

AVALIAÇÃO DO EFEITO DA LUZ E DO USO DE ANTIOXIDANTE EM EXPLANTES DE *Laguncularia racemosa* (L.) C. R. GAERTN INTRODUZIDOS *IN VITRO*.

Nayra da Silva Negreiros Cardoso*
Ivana Oliveira Virgens**

Resumo: *Ecossistema costeiro de grande valor biológico, o manguezal constitui-se um rico banco genético para preservação de áreas degradadas e sua própria recuperação. A **Laguncularia racemosa** (L.) C. R. Gaertn vem sofrendo, junto ao ecossistema, influência de agentes estressores que causam alterações e desequilíbrio local. Cultura de tecidos vegetais, micropropagação, é uma ferramenta utilizada para preservação de fontes vegetais, por significar a produção e multiplicação de novas plantas. Na tentativa de se estabelecer um protocolo de introdução **in vitro** da *Laguncularia racemosa*, avaliou-se o efeito da luz e o uso de antioxidante para o controle da oxidação das culturas. Os explantes escolhidos foram os propágulos, coletados no manguezal do Rio Joanes, nas proximidades do Condomínio Vilas do Joanes. Inicialmente passaram por um processo de desinfestação superficial para serem introduzidos em tubos de ensaio contendo meio básico de Murashige & Skoog sem hormônios (MS0) acrescido de vitaminas, mio-inositol, sacarose e agar. O material foi dividido em 2 lotes (n: 70), um deles com pré-tratamento em solução de PVP 10, e submetidos a 4 tratamentos: 1A (iluminação constante), 1B (escuro por 12 dias), 2A (PVP 10 e iluminação constante) e 2B (PVP 10 e escuro por 12 dias). Os resultados demonstraram que a utilização do PVP 10 contribui para a redução da intensidade de oxidação em 94,5% dos explantes tratados, porém desencadeou contaminação endógena. Associação da luz com o PVP 10 promove redução significativa da oxidação. Torna-se necessária à continuidade e ampliação da pesquisa, para melhor entendimento da resposta **in vitro** da *Laguncularia racemosa*.*

Palavras-chave: *Laguncularia racemosa*; Micropropagação; Antioxidante.

INTRODUÇÃO

Dentre todos os ecossistemas, o manguezal é um dos mais produtivos e também o mais vulnerável aos efeitos do desenvolvimento econômico e do crescimento desordenado das populações humanas. Seu principal valor está na produção e exportação de detritos orgânicos para as águas estuarinas. Esses detritos, em suspensão nas águas, são compostos principalmente por fragmentos de folhas de mangue e formam a base alimentar das espécies animais que utilizam este ecossistema (FONSECA, 2004). Sua vegetação serve para fixar as terras, impedindo assim a erosão e ao mesmo tempo estabilizando a costa e as raízes que funcionam como filtros na retenção dos sedimentos (OLINTO et al., 2003). A destruição deste ecossistema não ocasiona, apenas, perda da biodiversidade das zonas costeiras, mas traz também grandes prejuízos econômicos e graves conseqüências sociais (ROSINI, 2001).

Composto por poucas espécies, todas com adaptações estruturais e fisiológicas para sobreviver nesse ambiente de solo pouco compactado, pouco oxigenado e frequentemente inundado pelas marés (ALVAREZ & MARIE, 2005). A baixa diversidade da flora se deve às

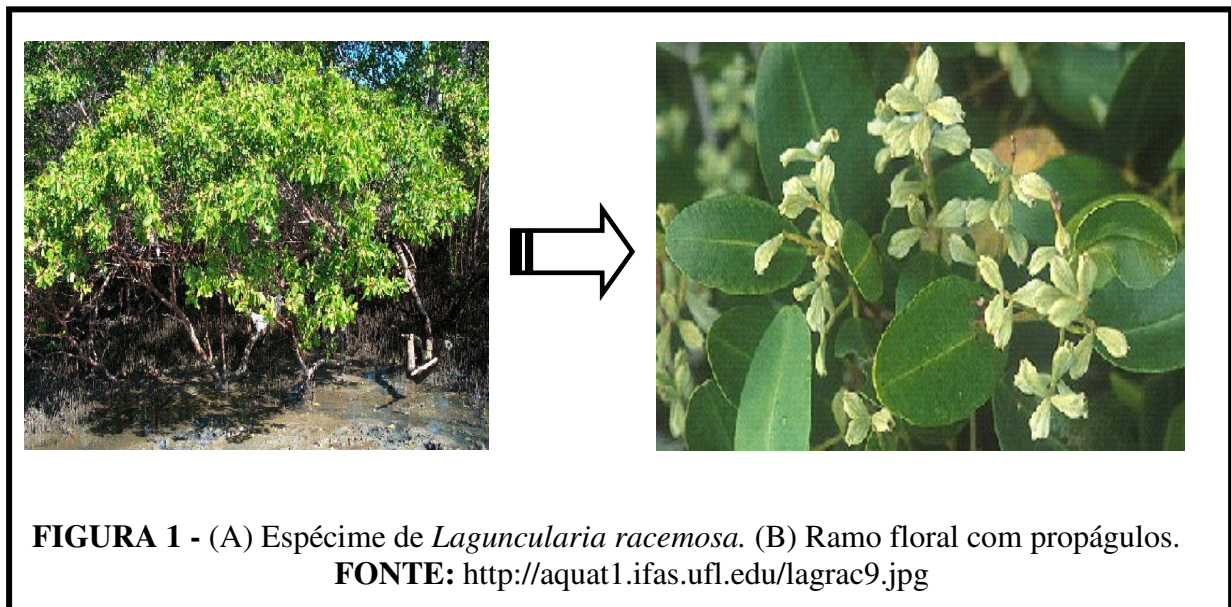
* Autora; Graduanda em Ciências Biológicas da UCSal; Estagiária Bolsista de Iniciação Científica – CEPEX LEMA/UCSal; e-mail: nayracardoso@yahoo.com.br. Orientadora: Luzimar Gonzaga Fernandez, Doutora em Bioquímica, Coordenadora e Pesquisadora do LEMA, Professora do ICS/UFBA; e-mail: luzimar@ucsal.br. Co-orientadora: Nina Cláudia Barboza da Silva, Doutoranda do Programa de pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal –IBCCF/UFRJ, Professor da FTC; e-mail: ninacbs@terra.com.br.

** Co-autora; Laboratório de Estudos em Meio Ambiente LEMA/UCSal; e-mail: ivanaovirgens@yahoo.com.br.

condições abióticas às quais este ecossistema está submetido, logo poucas espécies conseguem sobreviver neste ambiente de características estressantes (GRUZMAN, 2004; SCHAEFFER-NOVELLI, 1995).

Das espécies predominantes, a *Laguncularia racemosa* (L.) C. R. Gaertn, conhecida como mangue branco, mangue manso ou tinteiro, pertencente à família Combretacea, pode ser encontrada nas costas tropicais e subtropicais da América do Norte e do Sul, assim como na África Ocidental. Esta espécie ocupa preferencialmente as áreas mais afastadas da influência da oscilação das marés, necessitando de um período maior dessas amplitudes, para promover o enraizamento e conseqüentemente sua fixação ao substrato (FONSECA, 2004).

É uma árvore de pequeno porte, alcançando no máximo 15 m de altura, com diâmetro de 30 cm, cuja copa pode ser arredondada ou irregular “Figura 1A”. Suas folhas apresentam pecíolo avermelhado com duas glândulas de sal em sua parte superior, junto à lâmina foliar. Produzem grande quantidade de propágulos, formando verdadeiros cachos que pendem das partes terminais dos galhos “Figura 1B” (SCHAEFFER-NOVELLI, 1995).



Uma importante adaptação desta espécie está relacionada à sua reprodução, que consiste na permanência das sementes na árvore-mãe até sua transformação em embriões (propágulos), os quais germinam antes que o fruto se desprenda. Dessa forma, as sementes ao caírem já possuem um embrião desenvolvido, com acúmulo de reservas nutritivas para que sobrevivam por períodos longos e com raízes prontas para fixar-se imediatamente ao sedimento lodoso, impedindo que os frutos ou sementes sejam arrastados para o mar pela maré vazante, ou enterrado no lodo, morrendo por falta de oxigênio. Esta adaptação reprodutiva é denominada de viviparidade. (SANTOS, 2004).

Estudos no manguezal, principalmente relacionados à sua vegetação, são de fundamental importância e de grande valor biológico, já que este ecossistema constitui-se como um rico banco genético para a recuperação de áreas degradadas e principalmente para a sua própria preservação (OLINTO et al., 2003).

A cultura de tecidos vegetais tem sido considerada ferramenta promissora para a preservação de fontes vegetais (ABREU, 1998), pois envolve um conglomerado de técnicas, mediante as quais uma parte isolada de uma planta (explante) é cultivada de forma asséptica em meio nutritivo e sob condições controladas de temperatura e luminosidade (SOUZA, et al.,

2004). A propagação vegetativa *in vitro*, também denominada de micropropagação por causa do tamanho dos explantes utilizados, é a aplicação mais prática da cultura de tecidos (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998), significando a multiplicação e produção de novas plantas servindo como estratégia para a preservação de espécies nativas ameaçadas (AFONSO, 2005 e SOUZA, et al., 2004). Cultura de tecidos no manguezal é bastante limitada, pois os explantes de suas espécies frequentemente sofrem oxidação (escurecem) e morrem, eventualmente, após seu cultivo *in vitro*, dificultando o sucesso da micropropagação dessas espécies (Kathiresan e Bingham, 2001).

In vitro, a oxidação fenólica constitui um problema a ser enfrentado tanto no início do estabelecimento da cultura quanto durante o seu cultivo (TEIXEIRA, 2001). É caracterizada pelo escurecimento dos explantes, que ocorre quando as substâncias fenólicas, liberadas pelos tecidos lesionados para o meio, entram em contato com o oxigênio (UTINO, 2001; CRONAUER & KRIKORIAN, 1986). Essas substâncias exercem importante papel na defesa contra predadores e microorganismos, sendo prejudiciais para o desenvolvimento inicial da brotação e se tornando um fator de redução da taxa de multiplicação (CARNEIRO, 1997; LAMEIRA et al., 1990). Ocorre por meio de uma enzima chamada de polifenol oxidase, que pode ser estimulada pela luz (CREASY, 1968). Durante a oxidação, essa enzima leva à produção de substâncias complexas, tais como quinonas, responsável pela coloração marrom das culturas, que podem se ligar às proteínas de membrana ou outras enzimas, acarretando toxidez e morte da própria célula a depender do tipo de explante (TEIXEIRA, 2001).

Um método eficiente para evitar o escurecimento dos tecidos é transferir os explantes, frequentemente, para um novo meio (UTINO, 2001), sendo o intervalo entre as transferências ajustado de acordo com o grau de oxidação, normalmente mais intenso na fase inicial, decrescendo com o tempo (PASCAL et al., 1997; VUYLSTEKE, 1989). A oxidação também pode ser minimizada pela redução dos danos mecânicos e químicos e pela remoção de substâncias fenólicas através da transferência para meios frescos ou pelo cultivo em meio líquido (TEIXEIRA, 2001).

Grattapaglia & Machado (1998) recomendaram as seguintes medidas para controlar a oxidação: a) lavagem do material antes da desinfestação em água corrente, auxiliando na lixiviação dos compostos fenólicos; b) a utilização de antioxidantes ao meio tais como o ácido ascórbico, ácido nítrico, PVP (polivinilpirrolidona); e c) a incubação inicial dos explantes no escuro. O PVP é uma poliamida utilizada pela sua função adsorvente que por meio de ligações de hidrogênio, previne a oxidação e polimeriza os produtos fenólicos, inibindo a liberação da quinona.

A liberação dos fenóis é aumentada pela luz, portanto o escurecimento pode ser reduzido e até mesmo impedido, caso os explantes sejam cultivados no escuro por até 14 dias (MONACO et al., 1977; ADAMS, KOENIGSBERG E LANGHANS, 1979). Desta forma os problemas relacionados à oxidação seriam menores em explantes mantidos no escuro ou em baixa intensidade luminosa durante as primeiras semanas de cultivo, contribuindo para prevenir a oxidação e melhorar o crescimento (DURAND – CRESSWELL et al., 1982).

Na tentativa de estabelecer um protocolo de introdução *in vitro* da *Laguncularia racemosa* (L.) C. R. Gaertn avaliou-se o efeito da luz e o uso de antioxidante no controle da intensidade de oxidação dos explantes, verificando o efeito do PVP 10 (polivinilpirrolidona) e da luminosidade durante o cultivo *in vitro*.

METODOLOGIA

A parte vegetal escolhida para iniciar a cultura *in vitro* foram os propágulos de *Laguncularia racemosa*, devido a sua grande capacidade morfogenética. Sua coleta ocorreu no manguezal do Rio Joanes, nas proximidades do condomínio Vilas do Joanes, localizado no Km 8,5 da Estrada do Coco. Os propágulos foram coletados diretamente das árvores, retirando-se os ramos florais íntegros em diferentes estágios de desenvolvimento, sendo acondicionados em sacos plásticos e transportados, no mesmo dia, para o Laboratório de Estudos em Meio Ambiente (LEMA/UCSal), onde se iniciou a etapa de desinfestação superficial do material coletado.

A desinfestação superficial do material foi realizada da seguinte forma: a) lavagem dos propágulos com água corrente e sabão de coco; b) imersão em água com sabão de coco durante 30 minutos sob agitação constante “Figura 2”; c) lavagens sucessivas em água corrente até a retirada de todo o sabão; d) imersão em hipoclorito de sódio (água sanitária comercial) a 30% por 15 minutos, sob constante agitação. Posteriormente, os propágulos foram levados à câmara de fluxo laminar e lavados 3 vezes consecutivas, com água destilada estéril por 1 minuto. Em seguida o material foi imerso em álcool a 70% por 5 minutos e lavado novamente com água destilada estéril.



FIGURA 2 - Desinfestação dos propágulos de *Laguncularia racemosa* com agitação constante na placa.

No fluxo, os embriões juntamente com os cotilédones foram isolados do restante do fruto “Figura 3” e imersos em água destilada estéril por alguns minutos, para facilitar a retirada de uma película que os envolve e evitar o contato desse material com o ar.

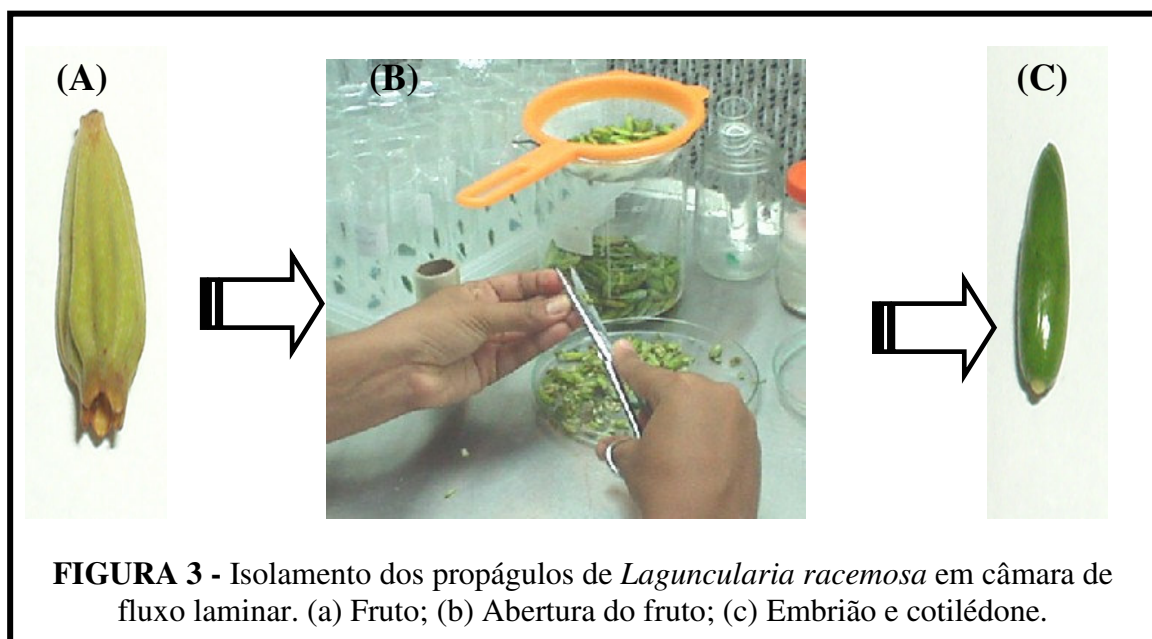


FIGURA 3 - Isolamento dos propágulos de *Laguncularia racemosa* em câmara de fluxo laminar. (a) Fruto; (b) Abertura do fruto; (c) Embrião e cotilédone.

Os explantes isolados foram divididos em 2 lotes ($n = 70$) sendo um deles submetido a pré-tratamento com uma solução de PVP 10 (polivinilpirolidona). O material, na câmara de fluxo laminar, foi mantido imerso nesta solução antioxidante por 20 minutos e em seguida transferidos para o meio de cultura.

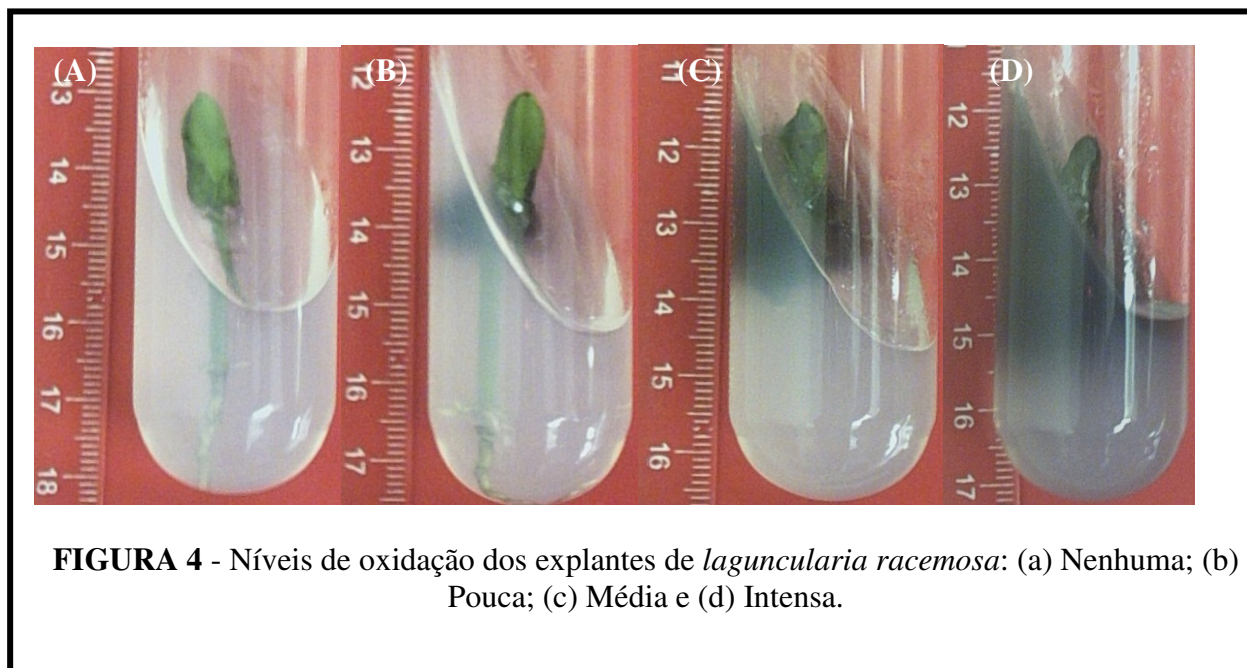
Estes foram introduzidos em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio básico de Murashige & Skoog sem hormônios - MS0, adicionado de 0,5 mg/L de vitaminas (Tiamina – HCl, Ácido Nicotínico e Piridoxina), 50 mg/L de mio-inositol, 3% de sacarose e 0,8% de agar, tendo pH ajustado para $5,8 \pm 0,1$ e previamente autoclavado a temperatura de 121°C por 15 minutos. Após o término da introdução, as culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, sob fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de, aproximadamente, $1,6\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$.

Para verificar o efeito da luz e do PVP 10 no controle da oxidação e no estabelecimento das culturas *in vitro* de *Lacungularia racemosa* (L.) C. R. Gaertn avaliaram-se as seguintes condições de cultivo: (a) Tratamento 1A - controle: iluminação constante tipo luz do dia; (b) Tratamento 1B: escuro por 12 dias, e posterior transferência para o claro; (c) Tratamento 2A: pré-tratamento com PVP 10 e iluminação tipo luz do dia; (d) Tratamento 2B: pré-tratamento com PVP 10, inicialmente no escuro durante 12 dias e posterior transferência para o claro.

Foram utilizados 35 explantes para cada tratamento, mantidos em sala de crescimento com as mesmas condições de temperatura, fotoperíodo e intensidade luminosa, já descrita anteriormente, exceto para os tratamentos que ficaram no escuro. Após os 12 primeiros dias de observação, os tratamentos que estavam no escuro (1B e 2B) foram transferidos para a iluminação tipo luz do dia e fotoperíodo de 16 horas até o término das análises.

Os tratamentos foram analisados segundo os seguintes parâmetros: 1) presença de agentes contaminantes; 2) intensidade de oxidação; e 3) desenvolvimento dos explantes. E suas observações foram realizadas no terceiro, sexto, décimo segundo e vigésimo quarto dia após a introdução *in vitro*. Para a análise da oxidação, adotaram-se quatro níveis qualitativos de oxidação: nenhuma, pouca, média e intensa “Figura 4”. Já o desenvolvimento dos explantes foi

observado através do alongamento do eixo cotiledonar medido (em cm) com paquímetro manual e a formação de raízes.



RESULTADOS

A presença de contaminação foi observada a partir do 6º dia, sugerindo-se ser uma contaminação do tipo endógena. Segundo Teixeira (2001), um problema enfrentado na fase inicial de estabelecimento do explante *in vitro* diz respeito à contaminação bacteriana e fúngica, seja pela ineficiência do protocolo de desinfestação superficial ou presença de contaminantes no interior dos tecidos, denominada contaminação endógena. Este tipo de contaminação geralmente ocorre após a primeira semana de cultivo *in vitro* dos explantes, sendo proveniente de microorganismos endofíticos, em sua grande maioria bactérias.

Comparando-se as amostras, após o 24º dia de cultivo, foi observado que em média 38,5% dos explantes tratados com PVP 10 apresentaram contaminação e apenas 1,45% nos explantes não-tratado com o PVP 10. A taxa de contaminação nos explantes tratados com o PVP 10 (2A e 2B), em ambas as condições de luminosidade, foram: 45,7% no tratamento 2A e 31,4% no tratamento 2B. Já nos tratamentos sem PVP 10 (1A e 1B) a contaminação foi relativamente baixa “Figura 5”

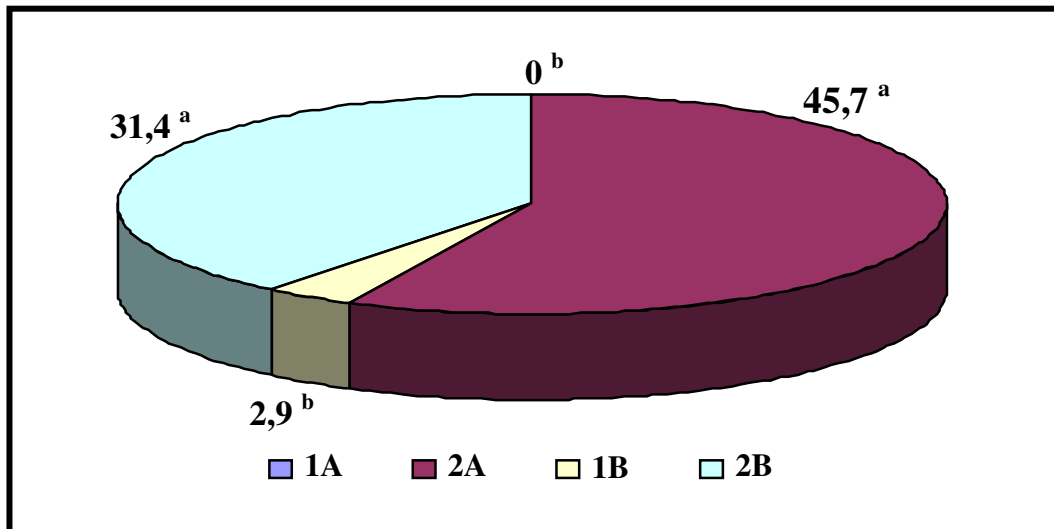


FIGURA 5 - Demonstrativo da contaminação em % nos diferentes tratamentos (1A, 2A, 1B e 2B) ao término dos 24 dias de análise (Letras diferentes significam resultados estatisticamente diferentes para $P \leq 5\%$).

Como todos os explantes passaram pelo mesmo protocolo de desinfestação e manipulação, diferindo apenas quanto ao uso do PVP 10, supõe-se que a proliferação dos contaminantes nos tratamentos 2A e 2B esteja relacionada a algum fator ativador do PVP 10 que pode ter desencadeado a proliferação dos contaminantes presentes no interior dos tecidos.

Comparando o efeito do PVP na oxidação, o material mantido no claro (amostras A), apresentou um controle significativo da oxidação com 73,7% dos explantes sem oxidação e apenas 10,5% com pouca e média oxidação. Já para o material mantido no escuro por 12 dias (amostras B) não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos exceto em relação ao controle da oxidação com intensidade média onde o antioxidante demonstrou maior eficiente, reduzindo esta intensidade a 4,2% “Tabela 1”.

TABELA 1 - Porcentagem de oxidação dos explantes de 1A, 2A, 1B e 2B, após 24 dias. (Letras diferentes significam resultados estatisticamente diferentes para $P \leq 5\%$)

Intensidade de oxidação	Claro		Escuro	
	1A	2A	1B	2B
Nenhuma	37,1 ^a	73,7 ^b	44,1 ^{a,d}	62,5 ^{a,b}
Pouca	54,3 ^a	10,5 ^c	26,5 ^{c,d}	16,7 ^{c,f}
Media	2,9 ^e	10,5 ^{c,e}	23,5 ^c	4,2 ^{e,f}
Intensa	5,7 ^e	5,3 ^{c,e}	5,9 ^e	16,7 ^{e,f}

A partir destas análises, pode-se constatar que a luminosidade é um importante fator para os processos fisiológicos dos vegetais, logo as atividades enzimáticas de biosíntese bem como a oxidação são estimuladas pela luz (Creasy, 1968). Desta forma os problemas relacionados à oxidação são menores quando os explantes são mantidos no escuro ou em baixa intensidade

luminosa durante as primeiras semanas de cultivo (Durand-Cresswell et al,1982). Apesar do efeito adsorvente do PVP 10, na prevenção da oxidação, a intensidade luminosa influenciou nos processos oxidativos, diminuindo a ação do PVP 10 (Teixeira, 2001; Creasy, 1968).

Analisando-se o desenvolvimento dos explantes, os tratamentos mantidos no escuro, com que obtive melhores resultados no controle da oxidação, apresentaram poucos explantes enraizados (apenas 11,4%). Já os tratamentos sob constante iluminação apresentaram logo nas primeiras semanas explantes enraizamento, tendo no 12º dia 55,7% destes com formação de raízes secundárias ou adventícias “Figura 6”.

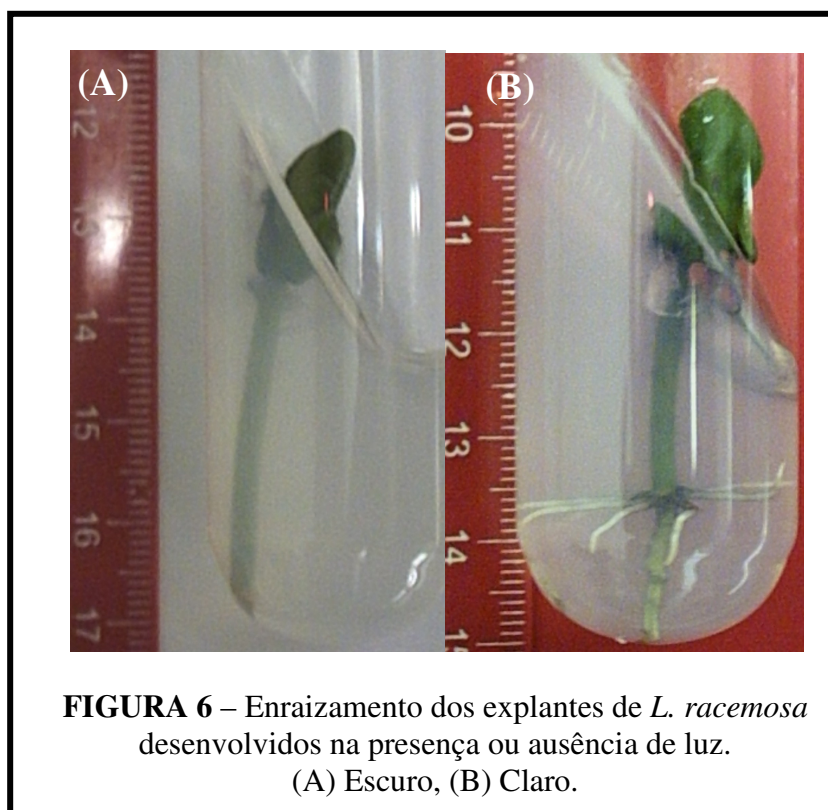


FIGURA 6 – Enraizamento dos explantes de *L. racemosa* desenvolvidos na presença ou ausência de luz.
(A) Escuro, (B) Claro.

Para o alongamento do eixo cotiledonar, os explantes mantidos sob constante iluminação diferiram significativamente dos mantidos no escuro por 12 dias, sendo maior nos tratamentos 1A e 2A. Atribuindo-se a presença de luz que, de acordo com Barreto Cid (2001), é importante para os processos de fotossíntese, fotomorfogênese e fototropismo, promovendo o crescimento e desenvolvimento do vegetal.”Tabela 2”

TABELA 2 - Alongamento médio do eixo cotiledonar (Letras diferentes significam resultados estatisticamente diferentes para $P \leq 5\%$)

	Claro		Escuro	
	1A	2A	1B	2B
Média	2,9 ^a	3,1 ^b	2,2 ^c	2,3 ^{a,c}
Desvio	1,3	1,3	1,0	1,1

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos demonstraram que:

- 1) o protocolo de desinfestação superficial foi eficiente;
- 2) o PVP 10 contribuiu para a redução da intensidade de oxidação, porém desencadeou uma elevada contaminação endógena, ou seja, de alguma forma sua ação adsorvente pode ter ativado a proliferação de contaminantes, principalmente os bacterianos;
- 3) os tratamentos nos quais se obtiveram os melhores resultados, em relação à diminuição da oxidação, foram o 2A e 2B (com uso de antioxidante); já em relação ao desenvolvimento foram aqueles mantidos sob iluminação constante (1A e 2A);
- 4) a luz, apesar do seu efeito oxidativo, é um fator importante e decisivo para desenvolvimento e crescimento dos explantes, com eficiência de 91% nos explantes analisados;
- 5) a associação do efeito da luz e uso do agente antioxidante (PVP 10) é um tratamento eficiente para cultivo *in vitro* da *Laguncularia.racemosa*. Este fator, aliado a boas condições de cultivo e de controle da contaminação, pode ser fundamental para conseguir estabelecer um protocolo eficiente de cultivo *in vitro*.

Faz-se necessário a continuidade da pesquisa com a ampliação das análises e dos tratamentos, verificando a ação de novos agentes antioxidantes e seus efeitos *in vitro*, objetivando estabelecer um protocolo para utilização destes. Deve-se também avaliar o efeito da luminosidade em diferentes intensidades, confirmando sua influência na oxidação. Além da realização, em paralelo, de novas pesquisas com a utilização de outros tipos de explantes, como, por exemplo, os segmentos nodais já utilizado em outras pesquisas com plantas de mangue.

Espera-se que este trabalho possa servir de subsídio para novas análises com plantas de manguezal, podendo ser um referencial para futuros projetos de pesquisa que busquem alternativas de conservação, preservação e recuperação de manguezais, através do melhoramento e produção em larga escala de espécies vegetais típicas deste ecossistema, como, por exemplo, a *Laguncularia racemosa* (L.) C. R. Gaertn.

REFERÊNCIAS

ABREU, I.N. Propagação in vivo e in vitro, calogênese, nutrição mineral e quantificação de mucilagem em *Cissus sicyoides*. Lavras: Universidades Federais de Lavras, 1998. 101p. (Dissertação mestrado)

ADAMS, R.M.; KOENIGSGERG, S.S.; LANGHANS, R.W. *In vitro* propagation of *cephalotus follicularis* (Australian patcher plant). **Horticultural Science**, Ash-ford Kent, v. 14, n. 1, p. 512-513, Jan. 1979

AFONSO, Carlos. **Clonagem**. (on line) Disponível em <<http://www.ufv.br/dbg/BIO240/C004.htm>> Acesso em 23 mar. 2005

ALVAREZ, R. S., MARIE, S. **Manguezal**. (on line) Disponível em
<<http://www.guiaguaruja.com.br/meioambiente/manguezal.htm>> Acesso em 10 mar. 2005.

BARRUETO CID, L.P. A propagação in vitro de plantas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília. N. 19. p. 16-21. 2001

CARNEIRO, I.F. **Adequação de técnicas de cultura in vitro na obtenção de mudas de bananeira (Musa AAB) cultivar maçã**. 1997. 106f. Tese (Doutorado)- Universidade Federal de Goiânia, Goiânia, 1997.

CREASY, L. L. The increase in phenylalanine ammonia-lyase activity in strawberry leaf disks and its correlation with flavonoid synthesis. **Phytochem**. V. 7, p. 441-446, 1968)

CRONAUER, S.S.; KRIKORIAN, A.D. **Banana (Musa sp.)** In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.) **Tress**. Berlim: Springer-Verlag, 1986. v.1, p.233-252. (Biotechnology in Agriculture and Forestry, 1)

DURAND – CRESSWEL, R.; BOULAYL, M & FRANCKET, A. Vegetative propagation of *Eucalyptus*. In: Tissue Culture in Forestry. Bonga & Duragan, eds. Martinus Nijhoff. The Hague. P. 15-151, 1982)

FONSECA, S. M.; ROCHA, M. T. O MDL e as florestas de manguezal. 2004. (on line) Disponível em:
<http://www.ead.fea.usp.br/Semead/7semead/paginas/artigos%20recebidos/Socioambiental/SA20_O_MDL_e_as_florestas_de_manguezal> Acesso em 24 mai. 2005

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. **Micropropagação**. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Ministério da Agricultura, v.1, p.183-242, 1998

GRUZMAN, E. **Manguezais: Conhecer para conservar**. (on line) Disponível em
<<http://www.conhecerparaconservar.org/temas/Manguezais/>> Acesso em 10 out. 2004

KATHIRESAN, K & BINGHAM, BL (2001) Biology of mangoves and mangrove ecosystems. *Adv. Marine Biol.* 40: 81-251.

LAMEIRA, O.A.; PINTO, J.E.B.P.; PASCAL, M. Propagação in vitro da bananeira-prata através da cultura de tecidos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 11, p.1613-1617, 1990

MONACO, L.C.; SONDAHL, M.R.; CARVALHO, A.; CROCOMO, O.J.; SHARP, W.R. Applications of tissue culture in the improvement of coffee. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y.P.S. (Ed.). **Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture**. Berlim: Springer-Verlag, 1997.p.109-129.

OLINTO, A.; ACIOLY, A. C.; GONDIM, D. O.; BASTO, E. R.; ESPINDULA, J.; SILVA, M. M.. LINS, V. B. O Ecossistema Manguezal. 2003 Disponível em: <<http://vivimarc.sites.uol.com.br/manguezal2.htm>> Acesso em 15 mai. 2005.

PASCAL, M.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J.D. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicação.** Lavras: UFLA, 1997. 159p.

ROSINI, A. Análise temporal do complexo estuarino da Baixada Santista – SP, por meio de imagens TM-Landsat. 2001

SANTOS, A. S. R. dos. **Manguezais: o que são? Qual a sua importância?** Disponível em <<http://www.ultimaarcadenoe.com.br/index1.htm>> Acesso em 08 mai.2004

SCHAEFFER-NOVELLI, Y. **Manguezal: Ecossistema entre a Terra e o Mar.** São Paulo – SP, Caribbean Ecological Reserch, 1995. 64p.

SOUZA, A.S.; et. al. Introdução à cultura de tecidos de plantas. 2004

TEIXEIRA, J. B. Limitações ao processo de cultivo in vitro de espécies lenhosas. EMBRAPA. Brasília, DF. 2001.

UTINO, S.; CARNEIRO, I.R.; CHAVES, L.R. Crescimento e oxidação de explantes de bananeira prata (*Musa AAB*) in vitro. IV. Concentrações de sais, ácidos ascórbicos e frequência de subcultivos. **Rev. Bras. Frutic., Jabotical.** São Paulo. v. 23, n. 2, p. 409-412, 2001.

VUYLSTEKE, D. **shoot-tip culture for the propagation, conservation, and exchange of *Musa* germplasm.** Rome: IBPGR, 1989. 56p. (IBPGR. Pratical manual for handling crop germplasm *in vitro*, 2)