



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
NÚCLEO DE PÓS-GRADUAÇÃO E ESTUDOS EM RECURSOS NATURAIS



**AVANÇOS NA PROPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO
IN VITRO DA MANGABEIRA (*Hancornia speciosa* Gomes)
NATIVA DA REGIÃO NORDESTE**

ALINE DE JESUS SÁ

2009



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
NÚCLEO DE PÓS-GRADUAÇÃO E ESTUDOS EM RECURSOS NATURAIS**



ALINE DE JESUS SÁ

**AVANÇOS NA PROPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DA
MANGABEIRA (*Hancornia speciosa* Gomes) NATIVA DA REGIÃO NORDESTE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agroecossistemas, área de concentração Sustentabilidade em Agroecossistemas, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora

Dr^a. Ana da Silva Lédo

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE - BRASIL
2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

Sá, Aline de Jesus

S111a Avanços na propagação e conservação *in vitro* da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) nativa da região Nordeste / Aline de Jesus Sá. – São Cristóvão, 2009.

iii, 67 f. : il.

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

Orientador: Dr^a Ana da Silva Lédo

1. Biotecnologia. 2. Propagação vegetal – Cultura de tecidos.
3. Genética vegetal. 4. *Hancornia speciosa* Gomes. I. Título.

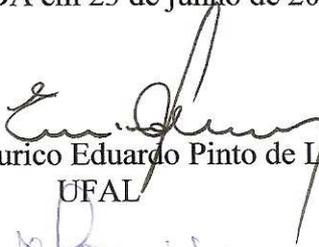
CDU 631.53:634.6

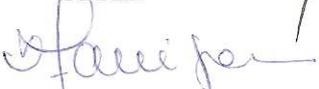
ALINE DE JESUS SÁ

AVANÇOS NA PROPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DA
MANGABEIRA (*Hancornia speciosa* Gomes) NATIVA DA REGIÃO NORDESTE

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agroecossistemas, área de concentração Sustentabilidade em Agroecossistemas, para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 23 de junho de 2009.


Prof. Dr. Eurico Eduardo Pinto de Lemos
UFAL


Prof. Dra. Maria de Fátima Arrigoni Blank
UFS


Dra. Ana da Silva Léo
Embrapa Tabuleiros Costeiros
(Orientadora)

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE - BRASIL

DEDICO

Ao meu querido e amado pai (*in memoriam*)

AGRADECIMENTOS

*Essa conquista não é só minha. Agradeço a **DEUS** por ter colocado em meu caminho todos os colaboradores que me ajudaram no desenvolvimento desse trabalho:*

*Ao **CNPQ** e **FAPITEC-SE** pela apoio e liberação de recursos financeiros;*

*À **EMBRAPA TABULEIROS COSTEIROS** e toda sua equipe técnica e administrativa pela oportunidade de desenvolvimento dessa pesquisa. Agradeço especialmente a:*

***Dr. Wilson Menezes Aragão e Edson Passos.** A vocês devo o início dessa realização;*

***Dr^a Ana da Silva Lédo** pela confiança que em mim depositou. Espero ter correspondido às suas expectativas. Os ensinamentos que você me proporcionou foram muito além de conhecimentos científicos e tecnológicos. Também cresci como pessoa. Muito obrigada!*

***Dr^a Sarah Brandão (in memorian)**, pessoa sublime e profissional exemplar. Tenho certeza que deixastes saudades em muitas pessoas. Eu, com certeza, sou uma delas;*

***Dr. Carlos Lédo**, pelos ensinamentos e **Ana Veruska**, pela atenção sempre ofertada;*

***Ester Gonçalves** pela boa vontade em me ajudar, mesmo sem me conhecer;*

*Aos estimados **companheiros de laboratório** que hoje, sem dúvida, considero **AMIGOS**:*

***Inácio Roque Andrade Junior.** Muito mais que um técnico, você também foi meu orientador e professor. Muito obrigada pela atenção, apoio, e pelos ensinamentos;*

***Maria da Conceição (Dona Cônsul)**, pelos abraços calorosos, carinho e toda atenção;*

***Caroline Araújo Machado e Karla Cristina Freire.** Ficar triste ao lado de vocês é simplesmente impossível. Muito obrigada pelos momentos de alegria e descontração!*

***Lucas Fonseca e Rodrigo Curvello**, vocês são a personificação da serenidade. Como foi bom tê-los por perto durante essa jornada. Vocês são simplesmente maravilhosos!*

***Micaele Costa Santos e Kícia Karine Pereira Gomes.** Pelo apoio e carinho. Vocês também são maravilhosas. Desejo sucesso na execução de seus trabalhos de pesquisa;*

***Zilná Brito Rezende Quirino e Vanice Dias.** Também desejo muito sucesso a vocês;*

*Também a **Nadjma Souza Leite, Márdina e Joice Alves, Jaci Villa Nova** pela companhia durante a realização dos experimentos desenvolvidos para essa pesquisa;*

*À **UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**, de maneira especial:*

*Aos professores do curso de Biologia que foram muito importantes para minha formação: **Carmem Regina Parisotto, Helena Zucon e Carlos Dias da Silva Junior**;*

Aos professores e alunos do curso de Mestrado em Agroecossistemas 2007:

***Juciara Torres Dantas** pelo acolhimento, **Leila Thaís Soares Magalhães, Roseane Santos de Jesus e Rogério Moreira Chagas** pelas palavras de apoio e motivação*

quando nuvens traiçoeiras rondavam minha vida, e **Trícia Pergentino** pelo jeito cativante de ser. Gosto de vocês de graça e sem dúvida vocês serão sempre lembrados; Aos **professores e alunos do curso de Mestrado em Biotecnologia 2008**, em especial a professora **Maria de Fátima Arrigoni Blank**, pelos ensinamentos ofertados;

Às **FAMÍLIAS** que Deus me deu o prazer do convívio. O que seria de mim sem vocês?

Maria do Carmo de Jesus Sá. Mãe querida, um bom exemplo vale mais que mil palavras. Tudo de bom que existe em mim, devo a ti. **TE AMO DEMAIS MINHA MÃE!**

José Felix de Sá (in memorian). Estava tão perto de presenciá-lo esse momento... Mas que certeza tenho eu que você não presenciou? Foi seu orgulho que me fez prosseguir;

Alessandro de Jesus Sá, Maria da Penha Soares Sá, Mariana Soares Sá e Marina Soares Sá. Caro irmão, cunhada e sobrinhas, estar com vocês no final desse período foi essencial e mesmo com a distância que nos separou nos últimos momentos, senti as vibrações positivas de vocês chegando a mim. Mariana e Marina vocês são minha vida!

Adriano de Jesus Sá e Daniela Fortuna dos Santos. Vocês estavam muito certos quando disseram que esse seria o dia da consumação de minha vitória. Realmente foi!

Ranulfo Joaquim de Jesus. Avô amado, gosto tanto de ti que nem consigo expressar quanto és importante em minha vida. Espero que viva por mais 98 anos ao nosso lado!

À **família FELIX DE SÁ**. Em especial a meu tio **Leúdes (in memorian)**. Como foi duro enfrentarmos sua perda e de meu pai num só mês... Mas não encaremos como perdas...

À **família de JESUS**. Em especial à querida tia **Augusta (és minha segunda mãe!;** Realmente vocês são de Jesus, e não tenho dúvidas que foram enviados a mim por ele;

À **família ÁVILA**. **Hudson, Robson, Vicente e Dona Celha**, obrigada é muito pouco para vocês. Sem dúvida devo essa conquista também a vocês. Sou grata pelo convívio!

À **família RAMOS**. **Tonho, Adelmo, Agnaldo, Anália, Ana, Pina (in memorian) e Dona Maria** e à **AMIGA IRMÃ, Angélica Maria**. Como o próprio nome já diz, você é um anjo em minha vida. Um obrigada também é muito pouco para vocês, meus queridos!

Aos **AMIGOS** de jornada e de trabalho sempre presentes e prontos a me ajudar:

À **Kamila Marcelino de Brito** pelo carinho (não é minha flor?) e **Gilberto de Oliveira Fraga Junior** pelo apoio incondicional. Sou muito feliz por tê-los como amigos;

Companheiros de Carmópolis (**Escola Municipal Maria Carmem Leite Alves e Escola Municipal Adília de Aguiar Leite**) e de Nossa Senhora de Socorro (**Colégio Estadual Professor José Barreto Fontes**). Obrigada por me ajudarem a enfrentar as duras jornadas de estudo e trabalho e pela compreensão nos momentos em que precisei me ausentar de meu ofício.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	i
RESUMO	ii
ABSTRACT	iv
CAPÍTULO 1	1
1. Introdução Geral	1
2. Referencial Teórico	2
2.1 Biodiversidade, desenvolvimento sustentável e biotecnologia	2
2.2 Recursos genéticos e a sustentabilidade dos agroecossistemas	3
2.3 Recursos genéticos da mangabeira na região Nordeste	4
2.4 Descrição botânica e ocorrência da mangabeira	6
2.5 Importância econômica, dados de produção e situação de cultivo	9
2.6 Cultura de tecidos de plantas	10
2.7 Propagação <i>in vitro</i>	10
2.8 Propagação <i>in vitro</i> de <i>Hancornia speciosa</i> Gomes	12
2.9 Conservação <i>in vitro</i>	13
3. Referências Bibliográficas	17
CAPÍTULO 2: Avanços na propagação <i>in vitro</i> de mangabeira (<i>Hancornia speciosa</i> Gomes) nativa da região Nordeste	26
1. Resumo	26
2. Abstract	27
3. Introdução	28
4. Material e Métodos.....	29
4.1 Avaliação de diferentes tipos de vedação de frascos no estabelecimento <i>in</i> <i>vitro</i> de segmentos nodais de mangabeira.....	29
4.2 Avaliação de diferentes tipos de vedação de frascos e da posição de segmentos nodais na multiplicação <i>in vitro</i> de mangabeira	30
4.3 Indução de enraizamento <i>in vitro</i> em microestacas de mangabeira	31
5. Resultados e Discussão	31
5.1 Avaliação de diferentes tipos de vedação de frascos no estabelecimento <i>in</i> <i>vitro</i> de segmentos nodais de mangabeira	31

5.2 Avaliação de diferentes tipos de vedação de frascos e da posição de segmentos nodais na multiplicação <i>in vitro</i> de mangabeira	33
5.2.1 Primeiro subcultivo	33
5.2.2 Segundo subcultivo	36
5.3 Indução de enraizamento <i>in vitro</i> em microestacas de mangabeira	39
6. Conclusões	41
7. Referências Bibliográficas	43

CAPÍTULO 3: Conservação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa*

Gomes) nativa da região Nordeste	46
1. Resumo	46
2. Abstract	47
3. Introdução	48
4. Material e Métodos	49
4.1 Condições gerais de experimentação para conservação <i>in vitro</i> de microestacas de mangabeira por crescimento lento	49
4.2 Efeito do manitol na conservação <i>in vitro</i> de microestacas de mangabeira	49
4.3 Efeito do ácido abscísico, da posição e de diferentes tipos de vedação de frascos na conservação <i>in vitro</i> de microestacas de mangabeira	50
5. Resultados e Discussão	51
5.1 Efeito do manitol na conservação <i>in vitro</i> de microestacas de mangabeira	51
5.2 Efeito do ácido abscísico, da posição e de diferentes tipos de vedação de frascos na conservação <i>in vitro</i> de microestacas de mangabeira	53
6. Conclusões	56
7. Referências Bibliográficas	58
ANEXOS	61

LISTA DE ABREVIATURAS

ABA	ácido abscísico
AIA	ácido 3- indolacético
AIB	ácido 3- indolbutírico
ANA	ácido naftalenoacético
BAP	6-benzilaminopurina
2,4 D	ácido 2,4-diclorofenoxiacético
MS	meio de cultura descrito por Murashige & Skoog (1962)
¼ Knop's	meio de cultura com ¼ da concentração salina do meio Knop's (1959)
½ Knop's	meio de cultura com ½ da concentração salina do meio Knop's (1959)

RESUMO

SÁ, Aline de J. **Avanços na propagação e conservação *in vitro* da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) nativa da região Nordeste**. São Cristóvão:UFS, 2009. 67 p. (Dissertação de Mestrado em Agroecossistemas).

A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) é uma planta frutífera nativa do Brasil encontrada vegetando espontaneamente em várias regiões do país, desde a região Centro-Oeste até as regiões Norte e Nordeste, onde apresenta grande importância devido à utilização de seu fruto, a mangaba, para a produção de polpas que servem para a comercialização de sucos e sorvetes. Em virtude da erosão genética que tem sido observada em seus bancos naturais de germoplasma, a mangabeira configura entre as espécies da região Nordeste que correm risco de extinção. Dessa forma o estudo de técnicas alternativas de conservação de germoplasma torna-se prioritário para auxiliar programas de recursos genéticos da espécie. Outro aspecto a ser considerado é que métodos de propagação assexuada para a variedade botânica de mangabeira do Nordeste não estão ainda definidos e necessitam ser aprimorados para melhoria do sistema de produção e auxiliar programas de melhoramento genético. O presente trabalho teve como objetivo aplicar técnicas de cultura de tecidos de plantas para a propagação assexuada e conservação de mangabeira de populações nativas de áreas litorâneas do Nordeste do Brasil. No primeiro capítulo é apresentada uma introdução geral, o referencial teórico sobre biodiversidade, desenvolvimento sustentável e biotecnologia, recursos genéticos da mangabeira na região Nordeste, descrição botânica e ocorrência, importância econômica, dados de produção e situação de cultivo, cultura de tecidos de plantas, propagação *in vitro*, propagação *in vitro* de *Hancornia speciosa* Gomes e conservação *in vitro*. O segundo capítulo trata dos avanços na propagação *in vitro* da mangabeira nativa da região Nordeste, com seleção da melhor vedação dos frascos (tampa plástica rosqueada, filme PVC, Para-film® ou papel alumínio) tempo de cultivo *in vitro*, explante (posição do segmento nodal na microestaca), meio de cultura e regulador de crescimento para indução da rizogênese *in vitro*. Para a multiplicação *in vitro* as culturas foram mantidas em meio MS com 3% de sacarose e 0,6% de ágar, suplementado com 1 mg.L⁻¹ de AIA e 1 mg.L⁻¹ de BAP e para o enraizamento *in vitro* em meio ¼ Knop's modificado com 3% de sacarose e 0,6% de ágar. Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado e as culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura variando de 26° C ± 2° C, umidade relativa do ar média em torno de 70% e fotoperíodo de 12 horas de luz branca fria (52 µmol.m⁻².s⁻¹ de irradiância). Os melhores tipos de vedação de frasco foram o filme PVC e Para-film® para a fase de estabelecimento, Para-film® para o primeiro subcultivo e filme PVC e Para-film® para o segundo subcultivo. Os melhores explantes para o primeiro subcultivo foram os segmentos nodais mediano e basal. Não houve efeito significativo do tipo de explante no segundo subcultivo. O tempo ideal para a fase de estabelecimento e para o primeiro e segundo subcultivos foi de 50 dias. Para o enraizamento foi avaliado o efeito da imersão de microestacas de mangabeira em quatro

concentrações de solução de AIB (0, 200, 400 e 600 mg.L⁻¹). Aos 60 e 90 dias de cultivo *in vitro*, observou-se maior valor numérico para o número de raízes na presença de 400 e 600 mg.L⁻¹ de AIB. Não foi observada diferença significativa para o comprimento de raízes em função das concentrações de AIB. O terceiro capítulo trata da conservação *in vitro* de mangabeira nativa da região Nordeste. Foi avaliado o efeito do manitol de forma isolada e do ácido abscísico em interação com diferentes tipos de explante e de vedação de frascos na conservação *in vitro* de microestacas de mangabeira. As culturas foram mantidas em meio MS com 3% de sacarose e 0,6% de ágar. Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado. As culturas foram mantidas em sala de crescimento sob as mesmas condições dos experimentos anteriores. Foram testadas quatro concentrações de manitol (0, 10, 15 e 20 g.L⁻¹). Na presença de manitol o comprimento da parte aérea apresentou valores numéricos inferiores à testemunha, mas aos 90 dias de cultivo *in vitro* foi observado efeito tóxico do manitol nas microestacas. Em relação ao ácido abscísico, foram testadas cinco concentrações (0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg.L⁻¹) em interação com dois tipos de vedação de frascos (tampa plástica rosqueada e papel alumínio) e dois tipos de explantes (microestacas apicais e basais). O ácido abscísico (0,5 mg.L⁻¹) apresentou melhores resultados para a conservação *in vitro* de mangabeira por um período de 90 dias quando microestacas de plântulas regeneradas *in vitro* foram cultivadas em frascos vedados com papel alumínio e não foi observado efeito significativo do tipo de explante.

Palavras-chave: biotecnologia, cultura de tecidos, recursos genéticos, frutífera.

Orientadora: Ana da Silva Lédo – Embrapa Tabuleiros Costeiros

ABSTRACT

SÁ, Aline de J. **Advances in *in vitro* propagation and conservation of mangaba tree (*Hancornia speciosa* Gomes) native of the Northeast of Brazil.** São Cristóvão:UFS, 2009. 67 p. (Thesis - Master of Science in Agroecosystems).

The mangaba tree (*Hancornia speciosa* Gomes) is a native plant fruit of Brazil found vegetating spontaneously in different regions of the country, from the Center-West to the North and Northeast of Brazil, which has great importance because of the use of its fruit, the mangaba, to produce pulp for use in the marketing of juices and icecreams. Because of the genetic erosion that has been observed in its natural banks of germplasm, the mangaba tree set among the species of the Northeast of Brazil who are at risk of extinction. Thus the study of alternative techniques for conservation of germplasm becomes priority to assist programs in genetic resources of the species. Another aspect to be considered is that asexual propagation methods for the variety of botanical mangaba tree the Northeast of Brazil are not defined and need to be enhanced to improve the production system and help breeding program. This study aimed to apply the techniques of tissue culture plants for asexual propagation and conservation of native populations in mangaba tree of coastal areas of northeastern of Brazil. The first chapter is a general introduction, the theoretical framework on biodiversity, sustainable development and biotechnology, genetic resources of mangaba tree in the Northeast, botanical description and occurrence, economic importance, data of the situation of production and cultivation, tissue culture plants, *in vitro* propagation, *in vitro* propagation of *Hancornia speciosa* Gomes and *in vitro* conservation. The second chapter deals with advances in *in vitro* propagation of mangaba tree native of the Northeast of Brazil, with the selection of best sealing bottles (threaded plastic cap, PVC film, Para-film® or aluminum foil) time of *in vitro* culture, explants (nodal position in the segment microcutting), culture medium and growth regulators for induction of *in vitro* rhizogenesis. For the *in vitro* multiplication cultures were maintained in MS medium with 3% sucrose and 0,6% of agar, supplemented with 1 mg.L⁻¹ of AIA and 1 mg.L⁻¹ of BAP and for *in vitro* rooting ¼ Knop's medium modified with 3% of sucrose and 0,6% of agar. The experiments were conducted in a randomized blocks design and the cultures were maintained in a growth room with temperature ranging from 26 ° C ± 2 ° C, average relative humidity around 70% and photoperiod of 12 hours of cold white light (52 µmol.m⁻².s⁻¹ irradiance). The best types of fencing were the bottle of PVC film and Para-film® to the stage of establishment, Para-film® for the first subculture and PVC film and Para-film® for the second subculture. The best explants for the first subculture were the median and basal nodal segments. There was no significant effect of type of explant in the second subculture. The ideal time for the phase of establishment and the first and second subcultures was 50 days. For rooting was evaluated the effect of immersion of microcutting mangaba tree of four concentrations of a solution of IBA

(0, 200, 400 and 600 mg.L⁻¹). At 60 and 90 days of *in vitro* culture, was a higher numerical value for the number of roots in the presence of 400 and 600 mg.L⁻¹ IBA. There was no significant difference in length of roots depending on the concentrations of IBA. The third chapter deals with the *in vitro* conservation of native mangaba tree region. The effect of mannitol in isolation and abscisic acid in interaction with different types of explants and sealing of vials in the *in vitro* conservation of microcutting mangaba tree. The cultures were maintained in MS medium with 3% sucrose and 0,6% of agar. The experiments were conducted in a randomized blocks design. The cultures were maintained in a growth room under the same conditions of previous experiments. Four concentrations of mannitol (0, 10, 15 and 20 g.L⁻¹) were tested. Mannitol in the presence of the length of the shoots showed values below the control, but after 90 days of *in vitro* culture was observed toxic effect of mannitol in microcutting. In relation to abscisic acid, five concentrations (0; 0,5; 1,0; 2,0 and 4,0 mg.L⁻¹) were tested in interaction with two types of sealing of bottles (threaded plastic cap and aluminum foil) and two types of explants (apical and basal microcutting). The abscisic acid (0,5 mg.L⁻¹) showed better results for *in vitro* conservation of mangaba tree for a period of 90 days when microcutting of regenerated plantlets *in vitro* were grown in bottles sealed with aluminum foil and there was significant effect of type of explant.

Keywords: biotechnology, tissue culture, genetic resources, fruitful.

Advisor: Ana da Silva Lédo – Embrapa Tabuleiros Costeiros

1.Introdução Geral

O Brasil é um país que se destaca por sua riqueza vegetal e por ser detentor da maior diversidade de espécies de plantas do mundo. Muitas dessas plantas são frutíferas que garantem ao país posição de destaque mundial no que se refere à produção de frutas frescas, mas ainda assim, existe um grande número de espécies nativas ainda pouco exploradas, em seus habitats naturais, correndo risco de serem perdidas.

Devido à intensa ocupação das áreas de vegetação nativa, muitas espécies de plantas que apresentam potencial de utilização estão sofrendo ameaça de extinção devido sobretudo à fragmentação dos seus habitats. Sendo assim, o conhecimento sobre o potencial de uso dessas plantas bem como o desenvolvimento de técnicas que visem multiplicar e conservar o germoplasma dessas espécies são necessárias para evitar a erosão genética ou mesmo a extinção das mesmas.

A mangabeira é uma planta nativa do Brasil típica da região de Cerrados e Baixadas Litorâneas e apresenta o maior potencial de uso imediato entre as fruteiras nativas da região Nordeste (FERREIRA et al., 2005). Apesar da importância que apresenta para as populações tradicionais e movimentação econômica dessa região, em muitos estados nordestinos, a maior parte da colheita de frutos é proveniente do extrativismo de plantas remanescentes, que devido à intensa ocupação imobiliária nas suas áreas de ocorrência natural, podem estar correndo risco de extinção.

Tendo em vista que a cultura da mangabeira está em fase de domesticação e todos os aspectos relacionados ao seu cultivo ainda necessitam ser melhor estudados, o desenvolvimento de tecnologias de propagação adaptadas para a mangabeira são de grande importância para a sobrevivência da espécie e para a exploração racional de sua cultura.

Encontra-se em fase de implantação no campo experimental de Itaporanga, SE, pela Embrapa Tabuleiros Costeiros, um Banco Ativo de Germoplasma de Mangabeira, surgindo assim, a necessidade de estabelecimento de estratégias complementares de conservação. A conservação complementar da mangabeira em bancos de sementes é inviável, devido à sua recalcitrância e dessa forma métodos de conservação *in vitro* tornam-se potenciais. Com base nisso, o objetivo do presente trabalho de pesquisa foi aprimorar o conhecimento técnico-científico sobre a clonagem e conservação *in vitro* da mangabeira de populações nativas de áreas litorâneas do Nordeste do Brasil.

2. Referencial Teórico

2.1 Biodiversidade, desenvolvimento sustentável e biotecnologia

A diversidade biológica ou biodiversidade é representada por todas as espécies de plantas, animais, microrganismos, em interação com os ecossistemas e os processos ecológicos dos quais essas espécies fazem parte (GOEDERT, 2007). Essa diversidade constitui, segundo Borém e Santos (2007), a base das atividades humanas nas áreas agrícola, pecuária, pesqueira e florestal e, além de ter grande valor econômico, possui também valores ecológicos, genéticos, sociais, científicos, educacionais, culturais, recreativos e estéticos.

É na América do Sul que se concentra a maior biodiversidade de todos os continentes e mais especificamente no Brasil que se encontra a maior biodiversidade do mundo. São descritas cerca de 55 mil plantas, muitas das quais correspondem a espécies nativas que têm sido usadas para alimentação humana, sendo algumas das mais conhecidas a mandioca, o cacau, o guaraná, além de espécies forrageiras que dão suporte para boa parte da pecuária nacional e as plantas medicinais nativas (GOEDERT, 2007).

Apesar da importância que a biodiversidade apresenta para manutenção dos processos ecológicos naturais que ocorrem no planeta e para as atividades humanas, estudos têm evidenciado que as taxas de extinção de espécies estão aumentando de maneira considerável. As estimativas atuais apontam em torno de 30 mil espécies extintas a cada ano (BORÉM & SANTOS, 2007) e diversas são as causas que estão provocando esse fenômeno. Segundo Scariot e Sevilha (2007), as principais ameaças à biodiversidade são poluição, superexploração, modificações ambientais (mudanças climáticas, ruptura dos ciclos biogeoquímicos, etc.), perda e fragmentação de habitats e ruptura da estrutura das comunidades nos habitats.

Diante dos impactos que a perda de biodiversidade pode provocar nas áreas agrícola, pecuária e pesqueira, surgiu a idéia do Desenvolvimento Sustentável, modelo que busca atender às necessidades do presente sem comprometer a possibilidade de as gerações futuras atenderem às suas próprias necessidades. Sendo assim, a adoção de iniciativas que permitam a conservação da biodiversidade é prioritária. É de fundamental importância que sejam fortalecidas iniciativas para conservação de espécies em seus habitats naturais e entre populações tradicionais de forma integrada

com o sistema formal de conservação *ex situ* (GOEDERT, 2007). A conservação da variabilidade genética nas espécies vegetais é primordial para a sustentabilidade da agricultura, tornando-se necessário que a erosão genética e a extinção local de espécies sejam combatidas (BORÉM & SANTOS, 2007). Há duas estratégias de conservação compostas por várias técnicas, que podem ser adotadas para conservar a diversidade. No artigo 2º da Convenção da Diversidade Biológica, é dada a definição dessas duas estratégias: conservação *ex situ* significa a conservação dos componentes da diversidade biológica fora de seus habitats naturais e conservação *in situ* significa a conservação dos ecossistemas e habitats naturais e a manutenção e recuperação de populações viáveis de espécies em seus ambientes naturais e, no caso das espécies domesticadas ou cultivadas, nos ambientes onde elas desenvolveram suas atividades distintas (SCARIOT & SEVILHA, 2007).

Nenhuma estratégia sozinha pode responder pela adequada conservação e, como ambas são complementares, devem ser utilizadas em conjunto para o sucesso da conservação. Mesmo para muitas espécies que possam ser adequadamente conservadas *ex situ*, a conservação *in situ*, por permitir a continuidade dos processos evolutivos, também pode ser necessária para a efetiva manutenção da variabilidade genética em longo prazo.

A biotecnologia associada a vários tipos de iniciativas de preservação dos habitats poderá retardar o processo de erosão genética. A cultura de células e tecidos, uma área da biotecnologia, está sendo empregada na manutenção de coleções vivas dos mais variados tipos de espécies animais e vegetais de importância econômica ou em risco de extinção. Por exemplo, a conservação da diversidade genética da mandioca é realizada em laboratórios de cultura de tecidos, onde milhares de variedades são mantidas em placas de Petri com meio de cultura. Se as técnicas de cultura de tecidos não tivessem sido desenvolvidas, a área necessária e o custo de conservação seriam muito maiores, limitando o número de tipos que poderiam ser mantidos para uso no futuro (BORÉM & SANTOS, 2007).

2.2 Recursos genéticos e a sustentabilidade dos agroecossistemas

A manifestação física da biodiversidade é representada pelos recursos genéticos, definidos como “espécies de plantas, animais e microrganismos de valor

atual ou potencial”. Esses recursos tratam da variabilidade genética entre as espécies (variabilidade interespecífica) de grupos de espécies de plantas de interesse agrícola para suas regiões de origem. Adicionalmente, o elemento dos recursos genéticos que maneja a variabilidade dentro de cada espécie (variabilidade intraespecífica), com fins de utilização para pesquisa em melhoramento genético e em biotecnologia, denomina-se “germoplasma”.

Após a criação, em Conferência Técnica organizada pela FAO, do Sistema Mundial para conservação e utilização dos recursos fitogenéticos para a alimentação e agricultura, 150 países aderiram ao Sistema, entre os quais o Brasil. Esse sistema tem como objetivos “assegurar a conservação dos recursos fitogenéticos e promover a sua utilização, visando ao interesse das gerações presentes e futuras, dentro de um marco flexível, que permita compartilhar os benefícios e obrigações”. Esse sistema enfatiza, principalmente, a conservação *ex situ*, a conservação *in situ* e o uso sustentável dos recursos genéticos para a alimentação e agricultura (GOEDERT, 2007).

A pesquisa em recursos genéticos é uma das atividades de inovação mais relevantes para o País, tendo produzido resultados que contribuíram significativamente para os principais ganhos qualitativos e quantitativos alcançados pela agricultura brasileira ao longo das últimas décadas (QUEIROZ & LOPES, 2007). A idéia de se trabalhar sistemas de produção que efetivamente contemplem a sustentabilidade dos recursos manejados, pode ser melhor compreendida na perspectiva do estudo dos agroecossistemas.

A sustentabilidade, segundo Altieri (1999), corresponde à habilidade de um agroecossistema em manter a produção ao longo do tempo, em face de distúrbios ecológicos e pressões socioeconômicas em longo prazo. Portanto, o manejo racional dos agroecossistemas é fundamental para que os objetivos de implementação de desenvolvimento sustentável sejam alcançados e para isso torna-se prioritária a adoção de medidas que permitam a conservação e adequada utilização de organismos domesticados e não-domesticados.

2.3 Recursos genéticos da mangabeira na região Nordeste

As áreas de maior antropização do Nordeste e, conseqüentemente, as mais densamente povoadas e de uso agrícola mais intensificado estão localizadas nos tabuleiros costeiros e baixada litorânea. Essas áreas são exploradas desde a época do

descobrimto, inicialmente por meio do extrativismo e, em seguida, pelas monoculturas da cana-de-açúcar, coco, cacau e citros, pelos plantios de grãos, pastagens e essências florestais exóticas, entre outras atividades como a pecuária, que transformaram drasticamente a paisagem da região.

A ocupação da região e a exploração desordenada desses cultivos levaram à extinção de espécies nativas, à perda irreparável de variabilidade genética e à degradação de grande parte dos recursos naturais existentes, sobretudo a cobertura vegetal (SILVA JUNIOR & LÉDO, 2006). A mangabeira configura entre as espécies que estão sendo afetadas por essa perda e, apesar de não constar em nenhuma lista de espécies em extinção, apresenta o seu germoplasma bastante ameaçado em diversos estados do Nordeste, como Pernambuco, Alagoas, Paraíba e Rio Grande do Norte, devido à redução da área de remanescentes dos ecossistemas nos quais a espécie ocorre. Acredita-se que essa espécie venha sofrendo grande erosão genética e supõe-se que germoplasma de interesse tenha sido perdido sem que, ao menos, fosse registrada a sua ocorrência (LEMOS et al., 1989; FERREIRA et al., 1996; NOGUEIRA et al., 1999; CRUZ et al., 2003; SILVA et al., 2003; SILVA JUNIOR, 2003).

Iniciativas para a conservação de germoplasma de mangabeira nativa da região Nordeste já foram tomadas: a Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba – Emepa-PB – possui o maior banco de germoplasma do país com 311 acessos individuais coletados na Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte e instalado em João Pessoa, Paraíba (BARREIRO NETO, 2003). A Universidade Federal de Alagoas – UFAL – possui uma coleção cujos acessos foram coletados no litoral de Alagoas e implantados no município de Rio Largo, Alagoas (ESPÍNDOLA et al., 1992). A Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária – IPA – mantém na Estação experimental de Porto de Galinhas, em Ipojuca, Pernambuco, uma reserva de aproximadamente 1,3 ha, com cerca de 125 matrizes implantadas em 1970 (SILVA JUNIOR et al., 1999) e a Embrapa Tabuleiros Costeiros realiza pesquisas que visam a prospecção, coleta, caracterização, conservação *ex situ* e utilização de uma ampla variabilidade de recursos genéticos da mangabeira de ocorrência nos ecossistemas de tabuleiros costeiros e baixada litorânea e em áreas adjacentes do Nordeste e está implantando em Sergipe, no campo experimental de Itaporanga, um Banco Ativo de Germoplasma de Mangabeira.

Apesar do aumento no número de pesquisas relacionadas à mangabeira nativa da região Nordeste (*Hancornia speciosa* var. *speciosa*), percebe-se que muito ainda

necessita ser desenvolvido para conservação da espécie e algumas das ações mais urgentes nesse sentido são: a ampliação das áreas de prospecção e coleta para todos os Estados da região Nordeste, conservação *ex situ*, por meio da formação do Banco Ativo de Germoplasma, estudos para conservação de germoplasma *in vitro* e aprimoramento da técnica de propagação vegetativa.

2.4 Descrição botânica e ocorrência da mangabeira

A mangabeira (Figura 1) é agrupada botanicamente nos seguintes táxons, conforme classificação de Cronquist (1988): Reino Plantae, Divisão Magnoliophyta, Classe Magnoliopsida, Subclasse Asteridae, Ordem Gentianales, Família *Apocynaceae* e Gênero *Hancornia*. O gênero *Hancornia* é considerado monotípico e, por isso, sua única espécie é *Hancornia speciosa* Gomes.



FIGURA 1 – *Hancornia speciosa* Gomes (Fotos: Josué Francisco Silva Junior)

A família *Apocynaceae* inclui aproximadamente 400 gêneros e 3700 espécies, sendo que no Brasil ocorrem cerca de 95 gêneros e 850 espécies. Nessa família estão incluídas árvores fornecedoras de madeira de boa qualidade, como as perobas e guatambus e são ricas em látex e em substâncias utilizadas no tratamento do câncer (SOUZA & LORENZI, 2008).

De acordo com Monachino (1945), são aceitas seis variedades botânicas de mangabeira que diferenciam-se por algumas características morfológicas, principalmente relacionadas à folhas e à flor : *H. speciosa* var. *speciosa* Gomes (ou simplesmente *H. speciosa* Gomes), *H. speciosa* var. *maximiliani* A. DC., *H. speciosa*

var. *cuyabensis* Malme, *H. speciosa* var. *lundii* A. DC., *H. speciosa* var. *gardineri* (A. DC.) Muell. Arg. e *H. speciosa* var. *pubescens* (Nees. Et Martius) Muell. Arg.

A ocorrência e a distribuição das diferentes variedades botânicas nos tabuleiros costeiros e restingas do Nordeste ainda necessitam ser estudadas, embora, conforme Monachino (1945), tenha sido registrada uma predominância da variedade típica (*H. speciosa* var. *speciosa*), que ocorre do Rio de Janeiro até o Norte do País, *H. speciosa* var. *lundii* ocorre em Minas Gerais, Pernambuco, Bahia e Goiás.

Segundo Monachino (1945), a mangabeira é uma árvore de porte médio, com altura variando de 4 a 7 m, podendo chegar até 15 m, de crescimento lento, copa ampla, às vezes mais ramificada que alta. O tronco é geralmente único, tortuoso ou reto, com 0,2 a 0,3 m de diâmetro. Os ramos são inclinados, numerosos, separados e bem formados, de córtice levemente suberoso. Os ramos jovens são de coloração violácea, lisos até um ano de idade, meio angulosos, curtos, com poucas folhas, floríferos no ápice. Caule rugoso e áspero com duas a três bifurcações na altura média de 40 a 50 cm da base. Toda a planta exsuda látex de cor branca ou róseo-pálida. As folhas, geralmente decíduas, são simples, opostas, uniformemente espaçadas, coriáceas, elípticas, oblongo ou elíptico-lanceoladas nas duas extremidades, às vezes obtuso-subacuminadas no ápice, possuindo de 3,5 a 10,0 cm de comprimento e 1,5 a 5,0 cm de largura, glabras ou pubescentes, oliváceo-enegrescentes na face ventral, mais descoradas na dorsal; pecíolo de 3 a 15 mm, axilar, fino, glabro ou pubescente, biglanduloso.

O fruto do tipo baga é elipsoidal ou arredondado de 2,5 a 6,0 cm, podendo ocorrer vários tamanhos na mesma planta, exocarpo amarelo com manchas ou estrias avermelhadas, polpa de sabor bastante suave, doce, carnososo-viscosa, ácida, contendo geralmente de duas a 15 ou até 30 sementes discóides (chatas) de 7 a 8 mm de diâmetro, castanho-claras, delgadas, rugosas, com o hilo no centro (MONACHINO, 1945).

A mangabeira é uma planta alógama (DIAS & MARANHÃO, 1994) e apesar de suas flores serem hermafroditas, há uma auto-incompatibilidade entre as estruturas de reprodução, o que a torna obrigatoriamente dependente de polinizadores (DARRAULT & SCHLINDWEIN, 2003).

A palavra “mangaba” é de origem indígena (mã’gawa) e, segundo Ferreira (1973), significa “coisa boa de comer”. César (1956), citando Garcia (s.d.), afirma que vem do tupi “mâguaba”, cujo significado é “coisa de comer”. No entanto, Braga (1960) a menciona como corruptela de “mongaba”, que quer dizer grude ou visgo, em alusão

ao látex exsudado pela planta. De acordo com Monachino (1945), os índios guaranis do Paraguai a chamam de “manga-icé” e, os tupis de “tembiú-catu”, que, segundo relatos de César (1956), talvez seja uma corruptela de “timiú-catu”, que significa “comida boa” (SILVA JUNIOR & LÉDO, 2006).

Além da denominação “mangaba”, existem muitas outras variantes usadas para nomear o fruto e a árvore no Brasil: mangabeira, mangaíba, mangabiba, mangaúva, mangareíba, mangava, manguba, mangabeira-agreste, mangabeira-brava, mangaba-das-caatingas, mangabinha-das-caatingas, mangabeira-do-norte, mangabeira-mansa, mangabeira-ovo, mangabeira-rana, mangabeira-branca, mangabeira-vermelha, mangabeira-de-goiás, mangabeira-de-minas, tembiú, tembiucatinga e catu (MONACHINO, 1945; BLOSSFELD, 1967; PIO CORRÊA, 1969; BAHIA, 1979).

A mangabeira está entre as primeiras espécies frutíferas cuja ocorrência foi relatada pelos exploradores da costa do Brasil no século XVI e apresenta ampla distribuição geográfica, ocorrendo em várias regiões do Brasil, desde o Estado do Amapá até São Paulo e estando associada, sobretudo, às vegetações de restinga e cerrados interioranos e costeiros, estes também denominados de vegetação de tabuleiro (LIMA, 1957). Sendo uma planta típica das áreas de cerrados, tabuleiros costeiros e baixada litorânea, ocorre em todos os estados do Nordeste onde esses ecossistemas se apresentam. No litoral da região, populações nativas foram identificadas desde o Maranhão até a divisa com o Espírito Santo (SILVA JUNIOR & LÉDO, 2006).

No Brasil, os principais centros de diversidade genética associados à mangabeira são, segundo Giacometti (1992): a Costa Atlântica e Baixo Amazonas (principalmente Pará e Amapá), o Nordeste (Caatinga, sobretudo as áreas de tabuleiros de savanas e zonas de transição caatinga-cerrado), Brasil Central (Cerrado), Mata Atlântica (nas áreas de cerrados litorâneos e restingas dos setores) e Bahia/Espírito Santo/ Vale do Rio Doce (do litoral de Sergipe ao Espírito Santo).

Fora do Brasil, essa fruteira é praticamente desconhecida e sua presença é registrada apenas na Bolívia (PRADO, 2000), Paraguai e, possivelmente, no Chaco da Argentina (SILVA JUNIOR & LÉDO, 2006). A espécie tem sido encontrada predominantemente em solos arenosos, ácidos, de baixa fertilidade e baixo teor de matéria orgânica (LEDERMAN & BEZERRA, 2006).

2.5 Importância econômica, dados de produção e situação de cultivo

Na região Nordeste é colhida quase toda mangaba produzida no Brasil. De acordo com o IBGE (2008), a maior produção da fruta no ano de 2006 foi alcançada em três estados nordestinos: Sergipe (520 toneladas), Bahia (170 toneladas) e Paraíba (49 toneladas). Nesses estados, o aproveitamento da mangaba pelas indústrias está restrito quase que exclusivamente ao período de safra e é direcionado essencialmente para fabricação de sucos concentrados, sorvetes e polpa congelada.

Na maioria dos estados nordestinos produtores de mangaba existem poucos plantios comerciais de mangabeira, demonstrando, assim, que a quase totalidade da produção de frutos é proveniente das plantas remanescentes (LEDERMAN & BEZERRA, 2006) tipicamente exploradas por comunidades extrativistas.

No estado de Sergipe, a mangabeira apresenta grande significado econômico, principalmente para a população do litoral. Estima-se que cerca de 7,5 mil pessoas estão associadas direta ou indiretamente à exploração da mangaba e quase todas são extrativistas, catadoras de mangaba que encontram nessa atividade sua maior fonte de renda (GLOBO RURAL, 2009).

Devido à sua importância econômica e cultural e a outros fatores relevantes como a necessidade de proteção de espécies nativas e ameaçadas de extinção, que a mangabeira foi instituída, através do decreto nº 12.723 de 20 de janeiro de 1992, como Árvore Símbolo do Estado de Sergipe.

Até o presente momento, não foi estabelecido um método comercial eficiente para propagação vegetativa da mangabeira, principalmente para a espécie ocorrente no litoral do Nordeste. Os processos convencionais de enxertia, estaquia e mergulhia testados nessa espécie não têm logrado êxito suficiente para serem adotados em viveiros comerciais (VASQUEZ ARAÚJO et al., 1996).

Ainda são poucas as informações sobre o potencial produtivo de uma mangabeira e seu rendimento por unidade de área e, considerando que a cultura ainda está em fase de domesticação, praticamente todos os aspectos relacionados ao cultivo propriamente dito necessitam ser investigados. Temas como a propagação vegetativa, seleção de genótipos promissores e desenvolvimento e adaptação de práticas culturais foram e continuam sendo pouco estudados (LEDERMAN & BEZERRA, 2006), portanto, o desenvolvimento de tecnologias de propagação bem desenvolvidas e adaptadas para a mangabeira é de grande importância para a sobrevivência da espécie.

2.6 Cultura de tecidos de plantas

A cultura de tecidos envolve um conjunto de técnicas, mediante as quais um explante (célula, tecido ou órgão) é cultivado de forma asséptica em meio nutritivo e sob condições controladas de temperatura e luminosidade (SOUZA et al., 2006). A aplicação dessas técnicas favorece a multiplicação rápida ou conservação por longos períodos de material vegetal de interesse.

Por permitir a propagação de plantas isentas de vírus e outros patógenos, a aplicação das técnicas de cultura de tecidos têm mostrado muito valor para o desenvolvimento da agricultura, especialmente quando associadas às áreas de melhoramento genético, fitossanidade e fitotecnia (SOUZA et al., 2006). Além dessas vantagens, essas técnicas também viabilizam soluções para evitar a extinção de espécies vegetais, através da formação e conservação de coleções de germoplasma *in vitro* por longos períodos.

Apesar das iniciativas tomadas por órgãos de pesquisa para implantação de coleções de mangabeira em campo, a vulnerabilidade dos acessos nesse tipo de coleção é grande e a implementação de métodos complementares de conservação é necessária para evitar perda de germoplasma de interesse. Diante disso, a aplicação das técnicas de cultura de tecidos pode permitir que o germoplasma de mangabeira seja conservado *in vitro* e se torne disponível para utilização futura.

Alguns trabalhos têm demonstrado o potencial e a viabilidade de regeneração *in vitro* da mangabeira (PEREIRA NETO, 1991; CARMO et al., 2002; COSTA et al., 2003; ALOUFA, 2003; COSTA et al., 2003; FONSECA et al., 2003; LEMOS, 2003; MOREIRA et al., 2003).

2.7 Propagação *in vitro*

A propagação assexuada *in vitro*, ou micropropagação, é um procedimento que permite a produção de plantas geneticamente idênticas em larga escala, através da aplicação das técnicas de cultura de tecidos. Esse processo pode ser dividido em três estágios que envolvem a seleção de explantes, desinfestação e cultura em meio nutritivo sob condições assépticas (I); multiplicação de propágulos mediante sucessivas subculturas em meio próprio para a multiplicação (II) e a transferência das partes aéreas produzidas para meio de enraizamento e subsequente tansplântio das plantas obtidas

para substrato ou solo (III) (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Esses estágios integram o sistema de micropropagação e sua utilização em âmbito comercial já é realidade em diversos países do mundo, onde os laboratórios comerciais trabalham com o objetivo de satisfazer as necessidades internas de material de propagação livre de doenças, ou de acelerar os métodos convencionais de propagação vegetativa (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Muitas espécies frutíferas, ornamentais, medicinais, hortícolas e arbóreas já podem ser multiplicadas, através da micropropagação, não somente em laboratórios de instituições de pesquisa e ensino, mas também de forma comercial em todo mundo, produzindo um número incrível de indivíduos semelhantes à planta matriz, de modo repetido e contínuo, colocando à disposição dos agricultores mudas de melhor qualidade genética e fitossanitária em qualquer época do ano (SOUZA et al., 2006).

Diversas formulações de meios de cultura têm sido utilizadas na etapa de propagação *in vitro* e, embora não exista uma formulação padrão para todas as espécies de plantas, o meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), suas modificações e diluições têm apresentado bons resultados para diversas espécies. Os meios de cultura, além de fornecer as substâncias essenciais para o crescimento, também controlam o padrão de desenvolvimento *in vitro* (CALDAS et al., 1998).

Fitorreguladores podem ser adicionados ao meio de cultura com o objetivo principal de suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes que se encontram isolados das regiões produtoras na planta-matriz (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). As auxinas controlam o crescimento e o alongamento celular e as citocininas controlam a citocinese ou divisão celular, estando também intimamente ligadas à diferenciação das células, sobretudo no processo de formação de gemas caulinares (KERBAUY, 2004). O balanço entre estes dois tipos de reguladores controla muitos aspectos da diferenciação e organogênese nas culturas de tecidos de órgãos (PASQUAL, 2001).

De modo geral, a auxina natural mais abundante é o AIA (ácido indol-acético). Dentre as auxinas sintéticas que causam muitas das respostas comuns ao AIA, encontram-se ácido naftalenoacético (α -ANA), o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), o ácido 2,4,5,-triclorofenoxiacético (2,4,5-T), o ácido 2-metroxi-3,6-diclorobenzóico (dicamba) e o ácido 4-amino-3,5,5-tricloropiclorínico (picloran). Grande parte dessas auxinas é empregada na agricultura como herbicida, sendo mais freqüentemente usados o 2,4-D, o picloran e o dicamba. O termo citocinina inclui a

cinetina (KIN) ou 6-furfurilaminopurina, a 6-benzilaminopurina (BAP) ou 6-benziladenina, a isopenteniladenina (iP), a zeatina e seus derivados. Mas algumas feniluréias como o thidiazuron, também possuem atividade citocinínica (KERBAUY, 2004). O BAP tem sido muito eficaz para promover multiplicação em diversas espécies (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

2.7 Propagação *in vitro* de *Hancornia speciosa* Gomes

Muitos trabalhos de pesquisa já foram realizados com a intenção de elucidar algumas etapas do processo de propagação *in vitro* da mangabeira. A produção de plântulas germinadas *in vitro* é uma dessas etapas e se faz muito importante para a obtenção de explantes com alta resposta morfogênética e livre de contaminação. Através da germinação de sementes de mangaba *in vitro*, é possível obter explantes juvenis de mangabeira livres de contaminantes com relativa facilidade. Nessa etapa, a adição de 0,3% de carvão ativado no meio de cultura promove um maior desenvolvimento do sistema radicular de plântulas de mangaba germinadas *in vitro* (LÉDO et al., 2005). Os autores obtiveram de 95 a 100% de germinação e ausência de contaminação em meio MS ou com ½ de sua concentração salina com e sem adição de carvão ativado.

Avaliando as respostas morfogênicas de diferentes explantes cultivados *in vitro*, Lédo et al. (2005) constataram que a concentração de 1 mg.L⁻¹ de AIA com 0,5; 1 ou 2 mg.L⁻¹ de BAP induz uma boa formação de calos em segmentos caulinares de plântulas de mangaba germinadas *in vitro* e a concentração de 1 mg.L⁻¹ de AIA combinada com 1 ou 2 mg.L⁻¹ de BAP promove uma boa formação de calos em segmentos nodais, com a proliferação de brotações adventícias após 45 dias.

O acúmulo de etileno no recipiente de cultivo *in vitro* corresponde a um dos principais problemas encontrados na propagação *in vitro* de mangabeira, pois essa substância apresenta efeito adverso no desenvolvimento, morfologia e crescimento das plantas, diminuindo a expansão foliar e a regeneração de novos brotos (BIDDINGTON, 1992). Segundo Pereira Netto & McCown (1999), o crescimento de partes aéreas de mangabeira em atmosfera enriquecida com 5 ou 10 µL.L⁻¹ de etileno resulta em inibição do alongamento de ramos laterais e o ramo principal e a concentração de 1 µL.L⁻¹ de etileno resulta em redução da ordem de 50% na proliferação de ramos laterais (PEREIRA NETTO & MCCOWN, 1999).

Trocas gasosas, por meio da renovação do meio de cultura e estabelecimento da definição dos intervalos e do número de subcultivos poderão minimizar os efeitos deletérios do acúmulo de etileno no vigor das culturas, somados a outros fatores, como o tipo de tampa empregada no fechamento de frascos, que podem influenciar o desenvolvimento de algumas culturas.

Apesar dos resultados promissores quanto ao número de brotações, a capacidade de enraizamento *in vitro* e *ex vitro* da mangabeira é baixa, razão pela qual a conversão em plantas também é pequena. Diversos estudos relacionados à indução da rizogênese em brotos adventícios de mangabeira foram conduzidos, mas os resultados ainda não são promissores para aplicação em larga escala. A adição isolada de AIB, ANA e 2,4-D, nas concentrações de 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹, em meio de cultura MS não foi satisfatória, obtendo-se enraizamento em apenas dois explantes, após oito semanas de incubação (LEMOS et al., 2006).

Pinheiro et al. (2002) obtiveram 18,39 e 15,23% de enraizamento de propágulos submetidos ao alongamento e oriundos de explantes basais em meio WPM e ½ MS, respectivamente, suplementado com 0,5 mg.L⁻¹ de ANA combinado com 0,1 mg.L⁻¹ de BAP, na presença de carvão ativado. Entretanto, em estudos conduzidos com variedades botânicas oriundas da região dos Cerrados, Grigoletto (1997) obteve maiores porcentagens de enraizamento em meio de cultura ¼ Knoop's (61,5%) e ½ MS (58,5%), suplementado com diferentes tratamentos de AIA e BAP. Provavelmente, as baixas porcentagens de enraizamento obtidas por Pinheiro et al. (2002) e Lemos et al. (2006), podem ser atribuídas a variações genotípicas da espécie.

2.8 Conservação *in vitro*

Segundo Giacometti e Ferreira (1988), genes e germoplasma constituem materiais praticamente idênticos, porém, o germoplasma governa o processo da hereditariedade, enquanto os genes constituem os elementos desse processo. Não existe unidade de medida de germoplasma, entretanto, existem diferentes formas de germoplasma, sendo algumas das mais frequentes a semente, a planta *in vivo* ou *in vitro*, o meristema *in vitro* e mais modernamente o DNA (GOEDERT, 2007).

A importância da conservação *in vitro* é evidente na Biologia Vegetal por causa das oportunidades que se criaram para compreender, utilizar e conservar recursos genéticos de plantas. A conservação *in vitro* foi proposta como alternativa lógica à

conservação em bancos de germoplasma no campo devido à vulnerabilidade que as plantas apresentam em função de sua exposição. A manutenção dos bancos de germoplasma em condições de campo tem como desvantagens a sua vulnerabilidade. As plantas são expostas ao ataque de patógenos, a intempéries climáticas ou ao vandalismo, podendo ser perdidas por falhas da identificação ou erros humanos. A possibilidade da utilização de conservação *in vitro* é atraente tanto por motivos econômicos quanto práticos, sendo um componente adicional importante do tratamento de recursos genéticos de plantas (WITHERS & WILLIAMS, 1998).

Várias estratégias simples, em termos técnicos, têm sido utilizadas com sucesso, para o estabelecimento e manutenção de culturas *in vitro*: redução na temperatura de incubação das culturas e aplicação de retardantes osmóticos e hormonais no meio nutritivo. O valor das técnicas de conservação *in vitro* varia de uma espécie para outra. O comprometimento com a conservação *in vitro* precisa ser avaliado caso a caso. Os métodos convencionais sempre terão seu papel, e será mais benéfica uma estratégia equilibrada, na qual se complementam o armazenamento de sementes, conservação *in situ* ou em bancos de germoplasma no campo, armazenamento *in vitro*, armazenamento de pólen e até o armazenamento de DNA em bibliotecas de genes (WITHERS & WILLIAMS, 1998).

No processo de conservação *in vitro*, partes de uma planta podem se regenerar em uma nova planta, desde que sejam cultivadas sobre meio de cultura com os nutrientes necessários. A manutenção de coleções *in vitro* tem sido considerada como um método alternativo à conservação de germoplasma, especialmente para espécies propagadas vegetativamente (ROCA et al., 1991) e para espécies que não podem ter suas sementes conservadas a baixas temperatura e umidade, como as da mangabeira.

No desenvolvimento desse método, dois procedimentos têm sido adotados: o crescimento lento – que envolve a depressão do metabolismo das plantas –, e o da supressão completa do crescimento por armazenamento em temperaturas ultra-baixas, a chamada criopreservação. De acordo com Malaurie et al. (2007), cerca de 20 espécies de inhame são conservadas no Institut de Recherche pour l'ê Développement (IRD) sob condições de crescimento mínimo. Embora não haja procedimento padrão para todos os genótipos de todas as espécies, os sucessos obtidos têm sido animadores, e será possível desenvolver um método adequado de crescimento lento para uma nova espécie que exija menos manipulação (WITHERS & WILLIAMS, 1998).

Com o objetivo de reduzir ou até suprimir o crescimento das células e tecidos, o processo de preservação *in vitro* apresenta diversas vantagens sobre o processo de conservação de germoplasma no campo, e dentre elas destacam-se: a necessidade de menor espaço para ocupação do material; manutenção de material vegetal livre de patógenos; disponibilidade de material para ser imediatamente propagado, além da redução dos custos financeiros, entre outros (DORION et al., 1991). Entre as técnicas mais utilizadas para reduzir o crescimento *in vitro* e, desta forma, estender o intervalo entre os subcultivos, encontra-se a aplicação de retardantes osmóticos e hormonais ao meio nutritivo (CONCEIÇÃO et al., 1998; MARTIN et al., 1998; GOLMIRZAI & TOLEDO, 1999). O manitol e o sorbitol apresentam um efeito retardante no crescimento e desenvolvimento de um grande número de espécies, e são utilizados com bastante frequência na conservação *in vitro*. Normalmente, são adicionados ao meio, para reduzir-lhe o potencial hídrico. Assim, os cultivos são sujeitos a uma desaceleração no seu crescimento, devido a um estresse (BHAT & CHANDEL, 1993; LOPEZ-DELGADO et al., 1998).

Não existem trabalhos sobre conservação *in vitro* de mangabeira. Algumas espécies têm sido conservadas sob crescimento lento com a utilização de retardantes osmóticos e inibidores de crescimento. O ABA inibe o crescimento por meio do fechamento estomático, limitando, portanto a assimilação de carbono e, conseqüentemente a produção de biomassa. Além disso, esse hormônio tem efeito inibitório sobre a divisão e alongamento celular (KERBAUY, 2004).

Os resultados obtidos por Faria et al. (2006), mostraram ser possível conservar sob crescimento lento, no período de meses, microplantas de maracujazeiro em meio de cultura MS suplementado com 10 ou 20 g.L⁻¹ de sorbitol, na ausência de sacarose, e mantidas sob condições de fotoperíodo de 16 h e temperatura de 27°C ± 1°C. Esses autores constataram também que a sacarose promoveu maior desenvolvimento de microplantas.

Em estudo desenvolvido com cana-de-açúcar, Lemos et al. (2002) constataram que houve efeito positivo da utilização de sacarose como fonte de carbono e regulador osmótico na manutenção da viabilidade dos explantes conservados *in vitro*. Esses autores constataram também que o uso de concentrações de 1,0 mg.L⁻¹ de ABA e de 20 g.L⁻¹ de sacarose associadas a condições de temperatura reduzida demonstraram que os brotos permaneceram viáveis por um ano no mesmo meio de cultura sem a necessidade de serem subcultivados.

Ao avaliar o efeito do paclobutrazol (PBZ) no crescimento *in vitro* de plantas de abacaxi visando à conservação do germoplasma, Canto et al. (2004) obtiveram melhores resultados na ausência do PBZ ou na presença de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ aplicada apenas no início do experimento.

Apesar dos resultados animadores, não existe um protocolo padrão de conservação que possa ser aplicado para todas as espécies de plantas. As respostas às estratégias de conservação *in vitro* variam em função da espécie estudada e da estratégia de conservação *in vitro* utilizada, evidenciando a necessidade de desenvolvimento ou adaptação de protocolos específicos para espécies de interesse.

3. Referências Bibliográficas

ALOUFA, M. A. I. Multiplicação e Conservação *in vitro* de Mangabeira. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DA MANGABA, 1., 2003, Aracaju. **Anais ...** Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2003. Seção Palestras. 1 CD-ROM.

ALTIERI, M. **Agroecologia**: bases científicas para uma agricultura sustentável. Montevideo: Editorial Nordan-Comunidad, 1999. 325p.

SECRETARIA DO ESTADO DA BAHIA. **Inventário de plantas medicinais do Estado da Bahia**. Salvador, 1979. p. 679-680.

BARREIRO NETO, M. Recursos genéticos para o melhoramento da mangabeira no Estado da Paraíba. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DA MANGABA, 1., 2003, Aracaju. **Anais ...** Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2003. 1 CD-ROM.

BHAT, S. R.; CHANDEL, K. P. S. *In vitro* conservation of *Musa* germplasm: effects of mannitol and temperature on growth and storage. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v. 68, n. 6, p. 841-846, 1993.

BIDDINGTON, N. L. The influence of ethylene in plant tissue culture. **Plant Growth Regulator**, v. 11, p. 173-187. 1992.

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

BORÉM, A. & SANTOS, F. R. de. Biotecnologia e Biodiversidade Vegetal. In: NASS, L. L. (Ed.). **Recursos genéticos vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, DF. 2007. p. 745-749.

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

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

CARMO, D. O.; CARVALHO COSTA, M. A.; SOUZA, F. V. D.; HANSEN, D. S.; ALMEIDA, W. B. Regeneração *in vitro* de plantas de jenipapeiro (*Genipa americana* L) a partir de segmentos internodais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17., 2002, Belém. **Resumos ...** Belém: SBF, 2002. Seção Artigos. 1 CD-ROM.

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

CESAR, G. **Curiosidade de nossa flora**. Recife: Instituto Agrônomo do Nordeste, 1956. 374 p.

CONCEIÇÃO, A. M. da; FORTES, G. R. de L.; Silva, J. B. da. Conservação *in vitro* de batata (*Solanum tuberosum*) cvs. Baronesa e Santo Amor: efeito sobre a formação de gemas e brotações dos segmentos caulinares. **Agropecuária de Clima Temperado**, Pelotas, v. 1, n. 1. p. 67-71, 1998.

COSTA, M. A. P. de C.; ALMEIDA, W. A. B. de; DANTAS, A. C. V.; Silva, S. A.; SOUZA, F. V. D. Principais resultados com micropropagação de mangabeira na Bahia. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DA MANGABA, 1., 2003, Aracaju. **Anais...** Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2003. 1 CD-ROM.

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

CRUZ, P. J.; SILVA, S. A. ; DANTAS, A. C. V. L.; COSTA, M. A. P. de C.; FONSECA, A. A.; CARVALHO, C. A. L. de; ALMEIDA, W. B. de; SALDANHA, R. B.; RIBEIRO, T. de A. D.; ANDRADE, E. M. Identificação da variabilidade genética

em mangaba (*Hancornia speciosa* Gom.) no município de Iramaia, BA. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2., 2003, Porto Seguro, BA. **Anais...** Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura/Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas, 2003. 1 CD-ROM.

DARRAULT, R.; SCHLINDWEIN, C. Polinização de *Hancornia speciosa* (Apocynaceae). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DA MANGABA, 1., 2003, Aracaju. **Anais...** Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2003. 1 CD-ROM.

DIAS, M. G. L.; MARANHÃO, T. O. Análise citogenética e palinológica quanto à viabilidade e morfologia em mangabeira (*Hancornia speciosa*). **Biociências**, v. 1, p. 61-69. 1994.

DORION, N.; KADRI, M.; BIGOT, C. *In vitro* preservation at low temperature of rose plantlets usable for direct acclimatization. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 298, p. 335-343, 1991.

ESPÍNDOLA, A. C. de M.; FRANÇA, E. A.; NASCIMENTO JÚNIOR, N. A. N. Efeito da profundidade de plantio e misturas de substratos na germinação e vigor das mudas de mangabeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 14, n. 3, p. 165-168, 1992.

FARIA, G. A.; Costa, M. A. C.; JUNGGHANS, T. G.; LÉDO, C.A. da S.; SOUZA, A. da S. Efeito da sacarose e do sorbitol na conservação *in vitro* de *Passiflora giberi* N. E. Brown. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 2, p. 267-270, Ago 2006.

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

FERREIRA, E. G.; SILVA, H.; BOSCO, J.; AGUIAR FILHO, S. P.; SILVA, A. Q. da. Estudo de plantas nativas e cultivadas de mangabeiras no litoral paraibano. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 47., 1996, Nova Friburgo. **Resumos...** Nova Friburgo: Sociedade Botânica do Brasil, 1996. p. 354.

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

FONSECA, F. K. P. de; LEMOS, E. E. P. de; OLIVEIRA, J. G. L.; ALENCAR, L. M. C. de. Efeito do balanço hormonal na organogênese e multiplicação de brotos de mangabeira *Hancornia speciosa* Gomes *in vitro*. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DA MANGABA, 1., 2003, Aracaju. **Anais...** Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2003. 1 CD-ROM.

GIACOMETTI, D. C. Recursos genéticos de fruteiras nativas do Brasil. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE RECURSOS GENÉTICOS DE FRUTEIRAS NATIVAS, 1992, Cruz das Almas, BA. **Anais...** Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 1993. p. 13-27.

GLOBO RURAL. **Em Sergipe, catadoras dependem da mangaba**. 23 de novembro de 2008. Disponível em: <<http://globoruraltv.globo.com/TVGlobo/Jornalismo/Telejornais/globorural/CDA/tvg>. As catadeiras de mangaba de novembro de 2008>. Acesso em: 16 jan. 2009.

GOEDERT, C. de O. Histórico e avanços em recursos genéticos no Brasil. In: NASS, Luciano L. (Ed.). **Recursos genéticos vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. p. 23-59.

GOLMIRZAIE, A.; TOLEDO, J. *In vitro* conservation of potato and sweet potato germplasm. In: AATHUR, C.; FERGUNSON, P.; SMITH, B. (Ed.). **Impact on a changing world: program report 1997-1998**. Lima: International Potato Center, 1999. p. 351-356.

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: Embrapa SPI/Embrapa CNPH, 1998. p.183 – 260.

GRIGOLETTO, E. R. **Micropropagação de *Hancornia speciosa* Gomez (mangabeira)**. 1997. (Dissertação de Mestrado). Universidade de Brasília. Brasília, 1997.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA ESTATÍSTICA. **Extração Vegetal**. 2006. Disponível em <<http://www.ibge.com.br>>. Acesso: 10 de outubro de 2008.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 452 p.

LEDERMAN, I. L. & BEZERRA, J. E. F. Situação atual e perspectivas da cultura da mangaba. In: SILVA JUNIOR, J. F. da; LÉDO, A. da. (Ed.). **A cultura da mangaba**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2006. p. 248-253.

LÉDO, A. da S.; VIEIRA, G. S. S.; SILVA JUNIOR, J. F. da; BARBOZA, S. B. S. C.; GOMES, K. K. P. Cultivo in vitro de sementes de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 2., 2005, Fortaleza. **Horticultura Brasileira**, v. 23, p. 622-623, 2005. Suplemento.

LEMOS, E. E. P de. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 10, p. 1359-1364, 2002.

LEMOS, E. E. P. de. Estratégias para a multiplicação clonal da mangabeira em Alagoas. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DA MANGABA, 1., 2003, Aracaju. **Anais...** Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2003. 1 CD-ROM.

LEMOS, E. E. P. de; COSTA, M. A. P. de C.; ALOUFA, M. A. I.; LÉDO, A. da S.; ALMEIDA, W. A. B. de; DANTAS, A. C. V. L.; SILVA, S. A.; SOUZ, F. V. D. Micropropagação. In: SILVA JUNIOR, J. F. DA; LÉDO, A. DA S. (Ed.). **A cultura da mangaba**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2006. p.125-133.

LEMOS, R. P. de; ALVES, R. E.; OLIVEIRA, E. F. de; SILVA, H.; SILVA, A. Q. da. Características pomológicas de mangabeiras (*Hancornia speciosa* Gomes) da Paraíba. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 10., 1989, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1989. p. 346-351.

LIMA, D. de A. **Estudos fitogeográficos de Pernambuco**. Recife: Instituto de Pesquisas Agronômicas de Pernambuco, 1957. 44 p. (Instituto de Pesquisas Agronômicas de Pernambuco. Publicação, 2).

LOPES-DELGADO, H.; JIMENEZ-CASAS, M.; SCOTT, I. M. Storage of potato microplants *in vitro* in the presence of acetyl salicylic acid. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 54, n. 3, p. 145-152, 1998.

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

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Suécia, v.15, p. 473-479, 1962.

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, v. 1. Disponível em: <<http://www.ejb.org/content/vol1/issue3/full/3/index.html>> Acesso em: 15 dez. 2007.

MARTIN, C.; IRIONDO, J. M.; GONZALES-BENITO, E.; PEREZ, C. The use of tissue culture techniques in the conservation of plant biodiversity. **Agro Food Industry Hi-Tech**, Milan, v. 9, n. 1, p. 37-40, 1998.

MOREIRA, M. J. S.; COSTA, M. A. P. de C.; ALMEIDA, W. A. B. de; SOUZA, F. V. D.; SILVA, S. A.; ALVES, C. da S. Regeneração de plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) *in vitro*. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DA MANGABA, 1., 2003, Aracaju. **Anais...** Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2003. 1 CD-ROM.

NOGUEIRA, R. J. M. C.; MELO FILHO, P. de A.; ARAÚJO, E. de L. Expressões ecofisiológicas de germoplasma de *Hancornia speciosa* Gomes cultivado no litoral de Pernambuco. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n. 4, p.731-732, 1999.

PASQUAL, M. **Textos acadêmicos**: meios de cultura. Lavras: FAEPE/UFLA, 2001. 127 p.

PEREIRA NETO, A. B. de. Propagação *in vitro* de *Hancornia speciosa*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 3., 1991, Viçosa, MG. **Anais...** Viçosa: UFV, 1991.

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

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

PIO-CORRÊA, M. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: IBDF, 1969. v. 5. p. 82-83.

PINHEIRO, C. S. R.; MEDEIROS, D. N. de; MACÊDO, C. E. C. de; ALLOUFA, M. A. I. Estudo comparativo do enraizamento de (*Hancornia speciosa* Gomez) mangabeira submetidas ou não ao alongamento *in vitro*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17., 2002, Belém. **Anais...** Belém: SBF, 2002.

PRADO, O. Q. de. Descripción del Bosque de “El Tumbador” (Puerto Suárez, Bolívia). In: SIMPÓSIO SOBRE RECURSOS NATURAIS E SÓCIO-ECONÔMICOS DO PANTANAL, 3., 2000, Corumbá. **Anais...** Corumbá: Embrapa Pantanal, 2000. 1 CD-ROM.

QUEIROZ, M. A. de; LOPES, M. A. Importância dos recursos genéticos vegetais para o agronegócio. In: NASS, Luciano L. (Ed.). **Recursos genéticos vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. p. 61-119.

ROCA, W. M.; ARIAS, D. I.; CHAVES, 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. 697-714.

SILVA, S. A.; CRUZ, P. J.; DANTAS, A. C. V. L.; COSTA, M. A. P. de C.; FONSECA, A. A.; CARVALHO, C. A. L. de; ALMEIDA, W. B. de; LIMA, S. N.; BAHIA, H. F.; MOREIRA, M. J. S. Identificação da variabilidade genética em mangaba (*Hancornia speciosa* Gom.) no município de Iramaia, BA. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2., 2003, Porto Seguro, BA. **Anais...** Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura; Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas, 2003. 1 CD-ROM.

SCARIOT, A. O.; SEVILHA, A. C. Conservação in situ de Recursos Genéticos Vegetais. In: NASS, L. L. (Ed.). **Recursos genéticos vegetais**. Brasília : Embrapa, DF. 2007. p. 473-502.

SILVA JUNIOR, J. F. da. Recursos genéticos da mangabeira nos Tabuleiros Costeiros e baixada Litorânea do Nordeste. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DA MANGABA, 1., 2003, Aracaju, SE. **Anais...** Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2003. 1 CD-ROM.

SILVA JUNIOR, J. F. da; LÉDO, A. da. Botânica. In: _____. (Ed.). **A cultura da mangaba**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2006. Cap. 1. p. 25-33.

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

SOUZA, F. V. D.; JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. da S.; SANTOS-SEREJO, J. A. dos; COSTA, M. A. P. de C. Micropropagação. **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas. Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. 2006. 152 p.

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

VASQUEZ-ARAÚJO, J. E.; LEMOS, E. E. P.; LOUZADA, T. A. Multiplicação de gemas e brotos de mangabeira (*Hancornis speciosa* Gomes) em plântulas germinadas *in vitro*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 14., Salvador, 1996. **Anais...** Salvador: SBF, 1996. p.313.

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

CAPÍTULO 2

AVANÇOS NA PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DA MANGABEIRA (*Hancornia speciosa* Gomes) NATIVA DA REGIÃO NORDESTE

1. RESUMO

SÁ, Aline de J. Avanços na propagação *in vitro* da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) nativa da Região Nordeste. In: **Avanços na propagação e conservação *in vitro* da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) nativa da região Nordeste**. 2009. Cap II. Dissertação de Mestrado em Agroecossistemas. Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE.

A propagação *in vitro* tem sido adotada como técnica complementar aos métodos convencionais de propagação vegetativa de diversas espécies. A mangabeira é uma planta nativa que apresenta o maior potencial de uso imediato entre as fruteiras nativas da região Nordeste, mas a propagação assexuada dessa espécie por métodos tradicionais tem apresentado limitações, tornando-se indispensável o desenvolvimento de métodos alternativos de propagação para a exploração racional de sua cultura. O presente trabalho teve como objetivo aprimorar a técnica de propagação *in vitro* da mangabeira de populações nativas de áreas litorâneas do Nordeste do Brasil, visando o estabelecimento de um protocolo de micropropagação, com a seleção da melhor vedação dos frascos (tampa plástica rosqueada, filme PVC, Para-film® ou papel alumínio), tempo de cultivo *in vitro*, explantes (posição do segmento nodal na microestaca), meio de cultura e regulador de crescimento para indução da rizogênese *in vitro*. Para a fase de estabelecimento, primeiro e segundo subcultivos foi utilizado meio MS com 3% de sacarose e 0,6% de ágar, suplementado com 1 mg.L⁻¹ de AIA e 1 mg.L⁻¹ de BAP e para o enraizamento, meio ¼ Knop's modificado com 3% de sacarose e 0,6% de ágar. Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado em sala de crescimento com temperatura variando de 26° C ± 2° C, umidade relativa do ar média em torno de 70% e fotoperíodo de 12 horas de luz branca fria (52 μmol.m⁻².s⁻¹ de irradiância). As avaliações foram realizadas aos 30, 50 e 65 dias de cultivo *in vitro*. Os melhores tipos de vedação de frasco foram o filme PVC e Para-film® para a fase de estabelecimento, Para-film® para o primeiro subcultivo e filme PVC e Para-film® para o segundo subcultivo. Os melhores explantes para o primeiro subcultivo foram os segmentos nodais mediano e basal. Não houve efeito significativo do tipo de explante no segundo subcultivo. O tempo ideal para a fase de estabelecimento e para o primeiro e segundo subcultivos foi de 50 dias. Para o enraizamento *in vitro* foi avaliado o efeito da imersão de microestacas de mangabeira em quatro concentrações de solução de AIB (0, 200, 400 e 600 mg.L⁻¹). Aos 60 e 90 dias de cultivo *in vitro* observou-se maior valor numérico de raízes nas concentrações de 400 e 600 mg.L⁻¹ de AIB.

Palavras- chave: micropropagação, segmentos nodais, vedação de frascos.

Orientadora: Ana da Silva Lédo – Embrapa Tabuleiros Costeiros

2. ABSTRACT

SÁ, Aline de J. Advances in *in vitro* propagation of mangaba tree (*Hancornia Gomes speciosa*) native of the Northeast of Brazil. In: **Advances in *in vitro* propagation and conservation of mangaba tree (*Hancornia speciosa* Gomes) native of the Northeast of Brazil**. 2009. Cap. II. Thesis - Master of Science in Agroecosystems. Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE.

The *in vitro* propagation has been adopted as a complementary technique to conventional methods of vegetative propagation of several species. The mangaba tree is a native plant that has the greatest potential for immediate use among native fruit of the Northeast of Brazil, but the asexual propagation of this species by traditional methods have shown limitations, making it essential to develop alternative methods of propagation for the rational exploitation of their culture. This study aimed to improve the technique of *in vitro* propagation of mangaba tree of native populations in coastal areas of northeastern of Brazil, aiming to establish a protocol for micropropagation with selection of the best sealing of vials, time of *in vitro* cultivation, explants (nodal position in the segment microcutting), culture medium and growth regulators for induction *in vitro* rhizogenesis. For the phase of establishment, first and second subcultures the cultures were maintained in MS medium with 3% sucrose and 0,6% agar, supplemented with 1 mg.L⁻¹ of AIA and 1 mg.L⁻¹ of BAP and for rooting in ¼ Knop's medium modified with 3% sucrose and 0,6% of agar. The experiments were conducted in a randomized blocks design in a growth room with temperature ranging from 26 ° C ± 2 ° C, average relative humidity around 70% and photoperiod of 12 hours of cold white light (52 µmol.m⁻².s⁻¹ irradiance). Evaluations were performed at 30, 50 and 65 days of *in vitro* cultivation. The best types of fencing were the bottle of PVC film and Para-film® to the stage of establishment, Para-film® for the first subculture and PVC film and Para-film® for the second subculture. The best explants for the first subculture were the median and basal nodal segments. There was no significant effect of type of explant in the second subculture. The ideal time for the phase of establishment and the first and second subcultures was 50 days. For *in vitro* rooting was evaluated the effect of immersion of microcutting mangaba tree of four concentrations of a solution of IBA (0, 200, 400 and 600 mg.L⁻¹). At 60 and 90 days of *in vitro* culture was a higher numerical value of roots in concentrations of 400 and 600 mg.L⁻¹ of IBA.

Keywords: micropropagation, nodal segments, vials sealing.

3. Introdução

A mangabeira é uma planta frutífera nativa do Brasil cuja ocorrência é registrada em várias regiões do país, estando associada, sobretudo, às vegetações de restinga e cerrados interioranos e costeiros (LIMA, 1957). A espécie é encontrada predominantemente em solos arenosos, de baixa fertilidade e baixo teor de matéria orgânica (LEDERMAN & BEZERRA, 2006) e corresponde à planta com maior potencial de uso imediato entre as fruteiras nativas da Região Nordeste (FERREIRA et al., 2005).

Apesar da importância que apresenta na região Nordeste, observa-se que a maior parte da produção de mangaba nessa região é proveniente de plantas remanescentes, pois as técnicas de propagação vegetativa dessa espécie ainda não são completamente dominadas e existem poucos plantios comerciais nos estados onde a utilização e processamento da mangaba ocorrem com maior intensidade.

Tendo em vista que a mangabeira apresenta dificuldade de propagação assexuada por métodos tradicionais e que o seu germoplasma está sob séria ameaça de erosão genética, o desenvolvimento de métodos eficientes de propagação vegetativa é essencial para possibilitar a preservação da espécie e a exploração racional da cultura da mangaba. Nesse sentido, a propagação *in vitro* torna-se potencial para multiplicação de genótipos de interesse e para produção de mudas com características produtivas e fitossanitárias desejáveis.

Muitos trabalhos de pesquisa já elucidaram algumas etapas do processo de propagação *in vitro* da mangabeira nativa da região Nordeste, como a produção de plântulas germinadas *in vitro* e formação de brotações adventícias *in vitro* (LÉDO et al., 2005; LEMOS et al., 2006). Entretanto, resultados promissores de indução da rizogênese em brotos adventícios de variedades botânicas oriundas da região dos Cerrados (GRIGOLETTO, 1997) não têm sido observados para mangabeira nativa da região Nordeste (LEMOS et al., 2006).

O acúmulo de etileno no recipiente de cultivo *in vitro* também é limitante na propagação *in vitro* de mangabeira, devido a seus efeitos adversos no desenvolvimento, morfologia e crescimento das plantas. Trocas gasosas por meio da renovação do meio de cultura, a definição dos intervalos e do número de subcultivos e a seleção do tipo de vedação de frascos poderão minimizar os efeitos deletérios do acúmulo de etileno.

O presente trabalho teve como objetivo aprimorar o conhecimento técnico científico da clonagem de mangabeira de populações nativas de áreas litorâneas do Nordeste do Brasil, visando aprimorar o protocolo de micropropagação já existente estabelecendo o tempo de cultivo *in vitro*, o melhor tipo de vedação de frascos, posição de origem do explante e o meio de cultura para indução de rizogênese.

4. Material e Métodos

Para o estudo da multiplicação *in vitro* da mangabeira nativa do Nordeste, foram utilizados explantes (segmentos nodais) obtidos a partir de plântulas assépticas germinadas *in vitro*. As sementes foram coletadas de acessos da população nativa de mangabeira do Campo Experimental da Embrapa Tabuleiros Costeiros, localizado no município de Itaporanga-SE.

As atividades de assepsia, inoculação e desenvolvimento dos experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Tabuleiros Costeiros. O pH dos meios de cultura foi ajustado para 5,8 e todos os tratamentos foram submetidos à esterilização em autoclave a 120° C durante 15 minutos.

Após a inoculação, as culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura variando de 26° C \pm 2° C, umidade relativa do ar média em torno de 70% e fotoperíodo de 12 horas de luz branca fria (52 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de irradiância).

4.1 Avaliação de diferentes tipos de vedação de frascos no estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de mangabeira

Segmentos nodais obtidos a partir de plântulas germinadas *in vitro* foram inoculados em frascos de vidro tipo maionese com capacidade para 250 mL, contendo 30 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) com 3,0% de sacarose e 0,6% de ágar, suplementado com 1 mg.L⁻¹ de AIA e 1 mg.L⁻¹ de BAP, conforme Léo et al. (2005). Foram avaliados os seguintes tipos de vedação dos frascos: tampa plástica rosqueada, filme PVC, Para-film® e papel alumínio.

O experimento foi instalado em esquema de parcelas subdivididas no tempo sendo na parcela quatro tratamentos (quatro tipos de vedação) e subparcela em três

tempos, com seis repetições. Cada unidade experimental foi constituída de quatro frascos contendo dois segmentos nodais cada.

Aos 30, 50 e 65 dias após a inoculação, foram analisados os seguintes caracteres: número de brotações adventícias por segmento nodal, número de nós por brotação adventícia e abscisão foliar. Os dados de abscisão foliar foram transformados em raiz ($x + 0,5$).

Foi realizada análise de variância considerando o DIC no esquema de parcela subdividida no tempo. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.2 Avaliação de diferentes tipos de vedação de frascos e da posição de segmentos nodais na multiplicação *in vitro* de mangabeira

Segmentos nodais (apicais, medianos e basais) obtidos a partir das brotações adventícias do experimento anterior (4.1), foram transferidos para frascos de vidro tipo maionese com capacidade para 250 mL, contendo 30 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) com 3,0% de sacarose e 0,6% de ágar, suplementado com 1 mg.L^{-1} de AIA e 1 mg.L^{-1} de BAP. Foram avaliados os seguintes tipos de vedação dos frascos: tampa plástica rosqueada, filme PVC, Para-film® e papel alumínio.

O experimento foi instalado em esquema de parcelas subdivididas no tempo sendo na parcela em esquema fatorial 4×3 (quatro tipos de vedação de frascos combinadas com três posições de segmentos nodais) e subparcela em três tempos, com 5 repetições. Cada unidade experimental foi constituída de quatro frascos contendo um segmento nodal cada.

Aos 30, 50 e 65 dias após a inoculação, foram analisados os seguintes caracteres: número de brotações adventícias por segmento nodal, número de nós por brotação adventícia e porcentagem de abscisão foliar. Os dados de abscisão foliar foram transformados em raiz ($x + 0,5$).

Aos 65 dias de inoculação foi avaliada a redução do volume do meio de cultura. Essa redução foi estimada em função da diferença entre a altura no frasco correspondente ao volume de meio de cultura inicial (30 mL) no frasco e aos 65 dias de inoculação. Foi realizada análise de variância considerando o DIC no esquema de

parcela subdividida no tempo. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.3 Indução de enraizamento *in vitro* em microestacas de mangabeira

Para a indução de enraizamento *in vitro*, microestacas de mangabeira obtidas a partir de plântulas assépticas foram imersas, durante vinte segundos, em soluções de AIB com as seguintes concentrações: 0, 200, 400 e 600 mg.L⁻¹. Após a imersão, as microestacas foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 20 mL de meio de cultura ¼ Knop's modificado com 3% de sacarose e gelificado com 0,6% de ágar.

O experimento foi instalado em esquema de parcelas subdivididas no tempo sendo na parcela com quatro tratamentos (quatro concentrações de AIB: 0, 200, 400 e 600 mg.L⁻¹) e subparcela em três tempos, com 6 repetições. Cada unidade experimental foi constituída de dois tubos contendo uma microestaca de mangabeira cada. Aos 30, 60 e 90 dias de cultivo *in vitro* foram observadas as seguintes variáveis: número e comprimento de raízes.

Foi realizada análise de variância considerando o DIC no esquema de parcela subdividida no tempo. As médias das avaliações foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000).

5.Resultados e Discussão

5.1 Avaliação de diferentes tipos de vedação de frascos no estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de mangabeira

Foi observado um aumento significativo do número de brotações adventícias por segmento nodal em função do tempo de cultivo *in vitro* em frascos vedados com tampa plástica e papel alumínio (Tabela 1). Resultados diferentes foram reportados por Souza et al. (1999) que em trabalhos de regeneração *in vitro* de brotos de repolho (*Brassica oleraceae* L.), não observaram efeitos significativos de tampas de plástico para número de brotos aos 30 dias de cultivo *in vitro*. Para o filme PVC, o número de brotações adventícias regeneradas *in vitro* foi o mesmo ao longo do tempo e para o Para-film®, aos 30 e 50 dias, ocorrendo decréscimo para essa variável aos 65 dias em

função da perda de brotações. Não foi observada diferença significativa para número de brotações em função do tipo de vedação de frascos na fase de estabelecimento.

TABELA 1. Valores médios de número de brotações adventícias por segmento nodal, número de nós por brotação adventícia e abscisão foliar em função do tempo de cultivo *in vitro* e do tipo de vedação de frascos na fase de estabelecimento.

Tempo de cultivo <i>in vitro</i>	VEDAÇÃO DE FRASCOS			
	Tampa plástica	Filme PVC	Para-film®	Papel alumínio
Número de brotações adventícias				
30 dias	3,00 bA	3,46 aA	3,63 aA	3,31 bA
50 dias	3,13 abA	3,46 aA	3,63 aA	3,36 abA
65 dias	3,20 aA	3,46 aA	3,16 bA	3,53 aA
CV (%) = 4,21				
Número de nós				
30 dias	7,73 cA	7,46 cA	7,46 cA	6,66 cA
50 dias	13,90 bA	14,83 bA	13,66 bA	10,60 bA
65 dias	16,76 aAB	18,30 aA	18,20 aA	13,70 aB
CV (%) = 8,60				
Abscisão foliar (%)				
30 dias	4,42 bA	2,91 bA	0,0 cA	1,34 bA
50 dias	8,97 abA	9,65 aA	9,33 bA	7,94 aA
65 dias	10,74 aA	10,18 aA	15,45 aA	11,75 aA
CV (%) = 18,90				

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Houve um incremento no número de nós por brotação adventícia a partir dos 30 dias de cultivo *in vitro*. Aos 50 dias, esses incrementos foram, em média, maiores que 200% para todos os tipos de vedação (dados não apresentados), quando comparados aos 30 dias de cultivo *in vitro*. Aos 65 dias, o acréscimo no número de nós foi significativo, porém menor que o observado aos 50 dias. O número médio de nós é uma variável importante para estimativas de taxa de multiplicação *in vitro* de mangabeira considerando que o explante a ser utilizado nos subcultivos é o segmento nodal.

Apenas aos 65 dias foi observado efeito significativo do tipo de vedação de frascos para número de nós, sendo observado maior número médio de nós nas brotações mantidas em frascos vedados com filme PVC e Para-film® quando comparados ao papel alumínio, e este não diferiu estatisticamente da tampa plástica (Tabela 1). O tipo de vedação de frascos interfere na incidência de luminosidade para as plantas, sendo assim, tal resultado pode ser considerado consequência do sombreamento que ocorreu em frascos vedados com tampa plástica e papel alumínio. O sombreamento foi

responsável pelo aumento na concentração endógena de hormônios que provocaram estiolamento das brotações adventícias de mangabeira. Segundo Raven et al. (2001), a ocorrência de entrenós mais longos deve-se à ação das giberelinas (GA_3), hormônios que possuem efeitos no alongamento de caules e folhas em plantas intactas mediante o estímulo tanto da divisão quanto do alongamento celular que proporciona entrenós mais longos (Figura 2).



FIGURA 2 – Brotações adventícias mantidas em frascos vedados com Para-film® (A) e em frascos vedados com papel alumínio (B).

De uma maneira geral, os tipos de vedação de frascos não apresentaram diferenças significativas entre si para a variável abscisão foliar. Todavia esta cresceu significativamente com o tempo de cultivo *in vitro* (Tabela 1). O ambiente fechado ao qual as plântulas ou explantes são submetidos proporciona, de modo geral, o acúmulo de etileno, regulador de crescimento e responsável pela abscisão de folhas, frutos e flores. Esse regulador, mesmo em pequenas concentrações, pode ser fisiologicamente ativo e desencadear vários processos, dentre esses a abscisão foliar (KERBAUY, 2004).

5.2 Avaliação de diferentes tipos de vedação de frascos e da posição de segmentos nodais na multiplicação *in vitro* de mangabeira

5.2.1 Primeiro subcultivo

Não foi observado aumento significativo no número médio de brotações adventícias por segmento nodal ao longo do tempo de cultivo *in vitro* (Tabela 2). Houve decréscimo nos valores numéricos para essa variável quando comparado à fase de

estabelecimento (Tabela 1). Segundo Lemos et al. (2006), um dos problemas encontrados na propagação *in vitro* de mangabeira é a perda de vigor a cada subcultivo.

TABELA 2 - Valores médios de número de brotações adventícias por segmento nodal, número de nós por brotação adventícia e de abscisão foliar em função do tempo de cultivo *in vitro*, do tipo de vedação de frascos e da posição dos segmentos nodais no primeiro subcultivo de mangabeira.

Tempo de cultivo <i>in vitro</i>	VEDAÇÃO DE FRASCOS			
	Tampa plástica	Filme PVC	Para-film®	Papel alumínio
Número de brotações				
30 dias	1,06 aA	1,20 aA	1,35 aA	1,10 aA
50 dias	1,15 aB	1,18 aAB	1,50 aA	1,25 aAB
65 dias	1,08 aB	1,13 aB	1,51 aA	1,25 aAB
CV (%) = 15,92				
Número de nós				
30 dias	3,93 cAB	5,33 cA	4,70 cAB	3,16 cB
50 dias	6,35 bBC	6,76 bAB	8,05 bA	5,05 bC
65 dias	8,20 aAB	7,76 aAB	9,11 aA	7,03 aB
CV (%) = 18,11				
Abscisão foliar (%)				
30 dias	1,40 aA	2,82 bA	2,78 aA	4,05 aA
50 dias	3,00 aA	5,60 abA	4,33 aA	5,25 aA
65 dias	3,68 aA	6,56 aA	5,37 aA	4,70 aA
CV (%) = 36,59				
Tempo de cultivo <i>in vitro</i>	POSIÇÃO DO SEGMENTO NODAL			
	Apical	Mediano		Basal
Número de brotações				
30 dias	1,13 bA	1,26 aA		1,13 aA
50 dias	1,32 aA	1,28 aA		1,20 aA
65 dias	1,17 bA	1,31 aA		1,25 aA
CV (%) = 15,92				
Número de nós				
30 dias	4,00 bA	4,80 cA		4,05 cA
50 dias	6,17 aA	6,90 bA		6,58 bA
65 dias	6,82 aB	8,90 aA		8,36 aA
CV (%) = 18,11				
Abscisão foliar (%)				
30 dias	5,56 aA	1,72 bB		1,01 bB
50 dias	4,70 aA	4,15 abA		4,79 aA
65 dias	6,23 aA	4,89 aA		4,12 aA
CV (%) = 36,59				

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Foram observadas diferenças significativas no número médio de brotações por segmento nodal em função do tipo de vedação de frascos a partir dos 50 dias (Tabela 2). O Para-film® apresentou os melhores resultados para essa variável, se igualando estatisticamente ao papel alumínio e ao filme PVC aos 50 dias e apenas ao papel alumínio aos 65 dias. Vedações que são hermeticamente fechadas favorecem o acúmulo de etileno que, em quantidades mínimas pode impedir a proliferação de ramos laterais em mangabeira. Segundo Pereira Netto & McCown (1999), o crescimento de partes aéreas de mangabeira em atmosfera enriquecida com $1 \mu\text{L.L}^{-1}$ de etileno resulta em redução da ordem de 50% na proliferação de ramos laterais.

O número médio de nós por brotação adventícia aumentou de forma significativa em função do tempo de cultivo *in vitro*, porém os incrementos observados aos 50 dias foram menores que os observados na fase de estabelecimento, correspondendo, em média, a acréscimos menores que 70% (dados não apresentados). O Para-film® apresentou os melhores resultados para essa variável, se igualando estatisticamente ao filme PVC, aos 50 dias, e também à tampa plástica aos 65 dias.

Assim como na fase de estabelecimento, não foram observadas diferenças significativas para abscisão foliar em função do tipo de vedação de frascos (Tabela 2), sendo observados valores menores para essa variável, quando comparados à fase de estabelecimento (Tabela 1). Algumas espécies lenhosas quando cultivadas *in vitro* apresentam abscisão em resposta ao ambiente a que são submetidas; como consequência da abscisão foliar, o crescimento *in vitro* é reduzido e o explante torna-se frágil, impossibilitado à continuação do processo de micropropagação (LEMOS & BLAKE, 1994).

De acordo com a Tabela 2 observou-se não significância para número médio de brotações adventícias em função da posição de segmentos nodais. Esses resultados discordam dos obtidos por Nicoloso & Erig (2002), que avaliando o crescimento *in vitro* das plântulas de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*) observaram que os segmentos nodais basais proporcionam maior número de brotações e a maior taxa de multiplicação para aquela espécie. Para número médio de nós, foi observado efeito significativo da posição de segmentos nodais apenas aos 65 dias de cultivo. Os segmentos mediano e basal apresentaram valores médios de número de nós superiores ao do segmento apical. Houve maior abscisão foliar, apenas aos 30 dias de cultivo *in vitro*, para os segmentos apicais, quando comparados aos segmentos medianos e basais (Tabela 2).

5.2.2 Segundo subcultivo

Semelhantemente ao primeiro subcultivo, o número médio de brotações no segundo subcultivo não foi influenciado pelo tempo até os 65 dias. A vedação de Para-film® também apresentou valores no número médio de brotos superior, igualando-se estatisticamente ao filme PVC, aos 50 dias, e ao papel alumínio, aos 65 dias (Tabela 3).

TABELA 3 - Valores médios de número de brotações adventícias por segmento nodal, número de nós por brotação adventícia e de abscisão foliar em função do tempo de cultivo *in vitro* e do tipo de vedação de frascos no segundo subcultivo de mangabeira.

Tempo de cultivo <i>in vitro</i>	VEDAÇÃO DE FRASCOS			
	Tampa plástica	Filme PVC	Para-film®	Papel alumínio
Número de brotações				
30 dias	1,05 aB	1,41 aA	1,45 aA	1,00 bB
50 dias	1,06 aB	1,34 aAB	1,48 aA	1,08 bB
65 dias	1,07 aB	1,37 aAB	1,59 aA	1,27 aAB
CV (%) = 13,18				
Número de nós				
30 dias	4,80 cAB	6,43 bA	6,43 cA	4,08 cB
50 dias	5,78 bBC	7,32 aAB	8,03 bA	4,90 bC
65 dias	7,15 aAB	7,87 aA	8,88 aA	5,82 aB
CV (%) = 11,15				
Abscisão foliar (%)				
30 dias	5,05 bA	4,58 bA	2,82 bA	3,34 bA
50 dias	8,76 bA	9,00 abA	7,35 bA	7,50 abA
65 dias	21,25 aA	12,41 aB	14,30 aAB	8,95 aB
CV (%) = 29,61				

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e ma iúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os diferentes tipos de vedação de frascos utilizados na micropropagação de plantas exercem efeitos no desenvolvimento de alguns explantes, devido principalmente à formação de microclima dentro do frasco (GRATAPAGLIA & MACHADO, 1998). O tipo de vedação de frasco interfere na aeração e na incidência de luminosidade para as plantas. Vedações que não são hermeticamente fechadas permitem maiores trocas gasosas entre o ar atmosférico e o ambiente do interior dos frascos, permitindo melhor transpiração das folhas e impedindo o acúmulo de etileno, que pode ser prejudicial à multiplicação *in vitro* (FILHO et al., 2002).

No segundo subcultivo, o número médio de nós aumentou ao longo do tempo para todos os tipos de vedação, mas os incrementos foram menores que os observados no primeiro subcultivo. Esse fenômeno também foi relatado por Lemos et al. (2006) que consideram um dos problemas mais graves na micropropagação da mangabeira. Comparativamente, os frascos vedados com Para-film® também apresentam valores superiores para número de nós, igualando-se estatisticamente ao filme PVC e à tampa plástica.

Ao contrário do que ocorreu no estabelecimento e no primeiro subcultivo, foi observado efeito significativo do tipo de vedação na abscisão foliar. Apenas aos 65 dias, a tampa plástica apresentou os maiores valores para essa variável, igualando-se estatisticamente ao Para-film®.

A redução do meio de cultura variou de forma significativa em função do tipo de vedação de frascos tanto no primeiro quanto no segundo subcultivos (Tabela 3A e 5A, anexo). A redução de meio de cultura foi superior em frascos vedados com filme PVC quando comparado à tampa plástica, Para-film® e papel alumínio (Tabela 4, Figura 3).

TABELA 4 – Valores médios de redução do meio de cultura (%) em função do tipo de vedação de frascos no primeiro e no segundo subcultivo de mangabeira.

Subcultivo	VEDAÇÃO DE FRASCOS			
	Tampa plástica	Filme PVC	Para-film®	Papel alumínio
1°	11,33 B	59,33 A	11,00 B	15,66 B
CV(%) = 53,85				
2°	18,66 B	59,00 A	22,66 B	20,00 B
CV(%)=16,31				

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Em trabalho conduzido com *Herreria salsaparrilha* Martius, Gonçalves et al. (2008) observaram que a redução do volume do meio de cultura em frascos vedados com filme PVC está associada à perda de água e está diretamente relacionada ao processo de evapotranspiração dos explantes. Segundo Raven et al. (2001), inúmeros fatores influenciam o processo de transpiração, como as correntes de ar que eliminam o vapor que se acumula próximo à superfície foliar e acelera o ritmo de evaporação da água. Sendo assim, as trocas gasosas que se estabelecem entre o interior e o exterior dos frascos podem, de forma indireta, definir o padrão de transpiração dos explantes.

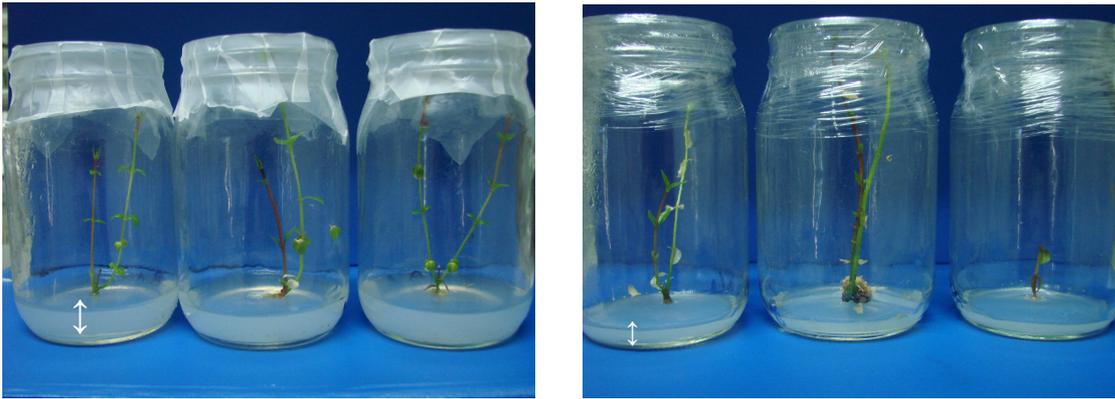


FIGURA 3 – Redução do meio de cultura em frascos vedados com Para-film® e filme PVC, respectivamente aos 65 dias de cultivo *in vitro* de mangabeira.

Apesar da redução do volume de meio de cultura ter sido significativamente maior em frascos vedados com filme PVC, quando comparado à tampa plástica, Para-film® e papel alumínio, as brotações mantidas em frascos com esse tipo de vedação apresentaram melhores resultados que a tampa plástica e papel alumínio, para as variáveis que interferem na taxa de multiplicação *in vitro* de mangabeira como número de nós por brotação adventícia. Segundo Kerbauy (2004), cerca de 95% de toda água absorvida pelas plantas é perdida pela transpiração, sendo o restante (ou menos) usado no metabolismo e crescimento, porém considera-se que a transpiração é benéfica às plantas porque causa, entre outros fenômenos, o aumento na absorção de nutrientes. A absorção e translocação de nutrientes, inclusive de íons cálcio, são provavelmente aumentadas por taxa de transpiração elevada. Íons cálcio são considerados mensageiros secundários para vários hormônios (TAIZ & KAIGER, 2006) e sendo os hormônios substâncias responsáveis pelo controle do crescimento e do desenvolvimento das plantas, pode-se inferir que existe relação indireta entre transpiração e crescimento.

5.3 Indução de enraizamento *in vitro* em microestacas de mangabeira

Em todas as concentrações testadas de AIB e na ausência de AIB, houve 100% de enraizamento das microestacas de mangabeira. O menor número médio de raízes foi observado aos 30 dias de cultivo *in vitro* e o maior número aos 90 dias de cultivo *in vitro* para todas as concentrações de AIB (Tabela 5).

Uma das limitações da técnica de cultura de tecidos tem sido o enraizamento de partes aéreas regeneradas *in vitro*. Para muitas espécies, sobretudo as herbáceas, essa fase não tem constituído grande problema enquanto para outras, entre as quais se inclui a maioria das espécies lenhosas, a elucidação do problema de rizogênese não foi ainda conseguida (ASSIS & TEIXEIRA, 1998).

TABELA 5. Valores médios de número de raízes em microestacas de mangabeira em função da concentração de AIB e do tempo de cultivo *in vitro*.

Tempo de cultivo <i>in vitro</i>	AIB (mg.L ⁻¹)			
	0	200	400	600
30 dias	3,16 aA	1,50 bA	2,66 bA	3,75 bA
60 dias	3,25 aA	3,08 aA	4,25 aA	4,33 abA
90 dias	3,58 aA	3,33 aA	4,66 aA	4,91 aA

CV(%) = 16,17

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Apesar de não ter sido detectada diferença significativa no número de raízes em função da concentração de AIB, aos 30, 60 e 90 dias de cultivo *in vitro*, os maiores valores numéricos para essa variável foram observados para as concentrações de 400 e 600 mg.L⁻¹ (Figura 4). Na ausência de AIB não foi observado aumento significativo no número de raízes ao longo do tempo. Aos 60 e 90 dias, nas concentrações de 200 e 400 mg.L⁻¹ de AIB a formação de raízes foi estatisticamente igual e superior aos 30 dias de cultivo *in vitro*. Na concentração de 600 mg.L⁻¹ de AIB o número médio de raízes aos 90 dias foi estatisticamente igual aos 60 dias de cultivo e superior aos 30 dias de cultivo *in vitro*.

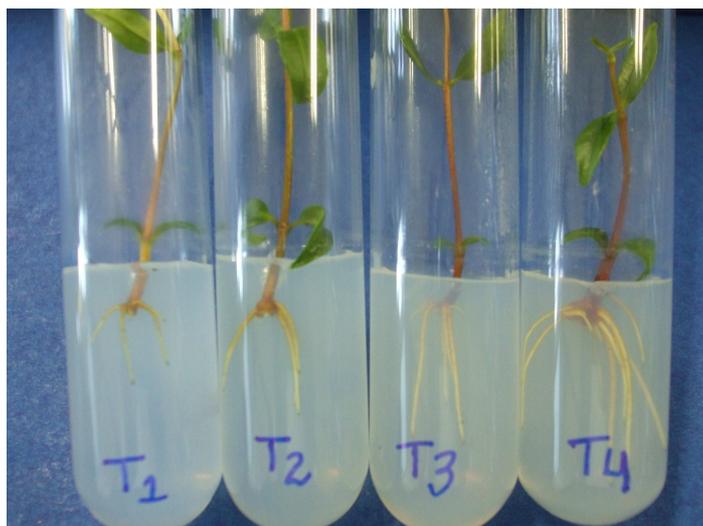


FIGURA 4 – Rizogênese *in vitro* de microestacas de mangabeira em função de diferentes concentrações de AIB (T1 = 0, T2 = 200, T3 = 400 e T4 = 600 mg.L⁻¹).

A formação de raízes adventícias em partes aéreas é essencial para o transplante para condições *ex vitro* e pode estar relacionada a diversos fatores como as condições de crescimento da planta, idade fisiológica, posição do explante na planta matriz, regulador de crescimento utilizado, potencial genético da planta, concentração endógena de fitohormônios nos explantes e outros fatores como meio nutritivo, estado físico do meio de cultura, pH e condições de incubação (ASSIS & TEIXEIRA, 1998).

Diversos estudos sobre a indução da rizogênese em brotos adventícios de mangabeira já foram conduzidos, mas os resultados obtidos para a variedade de mangabeira nativa da região Nordeste não foram promissores para aplicação em larga escala. A adição isolada de AIB, ANA e 2,4-D, nas concentrações de 1 e 2 mg.L⁻¹, em meio de cultura MS não foi satisfatória, obtendo-se enraizamento em apenas dois explantes, após oito semanas de incubação (LEMOS et al., 2006). Entretanto, em estudos conduzidos com variedades botânicas oriundas da região dos Cerrados, Grigoletto (1997) obteve maiores porcentagens de enraizamento em meio de cultura ¼ Knop's (61,5%) e ½ MS (58,5%), suplementado com diferentes tratamentos de AIA e BAP.

Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que o enraizamento das microestacas na ausência de AIB ocorreu devido ao potencial genético da planta matriz e/ou aos níveis endógenos de auxinas dos explantes que podem ter sido suficientes para ativar esse processo morfogênico. Segundo Roussos et al. (1999), pulsos breves em soluções de auxinas têm resultado em enraizamento satisfatório para muitas espécies de

plantas lenhosas. Oliveira et al. (2003) observaram que segmentos nodais de leiteira (*Tabernaemontana fuchsiaefolia*) (*Apocinaceae*) tratados de um a dois minutos com pulsos breves em solução com 5 mg.L⁻¹ de AIB, apresentavam 100% de enraizamento aos 30 dias de cultivo *in vitro*.

Em relação ao comprimento de raízes, foram observadas diferenças significativas apenas em função do tempo de cultivo *in vitro* (Tabela 6). Aos 60 e 90 dias de cultivo *in vitro*, houve acréscimos significativos para essa variável, não tendo sido observadas diferenças estatísticas entre os valores médios de comprimento de raízes para as concentrações de 0, 200, 400 e 600 mg.L⁻¹ de AIB.

TABELA 6. Valores médios de comprimento de raízes em microestacas de mangabeira em função da concentração de AIB e do tempo de cultivo *in vitro*.

Tempo de cultivo <i>in vitro</i>	AIB (mg.L ⁻¹)			
	0	200	400	600
30 dias	0,60 cA	0,51 cA	0,68 cA	0,55 cA
60 dias	2,16 bA	1,83 bA	2,03 bA	2,30 bA
90 dias	3,18 aA	3,20 aA	3,11 aA	3,40 aA
CV (%) = 33,47				

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Em razão da resposta positiva que as microestacas de mangabeira apresentaram com a imersão rápida em solução de AIB, estudos adicionais deverão ser realizados para avaliação da eficiência da técnica no enraizamento em brotações adventícias regeneradas *in vitro* em diferentes subcultivos.

6. Conclusões

Nas condições em que o trabalho foi conduzido, conclui-se que:

- Não há efeito significativo do tipo de vedação de frascos na regeneração de brotações adventícias de mangabeira na fase de estabelecimento. Na fase de multiplicação, o Para-film® induz maior número de brotações aos 65 dias no primeiro e no segundo subcultivos;

- A posição de segmentos nodais não apresenta efeito significativo na regeneração *in vitro* de brotações adventícias no primeiro e no segundo subcultivo;

- Brotações adventícias regeneradas em frascos vedados com Para-film® e filme PVC apresentam maior número de nós na fase de estabelecimento, apenas com Para-film® no primeiro subcultivo e com Para-film® ou filme PVC no segundo subcultivo;

- Segmentos apicais induzem menor número de nós que os segmentos mediano e basal no primeiro subcultivo. No segundo subcultivo, não é observado efeito significativo da posição de segmentos nodais para essa variável;

- Não há influência do tipo de vedação de frascos para abscisão foliar até os 65 dias na fase de estabelecimento e no primeiro subcultivo. No segundo subcultivo, frascos vedados com tampa plástica induzem maior abscisão foliar aos 65 dias;

- O tempo de 50 dias de cultivo *in vitro* é considerado adequado para a fase estabelecimento e para o primeiro e segundo subcultivos;

- A utilização de filme PVC induz maior redução de meio de cultura no primeiro e no segundo subcultivo, mas não interfere na multiplicação *in vitro* da mangabeira;

- As concentrações de 400 e 600 mg.L⁻¹ de AIB em imersão por vinte segundos induzem maior valor numérico de raízes em microestacas de mangabeira aos 60 e 90 dias de cultivo *in vitro*.

7. Referências Bibliográficas

ASSIS, T. F.; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa SPI/Embrapa CNPH, 1998. p. 261 – 296.

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., São Carlos. **Programas e resumos...** São Carlos: UFSCar, julho de 2000. p. 255-258.

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

FILHO, W. B.; PEREIRA A. M. S.; FRANÇA, S.C.; FURLAN, M. Indução de Metabólitos Bioativos em Culturas de Células de *Maytemus ticfolia*. **Eclética Química**, São Paulo, v. 27, n. especial, 2002.

GONÇALVES, L. A.; GERALDINE, R. M.; PICOLI, E. A. T.; VENDRAME, W. A.; CARVALHO, C. R. de; OTON, W. C. In vitro propagation of *Herreria salsaparrilha* Martius (Herreriaceae) as affected by different sealing materials and gaseous exchanges. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 92, n. 3, p. 243-250, mar. 2008.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa SPI/Embrapa CNPH, 1998. p.183-260.

GRIGOLETTO, E. R. **Micropropagação de *Hancornia speciosa* Gomez (mangabeira)**. 1997. 78 f. (Dissertação de Mestrado). Universidade de Brasília. Brasília, 1997.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 452 p.

LEDERMAN, I. L.; BEZERRA, J. E. F. Situação atual e perspectivas da cultura da mangaba. In: SILVA JUNIOR, J. F. da; LÉDO, A. da. (Ed.). **A cultura da mangaba**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2006. P. 248-253.

LÉDO, A. da S.; VIEIRA, G. S. S.; SILVA JUNIOR, J. F. da; BARBOZA, S. B. S. C.; GOMES, K. K. P. Cultivo in vitro de sementes de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 2., 2005, Fortaleza. **Horticultura Brasileira**, v. 23, p. 622-623, 2005. Suplemento.

LEMOS, E.E.P. de; COSTA, M. A. P. de C.; ALOUFA, M. A. I.; LÉDO, A. da S.; ALMEIDA, W. A. B. de; DANTAS, A. C. V. L.; SILVA, S. A.; SOUZ, F. V. D. Micropropagação. In: Silva Junior, J. F. da; Ledo, A. da S. (Ed.). **A cultura da mangaba**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2006. P.125-133.

LEMOS, E. E. P.; BLAKE, J. Leaf abscission in micropropagated sugar apple (*Annona squamosa* L.). In : LUMSDEN, P. J.; NICHOLAS, J. R. ; DAVIES, W. J. **Physiology, growth and development of plants in culture**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994. p. 232-237.

LIMA, D. de A. **Estudos fitogeográficos de Pernambuco**. Recife: Instituto de Pesquisas Agronômicas de Pernambuco, 1957. 44 p. (Instituto de Pesquisas Agronômicas de Pernambuco. Publicação, 2).

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Suécia, v. 15, p. 473-479, 1962.

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

- OLIVEIRA, A. J. B.; CARVALHO, V. M.; FERREIRA, A.; SATO, F. Y.; MACHADO, F. P. da S. *In vitro* multiplication of *Tabernaemontana fuchsiaefolia* L. (Apocynaceae). **Revista Árvore**, Viçosa, Minas Gerais, v. 27, n. 4, p. 42-425, 2003.
- PEREIRA-NETTO, A. B. de; MCCOWN, B. H. Thermally induced changes in shoot morphology of *Hancornia speciosa* microcultures: evidence of mediation by ethylene. **Tree Physiology**, Victoria, Canada, v. 19, p. 733-740, 1999.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 6ª edição. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2001. 906 p.
- RIBEIRO, M. V.; LIMA, C. S. M.; BANDEIRA, J. de M.; RUBIN, S; BENITEZ, L. C.; RETERS, J. A.; BRAGA, E. J. B. Concentrações de sacarose e tipos de vedação no cultivo *in vitro* de *Melissa officinalis* L. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, p. 843-845, jul. 2007.
- ROUSSOS, P. A.; KOTSIAS, D.; PONTIKIS, C. A. Rapid multiplication of Jojoba seedlings by *in vitro* culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 57, n. 2, p. 133-137, mai. 1999.
- SOUZA, C. M. de; PINTO, J. E. B. P.; RODRIGUES, B. M.; MORAIS, A. R. de; ARRIGONI-BLANK, M. F. Influência dos fatores físicos na regeneração brotos de repolho. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 23, n. 4, p. 830-835, 1999.
- TAIZ, L; KEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3ª edição. Artmed: São Paulo, 2006. 500 p.

CAPÍTULO 3

CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE MANGABEIRA

(*Hancornia speciosa* Gomes) NATIVA DA REGIÃO NORDESTE

SÁ, Aline de J. Conservação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) nativa da Região Nordeste. In: **Avanços na propagação e conservação *in vitro* da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) nativa da região Nordeste**. 2009. Cap III. Dissertação de Mestrado em Agroecossistemas. Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE.

1. RESUMO

A utilização de técnicas de cultura de tecidos de plantas para a conservação de recursos genéticos apresenta diversas vantagens sobre a conservação de germoplasma no campo, destacando-se a economia de recursos financeiros para a manutenção das coleções, redução de riscos fitossanitários e intempéries climáticas. Uma das maneiras de conservar material vegetal é através da técnica de crescimento lento. O metabolismo das plantas pode ser reduzido através da modificação nas condições químicas do meio de cultivo e embora não haja procedimento padrão para todos os genótipos de todas as espécies de plantas, os sucessos obtidos com a aplicação dessa técnica têm sido animadores especialmente para espécies que não podem ter suas sementes conservadas em baixas temperatura e umidade, como as da mangabeira. A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) é uma espécie cujas regiões de ocorrência natural vêm sofrendo grande pressão antrópica que está provocando erosão genética em muitas populações nativas, principalmente da região Nordeste. Em virtude da existência de poucas coleções de mangabeira conservadas *ex situ*, evidencia-se a importância do desenvolvimento de um método alternativo e complementar para a conservação de germoplasma dessa espécie. Por esse motivo o presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de reguladores osmóticos (manitol) e inibidor de crescimento (ácido abscísico) na conservação *in vitro* de microestacas de mangabeira por crescimento lento. As culturas foram mantidas em meio MS com 3% de sacarose e 0,6% de ágar. Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado em sala de crescimento com temperatura variando de $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar média em torno de 70% e fotoperíodo de 12 horas de luz branca fria ($52\ \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de irradiância). Foram avaliadas cinco concentrações de manitol (0, 5, 10, 15 e 20 g.L^{-1}). Na presença de manitol, o comprimento da parte aérea apresentou valores numéricos inferiores à testemunha, mas aos 90 dias de cultivo *in vitro* foi observado efeito deletério do manitol nas microestacas. Em relação ao ácido abscísico, foram testadas cinco concentrações (0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg.L^{-1}) em interação com dois tipos de vedação de frascos (tampa plástica rosqueada e papel alumínio) e dois tipos de explantes (microestacas apicais e basais). O ácido abscísico (0,5 mg.L^{-1}) apresentou melhores resultados para a conservação *in vitro* de microestacas de plântulas de mangabeira cultivadas em frascos vedados com papel alumínio. Não houve efeito significativo do tipo de explante.

Palavras-chave: *Apocynaceae*, crescimento lento, manitol, ácido abscísico.

2. ABSTRACT

SÁ, Aline de J. *In vitro* conservation mangaba tree (*Hancornia Gomes speciosa*) native of the Northeast of Brazil. In: **Advances in *in vitro* propagation and conservation of mangaba tree (*Hancornia speciosa* Gomes) native of the Northeast Brazil.** 2009. Cap. III. Thesis - Master of Science in Agroecosystems. Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE.

The use of techniques of plant tissue culture for the conservation of plant genetic resources presents several advantages over germplasm conservation of in the field, especially when focusing cost reduction for the maintenance of collections, sanitary risk and weather problems. One way to keep plant material *in vitro* is through the technique of slow growth. The plants metabolism can be reduced by adapting the chemical conditions of the culture medium. Although there is not standard procedure for all genotypes of all species of plants, the successes achieved with this technique are encouraging, especially for species not its seeds can be stored at low temperature and humidity, as the mangaba tree. The mangaba tree (*Hancornia speciosa* Gomes) is a species whose regions of occurrence has been over great pressure caused by human activities genetic erosion in many native populations, especially in the Northeast Brazil. Leading to a considerable of the existence of only few collections of mangaba tree preserved *ex situ*, shows the importance of developing complementary method to germplasm conservation of this species. The present work aimed to evaluate the effectiveness of regulators osmotic mannitol and the growth inhibitor abscisic acid on the *in vitro* conservation of microcutting of mangaba tree by slow growth. The cultures were maintained in MS medium with 3% sucrose and 0,6% of agar. The experiments were conducted in a randomized blocks design in a growth room with temperature ranging from 26 ° C + 2 ° C, average relative humidity around 70% and photoperiod of 12 hours of cold white light (52 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ irradiance). Were evaluated five concentrations of mannitol (0, 5, 10, 15 and 20 g.L^{-1}). Mannitol in the presence of the length of the shoots showed values below the control, but after 90 days of *in vitro* culture was observed deleterious effect of mannitol in microcutting. Were tested five concentrations of abscisic acid (0; 0,5; 1,0; 2,0 and 4,0 mg.L^{-1}) in interaction with two types of sealing of bottles (plastic cover and threaded aluminum foil) and two types of explants (apical and basal microcutting). Abscisic acid (0,5 mg.L^{-1}) showed better results for *in vitro* conservation of microcutting mangaba tree of seedling grown in flasks sealed with aluminum foil. There was not significant effect of type of explant.

Keywords: *Apocynaceae*, slow growth, mannitol, abscisic acid.

3. Introdução

Em função da crescente ocupação de áreas de vegetação nativa e da sensível erosão genética observada em muitas espécies de plantas que apresentam potencial de utilização alimentícia ou medicinal, torna-se evidente a necessidade do desenvolvimento e aperfeiçoamento de técnicas de conservação de germoplasma dessas espécies de forma que ele esteja disponível para utilização futura.

A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) é uma espécie nativa encontrada em várias regiões do país e apresenta o maior potencial de uso imediato entre as fruteiras nativas da região Nordeste (FERREIRA et al., 2005). Percebe-se que nessa região está ocorrendo erosão genética em muitas populações nativas da espécie, em consequência da exploração agrícola ou ocupação imobiliária de áreas remanescentes de mangabeira, ressaltando-se a necessidade de métodos de conservação eficientes que possam minimizar os riscos de extinção dessa espécie.

A conservação de germoplasma de mangabeira em campo já é realizada por órgãos de pesquisa em alguns estados nordestinos, mas a vulnerabilidade que os acessos apresentam nesse tipo de conservação é alta, o que ressalta a necessidade do desenvolvimento de técnicas complementares de conservação. Como a conservação da mangabeira em bancos de sementes é inviável devido à sua recalcitrância, a conservação *in vitro* pode ser considerada potencial para a conservação de germoplasma da espécie.

A aplicação de técnicas biotecnológicas de cultura de tecidos tem permitido que coleções de germoplasma de várias espécies de plantas sejam formadas e conservadas por longos períodos, permitindo assim que material vegetal de interesse se torne disponível para recuperação e possível utilização futura. Uma das maneiras de conservar material vegetal é através da técnica de crescimento lento, através da qual o metabolismo das plantas pode ser reduzido através da modificação nas condições químicas do meio de cultivo.

Trabalhos de conservação *in vitro* por crescimento lento têm sido desenvolvidos e mostrado viabilidade para diferentes espécies de importância econômica como cana-de-açúcar (LEMOS et al., 2002), abacaxi (CANTO et al., 2004), maracujazeiro (FARIA, 2004), coco (LÉDO et al., 2007) e açaí (OLIVEIRA et al., 2001). Apesar dos resultados animadores, não existe um protocolo padrão de conservação que possa ser aplicado para todas as espécies.

O estabelecimento de protocolos de conservação *in vitro* para a mangabeira nativa da região Nordeste é necessário, como forma alternativa e complementar à conservação de germoplasma de mangabeira em campo. Em virtude disso, o presente trabalho de pesquisa teve como objetivo avaliar o efeito do manitol e do ácido abscísico no crescimento de microestacas de mangabeira visando o estabelecimento de um protocolo de conservação por crescimento lento.

4. Material e Métodos

4.1 Condições gerais de experimentação para conservação *in vitro* de microestacas de mangabeira por crescimento lento

Para o estudo da conservação *in vitro* da mangabeira, variedade botânica do Nordeste, foram utilizados explantes obtidos a partir de plântulas assépticas obtidos de sementes germinadas *in vitro* coletadas de frutos maduros de acessos da população nativa de mangabeiras do Campo Experimental de Itaporanga-SE.

As atividades de assepsia e inoculação foram realizadas no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Tabuleiros Costeiros. Após a inoculação, as culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura variando de $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar média em torno de 70% e fotoperíodo de 12 horas de luz branca fria ($52\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de irradiância).

4.2 Efeito do manitol na conservação *in vitro* de microestacas de mangabeira

Foram utilizadas microestacas de aproximadamente 7 cm de comprimento oriundas de plântulas de mangabeira germinadas *in vitro*. As microestacas foram inoculadas em frascos de vidro tipo maionese com capacidade para 250 mL contendo 30 mL do meio de cultura MS gelificado com 0,6% de ágar e com 3% de sacarose, suplementado com $1\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de AIA e $1\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP, variando as seguintes concentrações de manitol: 0; 10; 15 e $20\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

O experimento foi instalado em esquema de parcelas subdivididas no tempo sendo na parcela com quatro tratamentos (quatro concentrações de manitol) e

subparcela em três tempos, com cinco repetições. Cada unidade experimental foi constituída de quatro frascos com uma microestaca cada.

As avaliações foram realizadas aos 30, 60 e 90 dias da inoculação, observando-se o comprimento das microestacas (cm) e número de folhas que sofreram abscisão.

Foi realizada análise de variância considerando o delineamento inteiramente casualizado no esquema de parcela subdividida no tempo. Para as médias de manitol foram ajustadas equações de regressão polinomial e as médias das microestacas e avaliações foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.3 Efeito do ácido abscísico, da posição e de diferentes tipos de vedação de frascos na conservação *in vitro* de microestacas de mangabeira

Para análise do efeito da posição, plântulas de mangabeiras germinadas *in vitro* (com aproximadamente 12 cm de comprimento) foram divididas em duas partes (basal e apical) e inoculadas em frascos contendo 30 mL do meio de cultura MS gelificado com 0,6% de ágar e suplementado com 3% de sacarose. Foram avaliadas as seguintes concentrações de ácido abscísico: 0; 0,5; 1; 2 e 4 mg.L⁻¹ e dois tipos de vedações de frasco: tampa plástica e papel alumínio.

O experimento foi instalado em esquema de parcelas subdivididas no tempo sendo na parcela em esquema fatorial 5 x 2 x 2 (cinco concentrações de ABA, duas posições e dois tipos de vedação de frascos) e subparcela em três tempos, com quatro repetições. Cada unidade experimental foi constituída de um frasco contendo uma microestaca cada.

As avaliações dos experimentos foram realizadas aos 30, 60 e 90 dias após a inoculação, observando-se o comprimento (cm) das microestacas e abscisão foliar.

Foi realizada análise de variância considerando o delineamento inteiramente casualizado no esquema de parcela subdividida no tempo. Para as médias de ABA foram ajustadas equações de regressão polinomial e as médias das posições, das vedações e do tempo de cultivo *in vitro* foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000).

5. Resultados e Discussão

5.1 Efeito do manitol na conservação *in vitro* de microestacas de mangabeira

De acordo com a análise de variância, houve efeito significativo do manitol e do tempo de cultivo *in vitro* para o comprimento das microestacas e para a abscisão foliar. O efeito da interação manitol x tempo de cultivo *in vitro* foi significativo apenas para abscisão foliar (Tabela 1B, anexo).

O comprimento das microestacas variou segundo uma regressão linear com decréscimo em função do aumento da concentração de manitol (Figura 5), sendo que o menor valor médio para essa variável foi observado para a concentração de 20 g.L⁻¹.

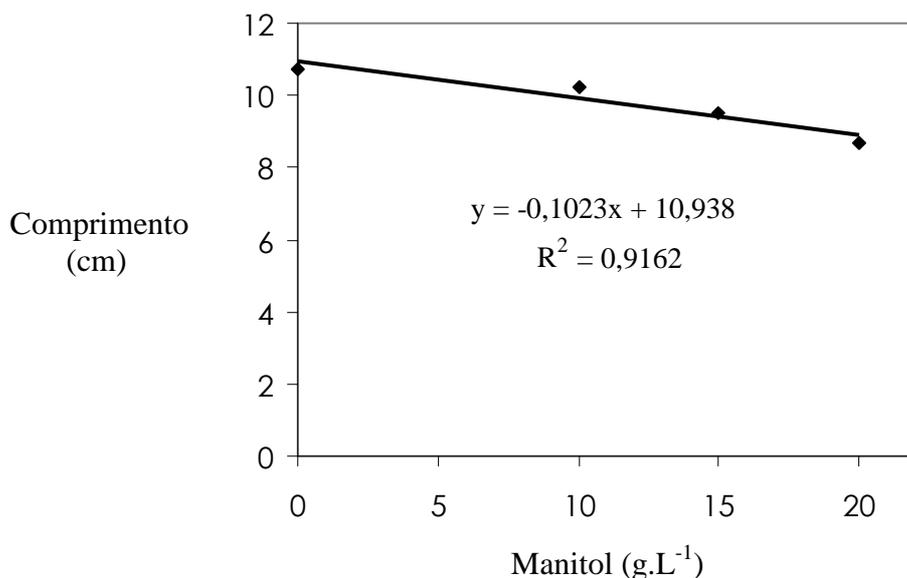


FIGURA 5 – Valores médios de comprimento de microestacas de mangabeira em função de diferentes concentrações de manitol aos 90 dias de cultivo *in vitro*.

Resultados semelhantes foram obtidos por Fortes e Pereira (2001) que na concentração de 15,96 mg.L⁻¹ de manitol associada às concentrações a partir de 30 mg.L⁻¹ de ácido acetilsalicílico observaram menor crescimento de hastes de batata (*Solanum tuberosum* L.) Apesar do resultado positivo na redução do alongamento das microestacas de mangabeira, fator importante para o processo de conservação *in vitro*, a utilização do manitol nas concentrações de 10, 15 e 20 g.L⁻¹, não se mostraram viáveis

para este propósito, uma vez que aos 90 dias de cultivo *in vitro* foi observado que seu efeito nas microestacas de mangabeira foi tóxico (Figura 6). Fortes e Pereira (2001) alcançaram apenas 37% de sobrevivência de hastes de batata em três meses de cultivo. Efeitos tóxicos do manitol foram reportados por Lemos et al. (2002) em cana-de-açúcar e por Lédo et al. (2007) em plântulas coqueiro anão verde de jiqui do Brasil.

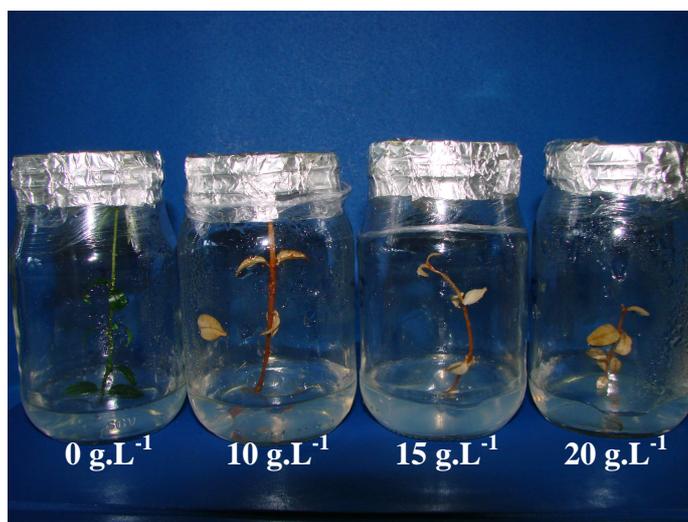


FIGURA 6 – Efeito tóxico do manitol em microestacas de mangabeira mantidas em frascos vedados com papel alumínio aos 90 dias de cultivo *in vitro*.

O tempo de cultivo *in vitro* foi significativo para o comprimento de microestacas de mangabeira submetidas a diferentes concentrações de manitol. Aos 90 dias, as microestacas apresentaram maior comprimento (10,73 cm), conforme Tabela 7.

TABELA 7. Valores médios do comprimento de microestacas de mangabeira em função do tempo de cultivo *in vitro*.

Tempo de cultivo <i>in vitro</i>	Comprimento (cm)
30 dias	8,63 c
60 dias	9,99 b
90 dias	10,73 a
CV (%)	7,48

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

Houve efeito significativo da interação manitol x tempo de cultivo *in vitro* para a abscisão foliar (Tabela 1B, anexo). De acordo com a Figura 12, aos 30 dias de cultivo *in vitro*, a abscisão variou segundo uma regressão quadrática, sendo que as concentrações de 15 e 20 mg.L⁻¹ induziram menor abscisão foliar e para a concentração de 10 mg.L⁻¹ observou-se maior abscisão foliar. De acordo com a derivada calculada o valor máximo para abscisão é de 9,3 correspondente à concentração de 6,15 g.L⁻¹ de manitol. Aos 60 e 90 dias de cultivo *in vitro* a abscisão variou segundo uma regressão linear, sendo que para as concentrações de 15 e 20 g.L⁻¹ de manitol também foi observada menor abscisão foliar nas microestacas e maior abscisão na ausência de manitol (Figura 7). Algumas substâncias químicas apresentam capacidade de inibir a ação do etileno e, conseqüentemente, interferirem no processo de abscisão foliar, como observado por Nepomuceno et al. (2007) com a utilização de AgNO₃ e CoCl₂ (10 e 20 µM) no controle de abscisão em plantas de angico.

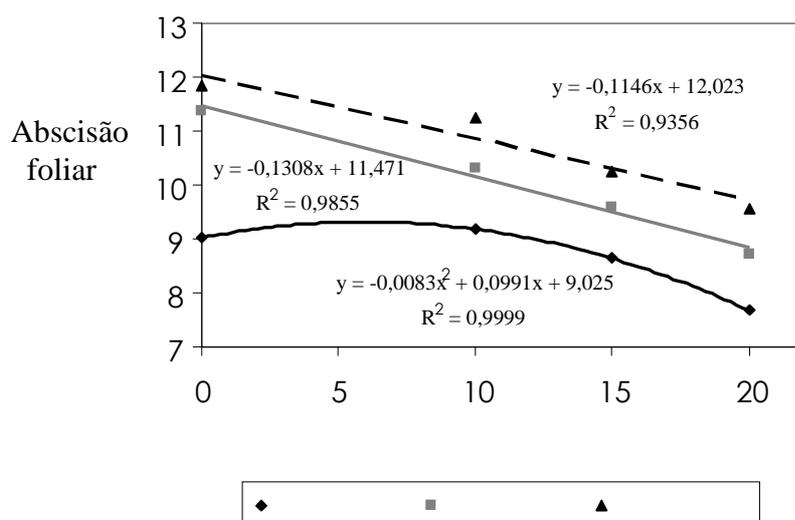


FIGURA 7 – Valores médios de abscisão foliar de microestacas de mangabeira em função do tempo de cultivo *in vitro* e da concentração de manitol.

5.2 Efeito do ácido abscísico, da posição e de diferentes tipos de vedação de frascos na conservação *in vitro* de microestacas de mangabeira

De acordo com a análise de variância (Tabela 2, anexo B), houve efeito

significativo do tempo de cultivo *in vitro* para o comprimento da microestaca e abscisão foliar e da interação ABA x vedação de frascos e ABA x tempo de cultivo *in vitro* para abscisão foliar. Não houve efeito isolado do ABA, da posição da microestaca e da vedação para as variáveis analisadas.

Aos 90 dias de cultivo *in vitro* as microestacas apresentaram maior comprimento e abscisão foliar do que aos 30 dias (Tabela 8). A abscisão foliar aos 90 dias de cultivo *in vitro* na presença de ABA apresentou menores valores numéricos quando comparado com microestacas mantidas na presença de manitol (Figura 7).

TABELA 8 – Valores médios de comprimento e abscisão foliar em microestacas de mangabeira em função do tempo de cultivo *in vitro*.

Tempo de cultivo <i>in vitro</i>	Comprimento (cm)	Abscisão foliar
30 dias	6,9875 b	0,6250 b
60 dias	7,5263 ab	1,0750 b
90 dias	8,1392 a	1,8101 a
CV (%)	35,65	112,44

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

A interação ABA x vedação de frascos apresentou efeito significativo para a abscisão foliar (Tabela 2, anexo B). Apesar de não terem sido detectadas diferenças significativas, em frascos vedados com papel alumínio observaram-se menores valores numéricos da abscisão foliar na presença de ABA. Em frascos vedados com tampa plástica, na ausência de ABA obteve-se menor abscisão foliar. Provavelmente a concentração de etileno nos frascos vedados com tampa plástica foi maior, intensificando o processo de abscisão das folhas, supondo-se que a vedação com papel alumínio promoveu maior troca gasosa. Essas variáveis afetam a composição da fase gasosa do frasco e, conseqüentemente, o crescimento e desenvolvimento das culturas (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Para a vedação tipo tampa plástica e papel alumínio, na presença de ABA, a concentração de 0,5 mg.L⁻¹ induziu menores valores numéricos para a abscisão (0,92 e 0,79, respectivamente). É possível que para a indução de um crescimento mínimo e manutenção de culturas viáveis sejam necessárias concentrações de manitol menores que 0,5 mg.L⁻¹.

A abscisão variou de acordo com uma regressão quadrática em função das concentrações de ABA com comportamento antagônico entre plantas mantidas em frascos vedados com tampa plástica e papel alumínio (Figura 8).

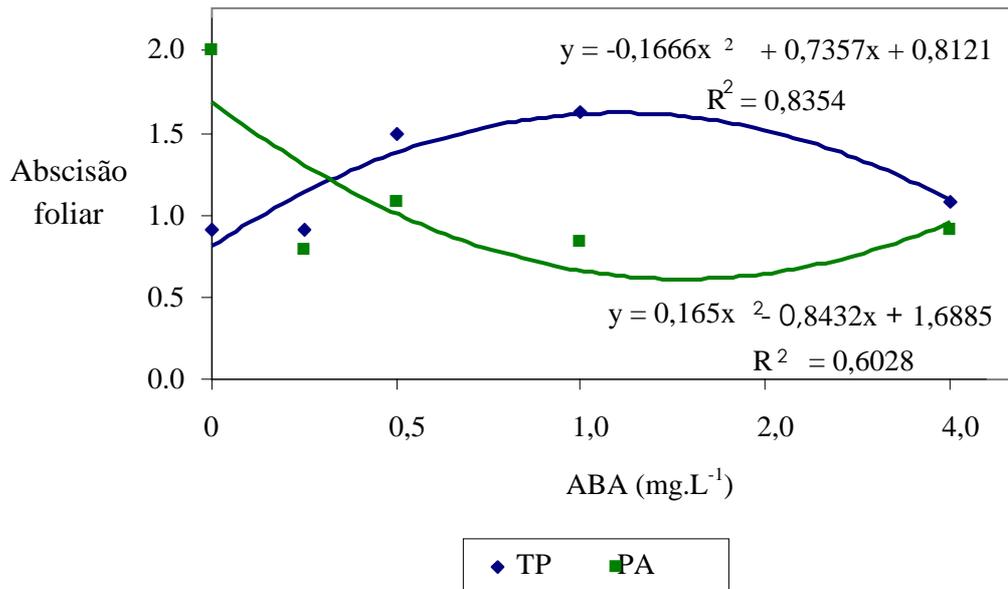


FIGURA 8 – Abscisão foliar de microestacas de mangabeira em frascos vedados com tampa plástica (TP) e papel alumínio (PA) em função a concentração de ABA.



FIGURA 9 – Microestacas de mangabeira mantidas em frascos vedados com papel alumínio e tampa plástica aos 90 dias de cultivo *in vitro* com 0,5 mg.L⁻¹ de ABA.

Não houve significância do efeito isolado das concentrações de ABA sobre o comprimento e abscisão foliar. Dependendo dos fatores que interferem na atuação do ácido abscísico esse regulador do crescimento pode estimular ou inibir o crescimento vegetal (LEMOS et al., 2002). A adição de ácido abscísico a 2 ou 3 mg.L⁻¹ promoveu

redução no crescimento da parte aérea de plântulas de coqueiro anão verde de Jiqui do Brasil por 270 dias e maior viabilidade das plântulas para a retomada do crescimento (LÉDO et al., 2008). Em cana-de-açúcar, concentrações de ABA inferiores ou superiores a 1 mg.L^{-1} favorecem o crescimento, porém na presença 1 mg.L^{-1} dessa substância ocorre inibição do crescimento dos explantes sem redução da sua viabilidade (LEMOS et al., 2002). A inibição de brotações e o desenvolvimento de raízes de gemas axilares da cv. Jewel de batata-doce em concentrações variáveis de 0,01 a 10 mg.L^{-1} de ABA após 90 dias de cultivo *in vitro* foi reportada por Jarret e Gawel (1991).

Apesar das microestacas de mangabeira submetidas à ação do ABA terem sido avaliadas apenas por três meses, os resultados obtidos no presente trabalho indicam viabilidade para utilização do ABA em frascos com vedação de papel alumínio no processo de conservação *in vitro* de microestacas de mangabeira (Figura 9), sendo necessários estudos adicionais para testar o efeito desse regulador de crescimento por um maior período de tempo.

O comprimento e a abscisão foliar foram eficientes como indicadores da ação do ABA e do manitol sobre o metabolismo das plantas mantidas em condições de crescimento lento. O desenvolvimento de protocolos eficientes para o processo de conservação *in vitro* de plantas depende da redução ou supressão do crescimento das células pelo maior tempo possível, sem que a planta perca sua viabilidade e possa ser recuperada.

6. Conclusões

Nas condições em que o trabalho foi conduzido, conclui-se que:

- A utilização do manitol nas concentrações de 10, 15 e 20 g.L^{-1} , não é viável para a conservação *in vitro* de microestacas de mangabeira, uma vez que apresenta efeito tóxico sobre as mesmas.

- A utilização do ácido abscísico na concentração de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ apresenta viabilidade para a conservação *in vitro* de microestacas de mangabeira por um período de 90 dias em frascos vedados com papel alumínio.

- São necessários estudos adicionais para testar o efeito do ácido abscísico no processo de conservação *in vitro* de microestacas de mangabeira por um período superior a 90 dias.

7. Referências Bibliográficas

BHAT, S. R.; CHANDEL, K. P. S. *In vitro* conservation of *Musa* germplasm: effects of mannitol and temperature on growth and storage. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v. 68, n. 6, p. 841-846, 1993.

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**, Brasília, v. 39, n. 7, p. 717-720, jul. 2004.

CONCEIÇÃO, A. M. da; FORTES, G. R. de L.; SILVA, J. B. da. Conservação *in vitro* de batata (*Solanum tuberosum*) cvs. Baronesa e Santo Amor: efeito sobre a formação de gemas e brotações dos segmentos caulinares. **Agropecuária de Clima Temperado**, Pelotas, v. 1, n. 1, p. 67-71, 1998.

DORION, N.; KADRI, M.; BIGOT, C. *In vitro* preservation at low temperature of rose plantlets usable for direct acclimatization. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 298, p. 335-343, 1991.

FARIA, G. A. **Morfogênese de espécies de maracujazeiro visando futuros trabalhos para conservação *in vitro***. 2004. 68 f. (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal da Bahia, 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., São Carlos. **Programas e resumos...** São Carlos: UFSCar, jul.2000. p. 255-258.

FERREIRA, E. G.; LEMOS, E. E. P.; SOUZA, F. X. ; LOURENÇO, I. P.; LEDERMAN, I. E.; BEZERRA, J. E. F.; SILVA JUNIOR, J. F. da ; BARROS, L. M.; RUFINO, M. S. M.; OLIVEIRA, M. E. B. Frutíferas. In: SAMPAIO, E. V. S. B. ; PPAREYN, F. G. C.; FIGUEIRÔA, J. M. de; SANTOS JUNIOR, A.G. (Org.). **Espécies**

da flora nordestina de importância econômica potencial. Recife: Associação Plantas do Nordeste, 2005. p. 49-100.

FORTES, G. R. L.; PEREIRA, J. E. S. Preservação *in vitro* de batata em ácido acetilsalicílico e duas fontes de carboidrato. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 10, p. 1261 – 1264, out. 2001.

GOLMIRZAI, A.; TOLEDO, J. *In vitro* conservation of potato and sweet potato germplasm. In: ARTHUR, C.; FERGUNSON, P.; SMITH, B. (Ed.). **Impact on a changing world**: program report 1997-1998. Lima: International Potato Center, 1999. p. 351-356.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa SPI/Embrapa CNPH, 1998. p. 183-260.

JARRET, R. L.; GAWEL, N. Abscisic acid-induced growth inhibition of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.24, p.13-18, 1991.

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

LÉDO, A. da S.; VIEIRA, G. S. S.; SILVA JUNIOR, J. F. da; BARBOZA, S. B. S. C.; GOMES, K. K. P. Cultivo *in vitro* de sementes de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 2., 2005, Fortaleza. **Horticultura Brasileira**, v. 23, p. 622-623, 2005. Suplemento.

LÉDO, A. da S.; CUNHA, A. O. ; ARAGÃO, W. M.; TUPINAMBÁ, E. A. Efeito da sacarose e do manitol na conservação *in vitro* por crescimento lento do coqueiro anão. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 19, 2007.

LÉDO, A. da S. ; FREIRE, K. C. S. ; MACHADO, C. A. ; OLIVEIRA, L. F. M. ; BARBOZA, S. B. S. C. . Efeito do ácido abscísico na conservação *in vitro* de coqueiro anão verde do Brasil de jiqui. In: XX Congresso Brasileiro de Fruticultura, 2008, Vitória. **Anais**. Vitória : SBF, 2008. v. 1. p. 1-4.

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

OLIVEIRA, M. do S. P.; MAUÉS, M. M.; KALUME, M. A. de A. Viabilidade de pólen *in vivo* e *in vitro* em genótipos de açaizeiro. **Acta Botânica Brasilica**, São Paulo, v. 15, n. 1, p. 27-33., abril 2001.

TOWILL, L. E.; JARRET, R. L. Cryopreservation of sweet potato (*Ipomoeae batatas* [L.] Lam.) shoot tips by vitrification. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 11, n. 4, mai. 1992.

ANEXOS

ANEXO A	Página
TABELA 1A. Resumo da análise de variância para número de brotações (NB), número de nós (NN) e porcentagem de abscisão foliar (AB) na fase de estabelecimento de mangabeira (<i>Hancornia speciosa</i> Gomes).....	62
TABELA 2A. Resumo de análise de variância para número de brotações (NB), número de nós (NN) e porcentagem de abscisão foliar (AB) no primeiro subcultivo de mangabeira (<i>Hancornia speciosa</i> Gomes).....	62
TABELA 3A. Resumo de análise de variância para porcentagem de redução do meio de cultura (RM) no primeiro subcultivo de mangabeira (<i>Hancornia speciosa</i> Gomes).....	63
TABELA 4A. Resumo de análise de variância para número de brotações (NB), número de nós (NN) e porcentagem de abscisão foliar (AB) no segundo subcultivo de mangabeira (<i>Hancornia speciosa</i> Gomes).....	63
TABELA 5A. Resumo de análise de variância para redução do meio de cultura (RM) no segundo subcultivo de mangabeira (<i>Hancornia speciosa</i> Gomes).....	64
TABELA 6A. Resumo da análise de variância para número de raízes (NR) e comprimento das raízes (CR) de microestacas de mangabeira (<i>Hancornia speciosa</i> Gomes).....	64

ANEXO A

TABELA 1A. Resumo da análise de variância para número de brotações (NB), número de nós (NN) e porcentagem de abscisão foliar (AB) na fase de estabelecimento de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes).

FV	GL	QM		
		NB	NN	AB ¹
Vedação de frascos	3	0,5349	37,5620	0,3132
Erro a	20	0,5642	19,6121	0,9392
Tempo cultivo <i>in vitro</i>	2	0,0226	542,8616**	26,6069**
Tempo cult x Vedação	6	0,1841**	5,7920**	1,2415*
Erro b	40	0,0200	1,1447	0,2490
CV(%)		4,21	8,60	18,90
Média Geral		3,36	12,44	2,64

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

¹ dados transformados por raiz (x + 0,5)

TABELA 2A. Resumo de análise de variância para número de brotações (NB), número de nós (NN) e porcentagem de abscisão foliar (AB) no primeiro subcultivo de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes).

FV	GL	QM		
		NB	NN	AB ¹
Vedação de frascos	3	1,0799*	38,7120**	2,3747
Polaridade	2	0,1430	21,6888*	3,5938
Vedação x Polar	6	0,2532	15,1342	3,1826
Erro a	48	0,2751	6,7177	1,9631
Tempo cultivo <i>in vitro</i>	2	0,1347*	213,6357**	7,2217**
Tempo cult x Vedação	6	0,0504	4,4061**	0,2621
Tempo cult x Polaridade	4	0,0690	4,0836*	1,1495
Tempo x Ved x Pol	12	0,0591	1,5679	0,7503
Erro b	96	0,0384	1,2966	0,4697
CV(%)		15,92	18,11	36,59
Média Geral		1,23	6,28	1,87

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

¹ dados transformados por raiz (x + 0,5)

TABELA 3A. Resumo de análise de variância para porcentagem de redução do meio de cultura (RM) no primeiro subcultivo de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes).

FV	GL	QM
		RM
Vedação de frascos	3	5677,0037**
Polaridade	2	1388,6435**
Vedação x Polaridade	6	1261,6319**
Erro		27,3534
CV(%)		17,32
Média Geral		30,19

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

TABELA 4A. Resumo de análise de variância para número de brotações (NB), número de nós (NN) e porcentagem de abscisão foliar (AB) no segundo subcultivo de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes).

FV	GL	QM		
		NB	NN	ABS ¹
Vedação de frascos	3	2,0509**	74,0072**	6,3801
Polaridade	2	0,9926	13,5995	15,8806*
Vedação x Polar	6	0,5813	15,5578	6,3140
Erro a	48	0,3690	11,5288	3,3293
Tempo cultivo <i>in vitro</i>	2	0,1422**	59,7207**	40,1568**
Tempo cult x Vedação	6	0,0770*	1,1961*	2,5143**
Tempo cult x Polaridade	4	0,0034	0,1159	0,2105
Tempo x Ved x Pol	12	0,0329	0,2789	0,8184
Erro b	96	0,0278	0,5192	0,6123
CV(%)		13,18	11,15	29,61
Média Geral		1,26	6,46	2,64

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

¹ dados transformados por raiz ($x + 0,5$)

TABELA 5A. Resumo de análise de variância para redução do meio de cultura (RM) no segundo subcultivo de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes).

FV	GL	QM
		RM (%)
Vedação de frascos	3	8213,5833**
Polaridade	2	61,9755
Vedação x Polaridade	6	76,6328
Erro		55,7057
CV(%)		30,45
Média Geral		24,51

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

TABELA 6A. Resumo da análise de variância para número de raízes (NR) e comprimento das raízes (CR) de microestacas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes).

FV	GL	QM	
		NR	CR (cm)
Concentração de AIB	3	6,0216	0,0992
Erro a	8	5,0645	0,8653
Tempo de cultivo <i>in vitro</i>	2	6,9722**	19,9640**
Concent AIB x Tempo cultivo	6	0,2436*	0,0759
Erro b	16	0,0862	0,1886
CV (%)		8,19	22,16
Média Geral		3,5853	1,9205

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

ANEXOS

ANEXO B

Página

TABELA 1B. Resumo da análise de variância para comprimento (CPM) e porcentagem de abscisão foliar (AB) de microestacas de mangabeira (<i>Hancornia speciosa</i> Gomes) sob efeito do manitol.....	66
TABELA 2B. Resumo da análise de variância para comprimento (CPM) e porcentagem de abscisão foliar (AB) de microestacas de mangabeira (<i>Hancornia speciosa</i> Gomes) sob efeito do ácido abscísico.....	66

ANEXO B

TABELA 1B. Resumo da análise de variância para comprimento (CPM) e porcentagem de abscisão foliar (AB) de microestacas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) sob efeito do manitol.

FV	GL	QM	
		CMP (cm)	AB
Concentração de Manitol	3	12,4811*	30,9010**
Erro a	16	3,0556	1,4548
Tempo de cultivo <i>in vitro</i>	2	22,7556**	113,7646**
Manitol x Tempo de cultivo	6	0,6232	9,3438**
Erro b	32	0,5365	1,6659
CV (%)		7,48	38,56
Média Geral		9,78	3,34

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

TABELA 2B. Resumo da análise de variância para comprimento (CPM) e porcentagem de abscisão foliar (AB) de microestacas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) sob efeito do ácido abscísico.

FV	GL	QM	
		CMP(cm)	ABS ¹
Concentração de ABA	4	9,7917	2,8071
Vedação	1	7,8635	0,4325
Polaridade	1	12,9122	2,4438
ABA x Vedação	4	15,6267	5,8921*
ABA x Polaridade	4	27,3283	0,4110
Vedação x Polaridade	1	5,8231	1,9768
ABA x Ved x Pol	4	10,1302	0,7831
Erro a	60	17,8260	1,9591
Tempo cult <i>in vitro</i>	2	26,3931*	28,4268**
ABA x Tempo	8	1,8659	4,6534*
Vedação x Tempo	2	0,2790	3,2042
Polaridade x Tempo	2	0,6869	2,5915
ABA x Ved x Tempo	8	2,6256	2,3121
ABA x Pol x Tempo	8	1,0236	0,5616
Ved x Pol x Tempo	2	3,9645	0,0996
ABA x Ved x Pol x Temp	8	4,5978	0,7625
Erro b	119	7,2429	1,7846
CV (%)		35,65	37,53
Média Geral		7,54	1,16

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

¹ dados transformados por raiz (x + 0,5)

Composição dos meios de cultura MS (Murashige & Skoog (1962) e ¼ Knoop's
(Gautheret, 1959)

Componentes	Concentrações dos componentes (mg.L ⁻¹)	
	MS	¼ Knoop's
Macronutrientes		
NH ₄ NO ₃	1,650	-
KNO ₃	1,900	125
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	440	500
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	370	125
KH ₂ PO ₄	170	125
Micronutrientes		
MnSO ₄ . 4H ₂ O	22,3	-
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	8,6	-
H ₃ BO ₃	6,2	-
KI	0,83	-
Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O	0,25	-
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0,025	-
CoCl ₂ . 6 H ₂ O	0,025	-
FeEDTA		
Na ₂ EDTA. 2 H ₂ O	37,3	-
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	27,8	-
Vitaminas e Aminoácidos		
Ácido nicotínico	0,5	-
Piridoxina.HCl	0,5	-
Tiamina.HCl	0,1	-
Glicina	2,0	-
Mio-inositol	100	50

Fonte: CALDAS et al. (1998); GRIGOLETTO (1997)