



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Ilha Solteira

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

PROPAGAÇÃO DE *Hancornia speciosa* GOMES –
APOCYNACEAE, POR ALPORQUIA E MICROPROPAGAÇÃO

LUIS LESSI DOS REIS
Engenheiro Agrônomo

Ilha Solteira – São Paulo – Brasil
Julho de 2011



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Ilha Solteira

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

PROPAGAÇÃO DE *Hancornia speciosa* GOMES –
APOCYNACEAE, POR ALPORQUIA E MICROPROPAGAÇÃO

LUIS LESSI DOS REIS

Orientador: Prof. Dr. Aparecida Conceição Boliani

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz de Souza Corrêa

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia – UNESP, Campus de Ilha Solteira, para obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Especialidade: Sistemas de Produção

Ilha Solteira – São Paulo – Brasil
Julho de 2011

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da UNESP - Ilha Solteira.

R375p

Reis, Luis Lessi dos.

Propagação de *hancornia speciosa* gomes – apocynaceae, por alporquia e micropropagação / Luis Lessi dos Reis. -- Ilha Solteira : [s.n.], 2011
105 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Especialidade: Sistemas de Produção, 2011

Orientador: Aparecida Conceição Boliani

Co-orientador: Luiz de Souza Corrêa

Inclui bibliografia

1. Mangaba.
2. Frutífera do cerrado.
3. Propagação vegetativa.
4. Biotecnologia.
5. Cultura de tecidos.
6. Reguladores vegetais.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ILHA SOLTEIRA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: PROPAGAÇÃO DE *Hancornia speciosa* GOMES - APOCYNACEAE, POR ALPORQUIA E MICROPROPAGAÇÃO

AUTOR: LUIS LESSI DOS REIS

ORIENTADORA: Profa. Dra. APARECIDA CONCEIÇÃO BOLIANI

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. LUIZ DE SOUZA CORREA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM AGRONOMIA, Área: SISTEMAS DE PRODUÇÃO, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. LUIZ DE SOUZA CORREA

Departamento de Fitotecnia, Tecnologia de Alimentos e Sócio Economia / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira

Profa. Dra. HELOIZA FERREIRA ALVES DO PRADO

Departamento de Fitotecnia, Tecnologia de Alimentos e Sócio Economia / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira

Prof. Dr. JOSÉ CARLOS CAVICHIOLI

Polo Regional de Desenvolvimento Tecnológico dos Agronegócios da Alta Paulista - APTA

Data da realização: 15 de julho de 2011.

À DEUS por me permitir a realização deste sonho, dando-me forças na superação das dificuldades e iluminando meu caminho dia a dia.

Aos meus pais **Clarismindo Henrique dos Reis & Carolina Lessi dos Reis**, que são tudo para mim, pelo amor, incentivo e dedicação que depositaram em meus estudos, concedo meus infinitos agradecimentos.

A minha irmã **Marcela Lessi dos Reis**, pelo apoio, incentivo e amizade, sou muito grato.

A minha namorada **Simone Silva Hiraki**, pelo amor, carinho, compreensão e incentivo...

DEDICO.

A todos aqueles que valorizam o espírito e o caráter humano e não as riquezas materiais mundanas que são passageiras.

OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pelo dom da vida e pela força para enfrentar e vencer mais essa etapa.

A Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Ilha Solteira-SP, pela oportunidade concedida à realização do curso de pós-graduação em agronomia e pela concessão para o desenvolvimento do projeto de pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado.

A minha Orientadora, Professora Dr^a. Aparecida Conceição Boliani, pela confiança, amizade, ideias, que mesmo a distância, enriqueceu o estudo desta obra e servirão de alicerce para minha caminhada.

Ao meu Co-orientador Professor Dr. Luiz de Souza Corrêa, pela confiança e amizade depositada em mim, pela dedicação e orientação deste trabalho durante todo o curso. Além disso, lhe agradeço pela exemplar pessoa que se dispôs em me ajudar e me fez crescer nesta minha caminhada.

À todos os professores ligados ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da UNESP de Ilha Solteira, pela amizade, confiança e pela grande contribuição a minha carreira acadêmica. Agradeço em especial os professores Ana Maria Rodrigues Cassiolato, Fernando Tadeu de Carvalho, Heloiza Ferreira Alves do Prado, Marcelo Andreotti, Maria Aparecida Anselmo Tarsitano, Marcos Eustáquio de Sá, Marlene Cristina Alves e Walter Veriano Valério Filho.

Aos professores José Luis Sussumo Sasaki e Shizuo Seno pelas ideias e ajuda na participação na banca avaliadora de qualificação.

A professora Dr^a Heloiza Ferreira Alves do Prado e pesquisador do APTA José Carlos Cavichioli, pelas ideias concedidas na banca de defesa.

Aos funcionários da seção de Pós-graduação, pela dedicação e atenção concedida.

Ao técnico de laboratório José Hernandes Marangoni Correa, pela atenção concedida no desenvolvimento do projeto de pesquisa e demais funcionários pertencentes ao Campus II (Agronomia) da UNESP de Ilha Solteira-SP.

Aos amigos de Laboratório de Cultura de Tecidos: Aline Susuki, Erica Moreira, Gustavo Pereira, Léia Carla Rodrigues dos Santos, e Renata Furlani, pelos momentos convividos, pelas brincadeiras e pela ajuda nos momentos em que precisei, o meu muito obrigado.

Aos amigos da Pós-Graduação: Gustavo Caione, Amilton Ferreira da Silva, Ronny Clayton Smarsi, Renato de Jaqueto Goes, Débora Marchini, Adriana Avelino, Renata da Silva Moura, Jaine Aparecida de Camargo Dias, Ana Paula dos Santos Santana, Léia Carla Rodrigues dos Santos, Flávia Mariano, Erica Moreira, Gustavo Alves Pereira e Gilmar Oliveira Santos e a todos aqueles que convivi durante a realização do mestrado que por minha falha tenham sido esquecidos de ser citados.

Aos meus eternos amigos: Diógenes Martins Bardivieso, Leandro Tropaldi, Rubiana Falopa Rossi, Marli Tieme Koyanagui, Joel da Silva Tosta, Ana Carolina Bueno Pereira, Joyce Helena Modesto, Marcos Roberto da Silva, Mauro da Silva Tosta, Alex Maciel de Lima e Caio Gracco Hiroshi Perini, pois apesar da distância, nunca estiveram longe de mim.

Aos meus amados pais Carolina Lessi dos Reis e Clarismindo Henrique dos Reis, pelo amor, pela minha criação, e por sempre ter acreditado em mim.

A todos os meus familiares, pela confiança depositada em mim.

A minha querida Simone Silva Hiraki e toda sua família, pelo amor, carinho e amizade.

A todos aqueles que de uma maneira ou de outra colaboraram para realização deste trabalho.

O meu muito Obrigado !!!

“Determinação, coragem e auto-confiança são fatores decisivos para o sucesso. Se estamos possuídos por uma inabalável determinação conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes e despidos de orgulho.”

Dalai Lama

PROPAGAÇÃO DE *Hancornia speciosa* GOMES – APOCYNACEAE, POR ALPORQUIA E MICROPROPAGAÇÃO

Autor: Luis Lessi dos Reis

Orientador: Aparecida Conceição Boliani

Co-orientador: Luiz de Souza Corrêa

RESUMO

A mangabeira *Hancornia speciosa* Gomes, pertencente à família Apocynaceae, considerada uma frutífera nativa do Brasil e encontrada em várias regiões do país. A propagação via sementes é a mais utilizada, porém perdem o poder germinativo assim que são retiradas do fruto, em função de sua recalcitrância. A propagação vegetativa por meio da estaquia também não se consolidou, em função do baixo percentual de enraizamento. Desta forma essa pesquisa teve por objetivo aprimorar o conhecimento técnico-científico sobre a clonagem da mangabeira pelas técnicas da alporquia e micropropagação. O trabalho de propagação por alporquia foi realizado em um pomar de mangabeira, localizado na Fazenda de Ensino Pesquisa e Extensão – FEPE/UNESP, localizado no município de Selvíria-MS. Os experimentos de micropropagação *in vitro* foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos-LCT da UNESP, Campus de Ilha Solteira-SP. O experimento de propagação vegetativa via técnica da alporquia, foi realizado em ramos semilenhosos, em plantas adultas de mangabeira. Após 95 dias, contabilizou-se o número de raízes, porcentagem de calejamento e enraizamento. Para o estabelecimento *in vitro*, os frutos foram coletados na FEPE/UNESP, no Município de Selvíria, MS. As sementes tiveram seus tegumentos removidos para facilitar a germinação e desinfestadas para inoculação em diferentes tipos de meio de cultura para determinação da influência das concentrações salinas sobre o desenvolvimento inicial de plântulas de mangabeira. Para o alongamento e multiplicação, microestacas de mangabeira foram subcultivadas em meio de cultura Wood Plant Medium (WPM) contendo 6-benzilaminopurina (BAP) em interação com ácido α -naftalenoacético (ANA), em diferentes concentrações. Ao final deste experimento foram contabilizadas principalmente a formação de multibrotações e a taxa de multiplicação dos explantes. Para o enraizamento de microestacas de mangabeira,

foram testadas diferentes concentrações de ácido indol-3-butírico (AIB) suplementadas em meio de cultura WPM. Foram avaliados após 40 dias da inoculação o percentual de enraizamento e o número de raízes formadas. A indução da calogênese foi realizada a partir de segmentos foliares e intermodais de aproximadamente 1 cm², provenientes de plantas micropropagadas. Os explantes foram cultivados em meio WPM integral suplementado com diferentes concentrações de auxina 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) e citocinina BAP. Foram avaliados os seguintes dados biométricos: percentagem de explantes formando calo friável e explantes não desenvolvidos ou mortos. A clonagem realizada em mangabeira se mostrou promissora pela técnica da alporquia, apresentando 25% de alporques enraizados. Não houve influência das concentrações do ácido indolbutírico e dos substratos em relação ao enraizamento dos alporques nas plantas. A formulação salina de ½ MS com adição de 2 g L⁻¹ de carvão ativado ao meio de cultura proporcionou melhores condições para germinação e desenvolvimento da parte aérea e sistema radicular de plântulas de mangabeira. A utilização do BAP é eficiente na indução de multibrotações em microestacas de mangabeira. A concentração de 3 mg L⁻¹ possibilita a obtenção de brotações mais desenvolvidas, porém induz também a formação de calos na base dos explantes. A adição de ANA ao meio de cultura é dispensável na multiplicação *in vitro* de microestacas de mangabeira. O meio de cultura WPM quando suplementado com 1,86 mg L⁻¹ de AIB induziu o enraizamento de 54,7% de microestacas de mangabeira cultivadas *in vitro*. Concentrações de AIB acima da recomendada ocasionou o efeito inibitório da rizogênese nas microestacas de mangabeira. Os segmentos foliares e internodais de mangabeira apresentaram 93,01% e 100% na formação de calos friáveis quando cultivados em meio WPM suplementado com 1,64 mg L⁻¹ de 2,4-D + 1,0 mg L⁻¹ de BAP e 2 mg L⁻¹ de 2,4-D + 2,36 mg L⁻¹ de BAP, respectivamente.

Palavras chave: Mangaba. Frutífera do cerrado. Propagação vegetativa. Biotecnologia. Cultura de tecidos. Reguladores vegetais.

PROPAGATION *Hancornia speciosa* GOMES - APOCYNACEAE, USING AIR-LAYERING TECHNIQUE AND MICROPROPAGATION

Author: Luis Lessi dos Reis

Adviser: Aparecida Conceição Boliani

Co-adviser: Luiz de Souza Corrêa

ABSTRACT

The mangabeira *Hancornia speciosa* Gomes, belonging to the family Apocynaceae, considered a fruit native to Brazil found in several regions of the country. The propagation of seeds is the most used, but lose their germinating power so they are removed from the fruit, because of their recalcitrance. Vegetative propagation by cuttings is also not consolidated, due to the low percentage of rooting. Therefore this research aimed to improve the technical and scientific knowledge about the cloning of mangabeira by layering and micropropagation techniques. The work of spreading by layering was performed in an orchard mangabeira in Fazenda Teaching Research and Extension - FEPE / UNESP, located in the municipality of Selvíria-MS. The micropropagation in vitro experiments were performed at the Tissue Culture Laboratory of the LCT-UNESP, SP, Ilha Solteira-SP. The experiment of vegetative propagation through layering technique, was performed in semi-hardwood branches on adult plants of *Hancornia speciosa* Gomes. After 95 days, counted the number of roots, percentage of callus and roots. To establish in vitro, the fruits were collected in FEPE / UNESP, in the Selvíria, MS. The seeds had their coats removed to facilitate the germination and sterilized prior to inoculation in different types of culture medium to determine the influence of salt concentrations on the early development of seedlings of *H. speciosa*. For the elongation and multiplication, micro mangaba were subcultured in culture medium Wood Plant Medium (WPM) containing 6-benzylaminopurine (BAP) in interaction with α -naphthaleneacetic acid (NAA) in different concentrations. At the end of this experiment were mainly accounted for the formation of multibrotações and the rate of multiplication of the explants. For the rooting of microshoots Mangabeira, tested different concentrations of indol-3-butyric acid (IBA) in culture medium supplemented WPM. We evaluated 40 days after inoculation the percentage of rooting and number of roots. Induction of callus formation was achieved from leaf and internodal segments of approximately 1 cm²,

from micropropagated plants. The explants were cultured in full WPM supplemented with different concentrations of auxin 2,4-dichlorophenoxyacetic (2,4-D) and BAP. We evaluated the following biometric data: percentage of explants forming callus explants and undeveloped Friable or killed. Cloning held in mangabeira proved promising technique of layering, with 25% of rooted air layers. There was no influence of IBA and the concentrations of substrates in relation to rooting of air layers in plants. The $\frac{1}{2}$ MS salt formulation with the addition of 2 g L^{-1} of activated charcoal to the culture medium provided better conditions for germination and development of shoot and root of seedlings of *H. speciosa*. The use of BAP is effective in inducing in multibrotações microshoots *speciosa*. The concentration of 3 mg L^{-1} allows to obtain more developed shoots, but also induces the formation of callus at the base of the explants. The addition of NAA to the culture medium is dispensable for in vitro multiplication of microshoots *speciosa*. The culture medium when WPM supplemented with 1.86 mg L^{-1} IBA induced rooting of 54.7% of microshoots mangabeira cultivated in vitro. IBA concentrations above the recommended caused the inhibitory effect of rooting in microshoots *speciosa*. The leaf and internodal segments showed the mangabeira 93.01% and 100% in the formation of friable callus when cultured in WPM supplemented with 1.64 mg L^{-1} 2,4-D + 1.0 mg L^{-1} BAP and 2 mg L^{-1} 2,4-D + 2.36 mg L^{-1} BAP, respectively.

Keywords: *Hancornia speciosa* Gomes. Cerrado fruit tree. Vegetative propagation. Biotchonology. Tissue culture. Growth regulators.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|--------------------|--|----|
| Figura 1 - | Aspecto visual da planta adulta de mangabeira (A), da inflorescência (B), de frutos (C) e sementes (D). Ilha Solteira-SP, 2011..... | 21 |
| Figura 2 - | Número de raízes obtidas nos alporques envolvidos com plantmax [®] (A), húmus (B) e esfagno (C) e tratados com 6.000 mg L ⁻¹ de AIB. Selvíria-MS, 2010..... | 38 |
| Figura 3 - | Desdobramento das concentrações de ácido indolbutírico dentro de cada substrato, em função da porcentagem de alporques calejadosem mangabeira. Selvíria-MS, 2010..... | 41 |
| Figura 4 - | Porcentagem de germinação de plântulas de mangabeira sob diferentes meios de cultivo <i>in vitro</i> , aos 14 dias após a inoculação. Ilha Solteira-SP, 2011..... | 51 |
| Figura 5 - | Aspecto visual das plântulas de mangabeira desenvolvidas em (A) MS integral, (B) MS integral + 2g L ⁻¹ de carvão ativado, (C) ½ MS integral, (D) ½ MS integral + 2 g L ⁻¹ de carvão ativado. Ilha Solteira, SP-2011... | 54 |
| Figura 6 - | Número de brotos laterais de mangabeira, em função de concentrações de BAP. Ilha Solteira-SP, 2011..... | 65 |
| Figura 7 - | Número de folhas de mangabeira, em função das concentrações de BAP. Ilha Solteira-SP, 2011..... | 66 |
| Figura 8 - | Desdobramento da interação das concentrações BAP x ANA no número de gemas de mangabeira. Ilha Solteira-SP, 2011..... | 68 |
| Figura 9 - | Porcentagem de calo formado em microestacas de mangabeira, em função das concentrações de BAP. Ilha Solteira, 2011..... | 70 |
| Figura 10 - | Porcentagem de calo formado em microestacas de mangabeira, em função das concentrações de ANA. Ilha Solteira, 2011..... | 71 |
| Figura 11 - | Diâmetro do calo formado em microestacas de mangabeira, em função das concentrações de BAP. Ilha Solteira-SP, 2011..... | 72 |
| Figura 12 - | Diâmetro do calo formado em microestacas de mangabeira, em função das concentrações de ANA. Ilha Solteira-SP, 2011..... | 73 |
| Figura 13 - | Desdobramento da interação das concentrações BAP x ANA na taxa de multiplicação de mangabeira. Ilha Solteira-SP, 2011..... | 74 |

| | | |
|--------------------|---|-----|
| Figura 14 - | Aspecto visual de brotações de mangabeira obtidas em segmentos caulinares inoculadas em meio WPM suplementado com 3 mg L ⁻¹ de BAP e 0,5 mg L ⁻¹ de ANA. Ilha Solteira-SP, 2011..... | 76 |
| Figura 15 - | Aspecto visual de brotações de mangabeira enraizadas em meio WPM, suplementando com 2,0 mg L ⁻¹ de AIB. Ilha Solteira-SP, 2011... | 84 |
| Figura 16 - | Porcentagem de enraizamento de microestacas de mangabeira cultivadas <i>in vitro</i> sob diferentes concentrações de AIB. Ilha Solteira-SP, 2011..... | 84 |
| Figura 17 - | Representação esquemática do protocolo para micropropagação de mangabeira, utilizando microestacas provenientes de sementes germinadas <i>in vitro</i> . 1. Desinfestação e assepsia das sementes; 2. As sementes foram germinadas em meio MS e mantidas em sala de crescimento sob temperatura de 25 ± 2°C e fotoperíodo de 16 horas; 3. As microestacas provenientes das sementes germinadas <i>in vitro</i> foram cultivadas em meio de cultura de WPM para plantas lenhosas, com adição da citocinina BAP e auxina ANA; 4. As microestacas foram submetidas a troca de meio de cultura para proporcionar o enraizamento em meio de cultura WPM contendo auxina AIB. Ilha Solteira-SP, 2011..... | 86 |
| Figura 18 - | Desdobramento da interação das concentrações 2,4-D x BAP na formação de calo friável em explantes foliares de mangabeira. Ilha Solteira-SP, 2011..... | 96 |
| Figura 19 - | Desdobramento da interação das concentrações 2,4-D x BAP na formação de calo friável em explantes internodais de mangabeira. Ilha Solteira-SP, 2011..... | 99 |
| Figura 20 - | Aspecto geral dos explantes de mangabeira inoculados <i>in vitro</i> em meio WPM suplementado com 2,4-D e BAP. A- Segmento foliar de mangabeira não desenvolvido. B e C- Segmento foliar e caulinar (internódio) apresentado o desenvolvimento de calos friáveis. D- Segmento foliar apresentando o desenvolvimento de calo não-friável ou amorfa. E- Explante internodal de mangabeira apresentando o desenvolvimento de raízes. F- Estrutura calogênica em explante de mangabeira apresentando o desenvolvimento de embriogênese somática em fase globular. Ilha Solteira-SP, 2011..... | 101 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-------------------|--|----|
| Tabela 1 - | Médias e valores de F do número de raízes, comprimento de raiz, alporques calejados e alporques enraizados em função das diferentes concentrações de AIB e substratos. Selvíria-MS ⁽¹⁾ | 37 |
| Tabela 2 - | Desdobramento dos substratos dentro das concentrações de ácido indolbutírico, em função da porcentagem de alporques calejados em mangabeira. Selvíria-MS, 2010 ⁽¹⁾ | 40 |
| Tabela 3 - | Composição dos meios de cultura utilizados no experimento para germinação <i>in vitro</i> de sementes de mangabeira (MURASHIGE e SKOOG, 1962). Ilha Solteira-SP, 2011..... | 49 |
| Tabela 4 - | Valores de F para porcentagem de germinação (Germ.), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento de raiz (CR), plântulas normais (PN) e relação do comprimento da parte aérea/comprimento da raiz (CPA/CR), em função dos tipos de formulações salinas na germinação <i>in vitro</i> de mangabeira. Ilha Solteira-SP, 2011 ⁽¹⁾ | 50 |
| Tabela 5 - | Médias das variáveis comprimento da parte aérea e raiz (cm), porcentagem de plântulas normais e relação do comprimento da parte aérea e raiz de plântulas de mangabeira sob diferentes meios de cultivo <i>in vitro</i> , aos 30 dias após a inoculação. Ilha Solteira-SP, 2011 ⁽¹⁾ | 53 |
| Tabela 6 - | Composição do meio de cultura Wood Plant Medium (WPM), utilizado no experimento para multiplicação <i>in vitro</i> de microestacas de mangabeira (Lloyd e McCown, 1980). Ilha Solteira-SP, 2011..... | 62 |
| Tabela 7 - | Médias e valores de F das variáveis número de brotos, número de folhas, número de gemas, altura (cm), porcentagem de formação de calo, diâmetro do calo e taxa de multiplicação, em função das concentrações de 6- Benzilaminopurina (BAP) e Ácido Naftalenoacético (ANA), na multiplicação de microestacas de mangabeira. Ilha Solteira-SP, 2011..... | 64 |
| Tabela 8 - | Valores de F para a porcentagem de enraizamento e número de raízes em microestacas de mangabeira cultivadas <i>in vitro</i> sob diferentes concentrações de AIB. Ilha Solteira-SP, 2011 ⁽¹⁾ | 83 |
| Tabela 9 - | Médias e valores de F nos tipos de explante, 2,4-D e BAP sobre o percentual de calos friáveis formados, explantes mortos/não desenvolvidos em mangabeira. Ilha Solteira-SP, 2011 ⁽¹⁾ | 94 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,4-D: Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético

2,4,5-T: 2,4,5-Triclorofenoxiacético

2-iP: 2-isopentenil-adenina

AIA: Ácido indol-acético

AIB: Ácido indol-3-butírico

ANA: Ácido α -naftalenoacético

AG₃: Ácido giberélico

BAP: 6-benzilaminopurina

DICAMBA: Ácido 2-metroxi-3,6-diclorobenzóico

KIN: 6-furfurilaminopurina (cinetina)

MS: Meio de cultura formulado por Murashige e Skoog, 1962

MS/2: Concentrações de sais do meio MS diluídas pela metade

PICLORAN: Ácido 4-amino-3,5,5-tricloropiclorínico

TDZ: Thidiazuron

WPM: Meio de cultura Woody Plant Medium formulado por Lloyd e McCown, 1980

SUMÁRIO

| | página |
|--|--------|
| 1. INTRODUÇÃO | 18 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 20 |
| 2.1. DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE..... | 20 |
| 2.2. PROPAGAÇÃO VEGETATIVA | 22 |
| 2.3. MICROPROPAGAÇÃO | 23 |
| 3. REFERÊNCIAS | 28 |
| CAPÍTULO I | 31 |
| NÍVEIS DE ÁCIDO INDOL-3-BUTÍRICO (AIB) E TIPOS DE SUBSTRATOS NA PROPAGAÇÃO VEGETATIVA DA MANGABEIRA POR ALPORQUIA | 31 |
| 1. RESUMO..... | 32 |
| 2. ABSTRACT | 33 |
| 3. INTRODUÇÃO | 34 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 35 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 36 |
| 6. CONCLUSÕES | 42 |
| 7. REFERÊNCIAS | 43 |
| CAPITULO II | 44 |
| GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE SEMENTES DE MANGABEIRA | 44 |
| 1. RESUMO..... | 45 |
| 2. ABSTRACT | 46 |
| 3. INTRODUÇÃO | 47 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 48 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 50 |
| 6. CONCLUSÕES | 55 |
| 7. REFERÊNCIAS | 56 |
| CAPITULO III | 58 |
| 1. RESUMO..... | 59 |
| 2. ABSTRACT | 60 |
| 3. INTRODUÇÃO | 61 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 61 |

| | |
|--|-----|
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 63 |
| 6. CONCLUSÕES | 76 |
| 7. REFERÊNCIAS..... | 77 |
| CAPITULO IV | 79 |
| APLICAÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO INDOL-3 BUTÍRICO (AIB) NO ENRAIZAMENTO DE MICROESTACAS DE MANGABEIRA..... | 79 |
| 1. RESUMO..... | 80 |
| 2. ABSTRACT | 81 |
| 3. INTRODUÇÃO | 82 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS..... | 82 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 83 |
| 6. CONCLUSÕES | 86 |
| 7. REFERÊNCIAS..... | 88 |
| CAPITULO V | 89 |
| CALOGÊNESE A PARTIR DE SEGMENTOS FOLIARES E CAULINARES DE MANGABEIRA SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE 2,4-D E BAP..... | 89 |
| 1. RESUMO..... | 90 |
| 2. ABSTRACT | 91 |
| 3. INTRODUÇÃO | 92 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS..... | 93 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 94 |
| 6. CONCLUSÕES | 102 |
| 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS | 103 |
| 8. REFERÊNCIAS..... | 105 |

1. INTRODUÇÃO

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. A produção e comercialização mundial de frutas nativas e exóticas se encontram em franca expansão, devido à busca por alimentos saborosos e saudáveis, tanto na forma natural como processados. Dentre elas a produção e consumo de mangabeira vem aumentando a cada ano pelo seu sabor marcante e único.

As fruteiras nativas ocupam lugar de destaque no ecossistema do cerrado e seus frutos apresentam sabores “*sui generis*” e elevados teores de açúcares, proteínas, vitaminas e sais minerais e podem ser consumidos *in natura* ou na forma de sucos, licores, sorvetes, geleias, etc. Hoje, existem mais de 58 espécies de frutas nativas do cerrado conhecidas e utilizadas pela população (LEDERMAN et al., 2000).

Atualmente, é possível encontrar grande quantidade de frutas nativas do cerrado sendo comercializadas em feiras da região e nas margens das rodovias a preços competitivos e alcançando grande aceitação popular. Observa-se, hoje, a existência de mercado potencial e emergente para as frutas nativas do cerrado, a ser melhor explorado pelos agricultores, pois todo o aproveitamento desses frutos tem sido feito de forma extrativista e predatória.

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 Cerrado e Baixadas Litorâneas e apresenta grande potencial para uso imediato entre as fruteiras nativas. Os maiores estados produtores são Paraíba, Bahia e Sergipe (FERREIRA et al., 2005). Porém a oferta do produto não atende à demanda de mercado, confirmando o seu potencial agro-socio-econômico e as poucas informações técnicas de cultivo ainda limitam a expansão de pomares comerciais (EPSTEIN, 2004).

Por outro lado a cultura esta em fase de domesticação e, portanto, todos os aspectos relacionados ao seu cultivo necessitam ser estudados, podendo então citar: propagação vegetativa, seleção de genótipos promissores, desenvolvimento e adaptação de práticas culturais, estudos sobre a fenologia da planta e aspectos relacionados a pré e pós-colheita do fruto, afim de proporcionar a sobrevivência da espécie e sua exploração racional (LÉDO et al., 2007).

Dessa forma a conservação complementar da mangabeira em bancos de sementes, a produção de mudas via sementes e ou estacas, tem-se mostrado inviável, devido à recalcitrância das sementes e/ou pela nula taxa de enraizamento encontrada via técnica da estaquia. Com base nestas informações, o objetivo do presente trabalho de pesquisa foi aprimorar o conhecimento técnico-científico sobre a clonagem da mangabeira pelas técnicas da alporquia e micropropagação *in vitro*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE

A mangabeira 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.

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.

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).

O nome “mangaba” significa em tupi-guarani “fruta boa de comer”, é planta perene e lactescente, dotada de copa arredondada. Nativa do Brasil e encontrada em várias regiões do país, desde os tabuleiros costeiros e baixadas litorâneas do Nordeste até os cerrados das regiões Centro-Oeste, Norte e Sudeste. Fora do Brasil, essa frutífera é praticamente desconhecida, embora se saiba que ocorre também na Venezuela, Bolívia, Peru e Paraguai (MONACHINO, 1945).

Segundo Lederman et al. (2000), a mangabeira ocorre em maior densidade em solos pobres e de textura arenosa, predominantes na região do Cerrado e

Tabuleiros Costeiros, indo desde as areias quartzosas até os podzólicos e latossolos. Encontrada em áreas com temperaturas médias anuais entre 24°C e 26°C e altitudes de até 1.500 m. Desenvolve-se em regiões cuja precipitação varia entre 750 e 1.600 mm anuais, sendo tolerante, contudo, a períodos de déficit hídrico.

A mangabeira é uma árvore de porte médio, variando de 2,9 a 7,4 metros de altura, sendo possível alcançar de 10 a 15 metros, e quando tem menos altura, sua copa fica mais esparramada lateralmente (MANICA, 2002) (Figura 1).

Figura 1 - Aspecto visual da planta adulta de mangabeira (A), da inflorescência (B), de frutos (C) e sementes (D). Ilha Solteira-SP, 2011.



(REIS, 2011)

O sistema radicular é constituído por uma raiz pivotante profunda, circundada de raízes secundárias bem desenvolvidas, dispostas obliquamente em relação à principal. As raízes exploram grande volume de solo, absorvendo água e nutrientes em camadas profundas do perfil do solo (ROSA et al., 2005).

Os frutos são do tipo baga, de tamanho, formato e cores variados, normalmente elipsoidais ou arredondados, amarelados ou esverdeados, com pigmentação vermelha ou sem pigmentação, polpa amarelada adocicada, rica em vitaminas, ferro, fósforo, cálcio e proteínas. Devido ao excelente aroma e sabor dos seus frutos, a mangabeira é uma das mais populares produtoras de matéria-prima para a agroindústria entre as frutíferas do Nordeste, sendo utilizada, sobretudo, para a fabricação de sucos e polpas congeladas (LEDERMAN et al., 2000). No Brasil, além dessas formas, utiliza-se o fruto no consumo *in natura* e para a produção de doces, xaropes, compotas, licores, vinhos e vinagres. Como o fruto é ácido, pode também ser usado no preparo de geleias (SILVA, 1994; LORENZI, 2000). Além da produção de frutos, a mangabeira possui outra utilidade, como a produção de látex para o processamento da borracha.

A polpa, principal componente no tocante ao aspecto comercial, e em função do aroma e da palatabilidade, é consumida *in natura*, como sorvete, geleia, doces e licores. Em 100 gramas de polpa pode-se encontrar 0,7 g de proteínas, 41 mg de cálcio, 18 mg de fósforo, 28 mg de ferro, 30 mg de vitamina A, 0,04 mg de vitamina B1, 33 mg de vitamina C e 43 calorias (LEDERMAN et al., 2000).

2.2. PROPAGAÇÃO VEGETATIVA

A propagação sexuada da mangabeira é dificultada pelo fato de suas sementes serem recalcitrantes e a polpa do fruto ter uma ação inibitória sobre a germinação destas (GRICOLETTO, 1997). De acordo com Lorenzi (2000), normalmente, a percentagem de germinação de sementes desta espécie é baixa, devido à presença de inibidores na polpa.

Dentre as vantagens da propagação vegetativa, lista-se a manutenção das características genéticas das plantas-matrizes, uniformidade e precocidade de produção. Dentre as técnicas de propagação vegetativa, destaca-se a propagação por alporquia (HARTMANN et al., 2002).

A alporquia é recomendada para espécies com dificuldades de multiplicação por outros métodos clonais ou mesmo por sementes. Baseia-se no princípio de que, pelo sombreamento parcial ou total do ramo ou de outra parte da planta, são proporcionadas condições de umidade, aeração e ausência de luz, que favorecem a emissão de raízes (FACHINELLO et al., 2005).

Em outras culturas a propagação vegetativa por alporquia tem obtido excelentes resultados. Segundo Castro e Silveira (2003), a propagação em pessegueiro pelo método de alporquia apresenta vantagens em relação à estaquia, dentre as quais estão: o alto percentual de enraizamento em muitas espécies e a independência de infra-estrutura (casa de vegetação com sistema de nebulização).

Uma das maneiras de auxiliar no sucesso dessa técnica de propagação vegetativa é a adoção da utilização de reguladores vegetais, a exemplo do ácido indol-3-butírico (AIB), auxina mais comumente utilizada na indução do enraizamento adventício. Segundo Fachinello et al. (1995), em fruteiras de clima temperado já esta confirmado que o uso do regulador vegetal AIB auxilia no pegamento de alporques, por se tratar de uma substância fotoestável, de ação localizada e menos sensível à degradação biológica, em comparação às demais auxinas sintéticas .

2.3. MICROPROPAÇÃO

Ainda são poucas as informações sobre o potencial produtivo da 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 ainda são 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.

Atualmente, a modalidade de maior interesse e aplicação na propagação de plantas é a micropropagação, que reúne características, tais como multiplicação rápida de plantas selecionadas, obtenção de mudas livres de patógenos que acompanham outros métodos de propagação vegetativa, conservação e transporte de germoplasma, entre outras. Por outro lado, um exemplo que justifica o uso da

micropropagação é a multiplicação de plantas selecionadas por alta produtividade ou qualidade de frutos superiores. No caso de espécies cujas estacas não enraízam ou possuem baixo percentual de enraizamento, a cultura de tecidos pode representar solução para sua propagação.

Em função da necessidade de novas tecnologias para a domesticação da mangabeira, a cultura de tecidos, é o 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. 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).

As plantas lenhosas, que contemplam grande parte das frutíferas, inclusive a mangabeira, têm dificuldades relevantes para o estabelecimento *in vitro*, principalmente devido à contaminação e oxidação, por isso a utilização de técnicas de micropropagação são estratégias importantes para solucionar problemas de propagação, também melhoramento genético e da biotecnologia das plantas, principalmente de lenhosas e perenes (ERIG; SCHUCH, 2003).

Através das técnicas de micropropagação pode-se induzir a proliferação de gemas apicais e axilares (gemas laterais), formação de gemas adventícias por organogênese direta/indireta e formação de embriões por embriogênese somática, permitindo a obtenção de um grande número de plantas em reduzido período de tempo (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Em um sistema de micropropagação estão geralmente envolvidas as seguintes fases: estabelecimento da cultura *in vitro*, multiplicação dos brotos formados por meio de subculturas sucessivas, enraizamento dos brotos obtidos e aclimatização em casa de vegetação (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

De acordo com Andrade (2002), existem três fatores que afetam a regeneração da planta *in vitro*: o genótipo (espécie, cultivar ou variedade que está sendo estudado), a fonte de explantes (folha, raiz, caule, meristema, etc.) e o uso de reguladores vegetais e suas respectivas concentrações.

A regeneração de plantas *in vitro* através da cultura de segmentos internodais, folhas, brotos, embriões, anteras, meristemas, anteras, botões florais e gemas, se destaca pela possibilidade de obtenção de clones, ou seja, de plantas

micropropagadas que mantêm todas as características da planta-matriz (BERTOLUCCI et al., 2000). Guerra et al. (1999) afirmam que por meio da micropropagação é possível a fixação de ganhos genéticos nas populações clonais, obtenção de um grande número de plantas saudáveis e de alta qualidade em pequeno espaço físico e curto período de tempo, independentemente de fatores climáticos e da época do ano.

Assim, diversas 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).

De acordo com Pasqual et al. (1998) toda a planta de uma forma geral, é autotrófica, necessitando para o seu desenvolvimento de um substrato que contenha os sais minerais essenciais, água, gás carbônico e luz. No entanto, ao se cortar parte desta planta para cultivá-la *in vitro* ou a utilização de sementes e embriões observa-se que os explantes não são autotróficos e por isso necessitam também de elementos essenciais, constituintes orgânicos e energia (sacarose).

Os meios de cultivo são compostos por seis componentes básicos, são eles: macronutrientes (N, P, K, S, Ca e Mg), micronutrientes (Mn, Zn, Fe, B, Cl, Mo, Co e Cu), açúcares (sacarose, glicose ou frutose), vitaminas e aminoácidos (tiamina, niacina, piridoxina, glicina e Mio-inositol) e reguladores de crescimento (auxinas e citocininas) (PASQUAL et al., 1998; TOMBOLATO; COSTA, 1998).

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). Já o meio de cultura WPM (do inglês wood plant medium) (LLOYD; MCCOWN, 1980) é bastante utilizado para plantas lenhosas, por possuir baixas concentrações de íons totais.

O carvão ativado também é recomendado no cultivo *in vitro* sendo importante para evitar a oxidação que é a reação do oxigênio com íons metálicos (+) dos outros

compostos do meio de cultivo. Os explantes ao serem inoculados no meio de cultura podem liberar exsudatos que tornam o meio de cultivo escuro, sendo consequência da liberação de fenóis dos ferimentos ocasionados no processo de extração dos explantes (SANTOS, 2001).

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 α -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 frequentemente 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 (2-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).

As citocininas consideradas em grande destaque para indução e proliferação de gemas axilares *in vitro*. Entre os vários tipos de citocininas, o (BAP) é o mais utilizado para a multiplicação de partes aéreas, sendo utilizado em aproximadamente 60% dos meios de cultura destinados a multiplicação *in vitro* (SANTOS, 2001). Inúmeros são os trabalhos que reportam o uso de BAP como indutor de brotos na micropropagação.

Avaliando as respostas morfogênicas de diferentes explantes cultivados *in vitro*, Léo 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.

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 18,4 e 15,2% de enraizamento de propágulos de mangabeira 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 do Cerrado, Grigoletto (1997), obteve maiores porcentagens de enraizamento de mangabeira 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 genóticas da espécie.

3. REFERÊNCIAS

- ANDRADE, S. R. M. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. Planaltina Embrapa Cerrados, 2002. 16 p. (Documentos, 58).
- BERTOLUCCI, S. K. V.; PINTO, J. E. B. P.; CARDOSO, M. G.; GAVILANES, M. L.; SANTIAGO, E. J. A.; LAMEIRA, O. A. Micropropagação de *Tournefortia cf paniculata* cham. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.3, n.1, p.43-49, 2000.
- 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.
- CASTRO, L. A. S.; SILVEIRA, C. A. P. Propagação vegetativa do pessegueiro por alporquia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p. 368-370, 2003.
- CRONQUIST, A. **The evolution in classification of flowering plants**. 2. ed. Bronx: The New York Botanical Garden, New York, 1988. 555 p.
- ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Estabelecimento *in vitro* de plantas de marmeleiro (*Cydonia oblonga* Mell) cultivares MC, Adams e Portugal. **Revista Científica Rural**, Bagé, v. 8, n. 2, p. 107-115, 2003.
- EPSTEIN, L. Mangaba: coisa boa de comer. **Bahia Agrícola**, Bahia, v. 6, n. 2, p. 19-22, 2004.
- FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C.; KERSTEN, E.; FORTES, G. R. de L. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. 2. ed. Pelotas: UFPel, 1995. 178p.
- FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C. **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília: Embrapa, 2005. 221p.
- 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.; 20 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.
- HARTMANN, H. T.; KESTER, D.E.; DAVIES JUNIOR, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. 7th ed. New Jersey: Prentice Hall, 2002. 880p
- GIACOMETTI, D. C. Recursos genéticos de fruteiras nativas do Brasil. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE RECURSOS GENÉTICOS DE FRUTEIRAS NATIVAS, 1., 1992, Cruz das Almas. **Anais...** Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 1992. p. 13-27.

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-CNPQ, 1998. v. 1, p. 183-260.

GRICOLETTO, E. R. **Micropropagação de *Hancornia speciosa* Gomes (Mangabeira)**. 1997. 76 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal)– Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Brasília, Brasília.

GUERRA, M. P.; DAL VESCO, L. L.; PESCADOR, R.; SCHUELTER, A. R.; NODARI, R. O. Estabelecimento de um protocolo regenerativo para a micropropagação do abacaxizeiro. **Pesquisa agropecuária Brasileira**, Rio De Janeiro, v. 34, n. 9, p. 557-1563, 1999.

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

LEDERMAN, I. E.; JÚNIOR, J. F. S.; BEZERRA, J. E. F.; ESPÍNDOLA, A. C. M. **Mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes)**. Jaboticabal: Funep, 2000. 35 p. (Série Frutas Nativas, 2).

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. 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. **Título...** Fortaleza: Ed. Horticultura brasileira, v.23, p. 622-623, 2005. Suplemento.

LÉDO, A. S.; SECA, G. S. V.; BARBOZA, S. B. S. C.; SILVA JUNIOR, J. F. Crescimento inicial de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) em diferentes meios de germinação *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 989-993, 2007.

LEMO, 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. S. (Ed.). **A cultura da mangaba**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2006. p.125-133.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 3. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2000. v. 1, 352 p.

LLOYD, G.; MC COWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. **HortScience**, Alexandria, v. 15, n. 3, p. 416, June 1980.

MANICA, I. **Frutas nativas, silvestres e exóticas**: técnicas de produção e mercado: feijoa, figo-da-índia, fruta-pão, jaca, lichia, mangaba. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2002. 514 p.

MONACHINO, J. A. A revision of *Hancornia* (Apocynaceae). *Lilloa*, Tucumán, v. 11, n. 2, 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, n. 1, p. 473-479, 1962.

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

PASQUAL, M.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J. D. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações – introdução: fundamentos básicos**. Lavras: UFLA/ FAEPE. 1998, 159 p.

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. p. 55-72

SANTOS, I. R. I. Criopreservação de germoplasma vegetal: a alternativa para a conservação a longo prazo. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 4, n. 20, p. 60-65, 2001.

SILVA, J. A. **Frutas nativas dos cerrados**. Brasília: Embrapa - CPAC / SPI, 1994. 166 p.

SOUZA, F. V. D.; JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. S.; SANTOS-SEREJO, J. A. dos; COSTA, M. A. P. 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. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 703 p.

ROSA, M. E. C. da; NAVES, R. V.; OLIVEIRA JÚNIOR, J. P. de. Produção e crescimento de mudas e mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) em diferentes substratos. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 35, n. 2, p. 65-70, 2005.

TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. M. M. **Micropropagação de plantas ornamentais**. Campinas: IAC, 1998. 72 p. (Boletim Técnico, 174).

CAPÍTULO I
NÍVEIS DE ÁCIDO INDOL-3-BUTÍRICO (AIB) E TIPOS DE SUBSTRATOS NA
PROPAGAÇÃO VEGETATIVA DA MANGABEIRA POR ALPORQUIA

NÍVEIS DE ÁCIDO INDOL-3-BUTÍRICO (AIB) E TIPOS DE SUBSTRATOS NA PROPAGAÇÃO VEGETATIVA DA MANGABEIRA POR ALPORQUIA

1. RESUMO

A mangabeira é uma cultura que está despontando no cenário da fruticultura pelas suas qualidades e aplicações, demonstrando forte demanda. Porém, apesar do seu grande potencial e da inexistência de plantios racionais e tecnificados, o extrativismo é atualmente a única forma de exploração, constituindo-se assim numa barreira ao aproveitamento de todas as suas propriedades. A principal via de propagação da mangabeira é por sementes, por outro lado, a propagação vegetativa por meio da estaquia, ainda não se consolidou como uma técnica viável. Dessa forma, objetivou-se neste trabalho, avaliar o efeito da aplicação de de ácido indol-3-butírico (AIB) e tipos de substratos na propagação vegetativa da mangabeira por alporquia. Os alporques foram realizados em ramos semilenhosos, contendo aproximadamente 1,5 cm de diâmetro, sadios e vigorosos em plantas adultas de mangabeira. Os ramos foram anelados com 2 cm de largura por todo perímetro do ramo, a 40 cm da extremidade apical. No local anelado, foram aplicadas as concentrações de AIB (0, 2.000, 4.000, 6.000, 9.000 mg L⁻¹), distribuídos em solução hidro-alcoólica com auxílio de pincel e cobertos com três diferentes tipos de substratos (plantmax HT[®], húmus de minhoca e esfagno), umedecidos com água. Em seguida, foram envolvidos com filme de polietileno (PVC) transparente e amarrados com barbante nas extremidades. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5 x 3, correspondendo as 5 concentrações do regulador e 3 tipos de substratos. Após 95 dias da realização dos alporques avaliaram-se o número de raízes, expressos em notas de 0 a 5, comprimento de raiz (cm), porcentagem de calejamento e enraizamento. A clonagem realizada em mangabeira se mostrou promissora pela técnica da alporquia, apresentando 25% dos alporques enraizados. Não houve influência das concentrações do ácido indol-3-butírico e dos substratos em relação ao enraizamento dos alporques nas plantas.

Palavras-chave: *Hancornia speciosa* Gomes. Regulador vegetal. Substrato. Propagação vegetativa.

LEVELS OF INDOL-3-BUTYRIC ACID (IBA) AND TYPES OF SUBSTRATES IN THE VEGETATIVE PROPAGATION OF THE MANGABEIRA BY AIR-LAYERING TECHNIQUE

2. ABSTRACT

The mangabeira is a culture that is emerging in the setting of fruit by its qualities and applications, demonstrating strong demand. However, despite its great potential and the absence of rational and technified plantations, the extraction is currently the only form of exploitation, thus constituting a barrier to the use of all its properties. The major route of spread is by seeds of *Hancornia speciosa* Gomes, on the other hand, vegetative propagation by cuttings, not yet established itself as a viable technique. Thus, the objective of this study was to evaluate the effect of acid indole-3-butyric acid (IBA) and substrates in the vegetative propagation of mangabeira by layering. The air layers were performed in semi-hardwood branches, containing approximately 1.5 cm in diameter, healthy and vigorous in adult plants of *H. speciosa*. The branches were ringed with two inches wide around the perimeter of the branch, 40 cm above the apex. In the local ring-shaped, were applied concentrations of IBA (0, 2.000, 4.000, 6.000 and 9.000 mg L⁻¹), distributed in hydro-alcoholic with the help of brush and covered with three different types of substrates (Plantmax HT[®], humus worm and sphagnum moss), moistened with water. Then, they were involved with polyethylene film (PVC) transparent and tied with twine at the ends. The experimental design was completely randomized in a factorial 5 x 3, corresponding to the concentrations of the regulator 5 and 3 substrates. After 95 days of the completion of the air layers evaluated the number of roots, expressed in grades 0-5, root length (cm), percentage of callus and roots. Cloning held in mangabeira proved promising technique of layering, with 25% of rooted air layers. There was no influence of the concentrations of indol-3-butyric and substrates in relation to rooting of air layers in plants.

Keywords: *Hancornia speciosa* Gomes. Growth regulator. Substrate. Vegetative propagation.

3. INTRODUÇÃO

O Brasil tem sua área territorial dividida atualmente em seis complexos ecossistemas: a Floresta Amazônica, o Cerrado, a Caatinga, a Floresta Atlântica, o Pantanal e as pradarias de campo limpo (RODRIGUES; CARVALHO, 2001).

O Cerrado, bioma típico da zona tropical, é uma formação savânica que ocupa aproximadamente 2,0 milhões de Km² e corresponde a 23,1% do território brasileiro, compreendendo o sul do Mato Grosso, os estados de Goiás, Tocantins, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais, o oeste da Bahia e o Distrito Federal (RODRIGUES; CARVALHO, 2001).

Apesar das limitações impostas ao crescimento e ao desenvolvimento das plantas pelo regime de chuvas e pelas características do solo, o Cerrado apresenta surpreendente variabilidade de espécies. Algumas destas espécies podem contribuir diretamente como fonte de exploração econômica, desde que a pesquisa e o desenvolvimento de tecnologias viabilizem seu aproveitamento.

As frutíferas nativas ocupam lugar de destaque neste ecossistema e seus frutos, de grande aceitação popular, já são comercializados em feiras. Apresentam sabor *sui generis* e elevados teores de açúcares, proteínas, vitaminas e sais minerais, podendo ser consumidos *in natura* ou na forma de sucos, licores, sorvetes e geléias.

Existe, atualmente, um mercado potencial e emergente para as frutas nativas do Cerrado, a ser melhor explorado pelos agricultores, já que todo o aproveitamento desses frutos tem sido feito de forma extrativista e predatória.

Neste cenário, o Cerrado tem sido agredido e depredado pela ação do homem, colocando em risco de extinção várias espécies de plantas, entre elas algumas frutíferas nativas. Torna-se necessário, portanto, tomar medidas relacionadas ao desenvolvimento de metodologias de cultivo e propagação destas espécies, tanto para exploração econômica como para conservação.

A mangabeira, fruta nativa do Cerrado, se caracteriza pela propagação sexuada e por produzir indivíduos heterogêneos. Estudos já concluídos desta espécie indicam que suas sementes são recalcitrantes, o que limita a obtenção de pomares comerciais e para reflorestamento em áreas degradadas. A propagação vegetativa por meio da estaquia, para a mangabeira, também não se consolidou, em função do baixo percentual de enraizamento (LEDERMAN; BEZERRA, 2006).

Porém, a alporquia, outro método de propagação vegetativa, ainda pouco estudada em mangabeira, pode ser uma técnica promissora para a propagação da frutífera que apresenta difícil enraizamento de estacas, pois a técnica proporciona melhores condições para que a rizogênese aconteça.

Em virtude dos obstáculos mencionados na cultura da mangabeira, a propagação vegetativa por alporquia poderá ser usada com grandes vantagens para a propagação de mangabeira no Brasil, justificando assim a necessidade de obtenção de mudas com alto padrão de qualidade para garantir a homogeneidade de novos pomares.

Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da aplicação de ácido indol-3-butírico e diferentes tipos de substratos na propagação vegetativa de mangabeira via técnica de alporquia.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi instalado na Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão da UNESP, localizada no município de Selvíria-MS, no período de 95 dias (22-07-2010 a 27-11-2010). As coordenadas geográficas do local são: 20° 20' 14" de latitude Sul, 51° 24' 17" de longitude Oeste e 375 m acima do nível do mar.

Os alporques foram confeccionados em plantas de *Hancornia speciosa* Gomes com aproximadamente 20 anos de idade, em ramos semilenhosos, com aproximadamente 1,5 cm de diâmetro, sadios e vigorosos. Os ramos foram anelados com 2 cm de largura por todo perímetro do ramo, a 40 cm da extremidade apical. No local anelado, foram aplicadas as concentrações de AIB, distribuídos em solução hidro-alcoólica com auxílio de pincel e cobertos com três diferentes tipos de substratos, umedecidos com água. Para criar um microclima ao redor da lesão, favorável ao desenvolvimento de raízes, o alporque foi envolvido com filme de polietileno (PVC) transparente e amarrado com barbante de algodão nas duas extremidades, para contenção do substrato e evitar a sua desidratação.

Os alporques foram realizados aleatoriamente em plantas uniformes, estáveis, sem a presença de flores e frutos, utilizando-se de ramos distribuídos nos quatro quadrantes da planta. Quando necessário, os alporques foram umedecidos com 15 mL de água alporque⁻¹, utilizando-se seringa plástica.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5 x 3, com quatro repetições e cinco alporques por parcela, sendo os tratamentos: cinco concentrações de ácido indol-3-butírico – AIB (0; 2.000; 4.000; 6.000 e 9.000 mg L⁻¹) e três substratos (plantmax HT[®], húmus de minhoca e esfagno).

As avaliações ocorreram após 95 dias da realização dos alporques, coletando os seguintes dados biométricos: comprimento de raiz (cm), número de raízes expressos em notas de 0 a 5 (0 = sem raízes; 1 = uma raiz; 2 = de duas a cinco raízes; 3 = seis a dez raízes; 4 = onze a dezenove raízes, e 5 = mais de vinte raízes), porcentagem de calejamento e de enraizamento.

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F, as médias dos substratos ao teste de Tukey e as concentrações de AIB submetidas à análise de regressão, ao nível de 5% de probabilidade. As análises foram realizadas pelo programa computacional – Sistema para Análise de Variância - SISVAR (FERREIRA, 2000). Dados sobre número de raízes, comprimento da raiz e alporques enraizados foram transformados segundo raiz de $x+0,5$, bem como, quando necessário, os coeficientes de variação foram transformados segundo a raiz de $x+0,5$ ou $x+1$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1, estão apresentados as médias e os valores de F das variáveis: número de raízes, comprimento do sistema radicular, porcentagem de alporques calejados e enraizados de mangabeira, dos quais foram submetidos a diferentes concentrações do regulador vegetal AIB e substratos. Estatisticamente verificou-se que não houve diferença estatística entre os tratamentos e interação para as variáveis estudadas. A exceção foi observada para a porcentagem de calejamento, onde houve efeito significativo tanto para os tratamentos, bem como para a interação.

Tabela 1- Médias e valores de F do número de raízes, comprimento de raiz, alporques calejados e alporques enraizados em função das diferentes concentrações de AIB e substratos. Selvíria-MS⁽¹⁾.

| Tratamentos | Número de raízes ⁽²⁾ notas | Comprimento da raiz ⁽²⁾ cm | Alporques calejados % | Alporques enraizados % |
|---|--|--|--------------------------|---------------------------|
| Substrato | | | | |
| Plantmax HT [®] | 0,30 (0,85) a | 0,64 (0,97) a | 58,33 b | 11,65 a |
| Húmus de minhoca | 0,43 (0,90) a | 1,10 (1,11) a | 29,99 c | 14,99 a |
| Esfagno | 0,81 (1,07) a | 1,64 (1,30) a | 79,99 a | 24,99 a |
| DMS | 0,60 (0,24) | 1,23 (0,42) | 19,70 | 17,56 |
| Ácido Indol-3-butírico (mg L⁻¹) | | | | |
| 0 | 0,66 (1,01) | 1,58 (1,25) | 47,22 | 19,44 |
| 2000 | 0,55 (0,95) | 1,15 (1,14) | 61,10 | 19,44 |
| 4000 | 0,27 (0,86) | 0,86 (1,07) | 47,21 | 13,88 |
| 6000 | 0,14 (0,77) | 0,15 (0,77) | 49,99 | 2,77 |
| 9000 | 0,94 (1,12) | 1,91 (1,40) | 74,99 | 30,55 |
| Teste F | | | | |
| Substrato (S) | 2,36 ^{ns} | 1,95 ^{ns} | 19,036 ^{**} | 1,83 ^{ns} |
| Ácido Indolbutírico (AIB) | 2,00 ^{ns} | 2,13 ^{ns} | 2,62 [*] | 2,33 ^{ns} |
| S X AIB | 1,39 ^{ns} | 1,41 ^{ns} | 2,39 [*] | 1,48 ^{ns} |
| C.V. (%) | 34,07 | 48,73 | 45,80 | 84,21 ⁽³⁾ |
| Média Geral | 0,51 | 1,13 | 56,10 | 17,22 |

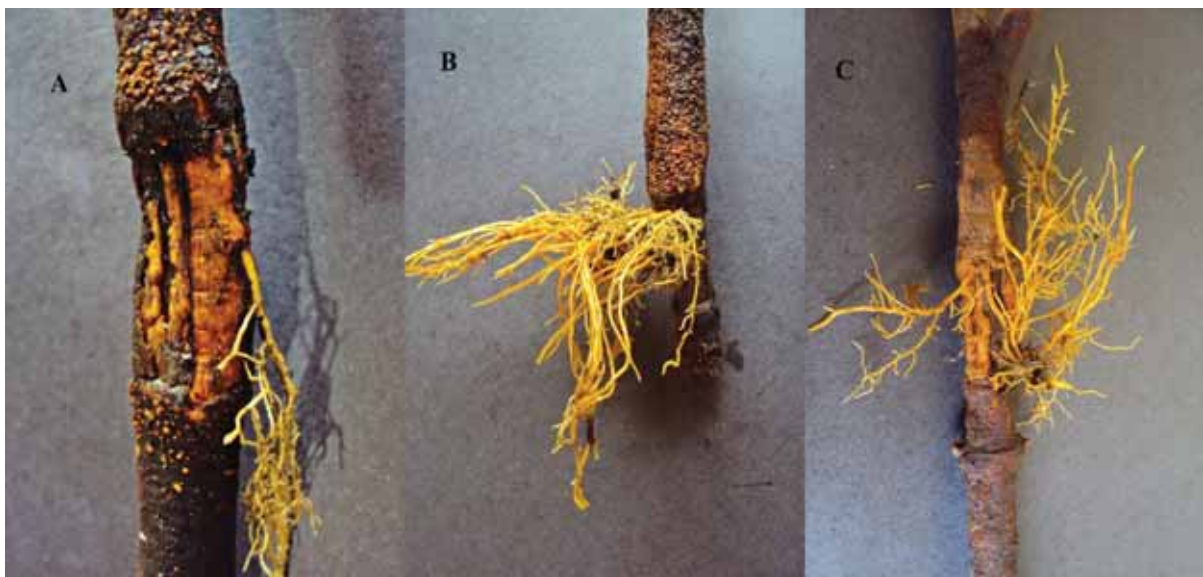
(1) Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05); *: significativo a 5%; **: significativo a 1% e ns: não significativo; (2) Médias entre parênteses são médias transformadas para raiz quadrada de (x +0,5); (3) CV% transformado para a raiz quadrada de (x +1).

Embora sem efeito significativo para número de raízes, a média absoluta verificada quando se utilizou o substrato esfagno foi de 0,81, independentemente da concentração de AIB utilizada. Porém não foi encontrada diferença na quantidade de raízes em relação aos alporques envolvidos com húmus de minhoca (0,43) e plantmax HT[®] (0,30), (Tabela 1). Esse resultado já era esperado, pois o esfagno é o

substrato mais recomendado e utilizado na propagação vegetativa do tipo alporquia em pêsego, maçã, lichia, jaboticaba, entre outras espécies que possuem dificuldades para enraizamento, pelo motivo de conferir alta capacidade de aeração e retenção de água e oferecer boas condições para o bom crescimento e desenvolvimento do sistema radicular do alporque realizado.

Através da Figura 2, observa-se a quantidade de raízes formadas nos alporques envolvidos com plantmax HT[®], húmus e esfagno, quando da utilização de 6.000 mg L⁻¹ de AIB. As raízes adventícias emitidas foram formadas acima e abaixo da região do anelamento. Observou-se também que as raízes formadas apresentavam emissão de raízes laterais. Segundo Hartmann et al. (2002) o desenvolvimento das raízes é auxiliado pelo anelamento do ramo, impedindo que os carboidratos, hormônios e outras substâncias produzidas pelas folhas e gemas, necessárias à rizogênese, sejam translocadas para outras partes da planta. Husen e Pal (2007) afirmam que a formação do sistema radicular vigoroso em alporques também está relacionado com a maior quantidade de carboidratos presentes nos ramos, pois os carboidratos são fontes de energia, os quais são intensamente mobilizados para o local em que ocorre o enraizamento.

Figura 2 - Número de raízes obtidas nos alporques envolvidos com plantmax HT[®] (A), húmus (B) e esfagno (C) e tratados com 6.000 mg L⁻¹ de AIB. Selvíria-MS, 2010.



(REIS, 2010)

Corroborando com Franco et al. (2005) a formação do sistema radicular vigoroso com maior volume é fator de suma importância para garantir o sucesso na instalação do pomar, pelo efeito na maior taxa de pegamento das plantas no campo.

Neste experimento não ocorreu a formação de raízes diretamente do calo, fato também observado em alporques de videira muscadínia por Pacheco et al. (1998) e corroborado por Sidlowski et al. (1971) os quais observaram que o tecido caloso meristematicamente ativo é representado por diversas camadas de células com aspecto parenquimático, que se originam nas áreas floemáticas da casca acima e abaixo do anelamento e se distribuem por toda a extensão deste.

Considerando a variável analisada comprimento da raiz, embora também sem efeito significativo, verifica-se que o maior comprimento médio absoluto foi observado nos alporques envolvidos com esfagno (1,64 cm). Aliado a isso, destacam-se as propriedades físicas que os substratos composto de húmus de minhoca, plantmax HT[®] e esfagno apresentam, como: elevada macro e microporosidade, conferindo aos mesmos, alta capacidade de aeração e retenção de água. Minami et al. (1994) ressaltam que um bom substrato é aquele que proporciona condições adequadas ao desenvolvimento do sistema radicular da muda em formação. Dessa forma, constata-se que mesmo com boas condições de aeração e retenção de água que os substratos puderam fornecer para o bom desenvolvimento dos alporques de mangabeira, é possível considerar que houve insuficiência em co-fatores necessários em quantidades suficientes para o processo de desenvolvimento do sistema radicular. Entre eles se destacam as baixas condições fisiológicas expostas nas plantas matrizes em ocasião da baixa umidade e alta temperatura do ambiente em ocasião da alta escassez de chuva na época em que o experimento foi conduzido.

Com relação ao percentual de calejamento, houve a interação entre os fatores estudados. Os substratos esfagno e plantmax HT[®] demonstraram semelhança no percentual de calos desenvolvidos nos alporques em praticamente todas as concentrações do regulador vegetal, com exceção apenas na concentração de 0 e 2000 mg L⁻¹, onde o substrato plantmax HT[®] obteve média significativamente inferior ao substrato esfagno. Verificou-se também que o substrato húmus de minhoca obteve médias intermédias em relação aos demais compostos em praticamente todas as concentrações de AIB. A ausência de regulador e sua presença na

concentração de 9000 mg L⁻¹ proporcionou as maiores médias absolutas com o substrato esfagno (Tabela 2).

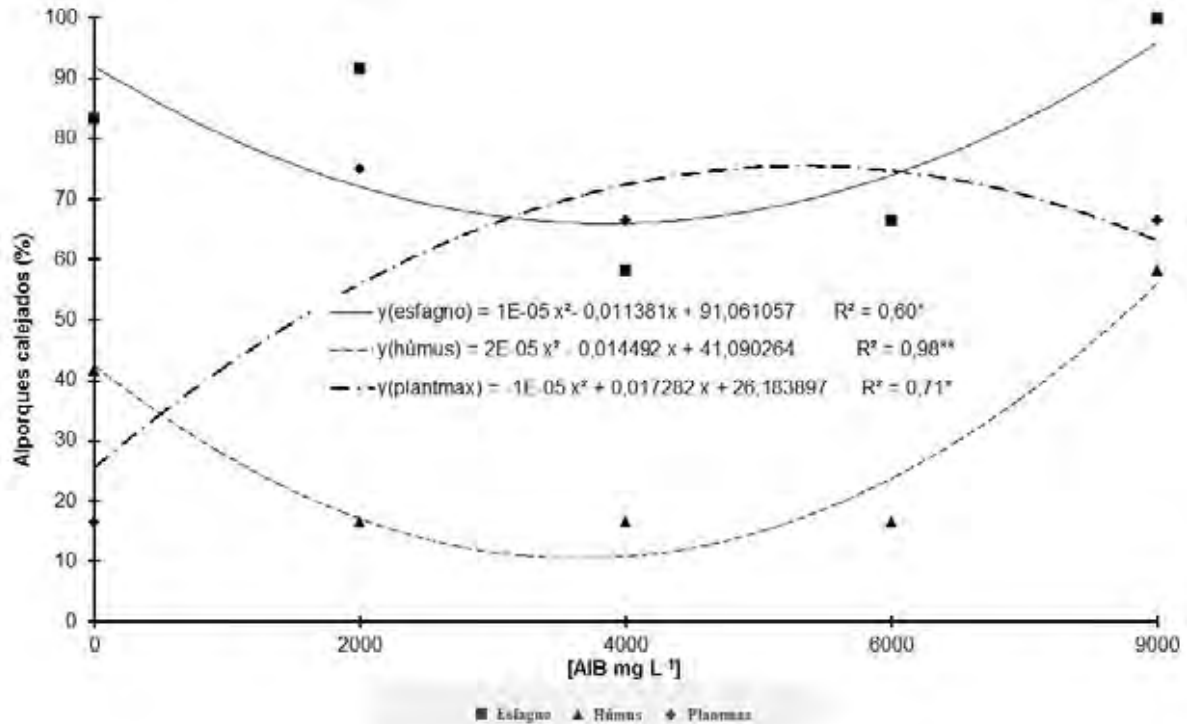
Tabela 2- Desdobramento dos substratos dentro das concentrações de ácido indolbutírico, em função da porcentagem de alporques calejados em mangabeira. Selviria-MS, 2010⁽¹⁾.

| Substrato | Concentrações de AIB (mg L ⁻¹) | | | | |
|--------------------------|--|---------|----------|---------|----------|
| | 0 | 2000 | 4000 | 6000 | 9000 |
| Esfagno | 83,33 a | 81,66 a | 58,32 ab | 66,66 a | 100,00 a |
| Húmus de minhoca | 41,66 ab | 16,66 b | 16,66 b | 16,66 b | 58,32 a |
| Plantmax HT [®] | 16,66 b | 74,99 b | 66,66 a | 66,66 a | 66,66 a |

(1) Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05);

A dependência dos fatores estudados pôde ser verificada através da Figura 3, onde o comportamento polinomial quadrático anormal foi verificado nos alporques recobertos com substratos esfagno e húmus de minhoca, com maior acúmulo de alporques calejados sem a utilização do regulador vegetal e na concentração de 9000 mg L⁻¹. O fato da progressão da porcentagem de calos na concentração de 9000 mg L⁻¹ pode estar ligada na concentração de auxina endógena na planta (ácido indol-acético – AIA), que pode ter sido superada a partir da concentração de 6000 mg L⁻¹ da auxina sintética (AIB), aplicada. Para o substrato plantmax HT[®], verifica-se que o modelo quadrático normal aplicado refletiu em 76,74 % dos alporques calejados, quando da associação com 8500 mg L⁻¹ de AIB. Embora o desenvolvimento de calos na região do anelamento resultou em detrimento na formação de raízes é provável que seja um indício em que a mangabeira possa responder na rizogênese em um período acima de 95 dias após a confecção do alporque. Assim, de maneira geral o tipo de substrato e a auxina sintética utilizada interfere na incidência de calos no alporque, embora tal resultado pode ser influenciado por outros fatores, dentre os quais: estrutura física (macroporosidade, microporosidade, textura, estrutura, densidade, tamanho de partícula, entre outras características) e química (presença de substâncias húmicas e não-húmicas) do substrato e além disso a concentração de auxina endógena na região do anelamento, etc.

Figura 3- Desdobramento das concentrações de ácido indolbutírico dentro de cada substrato, em função da porcentagem de alporques calejados em mangabeira. Selviria-MS, 2010.



(REIS, 2010)

Estes dados corroboram com os encontrados por Oliveira et al. (2008), na propagação via técnica da alporquia em plantas adultas de abacateiro variedade “Duke 7”, verificaram apenas efeito significativo da técnica na geração de tecido caloso. Segundo Fachinello et al. (2005) o fato dos alporques realizados na porção apical terem promovido maior porcentagem de formação de calos, pode estar associada à maior quantidade de reservas contidas nesse fragmento de ramo. Dessa forma ressalta-se que a aplicação da concentração de 9.000 mg L⁻¹ do regulador aliado aos substratos esfagno e húmus de minhoca aceleraram de forma direta a formação da calogênese.

Para a porcentagem de alporques enraizados, verificou-se uma tendência semelhante com a utilização dos três substratos analisados (Tabela 2). Na ausência do regulador, o esfagno foi o que proporcionou a melhor média absoluta, seguido do húmus de minhoca e do plantmax HT[®]. A utilização destes substratos promoveu 25%, 15% e 11,65% de alporques enraizados, respectivamente, na ausência do regulador vegetal.

Dessa forma é possível afirmar que existem hipóteses para explicar o difícil enraizamento da mangabeira, dentre as quais: as plantas de mangabeira neste ensaio não obtiveram boas condições para obtenção de altos níveis no percentual e volume de raízes nos alporques. Dentre esses, destacam-se as condições fisiológicas da planta-matriz (carboidratos nos ramos, auxinas, compostos fenólicos, desbalanço nutricional na planta e no solo, entre outras); idade da planta-matriz, variabilidade genética e fatores do ambiente (alta temperatura aliada à baixa umidade e escassez de chuvas).

6. CONCLUSÕES

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

- A clonagem realizada em mangabeira se mostrou promissora pela técnica da alporquia, apresentando 25% de alporques enraizados.
- Não houve influência das concentrações do ácido indolbutírico e dos substratos em relação ao enraizamento dos alporques nas plantas.

7. REFERÊNCIAS

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C. **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília: Embrapa, 2005. 221 p.

FERREIRA, D. F. Análise estatística por meio do SISVAR (Sistema para Análise de Variância) para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.

FRANCO, C. F.; PRADO, R. M. de; BRAGHIROLI, L. F.; LEAL, R. M.; PEREZ, E. G.; ROMUALDO, L. M. Uso da poda e de diferentes diâmetros de alporques sobre o desenvolvimento e acúmulo de nutrientes de mudas de lichieira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 3, p. 491-494, 2005.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES JUNIOR, F.T.; GENEVE, R.L. **Plant propagation: principles and practices**. 7th ed. New Jersey: Prentice Hall, 2002. 880 p.

HUSEN, A.; PAL, M. Metabolic changes during adventitious root primordium development in *Tectona grandis* Linn. f. (teak) cuttings as affected by age of donor plants and auxin (IBA and NAA) treatment. **New Forests, Dordrecht**, v. 33, n. 1, p. 309-323, 2007.

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.

MINAMI, K.; TESSARIOLI NETO, J.; PENTEADO, S. R.; SCARPARI FILHO, J. A. **Produção de mudas hortícolas de alta qualidade**. Piracicaba: ESALQ/SEBRAE, 1994. 155 p.

OLIVEIRA, I. V. M. et al . Clonagem do abacateiro variedade "Duke 7" (*Persea americana* Mill.) por alporquia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 3, p. 759-763, set. 2008 .

PACHECO, A. C.; CASTRO, P. R. C.; APPEZZETO-DA-GLÓRIA, B. Aspectos anatômicos do enraizamento da videira muscadínia (*Vitis rotundifolia* Michx.) através de alporquia. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 55, n. 2, p. 210-217, 1998.

RODRIGUES, V. R. G. ; CARVALHO, D. A **Plantas medicinais no domínio dos cerrados**. Lavras: UFLA, 2001. 180 p.

SIDLOWSKI, J.J.; PHILLIPS, W.S. ; KUYKENDALL, J.R. Phloem regeneration across girdles of grape vines. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.96, n. 2, p. 97-102, 1971.

CAPITULO II

GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE SEMENTES DE MANGABEIRA

GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE SEMENTES DE MANGABEIRA

1. RESUMO

As dificuldades encontradas no processo de propagação da mangabeira está principalmente relacionadas à baixa taxa de germinação e à recalcitrância das sementes. Dessa forma é de grande valia a busca de soluções alternativas para a produção de mudas dessa espécie, de maneira rápida e eficiente através das técnicas de micropropagação. Este trabalho teve por objetivo determinar as condições mais favoráveis para a germinação *in vitro* de sementes e o desenvolvimento inicial de plântulas de mangabeira. Para o estabelecimento *in vitro*, frutos foram coletados na Fazenda de Pesquisa e Extensão da UNESP, município de Selvíria, MS. As sementes tiveram seus tegumentos removidos para facilitar a germinação e desinfestadas para inoculação em diferentes tipos de meio de cultura para determinação da influência das concentrações salinas sobre o desenvolvimento inicial de plântulas de mangabeira. Após assepsia, as sementes foram inoculadas em tubos de ensaio com dimensões de 250 x 10 mm contendo os seguintes tratamentos: T1- 15 mL de meio MS integral; T2- 15 mL de meio MS integral + 2,0 g L⁻¹ de carvão ativado; T3- 15 mL de meio ½ MS; T4- 15 mL de meio ½ MS + 2,0 g L⁻¹ de carvão ativado. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro tratamentos e seis repetições, sendo cada parcela experimental composta de cinco tubos de ensaio contendo uma semente cada. Avaliou-se a porcentagem de germinação aos 14 dias; plântulas normais, comprimento da parte aérea, comprimento da raiz principal e relação parte aérea/raiz, aos 30 dias após a inoculação. Considerou-se como plântulas normais as plântulas que não apresentavam crescimento atrofiado da parte aérea e/ou do sistema radicular. A formulação salina de ½ MS com adição de 2 g L⁻¹ de carvão ativado ao meio de cultura proporcionou melhores condições para germinação e desenvolvimento da parte aérea e sistema radicular de plântulas de mangabeira.

Palavras chave: *Hancornia speciosa* Gomes. Cultivo *in vitro*. Meio de cultura.

IN VITRO GERMINATION OF SEEDS OF MANGABEIRA

2. ABSTRACT

The difficulties encountered in the process of spread of *Hancornia speciosa* Gomes mostly related to the low germination rate and seed recalcitrance. Thus it is valuable to seek alternative solutions for the production of seedlings of this species, quickly and efficiently through micropropagation techniques. This study aimed to determine the most favorable conditions for in vitro seed germination and early growth of seedlings of *H. speciosa*. To establish in vitro, fruits were collected in the Research and Extension Farm, UNESP, municipality of Selviria, MS. The seeds had their coats removed to facilitate the germination and sterilized prior to inoculation in different types of culture medium to determine the influence of salt concentrations on the early development of seedlings of *Hancornia speciosa* Gomes. After sterilization, the seeds were inoculated in test tubes with dimensions of 250 x 10 mm containing the following treatments: T1-15 mL of MS medium full T2-15 mL of MS medium + full 2.0 g L⁻¹ coal activated, T3-15 mL of ½ MS medium, T4-15 mL of ½ MS medium + 2.0 g L⁻¹ of activated charcoal. The experimental design was completely randomized design with four treatments and six replications, each experimental plot consisted of five test tubes each containing one seed. We evaluated the percentage of germination at 14 days; normal seedlings, shoot length, main root length and relative shoot / root, 30 days after inoculation. Considered as normal seedlings seedlings that did not have stunted growth of shoots and / or root system. The ½ MS salt formulation with the addition of 2 g L⁻¹ of activated charcoal to the culture medium provided better conditions for germination and development of shoot and root of seedlings of *Hancornia speciosa* Gomes.

Keywords: *Hancornia speciosa* Gomes. *In vitro* cultivate. Culture medium

3. INTRODUÇÃO

Pertencente à família Apocynaceae, a mangabeira, originária do Brasil, encontrada em várias regiões, sendo que os Estados da Paraíba, Bahia e Sergipe figuram entre os maiores produtores do país, cujos os frutos são obtidos de forma extrativista (LEDERMAN; BEZERRA, 2006).

A mangabeira produz frutos para o consumo *in natura* e para a industrialização nas formas de polpa, principalmente de sucos, batidas, coquetéis, doces, geleias, sorvetes, licores, vinhos e xaropes. Ainda, pode-se extrair o látex para a borracha, e também tem ampla aplicação na farmacologia, caracterizando seu potencial diversificado de aproveitamento e aplicações, demonstrando forte demanda (FERREIRA et al., 2008).

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

Atualmente a oferta de mangaba não atende à demanda de mercado, em função da colheita ser essencialmente extrativista e da escassez de pomares comerciais. Porém como já confirmado seu potencial agro-sócio-econômico, se faz necessário a busca de melhorias nas técnicas de multiplicação em massa da frutífera, devido principalmente aos baixos percentuais de germinação devido à recalitrância e inibidores presentes na polpa.

O desenvolvimento de técnicas de micropropagação *in vitro* tem dado uma contribuição bastante significativa na fruticultura. A micropropagação tem por finalidade a obtenção de um grande número de plantas uniformes, independente da época do ano. Neste sentido a micropropagação em mangabeira poderá apresentar inovações promissoras para o progresso da cultura.

Por essa razão, a definição de uma metodologia para a micropropagação da mangabeira pode apresentar uma contribuição efetiva no desenvolvimento da cultura, gerando subsídios para o incremento da cadeia produtiva, tornando o Brasil um país auto-suficiente na produção da fruta. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi determinar as condições mais favoráveis para a germinação *in vitro* de sementes e o desenvolvimento inicial de plântulas de mangabeira.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas – LCT/UNESP, localizado no município de Ilha Solteira-SP, no período de 30 dias (01/11/2010 à 30/11/2010). Os frutos foram coletados em plantas matrizes de mangabeira, localizadas na Fazenda de Pesquisa Ensino e Extensão da UNESP, Município de Selvíria-MS. As coordenadas geográficas do local são: 20° 20' 14" de latitude Sul, 51° 24' 17" de longitude Oeste e 375 m de altitude.

Os frutos coletados apresentavam tamanho e peso uniforme e coloração avermelhada, característica da espécie.

As sementes tiveram seus tegumentos removidos para facilitar a germinação e foram desinfestadas com a seguinte sequência de operações: 1- Lavagem com solução detergente a base do composto químico Monolaurato de Sorbitan Etoxilado 20 EO (Tween 20); 2- enxague em água destilada para remoção do detergente; 3- imersão em álcool etílico 70% por 1 minuto, em câmara de fluxo laminar; 4- imersão em hipoclorito de sódio 1% por 10 minutos e 5- dez enxagues com água destilada estéril.

Após desinfestadas, as sementes foram inoculadas em tubos de ensaio com dimensões de 250 x 10 mm contendo os seguintes tratamentos: T1- 15 mL de meio MS integral (Tabela 3); T2- 15 mL de meio MS integral + 2,0 g L⁻¹ de carvão ativado; T3- 15 mL de meio ½ MS; T4- 15 mL de meio ½ MS + 2,0 g L⁻¹ de carvão ativado. O meio de cultura, em todos os tratamentos, foi solidificado com 0,7% de ágar e seu pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 120° C com 1 Kgf. cm⁻² de pressão, durante 20 minutos.

Tabela 3- Composição dos meios de cultura utilizados no experimento para germinação *in vitro* de sementes de mangabeira (MURASHIGE; SKOOG, 1962). Ilha Solteira-SP, 2011.

| Componente | Concentração final (mg L ⁻¹) | |
|---|--|-----------------|
| | MS integral modificado | ½ MS modificado |
| Macronutrientes | | |
| NH ₄ NO ₃ | 1650,00 | 825,00 |
| KNO ₃ | 1900,00 | 950,00 |
| KH ₂ PO ₄ | 340,00 | 170,00 |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 88,00 | 44,00 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 740,00 | 370,00 |
| Micronutrientes | | |
| MnSO ₄ .7H ₂ O | 44,60 | 22,30 |
| ZnSO ₄ .7H ₂ O | 17,20 | 8,60 |
| H ₃ BO ₃ | 12,40 | 6,20 |
| KI | 1,66 | 0,83 |
| Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O | 0,500 | 0,25 |
| CuSO ₄ .5H ₂ O | 0,05 | 0,025 |
| CoCl ₂ .6H ₂ O | 0,05 | 0,025 |
| FeEDTA | | |
| FeSO ₄ .7H ₂ O | 55,70 | 27,85 |
| Na ₂ EDTA.2H ₂ O | 74,50 | 37,25 |
| Vitaminas e aminoácidos | | |
| Tiamina-HCL | 0,50 | 0,25 |
| Piridoxina-HCL | 0,50 | 0,25 |
| Ác. Nicotínico | 0,50 | 0,25 |
| Glicina | 2,00 | 1,00 |
| Mio-inositol | 100,00 | 50,00 |
| Sacarose | 30000,00 | 30000,00 |
| Ágar-Agar | 7000,00 | 7000,00 |
| pH | 5,80 | 5,80 |

As culturas foram mantidas em sala de crescimento a $25\pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura, irradiância de $36\text{ mmol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes do tipo brancas-frias e fotoperíodo de 16 horas.

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos e seis repetições, sendo cada parcela experimental composta de cinco tubos de ensaio contendo uma semente cada.

Foram coletados os seguintes dados biométricos: porcentagem de germinação aos 14 dias; plântulas normais, comprimento da parte aérea, comprimento da raiz principal e relação parte aérea/raiz, aos 30 dias após a inoculação. Considerou-se como plântulas normais as plântulas que não apresentavam crescimento atrofiado da parte e/ou do sistema radicular.

As médias das variáveis foram submetidas à análise de variância pelo teste F e comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. O programa utilizado para as análises estatísticas foi o SISVAR (FERREIRA, 2000).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo do estabelecimento *in vitro* para mangabeira, com as diferentes formulações do meio de cultura foi significativa ao nível de 5 % de probabilidade para as variáveis estudadas, com exceção apenas para a variável plântulas normais, na qual não se observou diferença significativa entre os tratamentos estudados (Tabela 4).

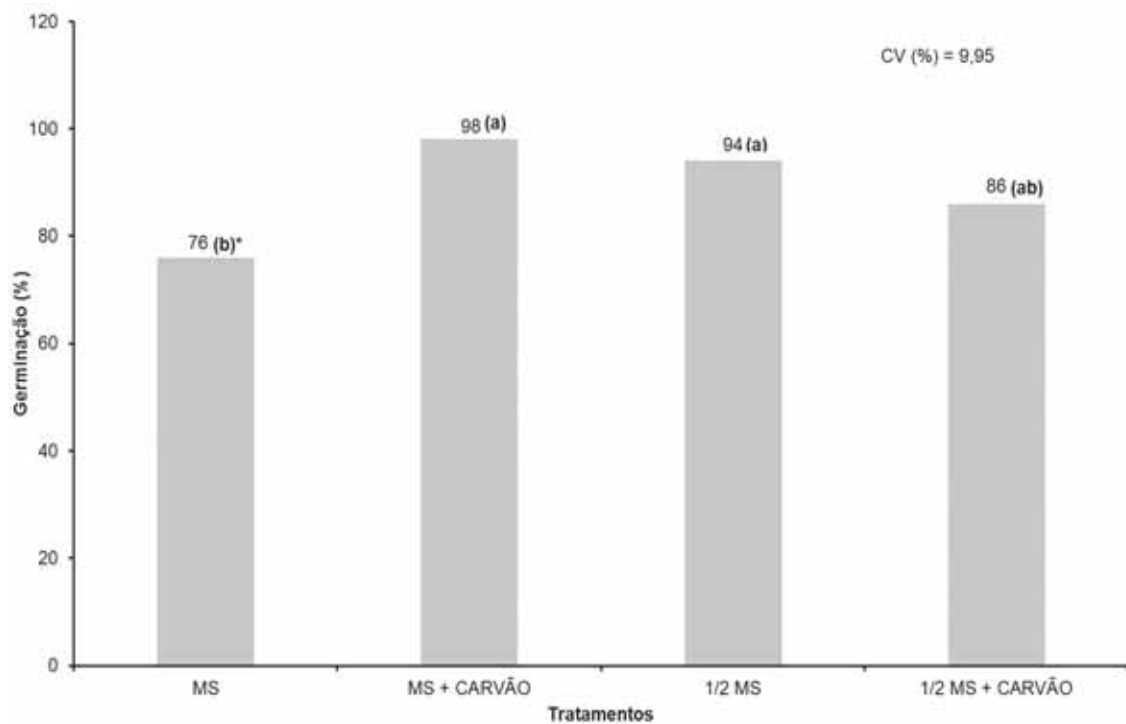
Tabela 4 - Valores de F para porcentagem de germinação (Germ.), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento de raiz (CR), plântulas normais (PN) e relação do comprimento da parte aérea/comprimento da raiz (CPA/CR), em função dos tipos de formulações salinas na germinação *in vitro* de mangabeira. Ilha Solteira-SP, 2011⁽¹⁾.

| FV | GL | Germ. | CPA | CR | PN | CPA/CR |
|-------------|----|--------|---------|-------|--------------------|---------|
| Tratamentos | 3 | 6,08** | 22,52** | 3,38* | 3,13 ^{ns} | 14,79** |
| Erro | 16 | | | | | |
| Total | 19 | | | | | |

(1) *: significativo a 5% de probabilidade; **: significativo a 1% de probabilidade ^{ns}: não significativo.

Foi constatada diferença significativa dos tratamentos para a porcentagem de germinação aos 14 dias (Figura 4). Observou-se que a formulação salina MS integral + 2 g L⁻¹ carvão ativado obteve 98 % das sementes de mangabeira germinadas, porém a mesma não se diferiu estatisticamente das formulações ½ MS e ½ MS + 2 g L⁻¹ de carvão ativado no qual obtiveram 94 e 86 %, respectivamente. A formulação salina MS integral apresentou 76 % das sementes de mangaba inoculadas *in vitro*, embora sendo o menor média percentual, não se verificou diferença significativa para o tratamento com a formulação salina ½ MS + 2 g L⁻¹ de carvão ativado.

Figura 4 - Porcentagem de germinação de plântulas de mangabeira sob diferentes meios de cultivo *in vitro*, aos 14 dias após a inoculação. Ilha Solteira-SP, 2011.



(REIS, 2011)

* Médias seguidas por letras distintas entre parênteses diferem pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Em estudos da germinação em mangabeira sob diferentes meios de cultivo *in vitro*, por Pinheiro et al. (2002) obtiveram 75% de germinação suplementado com 0,1 mg L⁻¹ de ácido giberélico (GA₃). Lemos (2006) e Souza et al. (2006) observaram 62% e 70 % da germinação de sementes de mangabeira inoculadas em Meio MS

integral sólido ou líquido, respectivamente, independente de apresentarem ou não o tegumento.

Machado et al. (2004) observaram 92% de germinação de *in vitro* em meio MS básico sem a adição de regulador de crescimento, em 11 matrizes de mangabeira nativas do cerrado, porém não se verificando diferença significativa entre as mesmas no percentual germinativo.

O percentual de germinação em sementes de mangabeira em viveiro, normalmente é baixo, justificado pela presença de inibidores da germinação na polpa como também ao fato das sementes serem recalcitrantes (LORENZI, 2000). Neste estudo, os percentuais de germinação próximo de 100%, foram obtidas, isto talvez se deva à remoção da polpa do fruto e o tegumento; a rápida inoculação das sementes, evitando a desidratação e mantendo a viabilidade das sementes. A utilização do carvão ativado, como aditivo, tanto na formulação integral ou na sua redução para 50% contribuiu para evitar a oxidação das sementes sobre o meio de cultura e também auxiliar nos processos metabólicos da germinação.

Com relação a variável comprimento da parte aérea, aos 30 dias, observou-se que os meios de cultivo constituído de $\frac{1}{2}$ MS + 2 g L⁻¹ de carvão ativado e MS integral + 2 g L⁻¹ de carvão ativado, apresentaram maior crescimento da parte aérea, 4,33 e 3,34 cm, respectivamente, quando comparados com os demais meios (Tabela 5). Este fato se deve a resposta do efeito benéfico do carvão ativado no sistema radicular, proporcionando um maior alongamento da parte aérea.

As maiores médias de comprimento da parte aérea encontrados nos tratamentos constituídos na sua base na redução de 50% dos sais de MS deveu-se, provavelmente, à diminuição do potencial osmótico promovido pela redução das concentrações de macro e micronutrientes do referido meio. Segundo Premecz et al. (1978), elevadas pressões osmóticas reduzem o crescimento e afetam o metabolismo celular. Grattapaglia e Machado (1990) afirmam que o meio MS completo não tem se mostrado satisfatório em alguns casos, para espécies lenhosas e que composições mais diluídas, podem apresentar melhores resultados.

Quanto ao comprimento da raiz principal, observou-se que os meios de cultura proporcionaram crescimento semelhante dos tecidos radiculares. O tratamento 2, constituído pela metade dos sais de MS obteve a menor média absoluta, 1,99 cm, porém o mesmo não se diferenciou dos tratamentos 1 e 3, constituídos pelos meios MS integral e MS integral + 2 g L⁻¹ de carvão ativado.

Segundo Maldaner et al. (2006), os níveis de nutrientes orgânicos e inorgânicos nos meios de cultivo *in vitro* influenciam em vários processos metabólicos apresentando efeito sobre o crescimento e diferenciação dos tecidos. Portanto, a redução da concentração dos sais em 50% apresentou efeito positivo na média absoluta pertencente ao crescimento do sistema radicular.

A presença do carvão ativado em concentrações de 0,1 a 2% pode ser benéfica em alguns casos. O carvão permite fisicamente simular a condição de escuro, no qual as raízes normalmente se desenvolvem melhor para a redução da incidência de luz na zona de crescimento ativo do sistema radicular, além de adsorver substâncias tóxicas, no caso, fenóis e/ou quinonas que podem afetar o desenvolvimento do explante (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Tabela 5 - Médias das variáveis comprimento da parte aérea (CPA) e raiz (CR) (cm), porcentagem de plântulas normais (PN) e relação do comprimento da parte aérea e raiz (CPA/CR) de plântulas de mangabeira sob diferentes meios de cultivo *in vitro*, aos 30 dias após a inoculação. Ilha Solteira-SP, 2011⁽¹⁾.

| Tratamentos | CPA cm | CR cm | PN % | CPA/CR - |
|-------------|-----------|----------|--------------------|-------------|
| T-1 | 0,39 c | 2,32 ab | 98 | 0,18 b |
| T-2 | 2,60 b | 1,99 b | 74 | 1,30 a |
| T-3 | 3,34 ab | 2,55 ab | 78 | 1,35 a |
| T-4 | 4,33 a | 2,78 a | 80 | 1,56 a |
| F | 22,52** | 3,38* | 3,13 ^{ns} | 14,79** |
| CV(%) | 29,6 | 16,88 | 16,26 | 32,8 |

(1) *Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. ^{ns}: não significativo; *Significativo (p<0,05) e ** Significativo (p<0,01). T-1: MS integral; T-2: 1/2 MS integral; T-3: MS integral + 2g L⁻¹ de carvão ativado; T-4: 1/2 MS integral + 2g L⁻¹ de carvão ativado.

Nos resultados de plântulas normais, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos, aos 30 dias após a inoculação. Os tratamentos constituídos com a redução de 50% dos sais de MS ou com a associação de carvão ativado ao meio induziram ao maior aparecimento de plântulas apresentando anormalidade na estrutura física do sistema radicular e/ou parte aérea (Tabela 5).

A relação comprimento da parte aérea e raiz observou-se um desenvolvimento desbalanceado e significativo em todos os tratamentos. As maiores relações foram estatisticamente semelhantes nos tratamentos 2, 3 e 4, demonstrando superioridade em relação ao tratamento 1. Por outro lado, a superioridade encontrada para o comprimento da parte aérea pode estar ligado ao aditivo carvão ativado utilizado na constituição do meio de cultivo. A redução da incidência de luz que o carvão provocou no meio de cultivo, proporcionou um desenvolvimento na zona de crescimento radicular e alongamento da parte aérea (Tabela 5). Pode-se visualizar na Figura 5, o aspecto geral do processo de germinação *in vitro* e desenvolvimento das plântulas de mangabeira.

Figura 5 - Aspecto visual das plântulas de mangabeira desenvolvidas em (A) MS integral, (B) MS integral + 2g L⁻¹ de carvão ativado, (C) ½ MS integral, (D) ½ MS integral + 2 g L⁻¹ de carvão ativado. Ilha Solteira, SP-2011.



(REIS, 2011)

Portanto, os resultados obtidos demonstraram a eficiência da utilização do meio de cultura com redução da concentração salina a 50% e com adição de carvão ativado ao meio, proporcionando melhores condições para a germinação e crescimento inicial *in vitro* de mangabeira. A aplicação de tais resultados poderão ser utilizados nas estratégias de micropropagação *in vitro* de mangabeira, assim como para obtenção de porta-enxertos em trabalhos relacionados à microenxertia.

6. CONCLUSÕES

- A formulação salina de $\frac{1}{2}$ MS com adição de 2 g L^{-1} de carvão ativado ao meio de cultura proporcionou melhores condições para germinação e desenvolvimento da parte aérea e sistema radicular de plântulas de mangabeira.

7. REFERÊNCIAS

- FERREIRA, D. F. Análise estatística por meio do SISVAR (Sistema para Análise de Variância) para windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.
- FERREIRA, E. G.; GUERRA, A. G.; MENINO, I. B.; ALVES, R. E. **Mangaba: diagnóstico da cadeia produtiva nos Estados da Paraíba e Rio Grande do Norte.** João Pessoa: EMEPA/CNPQ, 2008. 64p. (Documentos, 55).
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. L.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas.** Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990. p. 99-170.
- 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. v. 1, p. 183-260.
- 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.
- 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. S. (Ed.). **A cultura da mangaba.** Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2006. p. 125-133.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**, 3. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2000. v. 1, 352 p.
- MACHADO, L. L.; RAMOS, M. L. G.; CALDAS, L. S.; VIVALDI, L. J. Seleção de matrizes e clones de mangabeira para o cultivo in vitro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 5, p. 431-435, maio de 2004.
- MALDANER, J.; NICOLOSO, F. T.; SANTOS, E. S. dos; FLORES, R.; SKREBSKY, E. C. Sacarose e nitrogênio na multiplicação in vitro de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 4, p. 1201-1206, jul./ago.2006.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Suécia, v. 15, n. 1, p. 473-479, 1962.
- 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. p. 55-72

PREMECZ, G.; RUZICKSKA, P.; OLAH, T.; FARKAS, G. L. Effect of 'osmotic stress' on protein and nucleic acid synthesis in isolated tobacco protoplasts. **Planta**, Berlin, v. 141, n. 1, p. 33-36, 1978.

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

CAPITULO III

INDUÇÃO DE BROTAÇÕES EM MICROESTACAS DE MANGABEIRA TRATADAS COM 6-BENZILAMINOPURINA (BAP) E ÁCIDO α -NAFTALENOÁCETICO

INDUÇÃO DE BROTAÇÕES EM MICROESTACAS DE MANGABEIRA TRATADAS COM 6-BENZILAMINOPURINA (BAP) E ÁCIDO α -NAFTALENOÁCETICO

1. RESUMO

A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) possui grande potencial como planta frutífera. A propagação sexuada é prejudicada devido à recalcitrância presente nas sementes, o que torna evidente a necessidade da obtenção de mudas via propagação assexuada. Neste contexto, o cultivo *in vitro* apresenta-se como uma alternativa para ser utilizada. O objetivo deste trabalho foi induzir a brotação *in vitro* de mangabeira através do tratamento de microestacas com BAP e ANA. Para obtenção das brotações, microestacas contendo duas gemas laterais foram inoculadas em meio de cultura WPM, suplementado com diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina - BAP (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L⁻¹), ácido α -naftalenoácetico - ANA (0,0; 0,5; 1,0 e 1,5 mg L⁻¹) e sacarose à 3%. O meio foi solidificado com 0,7% de ágar e seu pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 120°C com 1 Kgf cm⁻² de pressão, durante 20 minutos. Após a inoculação dos segmentos, os mesmos foram mantidos em sala de crescimento a 25±2°C de temperatura, irradiância de 36 mmol m⁻² s⁻¹, fornecida por lâmpadas fluorescentes do tipo branca-frias e fotoperíodo de 16 horas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5 x 4, com 8 repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por um frasco. Após 40 dias foram avaliados os seguintes dados biométricos: número de brotações, número de gemas, comprimento da maior brotação, presença de calos na base dos explantes, diâmetro do calo e taxa de multiplicação. A utilização do BAP foi eficiente na indução de multibrotações em microestacas de mangabeira. A concentração de 3 mg L⁻¹ possibilita a obtenção de brotações mais desenvolvidas, porém induz também a formação de calos na base dos explantes. A adição de ANA ao meio de cultura é dispensável na multiplicação *in vitro* de microestacas de mangabeira.

Palavras chave: *Hancornia speciosa* Gomes. Reguladores vegetais. Meio de cultura. Cultura de tecido.

SHOOT INDUCTION MICROSHOOTS MANGABEIRA IN TREATED WITH 6-BENZYLAMINOPURINE (BAP) AND A-NAPHTHALENEACETIC ACID (NAA)

2. ABSTRACT

The mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) has great potential as fruitful plant. The sexual propagation is impaired because of this recalcitrant seeds, which makes evident the need for obtaining plants via asexual propagation. In this context, the in vitro culture presents itself as an alternative to be used. The objective of this study was to induce sprouting in vitro by treating mangabeira micropiles with BAP and NAA. To obtain the shoots, micro-containing two lateral buds were inoculated in WPM medium supplemented with different concentrations of 6-benzylaminopurine - BAP (0.0, 1.0, 2.0, 3.0 and 4.0 mg L⁻¹), α -naphthaleneacetic acid - ANA (0.0, 0.5, 1.0 and 1.5 mg L⁻¹) and sucrose at 3%. The medium was solidified with 0.7% agar and pH was adjusted to 5.8 before autoclaving at 120 ° C with 1 kgf cm⁻² pressure for 20 minutes. After inoculation of the segments, they were kept in growth room at 25 \pm 2 ° C temperature, irradiance of 36 mmol m⁻² s⁻¹, provided by fluorescent cool-white type and a photoperiod of 16 hours. The experimental design was completely randomized in a factorial 5 x 4, with 8 replicates per treatment, with each replicate consisting of a bottle. After 40 days we assessed the following biometric data: number of shoots, number of buds, length of shoots, presence of callus at the base of the explants, callus diameter and rate of multiplication. The use of BAP was effective in inducing in multibrotações microshoots speciosa. The concentration of 3 mg L⁻¹ allows to obtain more developed shoots, but also induces the formation of callus at the base of the explants. The addition of NAA to the culture medium is dispensable for in vitro multiplication of microshoots mangabeira.

Keywords: *Hancornia speciosa* Gomes. Growth regulators. Culture medium. Tissue culture.

3. INTRODUÇÃO

A mangabeira é considerada uma frutífera que vem ganhando aos poucos espaço no mercado pela qualidade e sabor único que seus frutos possuem. No entanto, o extrativismo apresenta-se atualmente como única forma de exploração da espécie.

A necessidade de plantios comerciais tem sido prejudicada pelo insucesso da propagação via sementes, em função da sua recalcitrância e também pela propagação vegetativa por estaquia. A produção de mudas de alta qualidade de baixo custo para a formação de pomares é evidente e necessário para a manutenção e restringir a erosão genética da espécie.

A partir das técnicas de cultura de tecidos vegetais tem sido uma das contribuições de grande aproveitamento para o avanço das técnicas de propagação de plantas. A micropropagação é uma técnica alternativa, com a finalidade de obtenção de um grande número de plantas uniformes, independente da época do ano.

Dessa forma o objetivo deste trabalho foi a obtenção de multibrotações *in vitro* a partir de microestacas de mangabeira submetidas a diferentes concentrações de BAP e ANA.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Plântulas obtidas da germinação *in vitro* (Capítulo II) com 60 dias de idade foram utilizadas como fonte de explantes para este experimento.

Segmentos caulinares contendo até duas gemas laterais foram inoculados em meio de cultura WPM (Tabela 6), suplementado com diferentes concentrações de BAP (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L⁻¹), ANA (0,0; 0,5; 1,0 e 1,5 mg L⁻¹ e sacarose à 3%. O meio foi solidificado com 0,7% de ágar e seu pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 120°C com 1 Kgf cm⁻² de pressão, durante 20 minutos.

Tabela 6 - Composição do meio de cultura Wood Plant Medium (WPM), utilizado no experimento para multiplicação *in vitro* de microestacas de mangabeira (LLOYD; MCCOWN, 1980). Ilha Solteira-SP, 2011.

| Componente | Concentração final (L L ⁻¹) |
|--|--|
| | WPM integral |
| Macronutrientes | |
| NH ₄ NO ₃ | 400,00 |
| KH ₂ PO ₄ | 170,00 |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 96,00 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 370,00 |
| Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O | 556,00 |
| K ₂ SO ₄ | 990,00 |
| Micronutrientes | |
| MnSO ₄ .7H ₂ O | 22,30 |
| ZnSO ₄ .7H ₂ O | 8,60 |
| H ₃ BO ₃ | 6,20 |
| Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O | 0,25 |
| CuSO ₄ .5H ₂ O | 0,25 |
| FeEDTA | |
| FeSO ₄ .7H ₂ O | 27,85 |
| Na ₂ EDTA.2H ₂ O | 37,25 |
| Vitaminas e aminoácidos | |
| Tiamina-HCL | 1,00 |
| Piridoxina-HCL | 0,50 |
| Ác. Nicotínico | 0,50 |
| Glicin | 2,00 |
| Mio-inositol | 100,00 |
| Sacarose | 30000,00 |
| Ágar-Agar | 7000,00 |
| pH | 5,80 |

Após a inoculação dos segmentos em frascos com 128 mL, contendo 30 mL de meio, os mesmos foram mantidos em sala de crescimento a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ de temperatura, irradiância de $36\text{ mmol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes do tipo branca-frias e fotoperíodo de 16 horas. Após 40 dias de cultivo foram avaliados o número de brotações e gemas por explante, o comprimento da maior brotação com auxílio de uma régua graduada e a presença de calos na base dos explantes, número de folhas, diâmetro do calo e taxa de multiplicação.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial (5×4 , em relação ao uso de BAP e ANA), com 8 repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por um frasco.

As médias das variáveis foram submetidas à análise de variância pelo teste F. As concentrações de BAP e ANA foram submetidas à análise de regressão e determinação do coeficiente de determinação ao nível de significância fixado em 5%. O programa utilizado para as análises estatísticas foi o SISVAR (FERREIRA, 2000). Dados sobre a variável altura foram transformados segundo a raiz de $x + 1$, bem como quando necessário, os coeficientes de variação foram transformados segundo a raiz de $x + 1$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O efeito das diferentes concentrações de BAP e ANA sobre os parâmetros de avaliação no alongamento e multiplicação de mangabeira foram significativos, considerando-se um nível de significância fixado com 5% (Tabela 7). Foi verificada a interação dos reguladores de crescimento para as variáveis, número de gemas e taxa de multiplicação. Por outro lado, a adição de BAP e ANA no meio de cultura não influenciou significativamente na altura das microestacas de mangabeira.

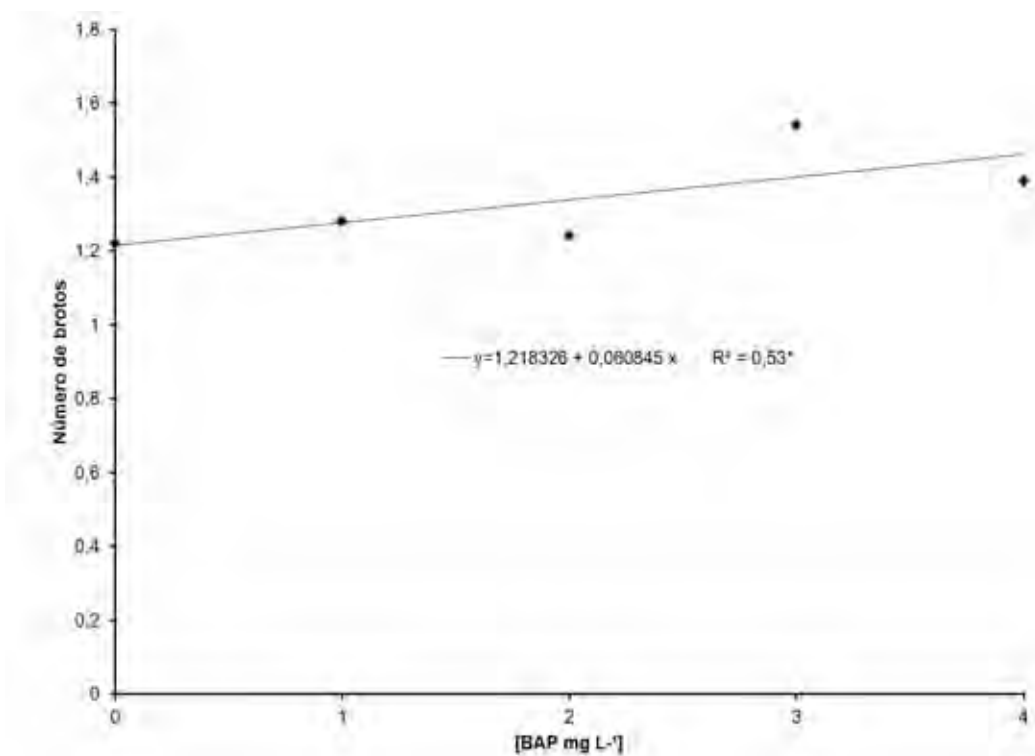
Tabela 7 - Médias e valores de F das variáveis número de brotos, número de folhas, número de gemas, altura (cm), porcentagem de formação de calo, diâmetro do calo e taxa de multiplicação, em função das concentrações de 6- Benzilaminopurina (BAP) e Ácido α -Naftalenoacético (ANA), na multiplicação de microestacas de mangabeira. Ilha Solteira-SP, 2011.

| Tratamentos | Nº Brotos | Nº Folhas | Nº Gemas | Altura (cm) ⁽¹⁾ | Formação de calo (%) | Diâmetro calo (mm) | Taxa de multiplicação |
|---|----------------------|----------------------|--------------------|----------------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|
| 6- Benzilaminopurina (mg L⁻¹) | | | | | | | |
| 0 | 1,22 | 0,87 | 2,12 | 1,05 | 0,00 | 0,00 | 1,06 |
| 1 | 1,28 | 1,58 | 2,58 | 1,26 | 37,50 | 4,07 | 1,29 |
| 2 | 1,24 | 2,62 | 3,08 | 1,21 | 33,33 | 4,40 | 1,54 |
| 3 | 1,54 | 8,45 | 5,66 | 1,31 | 45,83 | 3,45 | 2,83 |
| 4 | 1,39 | 4,08 | 3,16 | 1,17 | 41,66 | 4,83 | 1,58 |
| Ácido Naftalenoacético (mg L⁻¹) | | | | | | | |
| 0 | 0,93 | 3,30 | 3,80 | 1,21 | 0,00 | 0,00 | 1,90 |
| 0,5 | 1,53 | 4,43 | 3,00 | 1,14 | 26,66 | 2,25 | 1,50 |
| 1 | 0,93 | 4,36 | 3,93 | 1,27 | 53,33 | 6,32 | 1,96 |
| 1,5 | 0,53 | 2,00 | 2,56 | 1,18 | 46,66 | 4,84 | 1,28 |
| Teste F | | | | | | | |
| 6- Benzilaminopurina (BAP) | 2,83* | 5,88** | 5,50** | 1,65 ^{ns} | 5,36** | 3,79** | 5,50** |
| Ácido Naftalenoacético (ANA) | 2,57 ^{ns} | 1,05 ^{ns} | 1,55 ^{ns} | 0,88 ^{ns} | 11,48** | 9,83** | 1,55 ^{ns} |
| BAP X ANA | 0,93 ^{ns} | 1,85 ^{ns} | 2,01** | 0,99 ^{ns} | 1,43 ^{ns} | 1,60 ^{ns} | 2,01* |
| C.V. (%) | 31,52 ⁽¹⁾ | 59,08 ⁽¹⁾ | 86,23 | 29,25 ⁽¹⁾ | 90,67 ⁽¹⁾ | 55,65 ⁽¹⁾ | 86,31 |
| Média Geral | 0,98 | 3,52 | 3,32 | 1,21 | 31,66 | 3,35 | 1,66 |

*: significativo a 5%; **: significativo a 1% e ns: não significativo; (1) Valores transformados para raiz quadrada de (X+ 1).

Para a variável número de brotos, apesar de não haver diferenças significativas entre os tratamentos quando os explantes foram inoculados em meio de cultura WPM adicionado ANA, verifica-se na Figura 6 o comportamento linear do número de brotações, em função das concentrações crescentes de BAP adicionada ao meio de cultura WPM. Assim, as menores percentagens de brotações ocorrem quando não se adicionou BAP ao meio de cultura (1,2 brotos explante⁻¹), e na máxima concentração utilizada 1,46 brotos explante⁻¹.

Figura 6 - Número de brotos laterais de mangabeira, em função de concentrações de BAP. Ilha Solteira-SP, 2011.



(REIS, 2011)

O resultado em número de brotações citados acima não corroboram com os de Fonseca et al. (2003), que obtiveram o maior número de brotações de mangabeira com as concentrações de 1,0 e 2,0 mg L⁻¹ de BAP. E com a utilização de 4,0 mg L⁻¹ de BAP esses autores observaram uma redução em até quatro vezes a indução de novos brotos.

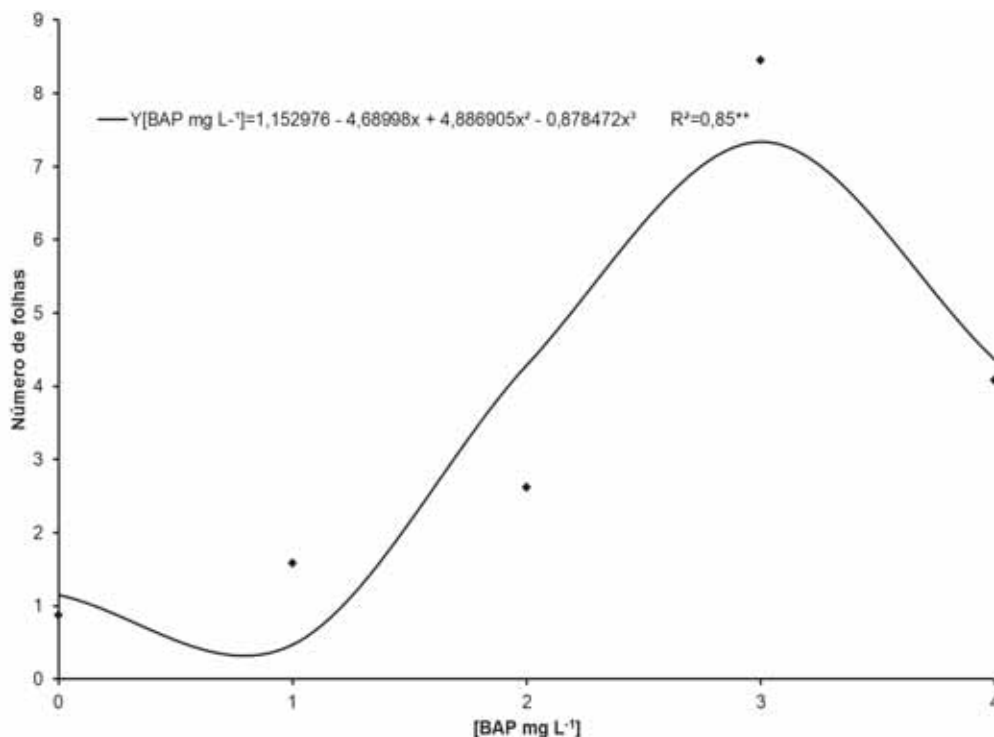
Segundo Brum et al. (2002) a multiplicação de brotações com BAP pode estar relacionada com a influência da carga genética da planta matriz e do regulador

vegetal utilizado para o auxílio da divisão celular e na quebra de dormência das gemas axilares, até então inibidas pela dormência apical.

Para Nogueira (2003), ao contrário, concentrações acima de $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ dessa citocinina não foram eficientes na indução de brotos axilares em segmentos nodais de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.).

Para a variável número de folhas verificou-se que não houve interação significativa entre as concentrações de BAP e ANA, porém á medida que as concentrações de BAP foram aumentadas observou-se aumento no número de folhas (Figura 7) até o valor de 8,45 folhas, quando se utilizou 3 mg L^{-1} de BAP e na ausência de ANA. A partir desse ponto houve redução, provavelmente devido ao efeito fitotóxico do regulador de crescimento BAP.

Figura 7 - Número de folhas de mangabeira, em função das concentrações de BAP. Ilha Solteira-SP, 2011.



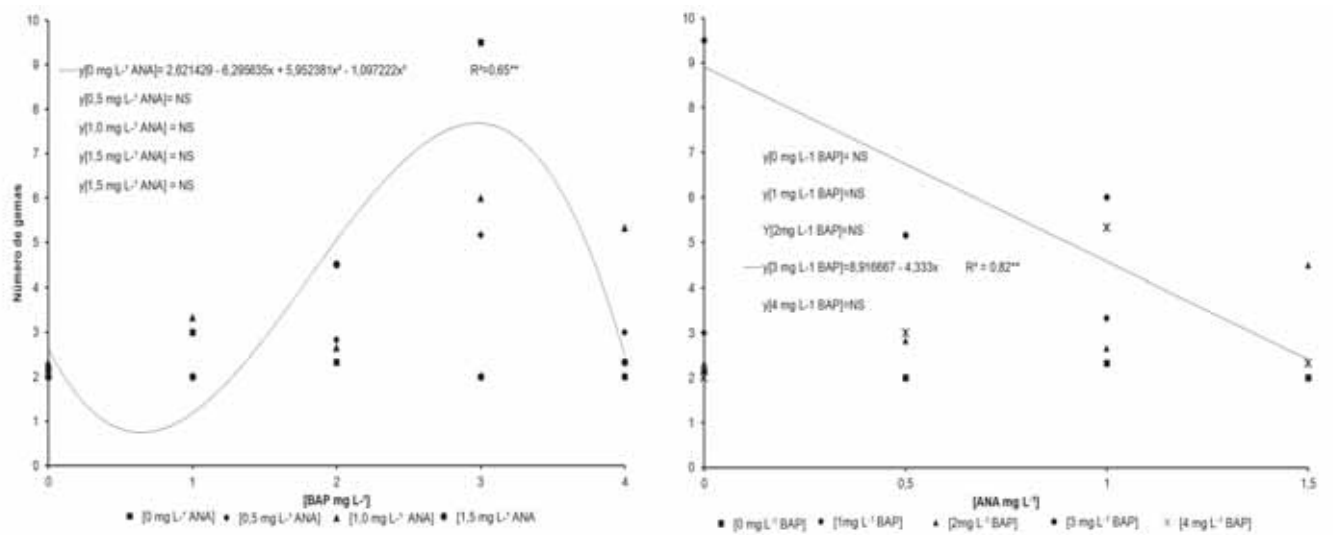
(REIS, 2011)

Segundo Paiva e Aloufa (2009), o BAP tem sido muito eficaz para promover a multiplicação de diversas espécies e é a citocinina utilizada por excelência para

multiplicação de partes aéreas e indução de gemas adventícias e consequentemente no aumento de folhas.

Quanto ao número de gemas, houve interação entre os reguladores de crescimento utilizados. Na Figura 8, verificou-se que no desdobramento da análise de regressão foi identificado que a presença das microestacas de mangabeira em meio WPM suplementando com 3 mg L^{-1} de BAP sem a presença de ANA resultou na formação de 9,5 gema explante⁻¹. Por outro lado, concentrações acima de 3 mg L^{-1} de BAP e a presença da auxina (ANA) ao meio, ocorreu um decréscimo na indução de gemas.

Figura 8 - Desdobramento da interação das concentrações BAP x ANA no número de gemas de mangabeira. Ilha Solteira-SP, 2011.



(REIS, 2011)

De acordo com Santos (2004), testando a indução de brotações de segmentos nodais de pequiheiro, verificou decréscimo do número de gemas a partir da concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP. Para Pasqual e Barros (1992), o melhor resultado para proliferação de gemas em segmentos nodais de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* Mart.), foi dada pela concentração de 4 mg L^{-1} de BAP.

Trabalhando com sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides* Kunth), Silveira et al. (1996) observaram que segmentos caulinares dessa espécie, quando inoculados em meio de cultura suplementado com $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP, produziam, em média, 10 brotos, enquanto que em $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP, o mesmo tipo de explante produzia quatro brotos.

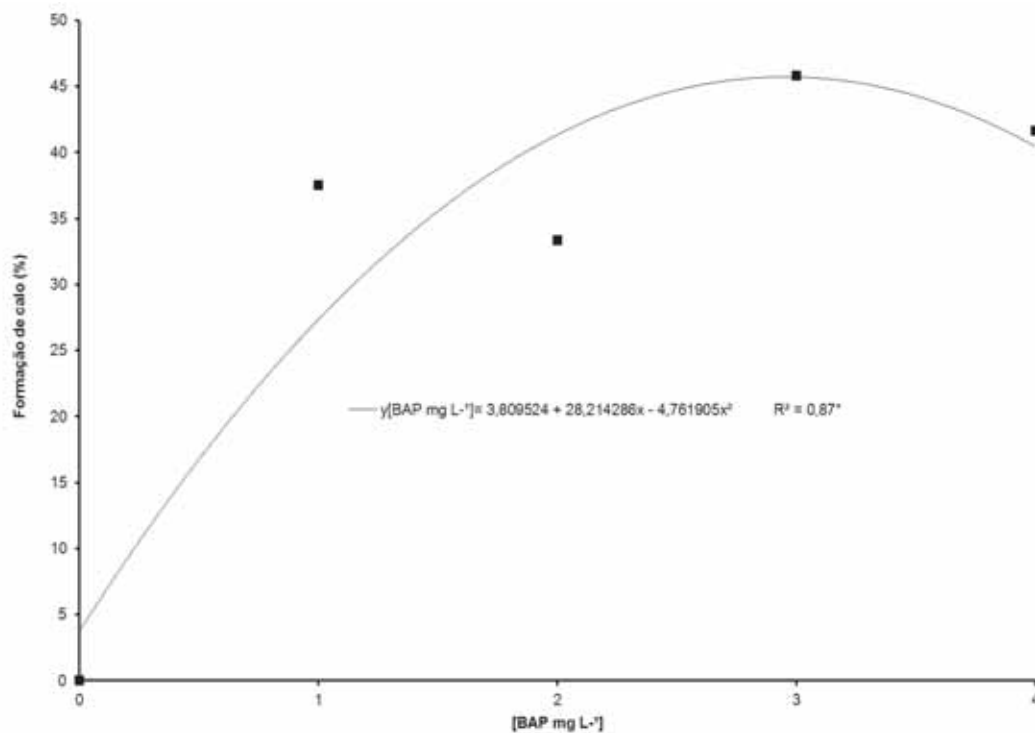
Em relação ao uso de diferentes formulações salinas, Amaral (2006) cita que as formulações salinas de MS ou WPM não afetaram a multiplicação em microestacas de cedro (*Cedrela fassilis*), mas que a presença de $5 \text{ } \mu\text{M}$ de BAP favoreceu o aumento do número de gemas laterais. O mesmo autor também testou diferentes concentrações de BAP em interação com $0,5 \text{ } \mu\text{M}$ da auxina ANA, e de acordo com os resultados, a adição de auxina também não promoveu resultado significativo para a multiplicação em cedro.

No que se refere às espécies que não necessitam da adição de reguladores de crescimento vegetal para o desenvolvimento *in vitro*, Blank et al. (2008), testaram diferentes concentrações de BAP ($0,0$; $0,1$; $0,5$; $1,0$; $2,0$ e $4,0 \text{ mg L}^{-1}$) a fim de determinar qual a melhor concentração desta citocinina para a indução de gemas laterais no alecrim-pimenta (*Lippia siloides*). Os autores afirmam que o tratamento testemunha proporcionou a formação do maior número de brotações e que a adição de BAP foi desnecessária para propagação *in vitro* desta espécie.

Para a micropropagação da babosa (*Aloe vera*), Debiasi et al. (2007) estudaram diferentes concentrações de BAP para a determinação de um protocolo que permitisse a formação do maior número de brotos, e de acordo com os autores, o tratamento isento de BAP favoreceu a uma maior taxa de multiplicação, com a formação de 2,5 brotos por explantes. Segundo estes autores, espécies que aumentam as taxas de multiplicação quando cultivadas na ausência de reguladores vegetais provavelmente possuem concentrações endógenas de reguladores vegetais adequadas ao desenvolvimento de novas brotações. Para tais espécies, a adição exógena de reguladores vegetais desequilibra as concentrações endógenas.

Para a formação de calos, em estudo isolado dos reguladores de crescimento, verificou-se que as microestacas cultivadas em meio de cultura de WPM na presença de $2,96 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP resultaram numa percentagem máxima estimada em 45,6%. A partir deste ponto, uma tendência de queda dessa variável resposta foi verificada (Figura 9).

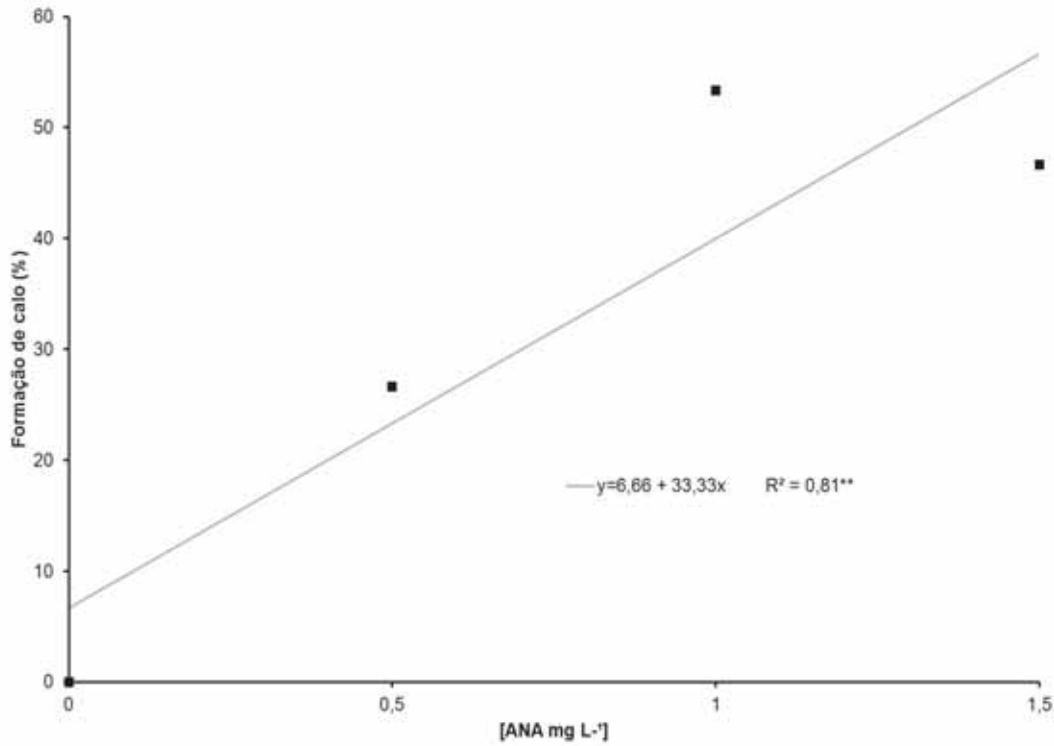
Figura 9 - Percentagem de calo formado em microestacas de mangabeira, em função das concentrações de BAP. Ilha Solteira, 2011.



(REIS, 2011)

Por outro lado, quando da adição de ANA ao meio de cultura, o comportamento das concentrações do regulador para com a percentagem de formação de calos foi linear, o que resultou em 56,65 % de calos formados em função da concentração máxima utilizada $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA. Ressalta-se também que a auxina promoveu um aumento percentual em 24,25% da formação de calos em relação a citocinina (Figura 10).

Figura 10 - Porcentagem de calo formado em microestacas de mangabeira, em função das concentrações de ANA. Ilha Solteira, 2011.



(REIS, 2011)

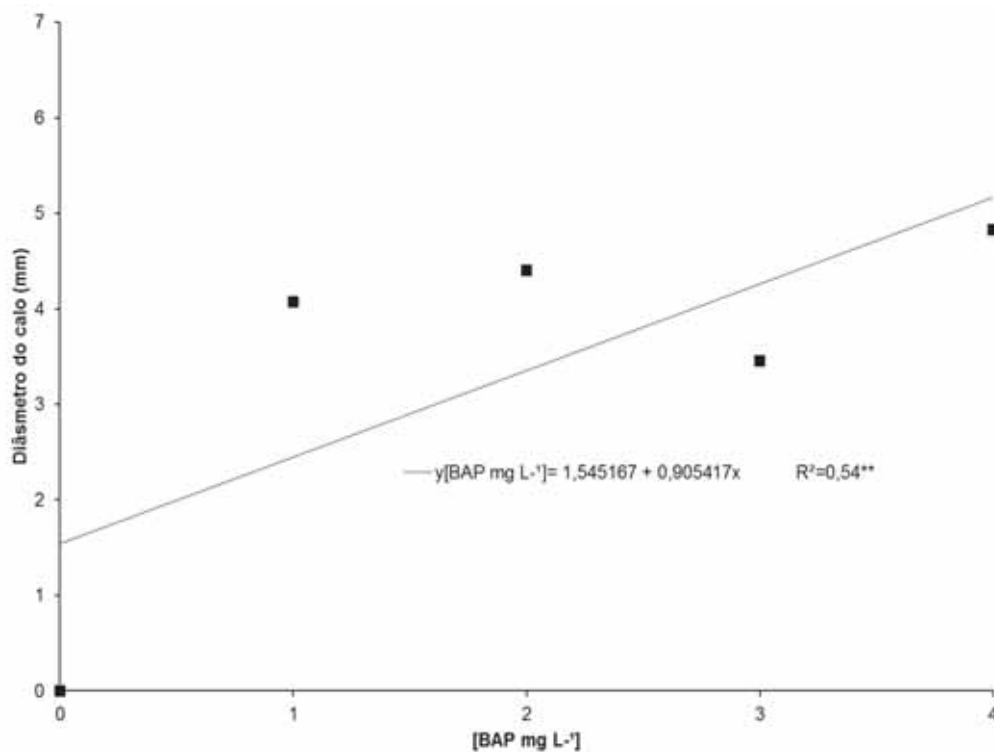
Corroborando com Fráguas (2003), que trabalhando com a figueira 'Roxo de Valinhos', encontrou maior peso da matéria fresca (1,672 g) de calos basais de explantes caulinares, utilizando o meio de cultura WPM, suplementado com 4,0 mg L⁻¹ de BAP. Soares (2003), em trabalho com *Inga vera* subsp. *Affinis*, observou que o BAP estimulou rigorosamente a formação de calos em segmentos caulinares. As concentrações de 6,0; 9,0 e 12,0 mg L⁻¹ do regulador promoveram percentuais entre 70 e 80% de formação de calos. Para Nogueira (2003), a concentração de 8,0 mg L⁻¹ de BAP proporcionou a maior ocorrência de calos em brotações de murici-pequeno (*Byrsonimia intermedia* A. Juss), em aproximadamente 90%.

Avaliando as respostas morfogênicas de diferentes explantes cultivados *in vitro*, Léo 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 promoveu uma boa formação

de calos em segmentos nodais, com a proliferação de brotações adventícias após 45 dias.

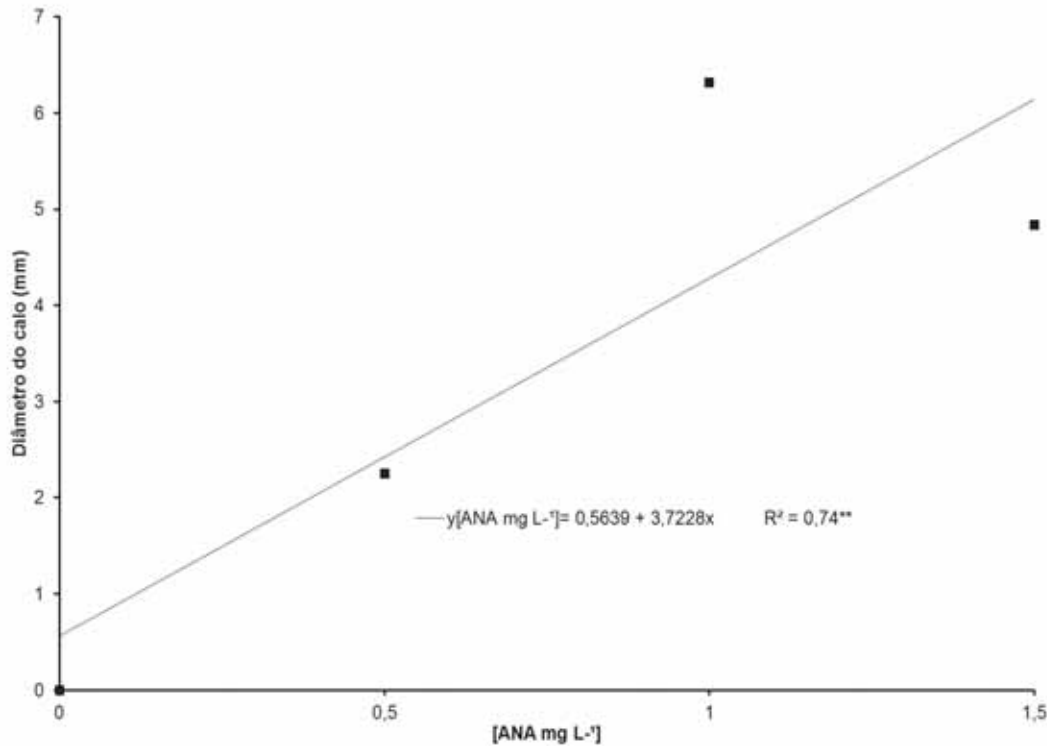
Não houve efeito significativo para a interação entre os reguladores de crescimento (BAP e ANA), porém, houve efeito significativo das concentrações isoladas dos reguladores para o diâmetro do calo. Dessa forma à medida que as concentrações de BAP e ANA aumentaram, o diâmetro dos calos basais também aumentaram. O estudo independente das concentrações máximas de BAP (4,0 mg L⁻¹) e ANA (1,5 mg L⁻¹), resultaram nos diâmetros estimados de 5,16 e 6,19 mm, respectivamente para citocina e auxina endógena adicionada ao meio de cultivo *in vitro* (Figura 11 e 12).

Figura 11 - Diâmetro do calo formado em microestacas de mangabeira, em função das concentrações de BAP. Ilha Solteira-SP, 2011.



(REIS, 2011)

Figura 12 - Diâmetro do calo formado em microestacas de mangabeira, em função das concentrações de ANA. Ilha Solteira-SP, 2011.

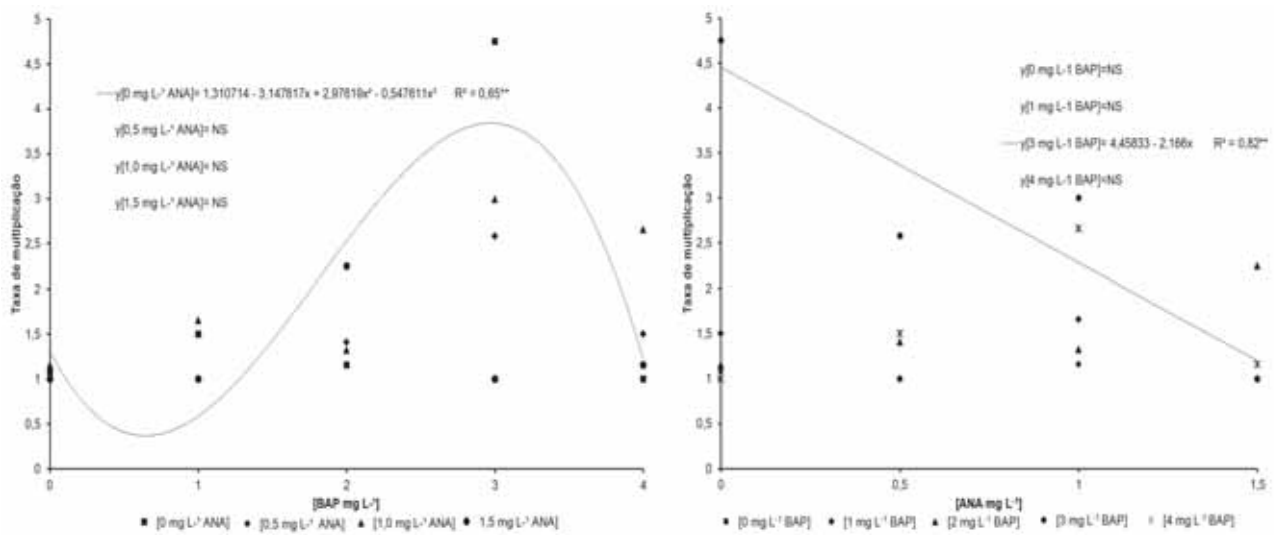


(REIS, 2011)

Segundo Torres e Caldas (1990), o calo é considerado uma massa de células não organizadas, em crescimento desordenado e irregularmente diferenciadas. A maior possibilidade de variações somaclonais a partir de calo pode ser importante para os trabalhos de melhoramento de plantas, mas indesejável na clonagem de plantas através do cultivo *in vitro*. De acordo com Grattapaglia e Machado (1998), o ANA é muito utilizado em meio de estabelecimento, mas, se adicionado em concentrações pouca acima das ótimas, pode estimular a formação de calo.

Para a taxa de multiplicação verificou-se resposta significativa para a interação entre os reguladores de crescimento utilizados. De maneira geral, o melhor resultado para a multiplicação de microestacas de mangabeira foi com a utilização de BAP na concentração de 3 mg L⁻¹, sem a adição conjunta de ANA ao meio de cultura para multiplicação de explantes. A taxa de multiplicação máxima estimada obtida foi igual a 4,0:1 (Figura 13).

Figura 13 - Desdobramento da interação das concentrações BAP x ANA na taxa de multiplicação de mangabeira. Ilha Solteira-SP, 2011.



(REIS, 2011)

Em trabalho reportado por Saha et al. (2004), utilizando diferentes variedades de mamão e em diferentes meios contendo BAP e ANA, obtiveram resultados superiores a uma taxa de multiplicação de 8,3:1, para a variedade 'Washington', e para as outras variedades esta taxa foi de 6,16:1, 5,9:1 e 4,14:1, para 'Co-5', 'Madhur' e 'Pusa Dwarf', respectivamente, o que assemelha aos encontrados neste trabalho. No entanto, os autores não identificaram quantos subcultivos foram utilizados.

Neste experimento, verificou-se que o uso do BAP, na concentração de 3 mg L^{-1} , ocasionou a formação de multibrotações, muitas vezes com a presença de calos na base do explante, viável para a produção de material propagativo de qualidade a partir do uso de microestacas de mangabeira. Por outro lado, também sugere, para a determinação de taxas de multiplicação a partir de microestacas de mangabeira, o cultivo em meio de cultura isento da adição da auxina ANA, já que os maiores valores encontrados nas variáveis analisadas, principalmente, número de brotos e taxa de multiplicação foi obtido a partir de microestacas cultivadas em meio livre de ANA.

O aspecto das brotações de mangabeira *in vitro* pode ser observado na Figura 14. Nesta figura, pode-se perceber, nas concentrações de 3 mg L^{-1} de BAP e $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA, a presença de multibrotações e calejamento basal.

Figura 14 - Aspecto visual de brotações de mangabeira obtidas em segmentos caulinares inoculadas em meio WPM suplementado com 3 mg L⁻¹ de BAP e 0,5 mg L⁻¹ de ANA. Ilha Solteira-SP, 2011.



(REIS, 2011)

6. CONCLUSÕES

- A utilização do BAP é eficiente na indução de multibrotações em microestacas de mangabeira.
- A concentração de 3 mg L⁻¹ de BAP possibilita a obtenção de brotações mais desenvolvidas, porém induz também a formação de calos na base dos explantes.
- A adição de ANA ao meio de cultura é dispensável na multiplicação *in vitro* de microestacas de mangabeira.

7. REFERÊNCIAS

- AMARAL, V. F. M. **Multiplicação *in vitro* de *Cedrela fissilis* Vell.** 2006. 79 f. Dissertação (Mestrado em Silvicultura)- Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.
- BLANK, A. F.; COSTA, A. S.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; MENDONÇA, A. B.; LEDO, A. S. *In vitro* establishment of pepper-rosmarin nodal segments. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 2, p. 255-258, 2008.
- BRUM, G. R.; SILVA, A. B.; PASQUAL, M. Efeito de diferentes concentrações de BAP e ANA na propagação *in vitro* da figueira (*Ficus carica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 2, p. 1403-1409, 2002.
- DEBIASI, C.; SILVA, C. G.; PESCADOR, R. Micropropagação de babosa (*Aloe vera* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 9, n. 1, p. 36-43, 2007.
- FERREIRA, D. F. Análise estatística por meio do SISVAR (Sistema para Análise de Variância) para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.
- FONSECA, F. K. P.; LEMOS, E. E.; OLIVEIRA, J. G. L.; ALENCAR, L. M. C. 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, Aracajú. **Anais...** Aracajú: EmbrapaTabuleiros costeiros, 2003a. CD-ROM. Seção Resumos Expandidos
- FRÁGUAS, C. B. **Micropropagação e aspectos da anatomia foliar da figueira 'Roxo de Valinhos' em diferentes ambientes.** 2003. 110 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003. p. 45-52
- 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. v. 1, p. 183-260.
- 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. **Anais...** Fortaleza: Ed. Horticultura Brasileira, v. 23, p. 622-623, 2005. Suplemento.
- LLOYD, G.; MC COWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. **HortScience**, Alexandria, v. 15, n. 3, p. 416, June 1980.
- NOGUEIRA, R. C. **Propagação *in vitro*, análises anatômicas e bioquímicas de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.).** 2003. 88 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

PAIVA, A. M. S.; ALOUFA, M. A. I. Estabelecimento *in vitro* de aroeira da praia (*Schinus terebinthifolius* Raddi) em diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 11, n. 3, p. 300-304, 2009.

PASQUAL, M.; BARROS, I. de. Efeito do ácido naftaleno acético e da 6-benzilaminopurina sobre a proliferação de brotos *in vitro* em barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 7, p. 1017-1019, jul. 1992.

SAHA, M.; PHATAK, A.; CHANDRA, N. *In vitro* culture studies in four dioecious varieties of *Carica papaya* L. using axillary buds from field-grown plants. **Journal of Tissue Research**, [S.l.]; v. 4, n. 2, p. 211-214, 2004.

SANTOS, B. R. **Otimização da propagação *in vitro* de pequi (Caryocar brasiliense Camb.)**. 2004. 239 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

SILVEIRA, C. E.; CALDAS, L. S.; AMARAL, L. I. V. Efeito de 6-benzilaminopurina na proliferação *in vitro* de brotos de *Bowdichia virgilioides* Kunth (sucupira-preta). In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 47., 1996, Nova Friburgo. **Resumos...** Nova Friburgo: Sociedade Botânica do Brasil, 1996. p. 436.

SOARES, G. A. **Aspectos do cultivo *in vitro* do ingazeiro [*Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC) T. D. Penn.]**. 2003. 90 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP, EMBRAPA-CNPq, 1990. 433p.

CAPITULO IV

APLICAÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO INDOL-3-BUTÍRICO (AIB) NO ENRAIZAMENTO DE MICROESTACAS DE MANGABEIRA

APLICAÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO INDOL-3-BUTÍRICO (AIB) NO ENRAIZAMENTO DE MICROESTACAS DE MANGABEIRA

1. RESUMO

A micropropagação *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 alto potencial de uso imediato entre as fruteiras nativas do cerrado, porém a propagação sexuada via sementes e a propagação assexuada via estaquia tem apresentado limitações, tornando-se indispensável o desenvolvimento de métodos alternativos de propagação para a exploração racional da cultura. O presente trabalho teve como objetivo avaliar diferentes concentrações do ácido indol-3-butírico (AIB) no enraizamento de microestacas de mangabeira. As brotações obtidas *in vitro* foram inoculadas em meio WPM contendo diferentes concentrações de AIB (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L⁻¹). Para inibição da oxidação utilizou-se no meio, como aditivo, o carvão ativado a 0,1%, por 15 dias. Decorrido este período as microestacas foram transferidas para o mesmo meio, porém sem a presença de reguladores vegetais. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 15 repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por um frasco com volume de 128 mL. Após 40 dias foram avaliados os seguintes dados biométricos: formação de raízes (%) e número de raízes. O meio de cultura WPM quando suplementado com 1,86 mg L⁻¹ de AIB induziu o enraizamento de 54,7% de microestacas de mangabeira cultivadas *in vitro*. Concentrações de AIB acima da recomendada ocasionou o efeito inibitório da rizogênese nas microestacas de mangabeira.

Palavras chave: *Hancornia speciosa* Gomes. Micropropagação. Regulador vegetal. Meio de cultura WPM.

APPLICATION OF DIFFERENT CONCENTRATIONS OF ACID INDOL-3-BUTYRIC ACID (IBA) ON ROOTING OF MICROSHOOTS MANGABEIRA

2. ABSTRACT

The in vitro micropropagation has been adopted as a complementary technique to conventional methods of vegetative propagation of several species. Mangabeira is a native plant that has a high potential for immediate use among the native fruits of the cerrado, but sexual propagation via seeds and vegetative propagation via cuttings has shown limitations, making it essential to develop alternative methods of propagation for the rational exploitation culture. This study aimed to evaluate different concentrations of indol-3-butyric acid (IBA) on rooting of microshoots speciosa. The shoots obtained in vitro were inoculated in WPM containing different concentrations of IBA (0.0, 1.0, 2.0, 3.0 and 4.0 mg L⁻¹). Inhibition of oxidation was used in the middle, as an additive, the activated carbon to 0.1% for 15 days. After this period microcuttings were transferred to the same medium but without the presence of plant growth regulators. The experimental design was completely randomized design with 15 replications per treatment, with each replicate consisting of a bottle with a volume of 128 mL. After 40 days we assessed the following biometric data: root formation (%) and number of roots. the culture medium when WPM supplemented with 1.86 mg L⁻¹ IBA induced rooting of 54.7% of microshoots mangabeira cultivated in vitro. AIB concentrations above the recommended caused the inhibitory effect of rooting in microshoots mangabeira.

Keywords: *Hancornia speciosa* Gomes. Micropropagation. Growth regulator. WPM culture medium.

3. INTRODUÇÃO

Dentre as técnicas de cultura de tecidos vegetais, a micropropagação é a mais largamente utilizada especialmente para a produção de mudas em espécies frutíferas, ou com algum potencial de interesse econômico. A micropropagação é uma técnica capaz de proporcionar a produção de um elevado número de plantas, em curto espaço de tempo e de alta qualidade genética e fitossanitária (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Devido a erosão genética e conseqüente diminuição da diversidade genética de mangabeira, é crescente a preocupação com relação à forma de extração e a conservação dos recursos genéticos ainda disponível no Cerrado brasileiro.

A mangabeira apresenta sua propagação sexuada dificultada pelo fato de suas sementes serem recalcitrantes e porque a polpa do fruto tem uma ação inibitória sobre a germinação destas.

Estudos com regulador vegetal que favoreçam o enraizamento *in vitro* desta espécie, é importante, tanto para maximizar o enraizamento, como para obter plântulas com qualidade genética e fitossanitária adequada, como também como fonte de explantes.

Dessa forma o objetivo do presente trabalho foi avaliar diferentes concentrações do ácido indol-3-butírico (AIB) no enraizamento de microestacas de mangabeira.

4. MATERIAL E MÉTODOS

As brotações obtidas *in vitro* foram inoculadas em meio WPM contendo diferentes concentrações de AIB (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L⁻¹). O meio foi solidificado com 0,25% de Fitigel[®] e seu pH foi ajustado a 5,8. Para inibição da oxidação utilizou-se no meio, como aditivo, o carvão ativado a 0,1%.

A inoculação foi realizada em frascos contendo 30 mL de meio e mantidos em sala de crescimento a 25±2°C de temperatura, na ausência de luz, por 15 dias. Decorrido esse período, os explantes foram transferidos para o mesmo meio de cultura, porém sem a presença de reguladores vegetais e aditivos. Após 40 dias foram avaliados os seguintes dados biométricos: formação de raízes (%) e número de raízes.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 5 tratamentos, 15 repetições, sendo cada repetição composta por um frasco.

As médias das variáveis foram submetidas à análise de variância pelo teste F. As concentrações de AIB foram submetidas à análise de regressão e determinação do coeficiente de determinação ao nível de significância fixado em 5%. O programa utilizado para as análises estatísticas foi o SISVAR (FERREIRA, 2000).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a Tabela 8, observa-se que ocorreu diferença significativa com relação às concentrações de AIB utilizadas. Constatou-se que as concentrações da auxina somente apresentou significância para a variável porcentagem de enraizamento. Para a variável número de raízes, não foram verificadas diferenças estatísticas entre os tratamentos utilizados.

Tabela 8 - Valores de F para a porcentagem de enraizamento e número de raízes em microestacas de mangabeira cultivadas *in vitro* sob diferentes concentrações de AIB. Ilha Solteira-SP, 2011⁽¹⁾.

| FV | GL | Enraizamento (%) | Número de raízes |
|-----------|-----------|-------------------------|-------------------------|
| AIB | 4 | 2,53* | 2,42 ^{ns} |
| Erro | 70 | | |
| Total | 74 | | |

(1)*:significativo a 5% de probabilidade; ^{ns}: não significativo.

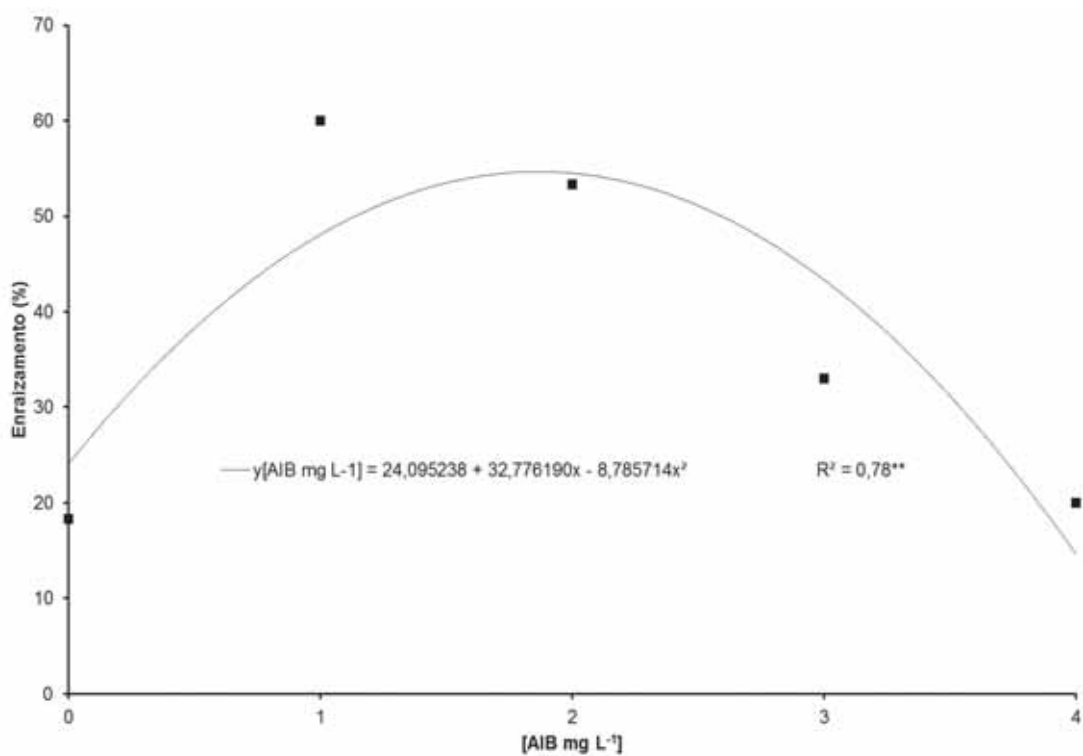
Com relação à porcentagem de enraizamento nota-se pela Figura 16, houve resposta quanto ao modelo de regressão, polinomial quadrático. As microestacas cultivadas em meio WPM contendo a concentração máxima estimada em 1,86 mg L⁻¹ de AIB apresentaram 54,7% das microestacas enraizadas (Figura 15).

Figura 15 - Aspecto visual de brotações de mangabeira enraizadas em meio WPMPM, suplementado com $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB. Ilha Solteira-SP, 2011.



(REIS, 2011)

Figura 16 - Porcentagem de enraizamento de microestacas de mangabeira cultivadas *in vitro* sob diferentes concentrações de AIB. Ilha Solteira-SP, 2011.



(REIS, 2011)

Para o número de raízes, as concentrações de AIB utilizadas nesse experimento não proporcionaram diferenças significativas, porém a maior média absoluta encontrada foi de 1,4 raízes explante⁻¹.

Segundo Wang e Anderson (1988), o AIB é a auxina sintética mais comumente utilizada na indução de enraizamento. Assim, por apresentar a propriedade de promover a formação de primórdios radiculares, este regulador tem sido utilizado principalmente para induzir o enraizamento de numerosas espécies vegetais.

Certas espécies, principalmente as lenhosas, enraízam com dificuldade ou não enraízam, mesmo na presença de auxinas e algumas espécies até dispensam o uso de reguladores de crescimento no seu enraizamento (ROHR ; HANUS, 1987).

Cuzzuol et al.,(1996) testaram diferentes concentrações de AIB (0,0; 0,25; 0,5 e 1,0 mg L⁻¹) na formação de raízes em cravo (*Dianthus caryophyllus*). Os autores relatam que as concentrações de AIB testadas não diferiram estatisticamente da testemunha, com todas as plantas apresentando formação de raízes.

Oposto a esses resultados, Soares et al. (2007) observaram que o AIB induziu a formação de raízes em brotações de mangabeira somente na concentração de 3 mg L⁻¹.

Decetti (2000), utilizando diferentes concentrações de AIB no meio de cultura, concluiu que o melhor enraizamento de segmentos nodais de *Annona glabra* foi obtido na ausência deste regulador, em plantas cultivadas na presença de luz. Por outro lado, Nogueira (2003), trabalhando com murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss), o AIB não se mostrou eficiente na indução de raízes.

Neste experimento de enraizamento, as microestacas de mangabeira quando cultivadas em meio WPM com a concentração plena dos sais, adicionado a 1,86 mg L⁻¹ de AIB, não apresentaram a formação de calos na base dos explantes, e ao mesmo tempo, este tratamento foi o responsável pela maior percentagem de enraizamento do experimento.

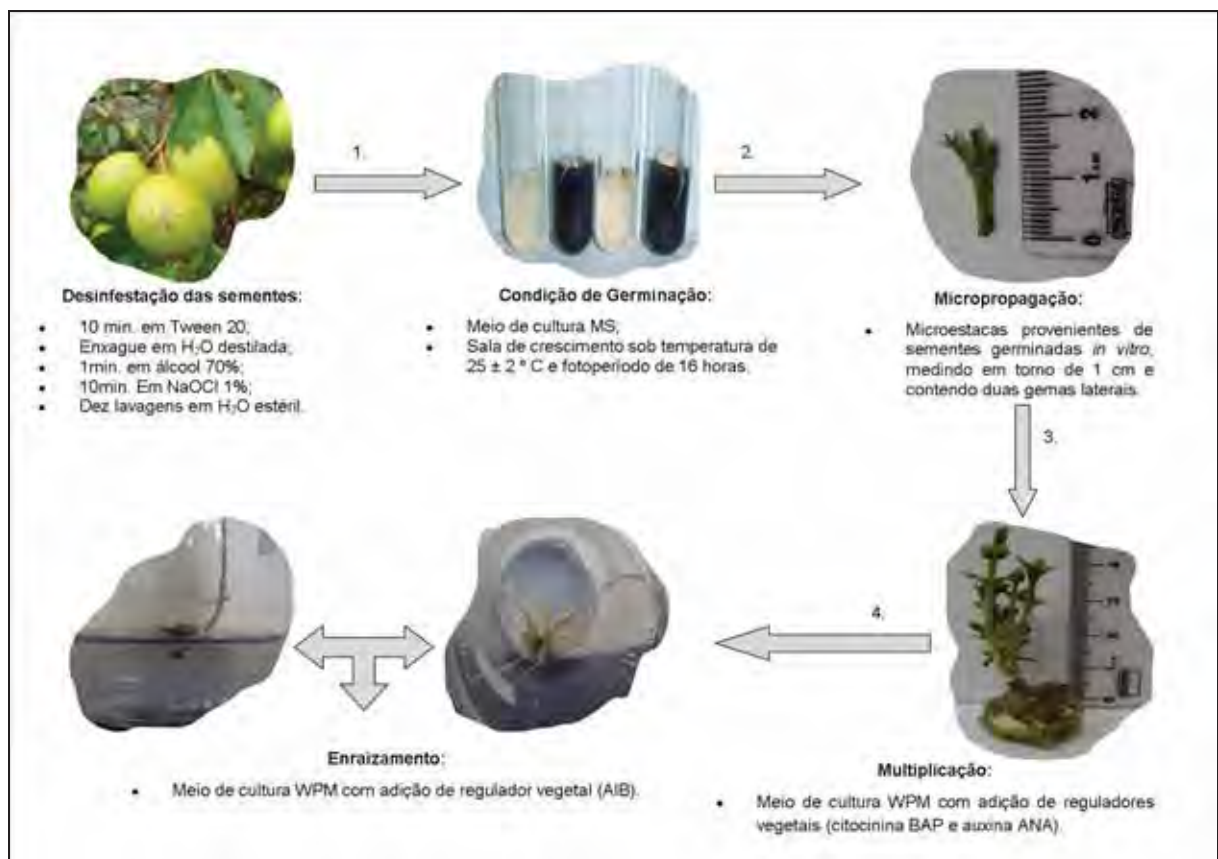
Em estudo do enraizamento *in vitro* de macieira (*Malus domestica* Borkh). Centellas et al. (1999), observaram resultados contrários ao deste trabalho, havendo a formação de calos na base das microestacas quando estas foram cultivadas em meio contendo auxinas.

Apesar da formação de calos não ser um fator desejável, ele nem sempre pode ocasionar perdas no desenvolvimento do explante, porém o desenvolvimento

exagerado do tecido caloso na base do explante pode impedir a formação de raízes, absorção de nutrientes e água, podendo provocar perdas por morte na etapa de aclimatização.

De acordo com os dados obtidos nas diferentes fases de micropropagação, desenvolveu-se o seguinte protocolo para micropropagação de mangabeira (Figura 17):

Figura 17 - Representação esquemática do protocolo para micropropagação de mangabeira, utilizando microestacas provenientes de sementes germinadas *in vitro*. 1. Desinfestação e assepsia das sementes; 2. As sementes foram germinadas em meio MS e mantidas em sala de crescimento sob temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas; 3. As microestacas provenientes das sementes germinadas *in vitro* foram cultivadas em meio de cultura de WPM para plantas lenhosas, com adição da citocinina BAP e auxina ANA; 4. As microestacas foram submetidas a troca de meio de cultura para proporcionar o enraizamento em meio de cultura WPM contendo auxina AIB. Ilha Solteira-SP, 2011.



(REIS, 2011)

6. CONCLUSÕES

- O meio de cultura WPM quando suplementado com $1,86 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB induziu o enraizamento de 54,7% de microestacas de mangabeira cultivadas *in vitro*.
- Concentrações de AIB acima de $1,86 \text{ mg L}^{-1}$ ocasionaram o efeito inibitório da rizogênese nas microestacas de mangabeira.

7. REFERÊNCIAS

- CENTELLAS, A. Q.; FORTES, G. R. L.; MÜLLER, N. T. G.; ZANOL, G. C.; FLORES, R.; GOTTINARI, R. A. Efeito de auxinas sintéticas no enraizamento *in vitro* da macieira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 2, p. 181-186, 1999.
- CUZZUOL, G. R. F.; GALLO, L. A.; CROCOMO, O. J. Enraizamento de cravo (*Dianthus caryophyllus* L.) *in vitro* e *ex vitro*. **Scientia agrícola**, Piracicaba, v. 53, n. 1, p. 60-66, 1996.
- DECETTI, S. F. C. **Propagação *in vitro* de *Annona glabra* L.** 2000. 101f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal)– Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.
- FERREIRA, D. F. Análise estatística por meio do SISVAR (Sistema para Análise de Variância) para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, 1998. v. 1, p. 183-260.
- NOGUEIRA, R. C. **Propagação *in vitro*, análises anatômicas e bioquímicas de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.)**. 2003. 88 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal)– Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.
- ROHR, R.; HANUS, D. Vegetative propagation of wavy grain sycamore maple. **Canadian Journal of Foresty Research**, Ottawa, v. 17, n. 5, p. 418-420, 1987.
- SOARES, F. P.; PAIVA, R.; CAMPOS, A. C. A. L.; PORTO, J. M. P.; NOGUEIRA, R. C.; STEIN, V. C. Germinação de sementes de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) em diferentes Substratos. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p.1180-1182, 2007.
- WANG, Q.; ANDERSON, A. S. Propagation of *Hibiscus rosa-sinensis*: relations between stock plant, age, environment and growth regulator treatments. **Acta horticulture**, Wageningen, v.245, n. 227, p. 167-169, 1988.

CAPITULO V

CALOGÊNESE A PARTIR DE SEGMENTOS FOLIARES E CAULINARES DE MANGABEIRA SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE 2,4-D E BAP

CALOGÊNESE A PARTIR DE SEGMENTOS FOLIARES E CAULINARES DE MANGABEIRA SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE 2,4-D E BAP

1. RESUMO

A mangabeira é uma planta frutífera nativa do Brasil e é encontrada vegetando espontaneamente em várias regiões do país, desde a região Centro-oeste até as regiões Norte e Nordeste, onde apresenta grande importância devido a utilização de seu fruto, a mangaba, para a produção de polpas que servem para a comercialização de sucos e sorvetes. A propagação da mangabeira mais utilizada é via sementes, porém em função da recalcitrância presente nas sementes impossibilita a produção de mudas em grande quantidade da frutífera. A propagação vegetativa por meio da estaquia também não se consolidou, em função do baixo percentual de enraizamento. O objetivo deste trabalho foi a obtenção de calos friáveis a partir de segmentos foliares e caulinares de mangabeira sob diferentes concentrações de 2,4-Diclorofenociacético (2,4-D) e 6- Benzilaminopurina (BAP). Realizou-se dois experimentos a partir de segmentos foliares e internodais de aproximadamente 1 cm², provenientes de plantas micropropagadas *in vitro*, foram utilizados como explantes. Os explantes foram cultivados em meio WPM integral suplementado com 2,4-D e BAP nas concentrações de 0,0; 1,0; 2,0 e 3,0 mg L⁻¹. O meio de cultura, para todos os tratamentos, foi solidificado com 0,25% de fitagel e seu pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso, em esquema fatorial 4 x 4, sendo cada explante avaliado isoladamente quanto as concentrações testadas. Cada tratamento foi formado por quatro repetições e quanto aos explantes: quatro para segmentos foliares e dois para segmentos intermodais. Após 4 semanas da inoculação foi efetuada a avaliação do experimento considerando-se : a percentagem de explantes formando calo friável e explantes não desenvolvidos ou mortos. Os segmentos foliares e internodais de mangabeira apresentaram 93,01% e 100% na formação de calos friáveis quando cultivados em meio WPM suplementado com 1,64 mg L⁻¹ de 2,4-D + 1,0 mg L⁻¹ de BAP e 2 mg L⁻¹ de 2,4-D + 2,36 mg L⁻¹ de BAP, respectivamente.

Palavras chave: *Hancornia speciosa* Gomes. Apocynaceae. Cultura de tecido. Regulador vegetal. Organogênese indireta.

CALLOGENESIS FROM LEAF SEGMENTS OF MANGABEIRA AND KAOLIN UNDER DIFFERENT CONCENTRATIONS OF 2,4-D AND BAP

2. ABSTRACT

The mangabeira fruit is a plant native to Brazil and is found vegetating spontaneously in various parts of the country, from the Mid-west to the North and Northeast, which has great importance because the use of its fruit, mangaba to produce pulp for use in the marketing of juices and smoothies. The spread of mangabeira most used is via seed, but due to the recalcitrance present in the seeds prevents the production of seedlings in large quantities of fruit. Vegetative propagation by cuttings is also not consolidated, due to the low percentage of rooting. The objective of this study was to obtain friable callus from leaf and stem segments of mangabeira under different concentrations of 2,4-Diclorofenociacético (2,4-D) and 6 - benzylaminopurine (BAP). We conducted two experiments from leaf and internodal segments of approximately 1 cm², from in vitro micropropagated plants were used as explants. The explants were cultured in WPM supplemented with complete 2,4-D and BAP at concentrations of 0.0, 1.0, 2.0 and 3.0 mg L⁻¹. The culture medium for all treatments was solidified with 0.25% fitagel and its pH adjusted to 5.8 before autoclaving. The experimental design was completely randomized in factorial scheme 4 x 4, each explant singled as the concentrations tested. Each treatment consisted of four replicates and how to explants: four leaf segments and two segments for intermodal. After 4 weeks of inoculation was conducted to evaluate the experiment considering: the percentage of explants forming callus explants and undeveloped Friable or killed. The leaf and internodal segments showed the Mangabeira 93.01% and 100% in the formation of friable callus when cultured in WPM supplemented with 1.64 mg L⁻¹ 2,4-D + 1.0 mg L⁻¹ BAP and 2 mg L⁻¹ 2,4-D + 2.36 mg L⁻¹ BAP, respectively.

Keywords: *Hancornia speciosa* Gomes. Apocynaceae. Tissue culture. Growth regulator. Organogênese indirect.

3. INTRODUÇÃO

A mangabeira é uma frutífera nativa do Brasil de grande potencial sócio-econômico. Por ser uma espécie silvestre sua exploração é basicamente realizada pelo extrativismo, um risco para sua sobrevivência e uma grande barreira ao aproveitamento de todas as suas vantagens.

Por ainda não ser uma planta domesticada, a mangabeira se caracteriza pela propagação sexuada e por produzir heterogêneos. Por outro lado, em estudos já concluídos desta espécie, indicam que suas sementes são recalcitrantes, o que limita a obtenção de pomares comerciais. A propagação vegetativa por estacas, também não se consolidou em função do baixo percentual de enraizamento.

As técnicas de cultura de tecidos vegetais têm sido de grande utilidade na resolução de diversos problemas de várias culturas, pois tratam-se de importantes ferramentas para o melhoramento, clonagem, multiplicação de plantas em larga escala e obtenção de plantas livres de patógenos.

A multiplicação do material vegetal, por meio da micropropagação, pode ser realizada por meio da proliferação de gemas axilares, mediante indução de gemas adventícias, segmentos foliares, caulinares (passando pela fase de calo) e via embriogênese somática (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A mangabeira possui características de germinação que impossibilita grande escala de produção de mudas, porém diante das diversas técnicas que já se consolidaram para a propagação de plantas, a cultura de tecidos poderá ser em breve, uma aliada para a propagação da mangabeira. A obtenção de calos friáveis neste caso pode revelar o ponto inicial em futuros trabalhos de regeneração de plantas saudáveis.

Dessa forma este trabalho objetivou a obtenção de calos friáveis a partir de segmentos foliares e caulinares de mangabeira sob diferentes concentrações de 2,4-D e BAP.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Para se determinar um protocolo visando a calogênese em mangabeira, realizou-se dois experimentos a partir de segmentos foliares e internodais de aproximadamente 1 cm², provenientes de plantas micropropagadas *in vitro*, que foram utilizadas como explantes. Os explantes foram cultivados em meio WPM integral suplementado com 2,4-D e BAP nas concentrações de 0,0; 1,0; 2,0 e 3,0 mg L⁻¹. O meio de cultura, para todos os tratamentos, foi solidificado com 0,25% de fitagel e seu pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem.

Com auxílio de bisturi, as folhas foram cortadas em quadrados de aproximadamente, 1 cm² e os explantes inoculados em placas de petri 90 x 15mm, com a face abaxial da folha em contato com os meio de cultura. Os internódios também foram cortados em 1 cm de comprimento e inoculados nas placas de petri em contato direto com o meio.

Os experimentos foram mantidos no escuro, em sala de crescimento sob temperatura de 25 ± 2 °C.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso, em esquema fatorial 4 x 4 (quatro concentrações de 2,4-D e quatro concentrações de BAP), sendo cada explante avaliado isoladamente quanto as concentrações testadas. Cada tratamento foi formado por quatro repetições e quanto aos explantes: quatro para segmentos foliares e dois para segmentos intermodais. Após 4 semanas da inoculação foi efetuada a avaliação do experimento considerando-se: a porcentagem de explantes formando calo friável e explantes não desenvolvidos ou mortos.

As médias das variáveis foram submetidas à análise de variância pelo teste F. As concentrações de 2,4-D e BAP foram submetidas à análise de regressão e determinação do coeficiente de determinação ao nível de significância fixado em 5%. O programa utilizado para as análises estatísticas foi o SISVAR (FERREIRA, 2000). Quando necessário os coeficientes de variação foram transformados segundo a raiz quadrada de x+1.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 9 é estão contidas as médias e os valores de F para os resultados de calos friáveis formados a partir de explantes foliares e caulinares (internódio), mantidos em meio de indução de calos, provenientes de plantas de mangabeira cultivadas *in vitro*.

Tabela 9 - Médias e valores de F nos tipos de explante, 2,4-D e BAP sobre o percentual de calos friáveis formados, explantes mortos/não desenvolvidos em mangabeira. Ilha Solteira-SP, 2011⁽¹⁾.

| Tratamentos | Formação de calo (%) | | Explantes mortos (%) | |
|--|----------------------|---------|----------------------|-----------------------|
| | Folha | Entrenó | Folha | Entrenó |
| 2,4- Diclorofenoxiacético (mg L⁻¹) – 2,4-D | | | | |
| 0 | 0,00 | 0,00 | 31,25 | 0,00 |
| 1 | 45,31 | 53,12 | 25,00 | 15,62 |
| 2 | 59,37 | 68,75 | 16,62 | 0,00 |
| 3 | 25,00 | 56,25 | 18,75 | 6,25 |
| 6- Benzilaminopurina (mg L⁻¹) - BAP | | | | |
| 0 | 0,00 | 0,00 | 40,62 | 0,00 |
| 1 | 60,93 | 59,37 | 6,25 | 9,37 |
| 2 | 34,37 | 50,00 | 28,12 | 6,25 |
| 3 | 34,37 | 68,75 | 15,62 | 6,25 |
| Teste F | | | | |
| 2,4- Diclorofenoxiacético (2,4-D) | 13,26** | 17,00** | 1,15 ^{ns} | 1,91 ^{ns} |
| 6- Benzilaminopurina (BAP) | 12,41** | 17,24** | 5,39 ^{ns} | 0,54 ^{ns} |
| 2,4-D x BAP | 3,32** | 3,07** | 7,36 ^{ns} | 1,30 ^{ns} |
| C.V. (%) | 87,46 | 66,33 | 113,74 | 129,06 ⁽²⁾ |
| Média Geral | 32,42 | 44,53 | 22,65 | 5,46 |

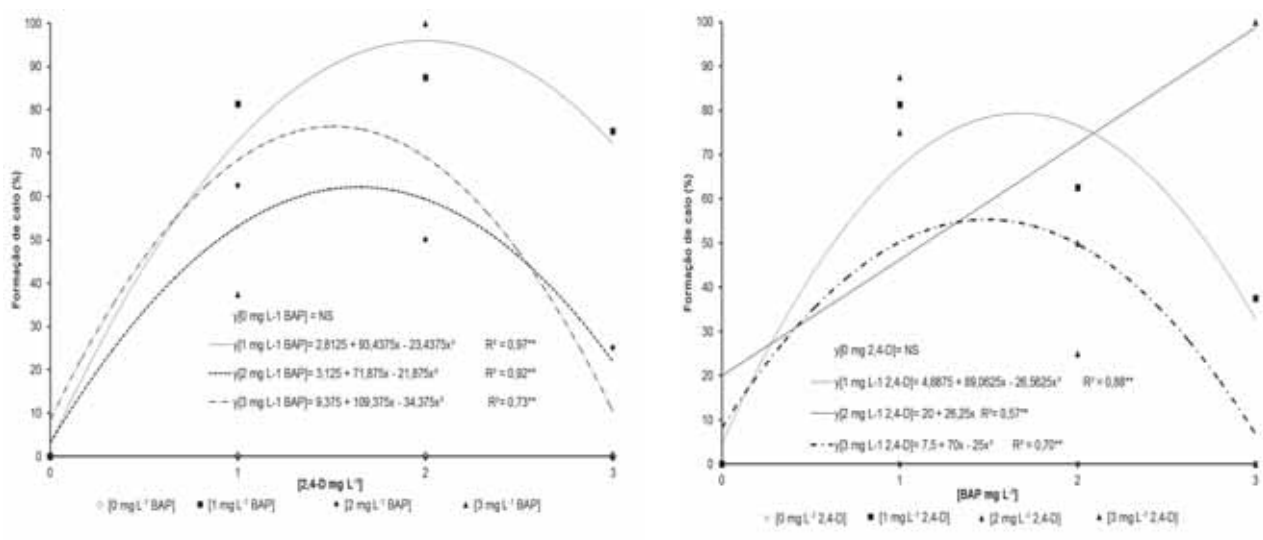
(1)*: significativo a 5%; **: significativo a 1% e ns: não significativo; (2) CV% transformado para a raiz quadrada de (x+1).

Pelo resultado do teste F verifica-se a significância para a formação de calos nos dois tipos de explantes estudados (folha e internódio), havendo, portanto,

grande evidência da calogênese na frutífera nativa do cerrado. Nota-se também que para a variável explantes mortos ou não desenvolvidos os reguladores vegetais não influenciaram estatisticamente nos resultados, demonstrando também que o meio de cultura utilizado para indução de calos não influenciou significativamente para a promoção da morte dos tecidos estudados (Tabela 9).

A interação significativa entre os reguladores vegetais 2,4-D e BAP revelaram na grande maioria ajustes polinomiais quadráticos, observado na Figura 18. Dessa forma verificou-se que as concentrações estimadas de $1,64 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D e de 1 mg L^{-1} de BAP adicionadas ao meio de cultivo proporcionaram a formação de 93,01% de calos friáveis a partir de segmentos foliares. Concentrações superiores de 2,4-D e BAP provocaram a diminuição da calogênese neste meio de cultivo. Ainda quanto à formação de calos, foi constatado que os explantes foliares cultivados no meio de cultura WPM, sem o acréscimo de 2,4-D e/ou BAP, não obtiveram a formação de calos, em relação aos demais tratamentos.

Figura 18 - Desdobramento da interação das concentrações 2,4-D x BAP na formação de calo friável em explantes foliares de mangabeira. Ilha Solteira-SP, 2011.



(REIS, 2011)

Os resultados acima corroboram com os estudos realizados por Decchetti (2000), que reportam a ausência de calos em *Annona glabra*, quando o 2,4-D não estava presente. Da mesma maneira, Vietez e San-José (1996) também não observaram a formação de calos em explantes de *Fagus silvatica*, quando BAP foi utilizado isoladamente no meio de cultura.

De maneira geral a adição conjunta ao meio de cultura, auxina 2,4-D e a citocinina BAP mostrou-se importante no aumento da calogênese.

Segundo Gomes (1999) observaram também a necessidade de interação entre auxina e citocinina para uma eficiente indução de calos em explantes de *Maclura tinctoria* e *Linum usitatissimum* L., respectivamente. Em copaíba (*Copaifera langsdorffi*), Azevedo (2003) somente obteve calogênese utilizando 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D + 1,0 mg L⁻¹ de BAP.

Segundo Grattapaglia e Machado (1998), o 2,4-D tende a estimular a formação de calos, mesmo em baixas concentrações. Este fitorregulador apresenta efeito no metabolismo do RNA, induzindo a transcrição de RNAs mensageiros capazes de codificar proteínas requisitadas para o crescimento e que podem induzir a proliferação celular desordenada, ou seja, a formação de calos.

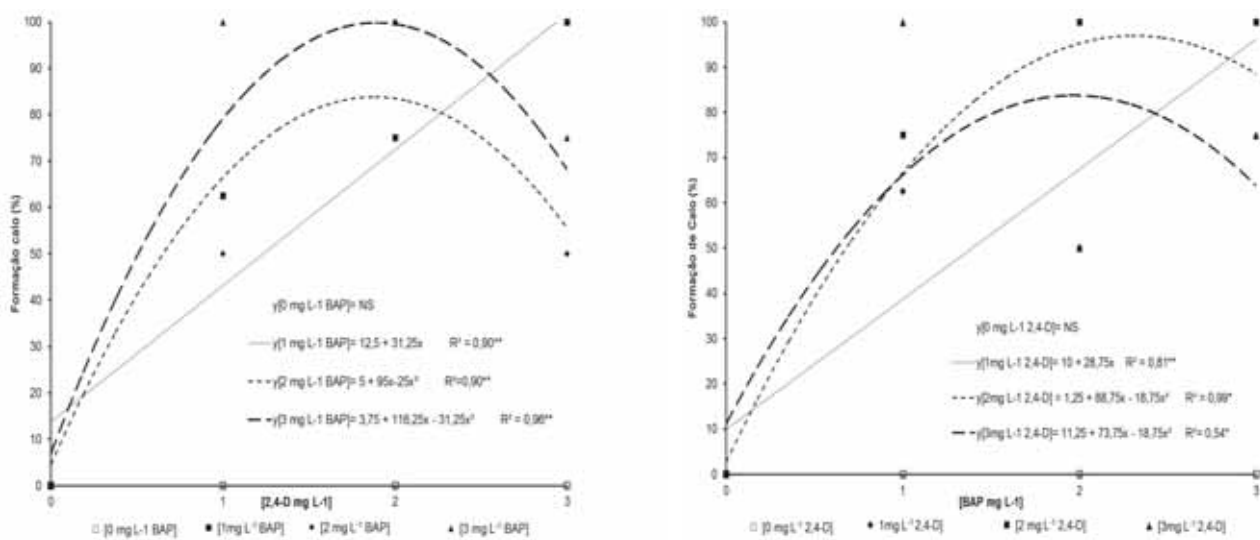
Resultados contrários foram verificados por Santos (2001) que, utilizando apenas as auxinas 2,4-D e AIB em um experimento de indução de calos em explantes foliares de cafeeiro (*Coffea arábica Coffea canephora*), observou que a interação entre esses reguladores de crescimento não influenciaram nos resultados. A produção de calos foi somente observada com a utilização do 2,4-D na concentração de 1,0 mg L⁻¹ para as cultivares Rubi e Topázio e com 0,5 mg L⁻¹ para a cultivar Apoatã.

Com relação à formação de calos através da utilização de internódios, como explante, verificou-se que houve a interação positiva entre a auxina 2,4-D e citocinina BAP adicionados ao meio de cultura. Observa-se na Figura 19 que houve ajuste de regressão polinomial quadrático para as concentrações de 2 e 3 mg L⁻¹ de 2,4-D e BAP e ajuste linear crescente para a concentração de 1,0 mg L⁻¹ para os dois reguladores de crescimento utilizados. Verificou-se também que não houve a formação de calos quando da ausência dos reguladores ao meio de cultura preparado para o condicionamento dos explantes.

Dessa forma a adição estimada de 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 2,36 mg L⁻¹ de BAP, proporcionaram 100 % na formação de calos friáveis, ao qual os tratamentos

próximos as concentrações aqui estimadas apresentaram a característica do calo ocupar toda a área do explante, não sendo possível distinguir o segmento inoculado inicialmente. Estudando o efeito isolado das concentrações de 2,4-D e BAP, houve efeito significativo, sendo assim observado o desenvolvimento da calogênese nos explantes caulinares inoculados na presença ou ausência de cada regulador de crescimento. Este comportamento possivelmente se deve ao fato da auxina ou da citocinina encontrada no meio de cultura, aliada ao conteúdo endógeno do explante caulinar, ter proporcionado um aumento na concentração dos reguladores, ocasionando a ocorrência de calos.

Figura 19 - Desdobramento da interação das concentrações 2,4-D x BAP na formação de calo friável em explantes internodais de mangabeira. Ilha Solteira-SP, 2011.



(REIS, 2011)

Resultado semelhante foi observado por Paiva-Neto (1996). O autor verificou que o uso isolado do 2,4-D, na concentração de 6,36 mg L⁻¹ em moreira (*Chlorophora tinctoria*), promoveu a calogênese. Ao contrário Gomes (1999), observou a necessidade da interação entre auxina e citocinina para a eficiente indução de calos em explantes de *Maclura tinctoria*.

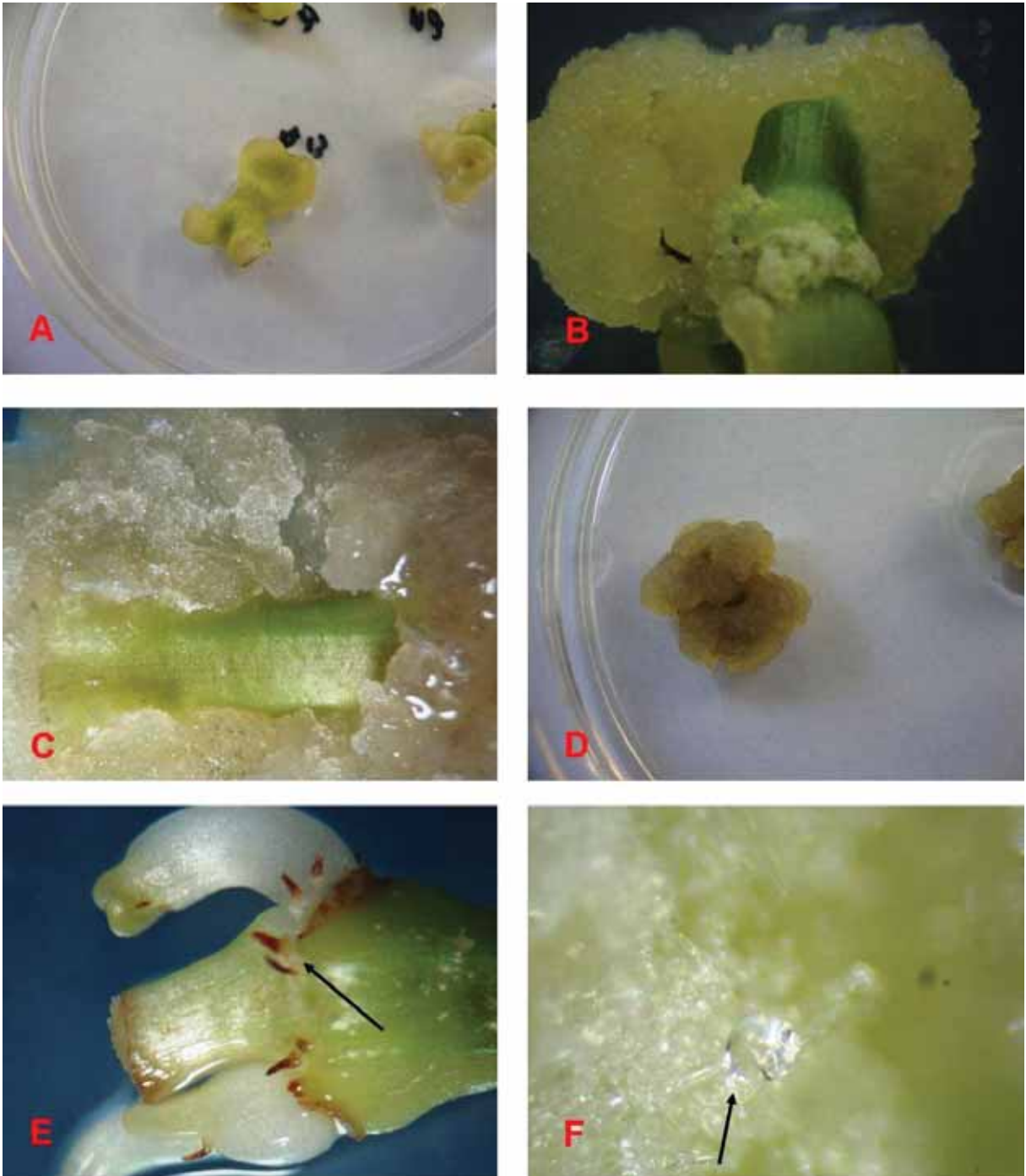
Neste experimento foi observado a formação de embriões em estádios globular. Vale ressaltar que houve também a formação de calos friáveis não embriogênicos, de coloração esbranquiçada e textura amorfa. Entretanto, este tipo de calo é de pouco interesse para trabalhos de micropropagação por não possuírem capacidade de regenerativa de embriões somáticos.

De acordo com Sondahl e Sharp (1977), o sucesso da indução de calos embriogênicos esta na alta concentração de 2,4-D e de BAP no primeiro meio (meio de condicionamento). No meio de indução, a razão auxina/citocinina é reduzida, ou substituída por apenas citocinina.

Outra evidência encontrada foi a presença de raízes emitidas a partir da extremidade dos explantes internodais e que as raízes foram verificadas em meio desprovido de auxinas e citocininas, levando a inferir sobre uma possível reserva endógena natural de auxinas nesse tipo de explantes. Além disso, não constatou-se organogênese direta e/ou a emissão de brotos nos explantes utilizados neste experimento.

Para melhor visualização dos resultados, observa-se abaixo as figuras contendo o aspecto geral da indução a calogênese (Figura 20).

Figura 20 - Aspecto geral dos explantes de mangabeira inoculados *in vitro* em meio WPM suplementado com 2,4-D e BAP. A- Segmento foliar de mangabeira não desenvolvido. B e C- Segmento foliar e caulinar (internódio) apresentado o desenvolvimento de calos friáveis. D- Segmento foliar apresentando o desenvolvimento de calo não-friável ou amorfa. E- Explante internodal de mangabeira apresentando o desenvolvimento de raízes. F- Estrutura calogênica em explante de mangabeira apresentando o desenvolvimento de embriogênese somática em fase globular. Ilha Solteira-SP, 2011.



(REIS, 2011)

Dessa forma, há necessidade de se otimizar o protocolo de indução de calos para a mangabeira, os quais apresentou formação de calos embriogênicos, objetivando o processo de multiplicação clonal em escala comercial.

6. CONCLUSÕES

- Os segmentos foliares de mangabeira apresentam 93,01% de calos friáveis quando cultivados em meio WPM suplementado com 1,64 mg L⁻¹ de 2,4-D e 1,0 mg L⁻¹ de BAP.
- Os segmentos internodais de mangabeira apresentam 100% da formação de calos friáveis quando cultivados em meio WPM suplementado com 2 mg L⁻¹ de 2,4-D e 2,36 mg L⁻¹ de BAP.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A mangabeira, frutífera nativa do cerrado, apesar da importância sócio-econômica que a espécie apresenta, encontra-se sob fase de domesticação, e estudos mais aprofundados a respeito de metodologias para a produção massal desta espécie, com vistas a produção comercial, são necessárias.

Este trabalho propôs desenvolver estratégias de produção de mudas através das técnicas de propagação por alporquia e micropropagação.

A propagação vegetativa de mangabeira por alporquia, no que diz respeito ao uso da auxina AIB e substratos, observou que houve a formação satisfatória de raízes, entretanto a formação de calos também foi verificada no desenvolvimento dos alporques, sugerindo que os mesmos sejam realizados em outras épocas para evidenciar que o uso suplementar da auxina AIB melhore significativamente o percentual de enraizamento dos alporques de mangabeira.

Com relação da técnica de micropropagação, a mangabeira passou por todas as fases de um protocolo de micropropagação (estabelecimento *in vitro*, através da germinação de sementes, determinação da taxa de multiplicação com a utilização suplementar dos reguladores de crescimento BAP e ANA, enraizamento e também a indução da calogênese através do 2,4-D e BAP. Observou-se que a utilização do meio de cultura ½ MS com adição de 2g L⁻¹ de carvão ativado proporcionou boas condições para germinação e desenvolvimento das plântulas de mangabeira *in vitro*. Uma proposta sugerida para um bom desenvolvimento da parte aérea das plantas micropropagadas de mangabeira seria a utilização do meio de cultura WPM, bem como a adição de carvão ativado no meio de cultura, já que tanto o meio e o aditivo são conhecidos por provocar bom desenvolvimento em plantas lenhosas.

No que diz respeito ao uso do BAP e ANA, durante o ensaio de multiplicação, observou-se que apenas a adição da citocinina ocasionou o desenvolvimento das multibrotações, porém induziu também a formação de calos na base dos explantes, sugerindo assim testes com outras citocininas, a fim de diminuir a formação de calos, melhorando o comportamento da espécie *in vitro*.

Entre a técnica de enraizamento, a concentração de 1,86 mg L⁻¹ de AIB foi a que apresentou os resultado mais satisfatório, uma vez que o tratamento correspondeu em 54,7 % das microestacas de mangabeira enraizadas.

A produção de calos friáveis com vistas a utilização de diferentes concentrações de 2,4-D e BAP em explantes foliares e caulinares, foi eficiente, apresentando friabilidade dos calos obtidos.

Assim, de maneira geral, verificou-se que as cinco estratégias podem ser utilizadas para a propagação de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes).

8. REFERÊNCIAS

- AZEVEDO, K. de S. **Indução e análises bioquímicas de calos e aspectos da anatomia foliar de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.)**. 2003. 86 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)– Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.
- DEC CETTI, S. F. C. **Propagação *in vitro* de *Annona glabra* L.** 2000. 101 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal)– Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.
- FERREIRA, D. F. Análise estatística por meio do SISVAR (Sistema para Análise de Variância) para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.
- GOMES, G. A. **Propagação *in vitro* de Moreira (*Maclura tinctoria*)**. 1999. 91 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal)– Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.
- 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. v. 1, p. 183-260.
- PAIVA-NETO, V. B. **Comportamento *in vitro* de tecido foliar e segmento nodal de moreira (*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud)**. 1996. 39 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal)– Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1996.
- SANTOS, C. G. **Micropropagação e caracterização bioquímico-anatômica em *Coffea arabica* e *Coffea canephora***. 2001. 110 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal)– Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.
- SÖNDAHL, M. R.; SHARP, W. R. High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea Arabica*. **Zeitschrift fuer Pflanzen Physiologie**, Stuttgart, v. 81, n. 4, p. 395-408, 1977.
- VIETEZ, A. M.; SAN-JOSÉ, M. C. Adventitious shoot regeneration from *Fagus sylvatica* leaf explants *in vitro*. **In vitro Cellular & Developmental Biology**, Columbia, v. 32, n. 3, p. 140-147, July/Sept. 1996.