

## EFEITO DA SACAROSE E DO MANITOL NA CONSERVAÇÃO *IN VITRO* POR CRESCIMENTO LENTO DE COQUEIRO ANÃO<sup>1</sup>

Ana da Silva Lédo<sup>2</sup>; Adriane Oliveira Cunha<sup>3</sup>; Wilson Menezes Aragão<sup>2</sup>;  
Evandro Almeida Tupinambá<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Embrapa Tabuleiros Costeiros. C. P. 44. CEP: 49025-040, Aracaju-SE. email: analedo@cpatc.embrapa.br; aragaowm@cpatc.embrapa.br; tupi@cpatc.embrapa.br

<sup>2</sup> Bolsista CNPq/Embrapa Tabuleiros Costeiros. email: aoliveiracunha@yahoo.com.br

**RESUMO:** O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do manitol e sacarose no crescimento *in vitro* de plantas de coqueiro anão verde do Brasil de Jiqui (AveBrJ) visando à conservação do germoplasma. Os embriões foram inoculados em meio de cultura gelificado Y3 (Eeuwens, 1976) com 2,5 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado. O manitol foi adicionado ao meio de cultura nas concentrações de 0; 0,2; 0,3 e 0,4 M e a sacarose nas concentrações de 20, 40, 60 e 80 g L<sup>-1</sup>. Na ausência de manitol observou-se 100% de germinação dos embriões aos 125 dias e o efeito retardante sob o crescimento do sistema radicular e parte aérea das plântulas em meio com 0,3 e 0,4 M de manitol aos 365 dias de cultivo. Entretanto, nestas concentrações foi observada a necrose das culturas com redução na sobrevivência das plântulas. Em todos os tratamentos de sacarose houve altas percentagens de germinação dos embriões, sendo que as concentrações de 40, 60 e 80 g L<sup>-1</sup> promoveram a redução do crescimento da parte aérea e induziram maior desenvolvimento do sistema radicular em plântulas de coqueiro AveBrJ. As concentrações de 40 e 60 g L<sup>-1</sup> de sacarose induzem um crescimento mínimo da parte aérea e 100% de sobrevivência das plântulas aos 365 dias de cultivo, podendo ser promissoras para a conservação *in vitro* de coqueiro AveBrJ. O manitol, nas concentrações avaliadas mostrou efeitos negativos na sobrevivência de plântulas de coqueiro AveBrJ.

Palavras-chave: *Cocos nucifera* L., germoplasma, reguladores osmóticos

## EFFECT OF MANNITOL AND SUCROSE ON *IN VITRO* CONSERVATION BY SLOW GROWTH OF DWARF COCONUT PALM

**ABSTRACT:** The objective of this study was to evaluate the effect of mannitol and sucrose on *in vitro* growth and conservation of the Brazilian green dwarf coconut (AveBrJ). Mature zygotic embryos were cultivated in Y3 (Eeuwens, 1976) semi-solid medium with 2.5 g L<sup>-1</sup> of activated charcoal. Mannitol was added in the following concentrations: 0; 0.2; 0.3 and 0.4 M and sucrose at concentrations of 20, 40, 60 and 80 g L<sup>-1</sup>. In the absence of mannitol, 100% of embryo germination was obtained at 125 days and a delaying effect on root and shoot growth in medium containing 0.3 and 0.4 M of mannitol at 365 days was observed. Furthermore, necrosis of the embryos was observed with low survival of plantlets at these concentrations. Higher embryo germination percentage was obtained for all sucrose treatments. Concentrations of 40, 60 and 80 g L<sup>-1</sup> reduced the growth of the aerial part at 160 and 365 days and induced an increased root growth of AveBrJ plantlets. Concentrations of 40 and 60 g L<sup>-1</sup> of sucrose induced a minimal growth of the aerial part and 100% of survival of plantlets at 365 days, being recommended for *in vitro* conservation of AveBrJ coconut. The mannitol concentrations evaluated presented negative effects on the survival of AveBrJ plantlets.

Key words: *Cocos nucifera* L., germoplasm, osmotic regulators

### INTRODUÇÃO

O coqueiro é a palmeira de maior importância sócio-econômica das regiões tropicais. Os principais países produtores de coco, segundo a FAO (2007), são

Filipinas (13 mil t), Indonésia (13 mil t) e Índia (9 mil t). O Brasil é atualmente o quarto maior produtor com 2.695.200 t. A Embrapa Tabuleiros Costeiros vem implementando um programa de melhoramento genético e conservação de germoplasma para a

<sup>1</sup> Apoio financeiro: Embrapa e CNPq; Concessão de bolsa: CNPq.

espécie há mais de 20 anos.

Atualmente, o Banco Ativo de Germoplasma de Coqueiro possui 17 acessos das variedades Gigante e Anão ocupando uma área de, aproximadamente, 100 hectares, o que torna sua manutenção com custos elevados. Dessa forma o estabelecimento de técnicas complementares de conservação torna-se prioritário.

Técnicas de cultura de tecidos têm sido aplicadas como estratégias complementares para a conservação de recursos genéticos vegetais e apresentam vantagens, como a manutenção de um grande número de acessos num pequeno espaço físico e livres dos riscos que existem em condições *ex vitro* (Nass, 2001).

A conservação de plantas *in vitro* se baseia no cultivo das coleções em laboratório, a partir da técnica de cultura de tecidos (George, 1993). Nestas condições, a conservação de germoplasma *in vitro* pode ser feita a partir de mudanças no ambiente de cultivo para desacelerar ou suprimir totalmente o crescimento de células, tecidos e órgãos. Na redução do metabolismo das plantas, têm-se utilizado como estratégia, modificações nas condições físicas (temperatura) ou químicas do meio de cultivo (nutrientes orgânicos e inorgânicos, reguladores osmóticos ou inibidores de crescimento) (Withers e Williams, 1998).

Vários são os agentes osmóticos utilizados como retardante de crescimento, tais como manitol, sorbitol e a sacarose, dentre outros. De acordo com Withers e Williams (1998), a concentração de 4% de manitol tem sido utilizada com sucesso para conservar propágulos de espécies de propagação clonal como tubérculos, raízes e fruteiras temperadas. O manitol apresenta um efeito retardante no crescimento e desenvolvimento de um grande número de espécies, e é utilizado com bastante freqüência na conservação *in vitro*. Normalmente, este carboidrato é adicionado ao meio, para redução do seu potencial hídrico. Assim, os cultivos são sujeitos a uma desaceleração no seu crescimento, devido a um estresse osmótico causado pela redução na absorção de água e nutrientes do meio (Fortes e Pereira, 2001). A redução da concentração de sais minerais no meio de cultura e de sacarose também permite a manutenção de plântulas em crescimento mínimo (Maurie, 2001).

O crescimento lento tem sido utilizado com sucesso para conservar cultura de gemas de muitas espécies (Withers e Williams, 1998). Cerca de 20 espécies de inhame (*Dioscorea* spp.) são conservadas no Instituto de Pesquisa para o Desenvolvimento (IRD), em Montpellier, França, sob condições de crescimento mínimo, com subcultivos de 6 a 8 meses (Maurie et al., 2004). No Brasil, protocolos de conservação *in vitro* por crescimento lento têm sido estabelecidos para diversas espécies principalmente de propagação assexuada como mandioca, batatinha, batata-doce,

cará, morango, aspargo, alho, videira (Goedert, 2005), cana-de-açúcar (Lemos et al., 2002), maracujazeiro (Gonçalves et al., 2003; Faria et al., 2006), batata (Fortes e Pereira, 2001) e abacaxi (Canto et al., 2004).

Existem poucos trabalhos publicados sobre estratégias de conservação *in vitro* de *Cocos nucifera* L.. Resultados promissores foram obtidos com criopreservação de embriões, plúmulas e ápices caulinares de coqueiro (Assy-Bah e Engelmann, 1992; Malaurie e Borges, 2001; N'nan et al., 2002). Damasco (2002), avaliando diferentes tratamentos na redução do crescimento de cultivares de coqueiro anão amarelo e coqueiro gigante observou que a redução de sacarose (20 g L<sup>-1</sup>) na presença de carvão ativado e a adição de 0,3 M de sorbitol promoveram um mínimo crescimento nas plântulas e que o ácido abscísico não teve efeito inibitório no crescimento das cultivares. Assy-Bah e Engelmann (1993) obtiveram a conservação *in vitro*, por seis meses, de embriões de coqueiro anão em meio sem sacarose e 100% de germinação dos embriões em meio com 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do manitol e da sacarose sobre o crescimento de embriões zigóticos de coqueiro anão verde do Brasil de Jiqui (AveBrJ), visando a conservação *in vitro* de plântulas por crescimento lento.

## MATERIAL E MÉTODOS

As atividades foram conduzidas no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

Foram utilizados embriões zigóticos de frutos maduros, com 11 a 12 meses após a fertilização, de coqueiro anão verde do Brasil de Jiqui – AveBrJ proveniente do Banco Ativo de Germoplasma de Coco da Embrapa Tabuleiros Costeiros, localizado no Campo Experimental do Betume, em Neópolis, SE. Cilindros de endosperma com embriões, extraídos de frutos maduros, foram submetidos a uma pré-asepsia com imersão em hipoclorito de sódio (NaClO) comercial e lavados em água potável, por três vezes, no local da coleta. Em condições assépticas, os embriões foram excisados de cilindros de endosperma, imersos em álcool etílico a 70% por dois minutos, em solução de NaClO comercial por 20 minutos sob agitação e, em seguida, lavados quatro vezes em água destilada e autoclavada.

Para avaliação do efeito do manitol no crescimento de plântulas de coqueiro AveBrJ, os embriões foram inoculados em meio de cultura Y3 (Eeuwens, 1976) suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, gelificado com 0,7% de agar na presença de 2,5 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado. O manitol foi adicionado ao meio de cultura nas concentrações de 0; 0,2; 0,3 e 0,4 M.

Para avaliação do efeito da sacarose no crescimento de plântulas de coqueiro AveBrJ, foi utilizado o meio de cultura Y3 (Eeuwens, 1976) com 2,5 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado e gelificado com 0,7% de agar. A sacarose foi adicionada ao meio de cultura nas concentrações de 20, 40, 60 e 80 g L<sup>-1</sup>.

As plântulas foram subcultivadas aos seis meses após a inoculação para o mesmo meio de cultivo. O pH dos meios de cultura foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem (121°C e 1,0 atmosfera por 15 minutos). As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura variando de 25°C ± 2, umidade relativa do ar média em torno de 70%, na ausência de luz até a indução da parte aérea e, em seguida, foram transferidas para fotoperíodo de 12 horas.

O delineamento experimental de cada ensaio foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos e cinco repetições, sendo cada parcela experimental constituída de três tubos de ensaio com um embrião cada. Aos 125 dias de cultivo foi avaliada a percentagem de germinação dos embriões e aos 160 e 365 dias o comprimento da parte aérea, comprimento da raiz primária das plântulas e percentagem de sobrevivência das plântulas. As médias foram submetidas à análise da variância pelo teste F e, quando significativo, comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para a análise estatística dos dados, utilizou-se o programa SISVAR.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Efeito do manitol no crescimento de plântulas de coqueiro AveBrJ

Houve diferença significativa entre as concentrações de manitol para os caracteres avaliados. Na ausência de manitol observou-se 100% de germinação e maior desenvolvimento tanto da parte aérea (1,44 cm), como da raiz (5,70 cm) (Tabela 1; Figura 1A). A adição de manitol nas concentrações

estudadas promoveu uma redução na percentagem de germinação dos embriões aos 125 dias e no desenvolvimento da parte aérea e do sistema radicular aos 160 dias. Resultados semelhantes foram obtidos por Damasco (2002) para cultivares de coqueiro anão amarelo da Malásia e coqueiro gigante.

Aos 365 dias de cultivo observou-se o efeito retardante sob o crescimento do sistema radicular e parte aérea das plântulas mantidas em meio de cultura com 0,3 e 0,4 M de manitol (Tabela 1). Entretanto, nestas concentrações foi observada a necrose das culturas com redução na sobrevivência das plântulas (Figura 1B).

Fortes e Pereira (2001), em estudos de conservação de hastes de batata também observaram que os tratamentos com manitol reduziram efetivamente o crescimento das hastes e apenas 37% de sobrevivência dos explantes em três meses de cultivo.

O sorbitol e o manitol são álcool açúcares que, ao serem adicionados ao meio de cultura, atuam externamente, removendo o excesso da água intracelular através do gradiente osmótico, fazendo com que o crescimento da cultura ocorra de forma mais lenta (Dumet et al., 1993). Este fato pode explicar o efeito altamente estressante do manitol sobre as culturas.

### Efeito da sacarose no crescimento de plântulas de coqueiro AveBrJ

Não houve diferença significativa entre as concentrações de sacarose na percentagem de germinação aos 125 dias, entretanto houve efeito significativo para os demais caracteres avaliados.

Em todas as concentrações observaram-se altas percentagens de germinação dos embriões (Tabela 2). As concentrações de 40, 60 e 80 g L<sup>-1</sup> de sacarose promoveram a redução do crescimento da parte aérea aos 160 dias e 365 dias de cultivo e induziram maior desenvolvimento do sistema radicular em plântulas de coqueiro AveBrJ (Tabela 2).

Tabela 1 - Médias da percentagem de germinação (% GERM) aos 125 dias e do comprimento do sistema radicular (CR) e da parte aérea (CPA) e percentagem de sobrevivência (% SOB) de plântulas de coqueiro AveBrJ aos 160 e 365 dias de cultivo em meio Y3 suplementado com diferentes concentrações de manitol.

Manitol (M)	% GERM	CR (cm)	CPA (cm)	CR (cm)	CPA (cm)	% SOB
	125 dias	160 dias		365 dias		
0,0	100,00a	1,44a	5,70a	8,00a	9,20a	100,00a
0,2	93,33a	0,97b	2,59b	4,71ab	3,66b	81,25ab
0,3	80,00ab	0,88b	1,83b	1,80c	2,70c	62,50bc
0,4	60,00b	0,55b	1,28b	1,60c	1,36c	56,25c
CV (%)	21,91	20,79	27,74	52,72	24,09	19,00

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

Considerando que a elevada pressão osmótica reduz o crescimento das plantas e afeta o metabolismo celular (Caldas et al., 1998), o aumento da concentração de sacarose no meio de cultura provavelmente promoveu um efeito depressivo no metabolismo das plântulas. Altas concentrações de sacarose no meio de cultura também afetam a capacidade da enzima rubisco induzindo um decréscimo na fotossíntese (Triques et al., 1997).

Outro aspecto a ser considerado é que o maior crescimento das raízes observado em altas concentrações de sacarose pode ter retardado o desenvolvimento da parte aérea (Figura 2). Segundo Barceló et al. (2001), o crescimento ativo do sistema radicular necessita de substâncias orgânicas translocadas da parte aérea para a base, comprometendo, assim, o desenvolvimento do caule e das folhas.

Não foi observado um efeito retardante da sacarose no desenvolvimento do sistema radicular nas concentrações onde houve redução do crescimento da parte aérea. Estes resultados discordam de Damasco (2002) que obteve menor crescimento da parte aérea e

do sistema radicular de cultivares de coqueiro gigante e coqueiro anão amarelo da Malásia em meio com 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose.

A redução na sobrevivência das plântulas foi observada apenas na concentração de 80 g L<sup>-1</sup> de sacarose, sendo alcançado 100% de sobrevivência nas demais concentrações. Provavelmente a alta concentração de sacarose no meio de cultura promoveu um efeito altamente estressante nas plântulas. Lemos et al. (2002) observaram maior viabilidade de meristemas apicais de cana-de-açúcar em meio contendo baixas concentrações de sacarose (20 g L<sup>-1</sup>) do que em meio onde se adicionou sacarose (10 g L<sup>-1</sup>) com sorbitol (5 g L<sup>-1</sup>) ou manitol (5 g L<sup>-1</sup>).

Apesar de ser utilizado com bastante frequência na conservação *in vitro* por apresentar um efeito retardante no crescimento e desenvolvimento de um grande número de espécies, no presente trabalho o manitol mostrou efeitos negativos na sobrevivência de plântulas de coqueiro AveBrJ.

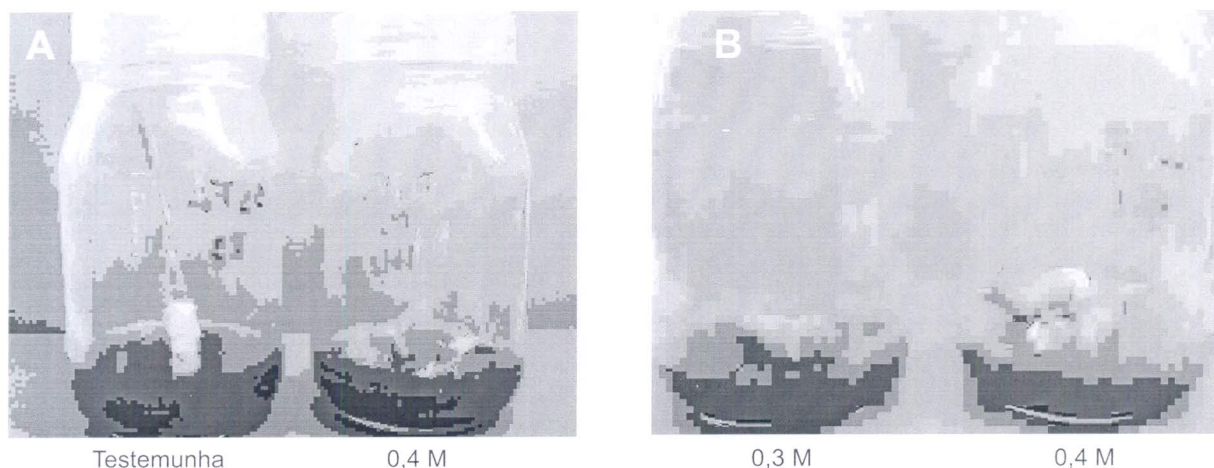


Figura 1 - (A) Efeito da adição de 0,4 M de manitol em meio Y3 no desenvolvimento *in vitro* de embriões zigóticos de coqueiro AveBrJ aos 365 dias de cultura; (B) Necrose de culturas mantidas em meio Y3 com 0,3 e 0,4 M de manitol aos 365 dias.

Tabela 2 - Médias da percentagem de germinação (% GERM) aos 125 dias e do comprimento da parte aérea (CPA) e do sistema radicular (CR) e percentagem de sobrevivência (% SOB) de plântulas de coqueiro AveBrJ aos 160 e 365 dias de cultivo em meio Y3 suplementado com diferentes concentrações de sacarose.

Sacarose (g L <sup>-1</sup> )	% GERM 125 dias	160 dias		CR (cm)	CPA (cm) 365 dias	% SOB
		CR (cm)	CPA (cm)			
20	100,0a	2,61b	3,71a	2,99b	6,32a	100,0a
40	90,0a	4,56ab	2,27b	5,79a	2,53b	100,0a
60	95,0a	4,92 a	1,21b	5,44a	1,43bc	100,0a
80	100,0a	5,66a	0,86b	5,90a	1,01d	39,8b
CV (%)	11,12	28,13	33,98	20,00	22,09	8,95

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

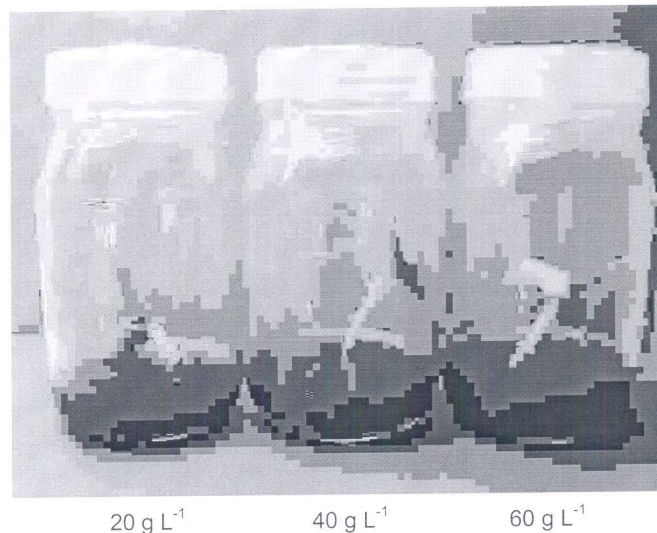


Figura 2 - Efeito da adição de 20 g L<sup>-1</sup>, 40 g L<sup>-1</sup> e 60 g L<sup>-1</sup> de sacarose em meio Y3 no desenvolvimento *in vitro* de embriões zigóticos de coqueiro AveBrJ aos 365 dias de cultura.

A taxa de crescimento mínimo observada nos diferentes tratamentos é satisfatória para a conservação *in vitro* de coqueiro, considerando seu alto vigor de desenvolvimento em condições normais de cultivo de embriões. Estudos adicionais sobre a transferência de embriões de coqueiro AveBrJ, cultivados em condições mínimas de crescimento, para a fase de recuperação são necessários para o estabelecimento de protocolos de conservação por crescimento lento.

### CONCLUSÕES

1. A adição de manitol a 0,3 ou 0,4 M promove um menor crescimento da parte aérea e da raiz e menor percentagem de sobrevivência das plântulas.

2. As concentrações de 40 e 60 g L<sup>-1</sup> de sacarose induzem um crescimento mínimo da parte aérea e 100% de sobrevivência das plântulas aos 365 dias de cultivo, podendo ser promissoras para a conservação *in vitro* de coqueiro AveBrJ.

3. O manitol nas concentrações avaliadas não apresenta efeitos positivos na conservação *in vitro* de plântulas de coqueiro AveBrJ.

### AGRADECIMENTOS

À Embrapa e ao CNPq pelo apoio financeiro e concessão de bolsa de iniciação científica, ao técnico

agrícola Erivaldo Fonseca Moraes, laboratorista Inácio Roque de Andrade Júnior e bolsistas Karla Cristina dos Santos Pereira e Caroline de Araújo Machado pelo apoio na execução do trabalho.

### REFERÊNCIAS

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

ASSY-BAH, B.; ENGELMANN, F. Medium-term conservation of mature embryos of coconut. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 33, n. 1, p. 19-24, April, 1993.

BARCELÓ C. J.; NICOLÁS R. G.; SABATER, G. B.; SÁNCHEZ T. R. **Fisiología vegetal**. 6.ed. Madrid: Pirâmide, 2001. 566p.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa - CNPH, v. 2, p. 87-132, 1998.

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

- DAMASCO, O. P. Utilization of embryo culture technology for germoplasm conservation: development of medium term conservation for coconut zygotic embryos in the Philippines. In: ENGELMANN, F.; BATUGAL, P.; OLIVER, J. (Ed.) **Coconut in vitro culture**: part II. Serdang: IPGRI-APO, 2002. p. 67-79, 2002.
- 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**, n. 14, p. 243-250, 1993.
- EEUWENS, C. J. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera*) and cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, v. 36, p. 23-28, 1976.
- FARIA, G. A.; COSTA, M. A. C.; JUNGHANS, T. G.; LEDO, C. A. da S.; SOUZA, A. da S. Efeito da sacarose e do sorbitol na conservação *in vitro* de *Plassiflora giberti* N. E. Brown. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 2, p. 267-270, Ago 2006
- FAO. World Production. Disponível em: <<http://apps.fao.org/page/collection?subset=agricultur>>. Acesso em 23 mar. 2007.
- FORTES, G. R. de L.; PEREIRA, J. E. S. Preservação *in vitro* da batata com ácido acetilsalicílico e duas fontes de carboidrato. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 10, p. 1261-1264, 2001.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. 2. ed. Exegetic: Edington, 1993, 547 p.
- GOEDERT, C. O. **Sistema de conservação de germoplasma a longo prazo da Embrapa**: modelo inicial. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. 21p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 163).
- GONÇALVES, K. S.; JUNGHANS, T. G.; VIDAL, A. M. Cultivo *in vitro* de gemas laterais de maracujazeiro amarelo em função da temperatura. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2., 2003, Porto Seguro. **Anais...** Cruz das Almas, 2003, 1 CD-ROM.
- LEMOS, E. E. P. de; FERREIRA, M. de S.; ALENCAR, L. M. C. de; RAMALHO NETO, C. E.; ALBUQUERQUE, M. M. de. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 10, p. 1359-1364, Oct. 2002.
- MALAUURIE, B. Medium- and long-term conservation and safe international exchange of germplasm from food and cash tropical crops. **Acta Horticulturae**, v. 560, p. 69-77, 2001.
- MALAUURIE, B.; BORGES, M. Cryopreservation of coconut (*Cocos nucifera* L.) plumules by encapsulation/dehydration. In: International Workshop on Plant Biotechnology-Plant Breeding and Biotechnology, BIOVEG, 2001. **Reports...**Centro de Bioplasmas, Ciego de Avila, Cuba, 2001. p. 59, 2001.
- MALAUURIE, B.; TROUSLOT, M. F.; BERTHAUD, J.; BOUSALEM, M.; PINEL, A.; DUBERN, J. Medium-term and long-term *in vitro* conservation and safe international exchange of yam (*Dioscorea* spp.) germplasm. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaiso, Chile, v. 1, n. 3. Disponível em: <http://www.ejb.org/content/vol1/issue3/full/3/index.html>. Acesso em: 15 mar. 2004.
- NASS, L. L. Utilização de recursos genéticos vegetais no melhoramento. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S. de; VALADARES-INGLIS, M. C. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 30-55.
- N'NAN, O.; VERDEIL, J. L.; HOCHER, V.; KONAN, J. L.; ZAKRA, N.; MALAUURIE, B. **Mise au point d'une méthode de cryoconservation d'apex caulinaire de cocotier (*Cocos nucifera* L.)**. In: Biotechnologies Végétales: Valorisations pour une Agriculture Durable, Journées Scientifiques du réseau "Biotechnologies, Amélioration des Plantes et Sécurité Alimentaire", 8., Marrakech, 2002. Paris. p. 152-153, 2002.
- TRIQUES, K.; RIVAL, A.; BEULE, T.; PUARD, M.; ROY, J.; NATO, A.; LAVERGNE, D.; HAVAU, M.; VERDEIL, J. L.; SANGARE, A.; HAMON, S. Photosynthetic ability of *in vitro* grown coconut (*Cocos nucifera* L.) plantlets derived from zygotic embryos. **Plant Science**, v. 127, n. 1, p. 39-51, 1997.
- WITHERS, L. A.; WILLIAMS, J. T. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa - CNPH, v. 1, p. 297-330, 1998.

Recebido: 31/05/2007

Aceito: 10/09/2007

