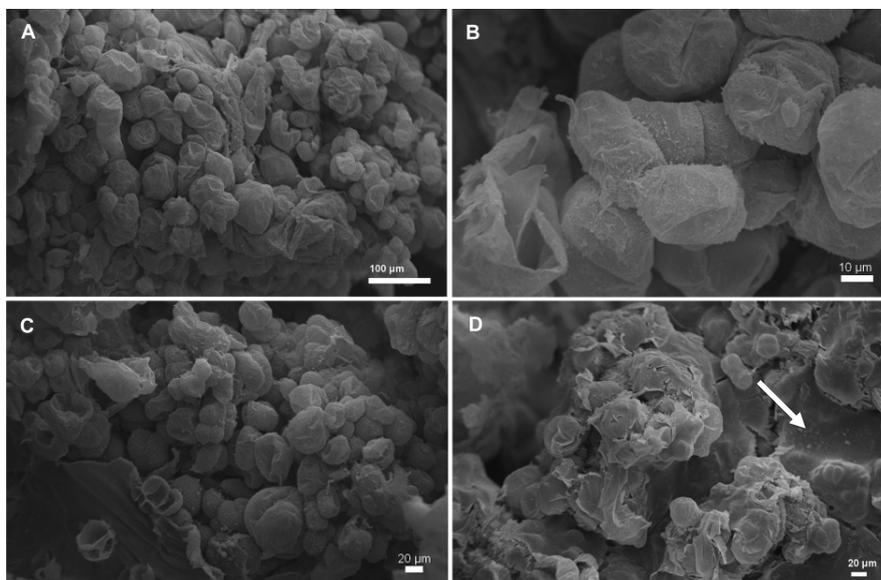


FIGURA 5 Análise ultra-estrutural de calos mangabeira criopreservados na presença da solução A. Após período de descongelamento (A = 100 μ m e B = 10 μ m) e 30 dias em meio de cultivo (C = 10 μ m e D = 20 μ m) com destaque para o acúmulo da solução crioprotetora na superfície células (seta em D).

A conservação de germoplasma através do congelamento mantém as características do material e suas alterações são menores do que qualquer outro método convencional. Mesmo assim, nem sempre é possível manter uma integridade celular, pois a água congelada tem um comportamento peculiar: expande-se ao cristalizar e, ao fundir-se, tem a tendência de recristalizar formando longos e protudentes cristais de gelo (Carneiro & Cal-Vidal, 2000).

Esses cristais geram uma série de danos mecânicos, bioquímicos e osmóticos aos tecidos (Carvalho, 2007). O que possivelmente tenha ocorrido nos calos criopreservados quando se observa o aspecto danificado de algumas células, independente da solução crioprotetora utilizada.

Na presença da solução B, observou-se um menor acúmulo do crioprotetor aos 30 dias de cultivo, em relação às outras soluções utilizadas na

criopreservação dos calos de mangabeira. Entretanto, constatou-se um grande número de células danificadas de acordo com a análise ultra-estrutural dos calos (Figura 6 A-D).

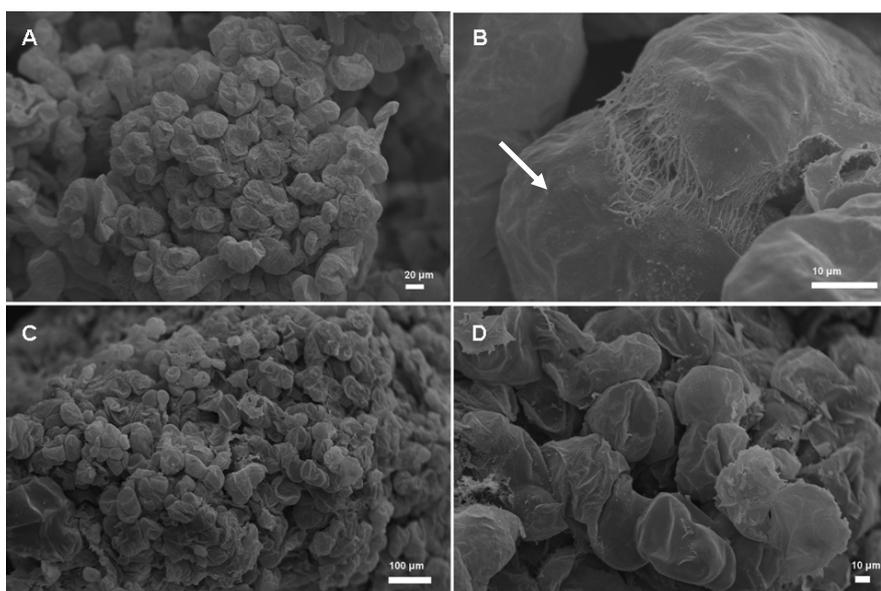


FIGURA 6 Análise ultra-estrutural de calos de mangabeira criopreservados na presença da solução B. Após período de descongelamento (A = 20µm e B = 10µm) com destaque para o acúmulo da solução crioprotetora na superfície células (seta em B) e 30 dias em meio de cultivo (C = 100µm e D = 10µm).

Comportamento semelhante foi observado para a solução de vitrificação PVS2 (Figura 7 A-D), na qual muitas células encontravam-se rompidas ou envoltas pela camada protetora. Esses aspectos observados, provavelmente, influenciaram na viabilidade celular dos calos após a exposição ao NL. Portanto, a análise ultra-estrutural dos calos vem complementar os resultados obtidos pelo Teste de CTT demonstrados na Tabela 2.

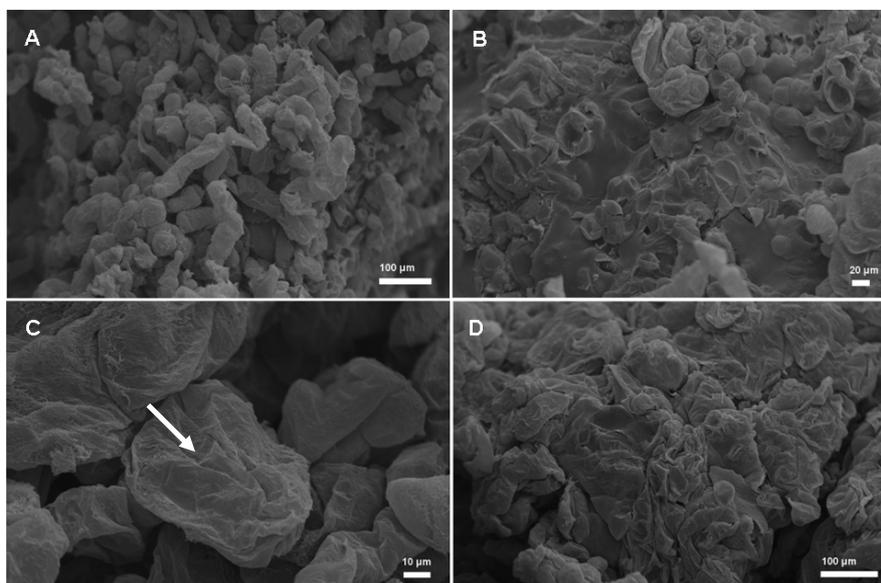


FIGURA 7 Análise ultra-estrutural de calos de mangabeira criopreservados na presença da solução vitrificação PVS2. Após período de descongelamento (A = 100 μ m e B = 20 μ m), 30 dias em meio de cultivo (C = 10 μ m e D = 100 μ m) e aspecto geral das células plasmolisadas (seta em C).

O estudo e a elucidação do mecanismo de ação das soluções crioprotetoras ainda é incipiente. Mas por meio da análise ultra-estrutural dos calos criopreservados, pode-se inferir que o acúmulo das soluções crioprotetoras pode estar relacionado à sua composição (alta viscosidade) ou a sua remoção não foi suficiente.

A criopreservação baseada na técnica de vitrificação já mostrou-se eficiente para diversos tipos de explantes como ápices caulinares (Pennycooke & Towill, 2000), calos embriogênicos (Sudarmonowati, 2001; Chenshu et al., 2003, Matsumoto et al., 2004), suspensões celulares (Seijo, 2000; Ishikawa et al., 2005).

Pesquisas na área de criobiologia vêm se destacando no cenário mundial com o objetivo de compreender os mecanismos biológicos envolvidos em todas

as etapas da conservação. Entretanto, diante da diversidade de respostas entre as diferentes espécies vegetais, torna-se cada vez mais relevante o desenvolvimento de pesquisas para o estabelecimento de protocolos de criopreservação.

6 CONCLUSÕES

As soluções crioprotetoras Solução A, Solução B, PVS2 e PVS2 modificado apresentam efeitos significativos no crescimento de calos de mangabeira.

As soluções de vitrificação PVS2 e PVS2 modificado promovem uma queda considerável na viabilidade celular dos calos.

O teste CTT é eficiente na determinação da viabilidade dos calos de mangabeira criopreservados.

Verifica-se elevado número de células plasmolisadas e o acúmulo das soluções crioprotetoras nos calos após criopreservação.

7 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

ALVES, E. **Curso introdutório à microscopia eletrônica de varredura.** Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2004. 43 p. Apostila.

ARRUDA, P. V. de; RODRIGUES, R. de C. L. B.; FELIPE, M. G. de A. Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. **Analytica**, São Paulo, v. 5, n. 26, dez. 2006.

BEKHEET, S. A.; TAHA, H. S.; SAKER, M. M.; SOLLIMAN, M. E. Application of cryopreservation technique for *in vitro* grown date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultures. **Journal of Applied Sciences Research**, Punjab, v. 3, n. 9, p. 859-866, Sept. 2007.

BENSON, E. E. Cryopreservation. In: DIXON, R. A.; GONZALES, R. A. (Ed.). **Plant cell culture: a practical approach**. 2. ed. Oxford: IRL, 1994. p. 147-166.

BLOCK, M. D.; BROUWER, D. D. A simple and robust *in vitro* assay to quantify the vigour of oilseed rape lines and hybrids. **Plant Physiology Biochemistry**, New Delhi, v. 40, n. 7, p. 845-852, June 2002.

CARNEIRO, C. S.; CAL-VIDAL, J. Estruturação de cristais de gelo em soluções aquosas contendo solutos diversos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 2, p. 423-432, fev. 2000.

CARVALHO, F. de. Indução de estruturas esféricas ou similares durante a cristalização da água por processos físicos ou químicos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 3, p. 814-820, maio/jun. 2007.

CHENSHU, A.; WANG, X.; YUAN, X.; ZHAO, B.; WANG, Y. Optimization of cryopreservation of *Artemisia annua* L. callus. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 25, n. 1, p. 35-38, Jan. 2003.

DANSO, K. E.; FORD-LOYD, B. V. Cryopreservation of embryogenic calli of cassava using sucrose cryoprotection and air desiccation. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 22, n. 9, p. 623-631, Apr. 2004.

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, v. 14, n. 1, p. 243-250, Jan./Feb. 1993.

ENGELMANN, F. Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (Ed.). **Cryopreservation of tropical plant germplasm: current research progress and application**. Rome: IPGRI, 2000. p. 8-20.

ENGELMANN, F. Plant cryopreservation: progress and prospects. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 40, n. 5, p. 427-433, Sept./Oct. 2004.

FANG, J. Y.; WETTEN, A.; HADLEY, P. Cryopreservation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) somatic embryos for long-term germplasm storage. **Plant Science**, Amsterdam, v. 166, n. 3, p. 669-675, Mar. 2004.

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., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar. 2000. p. 225-258.

HINCHA, D. K.; OLIVER, A. E.; CROWE, J. H. Lipid composition determines the effects of arbutin on the stability of membranes. **Biophysical Journal**, New York, v. 77, n. 10, p. 2024-2034, Oct. 1999.

ISHIKAWA, M.; SUZUKI, M.; ROBERTSON, A. J.; GUSTA, L. Effect of growth phase on survival of bromegrass suspension cells following cryopreservation and abiotic stresses. **Annals of Botany**, London, v. 97, n. 3, 2006. Disponível em: <<http://aob.oxfordjournals.org/cgi/content/full/97/3/453>>. Acesso em: 15 mar. 2009.

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

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. **HortScience**, Alexandria, v. 15, n. 3, p. 416-417, May/June 1980.

MATSUMOTO, K.; RAHARJO, S. H. T.; DHEKNEY, S.; MOON, P. A.; LITZ, R. E. Criopreservação e embriogênese somática de calos de *Dimocarpus longan*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 12, p. 1261-1263, dez. 2004.

MIKULA, A.; NIEDZIELSKI, M.; RYBCZYNSKI, J. J. The use of TTC reduction assay for assessment of *Gentiana* spp. cell suspension viability after cryopreservation. **Acta Physiologiae Plantarum**, Warszawa, v. 28, n. 4, p. 315-324, Apr. 2006.

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

PANIS, B.; LAMBRADI, M. Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). In: INTERNATIOL WORKSHOP ON THE ROLE OF BIOTECHNOLOGY, 2005, Turin. **Anais....**Turin: Villa Gualino, 2005. p. 43-54.

PANIS, B.; PIETTE, B.; SWENNEN, R. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all Musaceae. **Plant Science**, Amsterdam, v. 168, n. 1, p. 45-55, Jan. 2005.

PENNYCOOKE, J. C.; TOWILL, L. E. Cryopreservation of shoot tips from *in vitro* plants of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] by vitrification. **Plant Cell Reports**, Berlim, v. 19, n. 7, p. 733-737, June 2000.

PINHEIRO, C. S. R.; MEDEIROS, D. N. de; MACÊDO, C. E. C. de; ALLOUFA, M. A. I. Germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomez) em diferentes meios de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 413-416, ago. 2001.

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

RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A.; BRASIL, A. F.; FIGUEIREDO, J. R. Criopreservação de oócitos mamíferos: importância, estado atual, limitações e perspectivas. **Ciência Animal**, Fortaleza, v. 11, n. 2, p. 101-112, jan. 2001.

SAKAI, A. Cryopreservation of germplasm of woody plants. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry, Cryopreservation of plant germplasm I**. New York: Springer-Verlag, 1995. v. 32, p. 53-69.

SAKAI, A.; ENGELMANN, F. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. **Cryo-letters**, London, v. 28, n. 3, p. 151-172, May/June 2007.

SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. **Plant Cell Reports**, Berlim, v. 9, n. 1, p. 30-33, June 1990.

SALOMÃO, A. N.; SANTOS, I. R. I.; MUNDIM, R. C. **Conservação, manejo e uso de sementes de *Hancornia speciosa* Gomez (Apocynaceae)**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. (Boletim Técnico; Documento 0102-0110, 126).

SANTOS, I. R. I. Criopreservação de germoplasma vegetal. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 4, n. 20, maio/jun. 2001.

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

SEIJO, G. Effects of preculture with sucrose and aba on cell suspensions water status and its relation with vitrification resistance. **Revista Brasileira Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 12, n. 2, p. 166-180, jul. 2000.

SILVA, L. C. **Viabilidade de células pró-embriogênicas e suspensão celular de murici-pequeno**. 2009. 10 4p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SOARES, F. P.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A. A de; NOGUEIRA, R. C.; EMRICH, E. B.; MARTINOTTO, C. Organogênese direta em explantes caulinares de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1048-1053, jul./ago. 2007.

SUDARMONOWATI, E. Cryopreservation of garlic (*Allium sativum*) cv. Lumbu Hijau using vitrification technique. **Annales Bogorienses**, Bogor, v. 8, n. 1, p. 39-47, Jan. 2001.

VERLEYSSEN, H.; SAMYN, G.; VAN BOCKSTAELE, E.; DEBERGH, P. Evaluation of analytical techniques to predict viability after cryopreservation. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 77, n. 1, p. 11-21, Apr. 2004.

VOLK, G. M.; CASPERSEN, A. M. Plasmolysis and recovery of different cell types in cryoprotected shoot tips of *Mentha x piperita*. **Protoplasma**, New York, v. 231, n. 3/4, p. 215-226, May 2007.

WHITERS, L. A. Cryopreservation of cultured plant cells and protoplasts. In: VASIL, J. K. (Ed.). **Cell culture and somatic cell genetics of plants**. Orlando: Academic, 1985. p. 253-316.

CAPÍTULO 3

SEMENTE SINTÉTICA A PARTIR DE GEMAS APICAIS DE MANGABEIRA: CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL E ARMAZENAMENTO

1 RESUMO

A tecnologia de produção de sementes sintéticas vem se revelando como importante ferramenta em trabalhos de micropropagação e conservação *in vitro* de germoplasmas. O baixo custo, a rápida multiplicação e a facilidade de manuseio e armazenamento dos propágulos fazem da técnica uma alternativa para a conservação da mangabeira. A mangabeira é uma importante frutífera nativa do Cerrado, porém a sensibilidade de suas sementes ao dessecamento inviabiliza a conservação da espécie por meio dos métodos tradicionais. Objetivou-se, neste trabalho, foi determinar a necessidade nutricional para regeneração das sementes sintéticas de mangabeira e desenvolver um método para seu armazenamento. Gemas apicais foram misturadas à matriz de alginato de sódio 2,5%, gotejadas em CaCl_2 por 20 minutos e posteriormente, imersas em KNO_3 para a descomplexação das cápsulas. Foi testada a constituição de sais e água associados à matriz de alginato de sódio e a concentração de sais do meio de cultura (WPM e $\frac{1}{2}$ WPM). Quanto ao armazenamento, foi avaliada a associação de diferentes concentrações de sacarose à matriz de alginato. As gemas apicais encapsuladas foram armazenadas em temperatura de $\pm 4^\circ \text{C}$ por 7, 15 e 30 dias e em nitrogênio líquido por 60 minutos. O emprego do meio WPM associado à matriz de encapsulamento e a inoculação em meio WPM contendo metade da concentração de seus sais promoveram taxa de 90% de regeneração das sementes sintéticas. A adição de sacarose à matriz de alginato de sódio propiciou maior tolerância na conservação das sementes sintéticas à temperatura de $\pm 4^\circ \text{C}$, atingindo média de 60% de regeneração. Não houve regeneração das cápsulas após exposição ao nitrogênio líquido (-196°C).

Termos para indexação: *Hancornia speciosa*, alginato de sódio, gemas apicais, meio de cultura.

2 ABSTRACT

The synthetic seed production technology has come to be an important tool in micropropagation and *in vitro* germplasm conservation work. The low cost, the fast multiplication and the ease of handling and storage of the seedlings make the technique an alternative for the mangabeira propagule conservation. The mangabeira is an important native fruit from Brazilian Cerrado, however the sensitivity of its seeds to drying makes the conservation of the species unfeasible through the traditional methods. The aim of this work was to determine the nutritional necessity for the regeneration of synthetic mangabeira seeds and to develop a method for their storage. Apical buds were mixed to the 2.5% sodium alginate matrix, dripped in CaCl_2 for 20 minutes and later, immersed in KNO_3 for the descomplexation of the capsules. The constitution of salts and water associated to the sodium alginate matrix and the concentration of the culture medium salts (WPM and $\frac{1}{2}$ WPM) were tested. For the storage, the association of different sucrose concentrations to the alginate matrix was evaluated. The encapsulated apical buds were stored at $\pm 4^\circ \text{C}$ for 7, 15 and 30 days and in liquid nitrogen for 60 minutes. The use of WPM medium associated to the encapsulament matrix and the inoculation in WPM medium containing half its salts concentration promoted a 90% synthetic seed regeneration rate. The sucrose addition to sodium alginate matrix propitiated the highest tolerance in the conservation of the synthetic seeds at $\pm 4^\circ \text{C}$, reaching an average of 60% regeneration. There was no regeneration of the capsules after exposure to the liquid nitrogen (-196°C).

Index terms: *Hancornia speciosa*, sodium alginate, apical buds, culture medium.

3 INTRODUÇÃO

Diante da biodiversidade do Cerrado, a implementação de protocolos de conservação de espécies frutíferas nativas é de grande relevância para a preservação de espécies desse bioma. O Cerrado representa um complexo bioma rico em heterogeneidade de habitats e diversidade vegetal que ocupa cerca de 23% do território nacional. Grande parte desse ecossistema já foi alterado em função da ocupação agrícola e urbana.

Neste cenário, o Cerrado tem sido agredido e depredado, colocando em risco de extinção várias espécies de plantas, entre elas algumas frutíferas nativas (Soares et al., 2009). A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomez), pertencente à família Apocynaceae, está inserida como importante espécie do Cerrado e de grande potencial para o estudo da conservação *in vitro*.

Planta arbórea de porte médio, atinge de 5 a 10 metros de altura. Embora também seja produtora de látex, o fruto, denominado “mangaba” é o seu principal produto. A mangaba apresenta ótimo aroma e sabor, sendo utilizada na produção de doces, xarope, compotas, vinho, vinagre e principalmente suco e sorvete (Souza Neto et al., 2002).

Contudo, suas sementes são extremamente recalcitrantes o que dificulta o armazenamento pelos métodos tradicionais. Além disso, o extrativismo é, atualmente, a sua única forma de exploração (Soares et al., 2007). Assim, uma técnica eficiente de conservação de germoplasma precisa ser desenvolvida para essa espécie.

A tecnologia de sementes sintéticas baseada no encapsulamento de propágulos (embriões somáticos, gemas apicais e laterais, tecidos meristemáticos) em uma cápsula de hidrogel foi proposta por Redenbaugh et al. (1984). As principais vantagens dessa tecnologia são a proteção dos propágulos,

facilidade de armazenamento, conservação e intercâmbio de germoplasmas (Guerra et al., 1999; Raí et al., 2009).

A matriz alginato de sódio envolvendo os propágulos proporciona resistência para sua manipulação e preserva a viabilidade caso a matriz seja enriquecida com substâncias nutritivas (Prewein & Wilhelm 2003 citado por Pintos et al., 2008). A adição de nutrientes, fontes de carbono, reguladores de crescimento e agentes antimicrobianos na matriz de alginato facilita o crescimento e a sobrevivência dos propágulos encapsulados (Guerra et al., 2001).

As sementes sintéticas podem ser armazenadas a curto prazo em temperatura de $\pm 4^{\circ}$ C ou, a longo prazo, em nitrogênio líquido. Além de manterem a integridade genética do material, requerem mínimo espaço de armazenamento e manutenção (Rai et al., 2009).

A tecnologia de encapsulamento vem se destacando nos últimos anos como importante ferramenta na propagação e conservação de germoplasmas vegetais e, de acordo com Diniz (2004), essa técnica é absolutamente inovadora no Brasil. Objetivou-se, neste trabalho, determinar a necessidade nutricional para germinação das sementes sintéticas de mangabeira e desenvolver um método para seu armazenamento.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, Setor de Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia na Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG.

4.1 Características nutricionais da matriz de encapsulamento e meio de cultura na produção de sementes sintéticas de mangabeira

Brotações de mangabeira estabelecidas em meio de cultura WPM (Lloyd & McCown, 1980) + 8,87 μM de BAP acrescidos de 3% sacarose e solidificado com 0,6% de ágar, de acordo com o protocolo estabelecido por Soares et al. (2007), foram utilizadas como fonte de explante.

Gemas apicais foram excisadas das brotações de mangabeira e misturadas à matriz de alginato de sódio 2,5% (SIGMA) e, com auxílio de pipeta automática e ponteiras autoclavadas, as gemas foram resgatadas individualmente e gotejadas em solução com cloreto de cálcio (100 mM) na qual permaneceram por 20 minutos.

Posteriormente à fase de complexação, as unidades encapsuláveis foram mergulhadas em água destilada autoclavada para retirada do excesso de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e, em seguida, imersas em solução de nitrato de potássio (100 mM) para a descomplexação das cápsulas por 15 minutos (Figura 1). Foi testada a influência da constituição de água e sais ($\frac{1}{2}$ WPM e WPM) associados à matriz de alginato de sódio assim como a concentração dos sais do meio de cultura WPM e WPM com metade da concentração de seus sais.

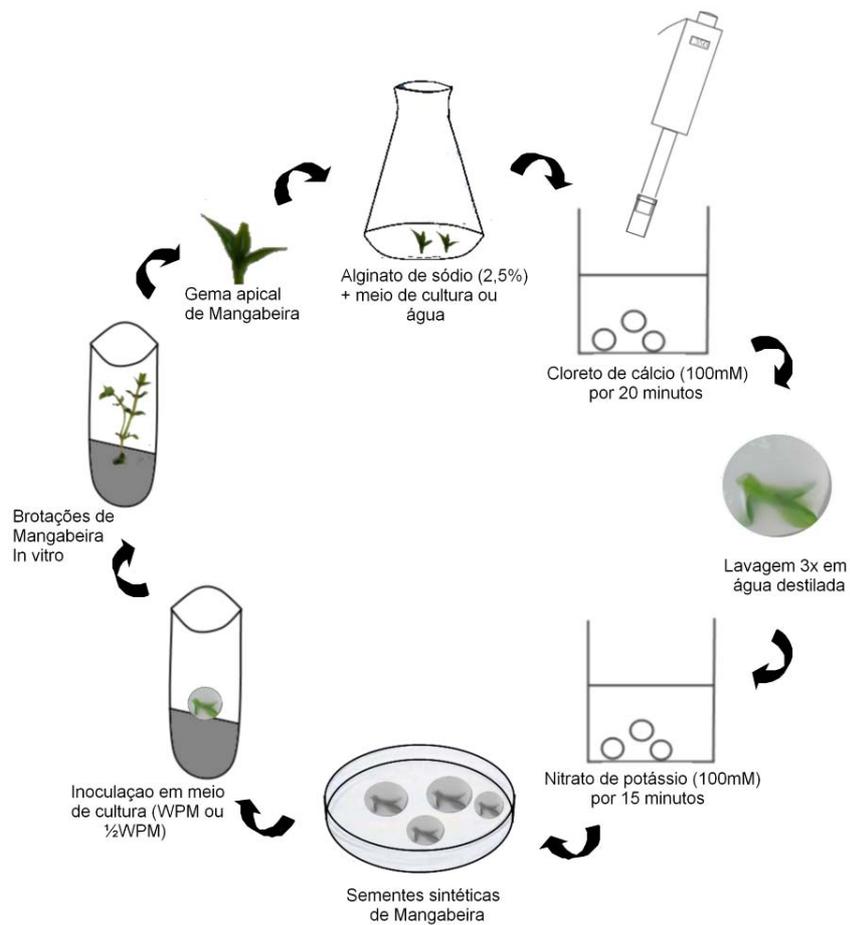


FIGURA 1 Esquema da produção de sementes sintéticas a partir de gemas apicais oriundas de brotações *in vitro* de mangabeira (Autor: Nogueira, G.F.).

As cápsulas contendo as gemas apicais foram inoculadas em meio de cultura (WPM ou $\frac{1}{2}$ WPM), acrescidos de 3% de sacarose e $8,87 \mu\text{M}$ de BAP e mantidas em sala de crescimento sob irradiância de $43 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $25 \pm 2^\circ \text{C}$.

A regeneração, o comprimento das brotações, o número de folhas e a formação de novas brotações foram avaliados a cada 15 dias até atingir 45 dias de cultivo. Foram consideradas regeneradas as sementes sintéticas que apresentavam as cápsulas rompidas, a partir do desenvolvimento das gemas apicais.

O experimento foi conduzido em esquema fatorial (2 meio cultura x 3 cápsula x 3 períodos de avaliação), com 10 repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por um tubo de ensaio contendo uma unidade encapsulável. Os dados foram analisados pelo Programa Estatístico SISVAR (Ferreira, 2000), sendo as médias comparadas pelo Teste de Scott-Knott, a 5% de significância.

4.1.1 Enraizamento das brotações oriundas da germinação das sementes sintéticas

Brotações obtidas no item 4.1 foram inoculadas em meio WPM, contendo 14,76 μM de AIB, 3% sacarose e 0,1% de carvão ativado. O meio foi solidificado com 0,6% de ágar, pH ajustado para 5,8 e autoclavado a 121° C por 20 minutos, de acordo com protocolo desenvolvido por Soares et al. (2007).

Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento a $25 \pm 2^\circ \text{C}$ e na ausência de luz, por período de 15 dias. As brotações foram transferidas para novo meio WPM, porém sem reguladores de crescimento e mantidas em sala de crescimento sob irradiância de $43 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $25 \pm 2^\circ \text{C}$. A formação de raízes foi avaliada aos 30 dias de cultivo.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com 10 repetições por tratamento (brotações com origens marcadas), sendo cada

repetição composta por um tubo de ensaio contendo uma brotação. Os dados foram analisados pelo Programa Estatístico SISVAR.

4.2 Armazenamento das sementes sintéticas

Foi utilizado como fonte de explante, brotações estabelecidas em meio de cultura WPM + 8,87 μ M de BAP, acrescidos de 3% sacarose e solidificado com 0,6% de ágar, de acordo com o protocolo estabelecido por Soares et al. (2007).

Gemas apicais foram excisadas das brotações de mangabeira e misturadas à matriz de alginato de sódio 2,5% (SIGMA), com auxílio de pipeta automática e ponteira autoclavadas, as gemas foram resgatadas individualmente e gotejadas em solução com cloreto de cálcio (100 mM) na qual permaneceram por 20 minutos.

Foram testadas diferentes constituições da matriz de encapsulamento e seu armazenamento. Os tratamentos foram constituídos de matriz de alginato de sódio + meio WPM; alginato de sódio + meio WPM + 1% sacarose; alginato de sódio + meio WPM + 3% sacarose; alginato de sódio + meio WPM + 2,0 M glicerol + 13 % sacarose (constituição da solução A). E, o armazenamento foi realizado à temperatura de $\pm 4^{\circ}$ C (geladeira) por 7, 15 e 30 dias ou em nitrogênio líquido por 60 minutos. O grau de umidade das cápsulas foi determinado em estufa a 105° C por 24 horas.

As unidades encapsuláveis armazenadas em nitrogênio líquido (NL) foram desidratadas em câmara de fluxo laminar por 60 minutos e, em seguida, submetidos ao armazenamento a -196° C.

Decorrido o tempo de armazenamento, as cápsulas contendo as gemas apicais de mangabeira foram imersas em solução de nitrato de potássio (100 mM) para a descomplexação das cápsulas, por 15 minutos. Essas foram

inoculadas em meio de cultura acrescidos de 3% de sacarose e 8,87 μM de BAP e mantidas em sala de crescimento sob irradiância de 43 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $25 \pm 2^\circ \text{C}$.

O experimento foi conduzido em esquema fatorial (4 constituições da matriz de encapsulamento x 4 condições de armazenamento) com 10 repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por um tubo de ensaio contendo uma unidade encapsulável. Os dados foram analisados pelo Programa Estatístico SISVAR e as médias comparadas pelo Teste de Scott-Knott, a 5% de significância.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Características nutricionais da matriz de encapsulamento e meio de cultura na produção de sementes sintéticas de mangabeira

Observou-se que a taxa de regeneração das sementes sintéticas *in vitro*, avaliada por meio do rompimento das cápsulas, foi de aproximadamente 70% aos 45 dias de cultivo (Figura 2).

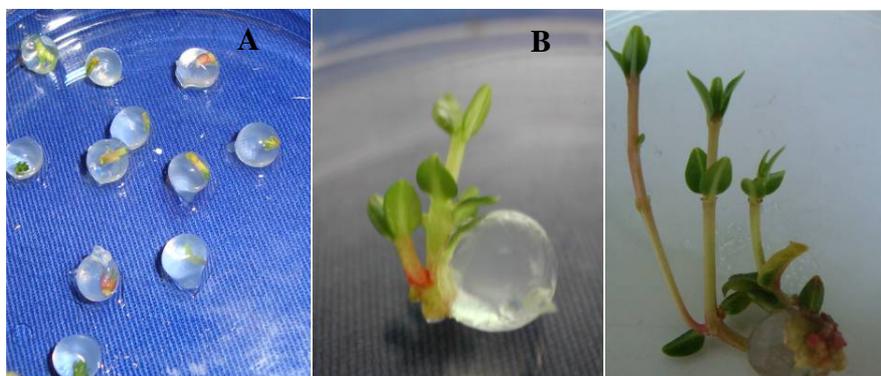


FIGURA 2 Aspecto das sementes sintéticas, a partir do encapsulamento de gemas apicais de mangabeira (A), rompimento das cápsulas pelas gemas regeneradas (B) e desenvolvimento das brotações *in vitro* (C).

De acordo com a análise de variância, a interação entre a constituição de água e sais associados à matriz de alginato de sódio e a concentração dos sais do meio de cultura apresentaram diferenças significativas, quanto ao porcentual de regeneração das sementes sintéticas (Tabela 1).

O aumento dos níveis de nutrientes na constituição da cápsula resultou em altas taxas de regeneração das gemas apicais, atingindo 90% quando inoculadas em meio WPM, contendo metade da concentração de seus sais.

TABELA 1 Efeito da constituição do meio de cultura e da matriz de alginato de sódio na regeneração *in vitro* das sementes sintéticas de mangabeira.

Constituição meio de cultura	Constituição da matriz de alginato de sódio		
	H ₂ O	½ WPM	WPM
½ WPM	56,0 b*	74,0 a	90,0 a
WPM	74,0 a	74,0 a	66,0 b

* Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem estatisticamente entre si (P<0,05), pelo Teste de Scott-Knott.

O contrário foi observado quando as sementes sintéticas foram inoculadas em meio WPM contendo concentração total dos sais. Neste trabalho

verificou-se que quanto maior os níveis de sais disponíveis no meio de cultura, menor é a necessidade de sais associados à cápsula de alginato de sódio.

A cápsula serve de proteção ao propágulo contra danos mecânicos durante a armazenagem, transporte e semeadura, além de funcionar como um endosperma sintético. Arun Kumar et al. (2005) declararam que, em alguns casos, a ausência de um tecido nutritivo, como o endosperma das sementes naturais, dificulta a emergência e a regeneração das sementes sintéticas.

O emprego de uma matriz de encapsulamento constituída por 75% dos sais e vitaminas de MS, acrescido de carvão ativado promoveu as mais altas taxas de conversão de sementes sintéticas de pimenta-longa (Pereira et al.; 2008). Cangahuala-Inocente et al. (2007) concluíram que o uso de BAP e GA₃ durante o encapsulamento, aumentou as taxas de conversão dos embriões somáticos de Feijoa em plântulas normais.

Castillo et al. (1998) observaram que a regeneração de embriões somáticos de papaya encapsulados foi influenciada pela presença ou ausência de sais na constituição da cápsula, além de outros fatores como concentração do alginato de sódio e tempo de complexação em CaCl₂.

Já Cartes et al. (2009) constataram comportamentos distintos em relação a regeneração de diferentes tipos de explantes encapsulados. De acordo com esses autores, a germinação de embriões zigóticos (100%) foi substancialmente superior ao alcançado pelos embriões somáticos (45%).

Em relação ao comprimento das brotações de mangabeira emergidas das sementes sintéticas, nenhuma diferença significativa foi observada para a constituição do endosperma sintético ou meio de cultura, diferentemente do fator dias de avaliação. Ao 30º dia de cultivo, o comprimento das brotações alcançou média de 1,31 cm, valor significativamente inferior ao observado nos 45º dia de cultivo (2,25 cm), o que pode ser explicado pelo maior tempo de permanência no meio de cultivo e, conseqüentemente, maior crescimento das plântulas.

Com relação aos outros parâmetros avaliados como número de folhas (média de 4,61) ou formação de novas brotações (média de 1,08), não se observou diferenças significativas entre os fatores estudados (meio de cultura x cápsula x períodos de avaliação) até os 45 dias de cultivo.

Em geral, os estudos sobre encapsulamento envolvem o emprego de embriões somáticos como fonte de explantes, havendo poucas pesquisas utilizando outros tipos de explantes como unidades encapsuláveis (Soneji et al., 2002; Pereira et al., 2008). A principal vantagem desses explantes não embriogênicos seria naquelas culturas onde a embriogênese somática ainda não está bem estabelecida ou não produz embriões de qualidade uniforme (Rao et al., 1998).

O interesse em utilizar a tecnologia de encapsulamento tem sido continuamente crescente para diversas frutíferas e, recentemente, o uso de gemas apicais como explante foram utilizadas com sucesso para espécies como kiwi, maçã, pêra, abacaxi entre outros (Rai et al., 2009).

O encapsulamento de gemas apicais de mangabeira demonstrou ser uma ferramenta promissora para propagação da espécie, respondendo positivamente à regeneração e ao desenvolvimento *in vitro*, após a produção de um endosperma sintético adequado.

De acordo com Guerra et al. (1999), a tecnologia de sementes sintéticas ainda deve ser aprimorada para que seja amplamente empregada. Pesquisas devem ser conduzidas principalmente no sentido de reconstituição dos endospermas sintéticos (similar ao das sementes naturais), e de aprimoramento da viabilidade e do período de conservação dessas.

5.2 Enraizamento das brotações oriundas da germinação das sementes sintéticas

As brotações de mangabeira desenvolvidas *in vitro* a partir da regeneração das gemas apicais encapsuladas em matriz de alginato de sódio foram transferidas para meio de enraizamento seguindo o esquema padrão da micropropagação.

Foi observado o enraizamento de aproximadamente 20% das brotações oriundas dos tratamentos nos quais o meio WPM estava associado à matriz de encapsulamento. Não houve formação de calos na base dos explantes. Estes resultados estão de acordo com Soares et al. (2007) que estabeleceram a metodologia de micropropagação da mangabeira, via organogênese direta.

Constatou-se que as brotações formadas a partir das cápsulas que continham apenas água em sua constituição, não enraizaram. Essas brotações apresentavam tamanho reduzido e a grande maioria, não resistiu a essa fase e morreu.

Para muitas plantas lenhosas, o enraizamento é a etapa mais difícil, mesmo na presença de auxinas exógenas (Assis & Teixeira, 1998). Contudo, os resultados encontrados demonstraram que as brotações provindas da germinação das sementes sintéticas são responsivas ao enraizamento e, acredita-se que um ajuste no protocolo de micropropagação poderia aumentar a formação de raízes para essa espécie.

Essa fase é crítica e representa um fator limitante à sobrevivência das plântulas, no processo de aclimatização (Grattapaglia & Machado, 1998). A aclimatização das plântulas é uma etapa essencial dentro da tecnologia de produção de sementes sintéticas, pois de acordo com Guerra et al. (1999) a técnica ainda não tem demonstrado aplicabilidade a nível de campo. A semeadura direta no campo exige, necessariamente, revestimentos protetores nas sementes encapsuladas, por serem sensíveis à dessecação, oscilação de

temperatura e ação de patógenos, quando expostos ao ambiente natural (Ara et al., 2000).

5.3 Conservação das sementes sintéticas a curto e longo prazo

Quanto à conservação das sementes sintéticas de mangabeira, observaram-se diferenças significativas em relação à constituição da matriz de alginato sódio e as diferentes formas de armazenamento, ou seja, em geladeira a $\pm 4^\circ \text{C}$ ou nitrogênio líquido a -196°C .

As gemas apicais envoltas em cápsulas contendo apenas meio WPM apresentaram uma taxa de regeneração de 20%, quando armazenadas à temperatura de $\pm 4^\circ \text{C}$, por 7 e 15 dias. Essa constituição da matriz de alginato de sódio foi pré-determinada no item 5.1. Entretanto, a mesma apresentou baixa proporção de regeneração após a conservação das sementes sintéticas em baixas temperaturas.

Vale ressaltar que, tanto o explante *in vitro* (gema apical) quanto a matriz de encapsulamento possui, em geral, alta quantidade de água (Engelmann, 2004; Santos, 2004), o que dificulta o seu armazenamento.

Diante do exposto, testou-se o acréscimo de sacarose nas concentrações de 1 e 3% e da solução A (2,0 M glicerol + 13 % sacarose) associados à matriz de alginato de sódio a fim de diminuir a quantidade de água livre e, provavelmente, aumentar o tempo de conservação das gemas apicais encapsuladas.

De acordo com a Tabela 2, verifica-se que o uso de sacarose associado à matriz de alginato proporcionou maiores porcentagens de regeneração das sementes sintéticas. Para ambas as concentrações de sacarose (1 e 3%), a regeneração atingiu média de 60%, após o armazenamento por 7 dias a $\pm 4^\circ \text{C}$. Um aumento significativo quando comparado com a regeneração das gemas

envoltas em cápsulas, contendo apenas meio WPM. Entretanto, não houve regeneração quando utilizou-se a solução A associada à matriz de alginato de sódio.

TABELA 2 Germinação e desenvolvimento *in vitro* das gemas apicais de mangabeira encapsuladas e conservadas por 7 dias, em temperatura de $\pm 4^{\circ}$ C.

Tratamento	Germinação (%)	Comprimento da Maior Brotação (cm)	Número de Folhas	Número de brotações
WPM	20 b*	0,55 b	1,20 b	0,30 a
1% Sacarose	60 a	1,32 a	4,60 a	0,50 a
3% Sacarose	60 a	1,03 a	3,40 a	0,50 a
Solução A	0 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b

* Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem estatisticamente entre si ($P < 0,05$), pelo Teste de Scott-Knott.

Diniz (2004), estudando a produção de sementes sintéticas a partir de gemas apicais de mandioca, afirmou que os propágulos encapsulados podem ser armazenados em geladeira por serem de fácil acomodação, ocupando pouco espaço. Também favorecem a conservação das espécies vegetais, pois podem ser armazenadas sem germinar e não precisam ser repicadas, como nas formas tradicionais de cultivo *in vitro*.

Quanto ao comprimento das brotações formadas a partir da regeneração das gemas apicais, o número de folhas e a formação de novos brotos não diferiram estatisticamente dentre os tratamentos nos quais adicionou-se a sacarose à matriz de alginato (Tabela 2). Entretanto, visualmente, as brotações provindas do encapsulamento, contendo 1% sacarose apresentaram-se mais vigorosas e com menor quantidade de calos na base dos explantes (Figura 3).

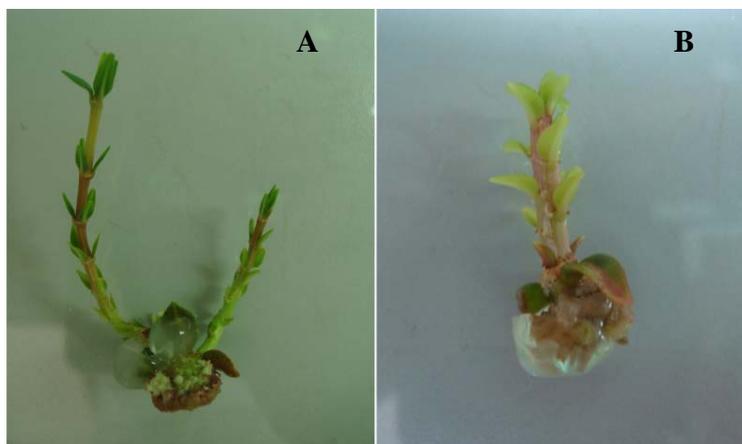


FIGURA 3 Aspecto visual das brotações de mangabeira obtidas a partir da regeneração das gemas apicais encapsuladas após armazenamento à temperatura de $\pm 4^{\circ}\text{C}$, por 7 dias. A) cápsula contendo 1% sacarose, com destaque para o aspecto vigoroso dos brotos formados; B) cápsula contendo 3% sacarose.

A regeneração das gemas apicais de mangabeira armazenadas por 15 dias à temperatura de $\pm 4^{\circ}\text{C}$ foi de 20% para matriz, contendo apenas meio WPM e 10% quando o açúcar foi incorporado à matriz de alginato. Não houve regeneração das sementes sintéticas quando essas foram armazenadas por 30 dias.

Rady & Hanafy (2004) observaram altas taxas de germinação das gemas apicais encapsuladas de *Gypsophila paniculata* após armazenamento por 30 dias à temperatura de 4°C . No mesmo trabalho, constatou-se influência da constituição da matriz de encapsulamento com relação à formação de brotos e enraizamento.

Recentemente, açúcares como sacarose, trealose, glucose têm sido utilizados como substâncias crioprotetoras, pois esses apresentam alta eficiência na estabilização de membranas durante a exposição a baixas temperaturas (Santos, 2001), aumentando a tolerância dos explante durante o estresse ao frio.

Entretanto, Bachiri et al. (2000) demonstraram que as células vegetais diferem muito em relação à sua tolerância ao aumento da concentração de sacarose. O que possivelmente poderia estar relacionado ao insucesso do armazenamento das sementes sintéticas, quando a solução A contendo 13% de sacarose foi incorporada à matriz de alginato de sódio. De acordo com Plessis et al. (1991) o aumento progressivo da concentração de sacarose poderia superar esse problema.

Outro aspecto a ser considerado, é o teor de umidade na qual essas sementes sintéticas foram armazenadas (aproximadamente 82%). Testes com diferentes pré-tratamentos e tempos de desidratação das sementes poderiam garantir uma melhor recuperação das gemas apicais após exposição a baixas temperaturas e viabilizar o armazenamento destas por maior intervalo de tempo.

As gemas apicais de mangabeira encapsuladas também foram armazenadas em nitrogênio líquido à temperatura de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 1 hora. Sob essa condição, as reações metabólicas ocorrem muito lentamente ou são totalmente paralisadas (Engelmann, 2004). Teoricamente, o material vegetal pode assim ser armazenado sem qualquer alteração, por um período indefinido de tempo.

Entretanto, não houve regeneração das gemas apicais após exposição à temperatura de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, independente da constituição da cápsula de alginato utilizada no processo de encapsulamento. Observou-se que as gemas apresentavam coloração verde após descongelamento, porém alguns dias após a inoculação em meio de cultivo estas se encontravam marrons e, aparentemente, mortas (Figura 4).

Resultado semelhante foi encontrado por Verleysen et al. (2004), em que os tecidos viáveis e não viáveis de ápices caulinares criopreservados foram distinguidos através da coloração: os viáveis apresentavam cor verde por

aproximadamente 2 horas e, logo em seguida, tornaram-se escuros devido aos processos de oxidação.

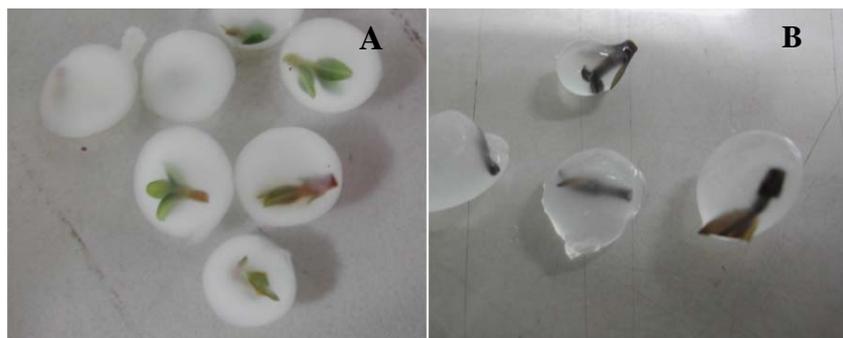


FIGURA 4 Criopreservação de gemas apicais de mangabeira encapsuladas em matriz de alginato de sódio 2,5%. A) após descongelamento; B) cultivadas em meio $\frac{1}{2}$ WPM por 7 dias.

Nos últimos anos, as técnicas de encapsulamento-desidratação e encapsulamento-vitrificação foram desenvolvidas e têm se destacado na criopreservação de ápices caulinares de diversas espécies de plantas tropicais e temperadas (Withers & Engelmann, 1997).

No método de encapsulamento-desidratação, os explantes encapsulados devem ser tratados com alta concentração de sacarose, secas até um teor de umidade de 20-30% (em câmara de fluxo laminar ou sílica gel) e, rapidamente congelados em nitrogênio líquido (Panis & Lambradi, 2005).

De acordo com Santos (2004), este método utiliza a sacarose como crioprotetor combinado com a desidratação parcial das cápsulas antes da exposição ao NL, evitando assim o uso de crioprotetores químicos que podem ser tóxicos para as células vegetais.

Ápices caulinares de videira encapsulados foram pré-cultivados em meio de cultivo suplementado com concentrações crescentes de sacarose (0,25 a 1,0 M), posteriormente, foram desidratados em câmara de fluxo laminar por

diferentes períodos de tempos a fim de determinar o tempo ótimo de desidratação das cápsulas (Wang et al., 2000). Esses autores constataram sobrevivência do material apenas quando os ápices caulinares atingiram teor de água inferior a 22,5%.

Neste trabalho, as sementes sintéticas ou sementes encapsuladas de mangabeira foram desidratadas em câmara de fluxo laminar por 1 hora. Entretanto, esse tempo não foi suficiente para uma boa desidratação das cápsulas, uma vez que essas permaneceram com alto teor de umidade durante a criopreservação, inviabilizando sua regeneração (70% de grau de umidade).

Wang et al. (2005) observaram que, cápsulas contendo gemas apicais de *Rubus idaeus* pré-cultivadas em sacarose continham 66% teor de umidade inicial e que, o conteúdo de água diminuiu para 22,2% nos primeiros 4 h em câmara de fluxo laminar e para 14,3%, após 8 horas de secagem. De acordo com esses autores, as maiores taxas de regeneração das gemas foram obtidas com desidratação de, pelo menos, 3h em fluxo laminar.

A tecnologia de encapsulamento-desidratação tem sido aplicada com sucesso na criopreservação de ápices caulinares em espécies como *Beta vulgaris* (Vandenbussche & Proft, 1998), *Vitis vinifera* (Wang et al., 2000), *Malus x domestica* (Paul et al., 2000), *Citrus* (Wang et al., 2002), *Rubus idaeus* (Wang et al., 2005), entre outras. De acordo com esses autores, dentre as vantagens desse método pode-se considerar que a regeneração dos brotos criopreservados é de forma direta e rápida, e normalmente, sem formação de calo.

6 CONCLUSÕES

O emprego do meio WPM associado à matriz de encapsulamento e o meio de cultivo contendo metade da concentração de seus sais favorecem a regeneração de sementes sintéticas de mangabeira.

Adição de 1% ou 3% de sacarose à matriz de alginato de sódio propicia maior tolerância na conservação das sementes sintéticas à temperatura de $\pm 4^{\circ}$ C.

Não houve regeneração das gemas apicais de mangabeira encapsuladas após exposição ao nitrogênio líquido (-196° C)

7 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

ARA, H.; JAISWAL, U.; JAISWAL, V. S. Synthetic seed: prospects and limitations. **Current Science**, Bangalore, v. 78, n. 12, June 2000.

ARUN KUMAR, M. B.; VAKESWARAN, V.; KRISHNASAMY, V. Enhancement of synthetic seed conversion to seedlings in hybrid rice. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht,, v. 81, n. 1, p. 97-100, Apr. 2005.

ASSIS, T. F. de; TEIXEIRAS, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. . In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, 1998. v. 1, p. 297-330.

BACHIRI, Y.; BAJON, C.; SAUVANET, A.; GAZEAU, C.; MORISSET, C. Effect of osmotic stress on tolerance of air-drying and cryopreservation of *Arabidopsis thaliana* suspension cells. **Protoplasma**, New York, v. 214, n. 3-4, p. 227-243, Sept. 2000.

CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; DAL VESCO, L. L.; STEINMACHER, D.; TORRES, A. C.; GUERRA, M. P. Improvements in somatic embryogenesis protocol in Feijoa (*Acca sellowiana* (Berg) Burret): Induction, conversion and synthetic seeds. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 111, n. 3, p. 228-234, Feb. 2007.

CARTES, P.; CASTELLANOS, H.; RIOS, D.; SÁEZ, K.; SPIERCCOLLI, S.; SÁNCHEZ, M. Encapsulated somatic embryos and zygotic embryos for obtaining artificial seeds of rauli-beech (*Nothofagus alpine* (Poepp. & Endl.) Oerst.). **Chilean Journal of Agricultural Research**, Santiago de Chile, v. 69, n. 1, p. 112-118, Jan./Mar. 2009.

CASTILLO, B.; SMITH, M. A. L.; YADAVA, U. L. Plant regeneration from encapsulated somatic embryos of *Carica papaya* L. **Plant Cell Reports**, Berlim, v. 17, n. 3, p. 172-176, Sept. 1998.

DINIZ, F. Sementes sintéticas: o desenvolvimento de sementes encapsuladas. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 7, v. 32, p. 4-7, jan./jun. 2004.

ENGELMANN, F. Plant cryopreservation: progress and prospects. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 40, n. 5, p. 427-433, Sept./Oct. 2004.

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., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar. 2000. p. 225-258.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, 1998. v. 1, p. 297-330.

GUERRA, M. P.; DAL VESCO, L. L.; DU CROQUET, P. H. J.; NODARI, R.; REIS, M. S. dos. Somatic embryogenesis in goiabeira serrana: genotype response, auxinic shock and synthetic seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 13, n. 2, p. 117-128, jul. 2001.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese Somática e Sementes Sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Culturas de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília, Embrapa, 1999. v. 2, p. 533-568.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. **HortScience**, Alexandria, v. 15, n. 3, p. 416-417, May/June 1980.

SOUZA NETO, R. D. V.; CINTRA, F. L. D.; LEDO, A. da S.; SILVA JÚNIOR, J. F.; COSTA, J. L. da S.; SILVA, A. A. G.; CUENCA, M. A. G. **Sistema de produção de mangaba para os tabuleiros costeiros e baixadas litorâneas**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2002. 22 p. (Boletim Técnico).

PANIS, B.; LAMBRADI, M. Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). INTERNATIOL WORKSHOP ON THE ROLE OF BIOTECHNOLOGY, 1., 2005, Italy. **Anais....** Italy: Villa Gualino, 2005. p. 43-54.

PAUL, H.; DAIGNY, G.; SANGWAN-NORREEL, B. S. Cryopreservation of apple (*Malus x domestica* Borkh) shoot tips following encapsulation-dehydration or encapsulation-vitrification. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 19, n. 8, p. 768-774, Aug. 2000.

PENNYCOOKE, J. C.; TOWILL, L. E. Cryopreservation of shoot tips from *in vitro* plants of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] by vitrification. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 19, n. 7, p. 733-737, June 2000.

PEREIRA, J. E. S.; GUEDES, R. S.; COSTA, F. H. S.; SCHMITZ, G. C. B. Composição da matriz de encapsulamento na formação e conversão de sementes sintéticas de pimenta-longa. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 1, p. 93-96, jan./mar. 2008.

PINTOS, B.; BUENO, M. A.; CUENCA, B.; MANZANERA, J. A. Synthetic seed production from encapsulated somatic embryos of cork oak (*Quercus suber* L.) and automated growth monitoring. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 95, n. 2, p. 217-225, Nov. 2008.

PLESSIS, P.; LEDDET, C.; DEREUDDRE, J. Resistance to dehydration and to freezing in liquid nitrogen of alginate coated shoot tips of grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay). **Comptes rendus de l' Academie des Sciences**, Montrouge, v. 313, n. 2, p. 373-380, Feb. 1991.

RADY, M. R.; HANAFY, M. S. Synthetic seed technology for encapsulation and regrowth of *in vitro*-derived *Gypsophila paniculata* L. shoot-tips. **Arab Journal of Biotechnology**, Arabic, v. 7, n. 2, p. 251-264, July 2004.

RAI, M. K.; ASTHANA, P.; SINGH, S. K.; JAISWAL, V. S.; JAISWAL, U. The encapsulation technology in fruit plants: a review. **Biotechnology Advances**, New York, v. 27, n. 6, p. 671-679, June 2009.

RAO, P. S.; SUPRASANNA, P.; GANAPATHI, T. R.; BAPAT, V. A. Synthetic seeds: concepts, methods and application. **Plant tissue culture and molecular biology**. Índia: Narosa. 1998. p. 607-19.

REDENBAUGH, K.; NICHOL, J.; KOSSLER, M. E.; PAASCH, B. D. Encapsulation of somatic embryos for artificial seed production. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 20, n. 1, p. 256-257, Jan./Feb. 1984.

SANTOS, I. R. **Criopreservação de eixos embrionários de espécies de Citrus usando encapsulamento e desidratação**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. (Documentos, 115). (Boletim Técnico).

SOARES, F. P.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A. A de; NOGUEIRA, R. C.; EMRICH, E. B.; MARTINOTTO, C. Organogênese direta em explantes caulinares de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1048-1053, jul./ago. 2007.

SOARES, F. P.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R. C.; STEIN, V. C.; SANTANA, J. R. F. de. **Marolo**: uma frutífera nativa do cerrado. Lavras, n. 82, 2009. p. 1-17. (Boletim Técnico).

SONEJI, J. R.; RAO, P. S.; MHATRE, M. Germination of synthetic seeds of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.). **Plant Cell Reports**, Berlim, v. 20, n. 10, p. 891-894, Mar. 2002.

VANDENBUSSCHE, B.; PROFT, M. P de. Cryopreservation of in vitro sugar beet shoot tips using the encapsulation-dehydration technique: influence of abscisic acid and cold acclimation. **Plant Cell Reports**, Berlim, v. 17, n. 10, p. 791-793, July 1998.

VERLEYSSEN, H.; SAMYN, G.; VAN BOCKSTAELE, E.; DEBERGH, P. Evaluation of analytical techniques to predict viability after cryopreservation. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 77, n. 1, p. 11-21, Apr. 2004.

WANG, Q. C.; BATUMAN, O.; LI, P.; BAR-JOSEPH, M.; GAFNY, R. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of 'Troyer' citrange [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. × *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.] by encapsulation- dehydration. **Plant Cell Reports**, Berlim, v. 20, n. 10, p. 901-906, Mar. 2002.

WANG, Q.; LAAMANEN, J.; UOSUKAINEN, M.; VALKONEN, J. P. T. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of raspberry (*Rubus idaeus* L.) by encapsulation-vitrification and encapsulation-dehydration. **Plant Cell Reports**, v. 24, n. 5, p. 280-288, July 2005.

WANG, Q.; TANNEI, E.; ARAV, A.; GAFNY, R. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of grapevine by encapsulation-dehydration. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 63, n. 1, p.41-46, Oct. 2000.

WITHERS, L.; ENGELMANN, F. *In vitro* conservation of plant genetic resources. In: ALTMAN, A. (Ed.). **Agricultural biotechnology**. New York: Marcel Dekker, 1997. p. 57-88.