

**INFLUÊNCIA DAS CITOCININAS NOS  
ASPECTOS ANATÔMICOS, BIOQUÍMICOS E  
FISIOLÓGICOS DO CULTIVO *IN VITRO* DA  
MANGABEIRA (*Hancornia speciosa* Gomes)**

**FERNANDA PEREIRA SOARES**

**2008**

**FERNANDA PEREIRA SOARES**

**INFLUÊNCIA DAS CITOCININAS NOS ASPECTOS  
ANATÔMICOS, BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS DO  
CULTIVO *IN VITRO* DA MANGABEIRA (*Hancornia speciosa*  
Gomes)**

Tese apresentada à Universidade Federal  
de Lavras como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Agronomia, área de concentração em  
Fisiologia Vegetal, para a obtenção do  
título de "Doutor".

Orientador

Prof. Dr. Renato Paiva

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2008

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

Soares, Fernanda Pereira.

Influência das citocininas nos aspectos anatômicos, bioquímicos e fisiológicos do cultivo in vitro da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) / Fernanda Pereira Soares. – Lavras : UFLA, 2008.

75 p. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.

Orientador: Renato Paiva.

Bibliografia.

1. Mangaba. 2. Biotecnologia. 3. Fitorreguladores. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 583.72041

**FERNANDA PEREIRA SOARES**

**INFLUÊNCIA DAS CITOCININAS NOS ASPECTOS  
ANATÔMICOS, BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS DO  
CULTIVO *IN VITRO* DA MANGABEIRA (*Hancornia speciosa*  
Gomes)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de "Doutor".

APROVADA em 4 de janeiro de 2008

Prof. Dr. Breno Régis Santos	UNIFAL
Dr. Sérgio Alves de Carvalho	IAC
Prof. Dra. Patrícia Duarte de Oliveira Paiva	UFLA
Prof. Dr. José Paulino da Costa Netto	UEMG

Prof. Dr. Renato Paiva

UFLA

(Orientador)

Lavras  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2008

*À titia Conceição (in memoriam), por seu amor pleno e verdadeiro, por seus ensinamentos enriquecedores e por ser exemplo de vida para mim,*

### **OFEREÇO**

*Aos meus amados pais, William e Nádia,*

*A minha querida irmã, Roberta,*

*À vovó Nércia,*

*Ao meu noivo e grande companheiro, Douglas,*

*pelo amor incondicional, apoio e incentivo*

### **DEDICO**

*A minha família,*

*Vovó Zalfa, vovô Wilson (in memoriam), à tia Ivana, tio Wilson,*

*À amiga Raírys,*

*Ao meu orientador, Renato Paiva,*

*por todo o auxílio e pela torcida,*

### **AGRADEÇO**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, pela oportunidade de realização do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu querido pai, William Soares de Lima, pelo apoio, incentivo e por seu exemplo de perseverança e ética.

Ao meu orientador e “segundo pai”, Professor Renato Paiva, por seu grande profissionalismo, pelo aprendizado, amizade e incentivo durante toda a minha jornada acadêmica.

À Professora Patrícia Duarte de Oliveira Paiva, pela orientação durante parte da iniciação científica e pela amizade durante todos esses anos.

Aos membros da banca examinadora: Prof. Dr. Breno Régis Santos, Profa. Dra. Patrícia Duarte de Oliveira Paiva, Dr. Sérgio Alves de Carvalho, Prof. Dr. José Paulino da Costa Netto, Dr. Marcelo Murad e Prof. Dr. Amauri Alves de Alvarenga.

Ao Professor Evaristo Mauro de Castro, pela disponibilidade do Laboratório de Anatomia Vegetal e também à Doutoranda Franciane Tavares Braga, pela ajuda na realização das análises anatômicas.

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

A todos os professores da UFLA, pelos conhecimentos adquiridos durante o curso, em especial ao Professor Evaristo, por ser um exemplo de docente para mim.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas: Raírys, Vanessa, Eduardo, Milene, Tina, Marcelo Padovani, Cristiano, Patrícia,

Rodrigo, Gabriela, Humberto, Lenaldo, Marcelo, Luciano, Ana Carolina, Letícia, Diogo, Jessé, Dayane, Cleilton e Stephânia, pela colaboração e amizade.

Aos amigos Lenaldo e Fran, por todo o auxílio prestado na condução dos experimentos.

À amiga Raírys, por sua constante orientação e ajuda, durante a execução desse trabalho.

À Fernanda Carlota, por seu coleguismo e amizade incondicional.

Aos funcionários técnico-administrativos: Joel, Lena, Ana Cristina, Evaristo, D' Artagnan, Izonel, Barrinha e Odorêncio, pelo auxílio e amizade.

As minhas amigas Daniela, Lívia, Neiva, Cristiane, Tathiana, Juliana, Marcela, Franciane, Vanessa, Raírys e Daiane ,pela convivência, apoio e grande amizade.

A todos aqueles que contribuíram, de alguma forma, para a realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

Fernanda Pereira Soares, filha de William Soares de Lima e Nádia Maria Pereira Soares, nasceu em Lavras, MG, no dia 8 de dezembro de 1980. Coursou o ensino fundamental no Colégio Santo Inácio (Baependi) e o médio no Centro Educacional da Criança – CEC Objetivo (Lavras), concluindo-o em 1998. Em 1999, foi aprovada no vestibular para o curso de Agronomia da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Iniciando sua jornada acadêmica, foi monitora da disciplina Morfologia e Sistemática Vegetal por um semestre, sob orientação do Professor Douglas Antônio de Carvalho e bolsista de iniciação científica da Fapemig, no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas do Setor de Fisiologia Vegetal, sob orientação do Professor Renato Paiva e da Professora Patrícia Duarte de Oliveira Paiva. Em janeiro de 2004, graduou-se e iniciou o mestrado em Fisiologia Vegetal na UFLA, concluindo-o dezoito meses depois. Iniciou o doutorado em agosto de 2005 e em junho de 2007 ingressou na carreira de Fiscal Federal Agropecuário do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, onde atua na Coordenação de Sementes e Mudas.

## SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	i
GENERAL ABSTRACT.....	ii
CAPÍTULO 1 .....	1
1 Introdução geral.....	1
2 Referencial teórico.....	4
2.1 Descrição da espécie.....	4
2.2 Usos da espécie.....	5
2.3 Propagação da mangabeira.....	7
2.3.1 Propagação sexuada.....	7
2.3.2 Propagação assexuada.....	7
2.3.2.1 Micropropagação.....	8
2.3.2.1.1 Citocininas e morfogênese <i>in vitro</i> .....	10
3 Referências Bibliográficas.....	11
CAPÍTULO 2 – Efeito de diferentes fontes de citocinina na multiplicação <i>in vitro</i> da mangabeira.....	17
Resumo.....	17
Abstract.....	18
1 Introdução.....	19
2 Material e métodos.....	21
2.1 Indução de brotações <i>in vitro</i> em explantes caulinares de mangabeira....	21
2.2 Enraizamento <i>in vitro</i> de brotações de mangabeira .....	21
2.3 Multiplicação <i>in vitro</i> de explantes caulinares de mangabeira em diferentes subcultivos.....	22
3 Resultados e Discussão.....	23
3.1 Indução de brotações <i>in vitro</i> em explantes caulinares de mangabeira...	23
3.2 Enraizamento <i>in vitro</i> de brotações de mangabeira.....	27
3.3 Multiplicação <i>in vitro</i> de explantes caulinares de mangabeira em diferentes subcultivos.....	30
4 Conclusões.....	34
5 Referências Bibliográficas.....	35
CAPÍTULO 3 – Efeito de diferentes fontes e concentrações de auxina na multiplicação <i>in vitro</i> da mangabeira.....	39
Resumo.....	39
Abstract.....	40
1 Introdução.....	41
2 Material e Métodos.....	43

2.1 Efeito de diferentes concentrações de AIB combinadas com BAP na indução de brotações <i>in vitro</i> em explantes caulinares de mangabeira.....	43
2.2 Efeito de diferentes concentrações de ANA combinadas com BAP na indução de brotações <i>in vitro</i> em explantes caulinares de mangabeira.....	43
3 Resultados e Discussão.....	44
3.1 Efeito de diferentes concentrações de AIB combinadas com BAP na indução de brotações <i>in vitro</i> em explantes caulinares de mangabeira.....	44
3.2 Efeito de diferentes concentrações de ANA combinadas com BAP na indução de brotações <i>in vitro</i> em explantes caulinares de mangabeira.....	47
4 Conclusões.....	51
5 Referências bibliográficas.....	52

CAPÍTULO 4 – Atuação de diferentes fontes de citocinina nos aspectos bioquímicos, anatômicos e ultra-estruturais do cultivo <i>in vitro</i> da mangabeira.....	54
Resumo.....	54
Abstract.....	55
1 Introdução.....	56
2 Material e Métodos.....	58
2.1 Material vegetal.....	58
2.2 Efeito de diferentes fontes de citocinina no retardo da senescência foliar em brotações de mangabeira cultivadas <i>in vitro</i> .....	59
2.2.1 Análises bioquímicas.....	59
2.3 Análises anatômicas.....	60
2.4 Análises ultra-estruturais.....	61
3 Resultados e Discussão.....	62
3.1 Efeito de diferentes fontes de citocinina no retardo da senescência foliar em brotações de mangabeira cultivadas <i>in vitro</i>	62
3.2 Análises anatômicas	67
3.3 Análises ultra-estruturais	70
4 Conclusões.....	72
5 Referências Bibliográficas.....	73

## RESUMO GERAL

SOARES, Fernanda Pereira. **Influência das citocininas nos aspectos anatômicos, bioquímicos e fisiológicos do cultivo *in vitro* da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes).** 2008. 75 p. Tese (Doutorado em Agronomia/ Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. \*

A mangabeira vem se destacando, no cenário nacional, por possuir frutos comestíveis e saborosos. As dificuldades encontradas no processo de propagação da espécie por meio de sementes devido, principalmente, à baixa taxa de germinação e à recalcitrância, e a sua insuficiente resposta à regeneração por estaquia valorizam a busca por soluções alternativas para a produção de mudas. Técnicas de cultivo *in vitro* se mostram eficientes. Contudo, sua utilização, de forma mais ampla para a espécie, tem sido limitada pela dificuldade de enraizamento, elevada taxa de abscisão foliar e reduzido índice de sobrevivência das plantas durante a fase de aclimatização. Entre os fatores que controlam a morfogênese na cultura de tecidos, estão as citocininas. Avaliou-se, neste trabalho, o efeito da ausência e da presença de três fontes de citocinina (6-benzilaminopurina - BAP, cinetina - CIN e thidiazuron - TDZ) na multiplicação, nos aspectos anatômicos e ultra-estruturais de folhas e no retardo da senescência foliar durante o cultivo *in vitro* de explantes caulinares de mangabeira. Entre as fontes de citocinina testadas, o BAP induziu maior taxa de multiplicação, maior aumento na espessura dos parênquimas paliçádico e esponjoso, maior funcionalidade estomatal e retardo da senescência foliar. Brotações de mangabeira oriundas de meio de cultura sem adição de citocininas apresentaram maior facilidade de enraizamento *in vitro*. Das citocininas testadas, a cinetina foi a que propiciou a formação de cloroplastos mais desenvolvidos.

---

\* Comitê Orientador: Prof. Dr. Renato Paiva - UFLA (Orientador); Prof. Dr. Amauri Alves de Alvarenga – UFLA (Co-orientador).

## GENERAL ABSTRACT

SOARES, Fernanda Pereira. **Influence of cytokinins in anatomical, biochemical and physiological aspects of *in vitro* growth of mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes).** 2008. 75 p. Tese (Doctorate in Plant Physiology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. \*

Mangabeira has been standing out internationally for having edible and delicious fruit. The faced difficulties in the propagation process of the species by seeds, mainly due to low rate of germination and recalcitrance, and insufficient feedback to regeneration by cutting, valorize the search for alternative solutions in the seedling production. Techniques of *in vitro* cultivation are efficient. However, using these techniques in a wide way for the species has been limited due to the difficulty of rooting, high rate of leaf abscission and reduced index of survival plants during the phase of acclimatization. Among the factors that control morphogenesis in the tissue culture are the cytokinins. This work evaluated the effect of absence and presence of three sources of cytokinins (6-benzylaminopurine - BAP, kinetin - CIN and thidiazuron - TDZ) in the multiplication, in the anatomical aspects and ultrastructural of leaves and in the leaf senescence delaying during *in vitro* cultivation of shoot explants of mangabeira. Among the sources of tested cytokinins, BAP induced higher rate of multiplication, higher increase in thickness of palisade and spongy parenchymas, bigger flooding functionality and leaf senescence delaying. Shoots of mangabeira from culture media without addition of cytokinins showed more facility of *in vitro* rooting. Of the tested cytokinins, the kinetin was the one that provided the most developed formation of chloroplasts.

---

\* Guidance Committee: Orientador: Prof. Dr. Renato Paiva - UFLA (Major Professor); Amauri Alves de Alvarenga – UFLA.

## CAPÍTULO 1

### 1 INTRODUÇÃO GERAL

O Cerrado, bioma típico da zona tropical, é uma formação savânica que ocupa, aproximadamente, 2,0 milhões de km<sup>2</sup> e corresponde a 23% do território nacional (Ribeiro & Walter, 1998). É, portanto, a segunda maior formação brasileira em extensão, superada apenas pela Floresta Amazônica. Compreende 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, estendendo-se, ainda, para fora do Brasil Central, em “ilhas”, como no sul do Maranhão, norte do Piauí, Rondônia e em um quinto do estado de São Paulo. Em Minas Gerais, ocupa mais de 50% do território (Silveira, 1989).

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 que, segundo Barbosa (1996), se viabilizadas pela pesquisa, podem constituir potenciais fontes de exploração econômica.

Das espécies com potencial de utilização agrícola, destacam-se as frutíferas, com seus frutos comestíveis, de formas variadas, cores atrativas e sabor característico, podendo ser consumidos *in natura* ou na forma de sucos, licores, sorvetes e geléias (Naves, 1999).

Há, atualmente, um mercado potencial e emergente para as frutas nativas do Cerrado, a ser mais bem explorado pelos agricultores, já que todo o seu aproveitamento tem sido feito de forma extrativista e predatória. Neste cenário, o Cerrado tem sido agredido e sua vegetação nativa substituída por culturas e pastagens. Torna-se necessário, portanto, tomar medidas relacionadas ao

desenvolvimento de metodologias de cultivo e propagação das espécies do bioma, tanto para exploração econômica como para conservação.

Neste contexto, insere-se a mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), frutífera do Cerrado, pertencente à família *Apocynaceae*. Sua propagação sexuada se caracteriza por produzir indivíduos heterogêneos e com longo período de imaturidade. Estudos indicam, ainda, que as sementes desta espécie são recalcitrantes, o que tem limitado a obtenção de mudas destinadas à implantação de cultivos comerciais.

A propagação vegetativa por meio de estaquia, enxertia e mergulhia, para a mangabeira, não tem logrado êxito suficiente para ser adotada, enquanto técnicas de cultivo *in vitro* têm se mostrado eficientes na propagação da espécie (Vasques-Araújo et al., 1996). Tais técnicas apresentam inúmeras vantagens em relação a outros métodos convencionais de propagação, como a produção de mudas saudáveis, em grande escala e com maior rapidez.

Apesar de alguns trabalhos terem demonstrado o potencial e a viabilidade da regeneração *in vitro* para a mangabeira, seu processo de micropropagação tem se deparado com grandes obstáculos, como a abscisão foliar precoce, a dificuldade de obtenção de brotações aptas para o processo de enraizamento e a baixa conversão em plantas.

Entre os inúmeros fatores que afetam o cultivo sob condições controladas, os reguladores de crescimento merecem destaque. Segundo Oliveira (2006), nenhuma outra classe hormonal parece estar tão ligada à biotecnologia de plantas como as citocininas. Além do controle da divisão celular, diversos processos fisiológicos têm sido relacionados a elas, como a fotossíntese, a diferenciação de cloroplastos, o retardo da senescência foliar, o metabolismo de nutrientes, o desenvolvimento do sistema vascular, a quebra da dominância apical e a indução de gemas e raízes (Takey et al., 2001).

O conhecimento do papel das citocininas no processo morfogênico da mangabeira pode contribuir para o desenvolvimento de protocolos que facilitem sua micropropagação.

Assim, este trabalho foi realizado com o objetivo de estudar o efeito de diferentes fontes de citocinina e sua relação com outros reguladores de crescimento nos aspectos anatômicos, bioquímicos e fisiológicos do cultivo *in vitro* da mangabeira.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Descrição da espécie

A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) é uma árvore frutífera de clima tropical, pertencente à ordem *Gentianales* e à família *Apocynaceae*. É 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 (Monachino, 1945).

Segundo Vieira Neto (1993), a espécie ocorre em maior densidade em solos pobres e de textura arenosa, indo desde as areias quartzosas até os podzólicos e latossolos. É observada em áreas com temperaturas médias anuais entre 24°C e 26°C, podendo, no entanto, ser encontrada em zonas com temperaturas mínimas e máximas de 15 e 43°C, respectivamente. A pluviosidade ideal para o seu cultivo pode estar entre 750 e 1.600 mm anuais, apesar da tolerância a períodos de déficit hídrico.

A mangabeira possui porte mediano, com altura variando de 4 a 7 m, podendo chegar até 15 m, crescimento lento, copa ampla, às vezes mais ramificada que alta. Seu tronco, geralmente, é único, tortuoso ou retilíneo, com 0,2 a 0,3 m de diâmetro. Seu caule é rugoso e áspero, com duas a três bifurcações na altura média de 40 a 50 cm da base. Toda a planta exsuda látex de cor branca e róseo-pálida. (Monachino, 1945).

As folhas, geralmente decíduas, são opostas, simples, uniformemente espaçadas, coriáceas, elípticas, elíptico-lanceoladas nas duas extremidades, às vezes obtuso-subacuminadas no ápice, possuindo de 3,5 a 10 cm de comprimento e de 1,5 a 5,0 cm de largura. São glabras ou pubescentes, oliváceo-enegrescentes na face ventral e mais descoradas na dorsal (Monachino, 1945; Espíndola et al., 1999).

Apresenta inflorescência em dicásio terminal, com duas a quatro ou até cinco flores hermafroditas em forma de campânula. Ocasionalmente, ocorrem flores isoladas (Monachino, 1945; Villachica et al., 1996).

O fruto da mangabeira, do tipo baga, é elipsoidal ou arredondado, de 2,5 a 6,0 cm, com exocarpo amarelo dotado de manchas ou estrias avermelhadas, polpa de sabor bastante suave, doce, carnosos-viscosa, ácida, contendo, geralmente, de 2 a 15 ou até 30 sementes discóides de 7 a 8 mm de diâmetro, castanho-claras, delgadas, rugosas, com hilo no centro. O peso de 100 sementes com, aproximadamente, 50% de umidade é de  $18,4 \pm 0,8$  g (Monachino, 1945; Ferreira, 1973).

A mangabeira é uma planta alógama (Dias & Maranhão, 1994) e, apesar de possuir flores hermafroditas, apresenta auto-incompatibilidade entre as estruturas de reprodução, o que a torna dependente de polinizadores.

Segundo Salomão & Alem (2001), na espécie pode ocorrer também um tipo de reprodução anômala à poliembrião, com o desenvolvimento de mais de um embrião por óvulo e a geração de mais de uma plântula com a germinação de uma única semente.

Em Minas Gerais, a mangabeira floresce de setembro a novembro e frutifica de dezembro a janeiro (Brandão et al., 2002). Já no litoral do Nordeste, observam-se duas florações e frutificações durante o ano. Vieira Neto (1994) relata que, nessa região, a frutificação ocorre praticamente durante todo o ano, com maior intensidade entre novembro e junho.

## **2.2 Usos da espécie**

A mangabeira apresenta grande potencial como planta frutífera. No entanto, com a inexistência de plantios racionais e tecnificados, o extrativismo é, atualmente, sua principal forma de exploração, constituindo-se, assim, numa grande barreira para o aproveitamento de todas as suas potencialidades.

O fruto é o seu produto principal e, devido ao excelente aroma e sabor, é uma das mais importantes matérias-primas para a agroindústria do Nordeste (Lederman et al., 2000). Além da fabricação de sucos e polpas congeladas, é utilizado no consumo *in natura* e para a produção de doces, xaropes, compotas, licores, vinhos e vinagres (Barros, 1967).

De acordo com Narain (1990), com elevado conteúdo de gomas que lhe conferem propriedades funcionais de agregação, retenção de sabor e inibição na formação de cristais, a mangaba é particularmente utilizada na elaboração de sorvetes.

Segundo esse mesmo autor, estudos da composição nutricional de diversas frutas do Cerrado revelaram que os frutos da mangabeira possuem elevado teor de proteína, superior ao da maioria das espécies frutíferas. O alto teor de ferro faz com que ele seja, também, um dos frutos mais ricos nesse nutriente, além de ser uma excelente fonte de ácido ascórbico.

O Censo Agropecuário, realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2002), registrou, a partir do ano de 1996, produção de frutos de mangaba superior a 1.000 toneladas anuais. Os estados de Sergipe, Minas Gerais e Bahia aparecem como maiores produtores, sendo os dois primeiros responsáveis por, aproximadamente, 85% da produção nacional.

Algumas partes da mangabeira também têm aplicação na medicina popular, como a casca, que possui propriedades adstringentes e o látex, empregado contra doenças pulmonares, tuberculose, úlceras e herpes (Braga, 1960). Cesar (1956) relata que a entrecasca e a raiz da mangabeira são usadas como purgantes, nas doenças uterinas e para provocar o fluxo menstrual. O fruto verde é venenoso e impróprio para o consumo, causando intoxicações que podem levar à morte.

A elevada qualidade do seu látex tornou a mangabeira objeto de intensa exploração no período áureo da borracha. No entanto, o excelente desempenho

técnico e econômico da borracha de *Hevea brasiliensis* se impôs sobre todas as demais espécies, fazendo com que suas produções fossem completamente abandonadas (Wisniewski & Melo, 1982).

## **2.3 Propagação da mangabeira**

### **2.3.1 Propagação sexuada**

A propagação via sementes tem como desvantagens o longo período de juvenilidade conferido às plantas e a variabilidade genética das progênes quanto a caracteres agronômicos importantes na fruticultura comercial.

Para a mangabeira, este tipo de propagação, apesar de usual, tem sido dificultado 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. Além disso, a emergência e o desenvolvimento das mudas são lentos.

Devido à recalcitrância, as sementes de mangabeira devem ser semeadas até o segundo dia após a extração dos frutos, uma vez que, a partir daí, o poder germinativo decresce rapidamente (Espíndola et al., 1993). Oliveira & Valio (1992) conseguiram conservar sementes de mangaba, por nove semanas, em sacos de polietileno, com umidade acima de 30%. No entanto, uma queda da germinação ocorreu quando o teor de umidade foi reduzido para menos de 25%.

O curto período de armazenamento das sementes é um fator limitante para a propagação sexuada da espécie e exige rápida semeadura. Isso acarreta um prolongado tempo de viveiro, tendo a muda que esperar até a próxima estação chuvosa para ser levada ao campo, o que incrementa os custos de produção.

### **2.3.2 Propagação assexuada**

Não se tem obtido sucesso com a propagação por estaquia da mangabeira (Borges & Zica, 1994).

Com relação à enxertia, em avaliações preliminares, Aguiar Filho et al. (1998) verificaram que os tipos que proporcionaram os maiores índices de pegamento dos enxertos foram a borbulhia em placa, em janela aberta e em T invertido, com borbulhas retiradas de ramos com, aproximadamente, um ano de idade. Relataram ainda os mesmos autores que, aos oito meses após a semeadura, mudas produzidas por sementes apresentavam diâmetro do caule apto para a enxertia, indicando que elas necessitam de elevado tempo de viveiro para serem propagadas por esse método, inviabilizando-o pelo custo e espaço necessário.

Pelo fato de os processos convencionais de propagação vegetativa da mangabeira não estarem obtendo sucesso suficiente para serem adotados em viveiros comerciais, a micropropagação surge como uma alternativa importante, tanto na fixação de genótipos de interesse e na produção de mudas em grande escala, como para auxiliar no conhecimento da fisiologia da planta.

#### **2.3.2.1 Micropropagação**

A micropropagação é a aplicação mais prática da cultura de tecidos e a de maior impacto (Grattapaglia & Machado, 1998). É utilizada comercialmente, permitindo que uma planta com características desejáveis possa ser multiplicada indefinidamente (Pasqual, 2001).

Pode ser realizada por organogênese ou embriogênese somática. Na organogênese ocorre a diferenciação de brotações e raízes durante o desenvolvimento vegetal. A embriogênese somática envolve o desenvolvimento de embriões a partir de células somáticas embriologicamente competentes *in*

*vitro* (Ahuja, 1992). Segundo George (1996), a maioria das plantas micropropagadas é obtida pela multiplicação de brotações axilares.

Observam-se diversos padrões de multiplicação, de acordo com a espécie cultivada. Existem aquelas que, na mesma subcultura, produzem até cem brotos por explante. Para as plantas do Cerrado, trabalhos já realizados indicam que, em média, a produção de brotos na mesma subcultura é da ordem de dez por explante. Entretanto, geralmente, quanto maior o número de brotos, menor será o seu comprimento. A grande vantagem da obtenção de brotos normais e alongados (maiores do que 1,5 cm) é a de que esses enraízam mais facilmente do que brotos curtos. Outro padrão de multiplicação ocorre quando o explante produz brotos alongados, mas em pequena quantidade, da ordem de dois. Esse padrão não reduz a taxa de multiplicação, pois um único broto pode ser excisado em três ou quatro novos explantes para subculturas de multiplicação ou pode ser repicado diretamente para a fase de enraizamento (Sano & Almeida, 1998).

O crescimento e a organogênese *in vitro* são altamente dependentes da interação entre as substâncias de crescimento que ocorrem naturalmente na planta (hormônios) e os análogos sintéticos (reguladores de crescimento), os quais são adicionados ao meio de cultura (George, 1996). Os principais grupos destas substâncias são auxinas, citocininas, giberelinas, etileno e ácido abscísico.

As auxinas são substâncias que controlam o crescimento e a alongação das células e as citocininas, estimulam a divisão celular e reduzem a dominância apical. O balanço entre estes dois tipos de reguladores controla muitos aspectos da diferenciação celular e da organogênese nas culturas de tecidos e órgãos (Pasqual, 2001).

Vários são os trabalhos que têm demonstrado o potencial e a viabilidade de regeneração *in vitro* da mangabeira (Pereira-Netto, 1991; Costa et al., 2003; Aloufa, 2003; Fonseca et al., 2003; Soares, 2005). No entanto, mesmo com

alguns avanços, há limitações ao processo de micropropagação da espécie que precisam ser solucionadas para que a técnica possa ser aplicada comercialmente.

#### **2.3.2.1.1 Citocininas e morfogênese *in vitro***

As citocininas, juntamente com as auxinas, constituem as classes de reguladores de crescimento mais utilizadas na cultura de tecidos.

A dominância apical é determinada inicialmente pelas auxinas, mas estudos de fisiologia indicam que as citocininas desempenham importante papel no crescimento inicial das gemas laterais, durante a morfogênese *in vitro*. Martinelli et al. (1985) citam que as citocininas se caracterizam por apresentarem grande capacidade de multiplicidade de brotos, induzindo a formação de grande número de brotações e elevada taxa de multiplicação em muitos sistemas de micropropagação.

Para Chernyad'ev (2000), as citocininas desempenham importante papel durante a ontogenia da folha e têm sua atividade aumentada nas fases iniciais desse processo, determinando a máxima taxa de divisão dos cloroplastos e das células, a formação de membranas e a síntese de proteínas. Após essa fase de crescimento linear, reduz-se a atividade citocinínica e, em contraste, observa-se um aumento na atividade das auxinas e a estimulação do alongamento das células do mesofilo.

Em alguns trabalhos tem-se também associado a aplicação de citocininas ao retardo da senescência foliar. Segundo Tian et al. (1994), há evidências de uma diminuição abrupta na concentração dessas substâncias em órgãos maduros. Por outro lado, o tratamento de folhas isoladas com citocininas tem promovido o retardo desse processo natural de envelhecimento.

Grattapaglia & Machado (1998) citam que os efeitos das citocininas no cultivo *in vitro* não se restringem a uma subcultura, o que é positivo quando se

trata do rejuvenescimento *in vitro* de espécies lenhosas, embora seja problemático quando afeta o alongamento e o enraizamento das brotações.

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR FILHO, S. P. de; BOSCO, J.; ARAÚJO, I. A. de. **A mangabeira (*Hancornia speciosa*):** domesticação e técnicas de cultivo. João Pessoa: Emepa-PB, 1998. 26 p. (Emepa-PB. Documentos, 24).

AHUJA, M. R. **Micropropagação of woody plants.** London: KluwerAcademic, 1992. v. 41, 507 p.

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

BARBOSA, A. S. **Sistema biogeográfico do cerrado:** alguns elementos para sua caracterização. Goiânia: UCG, 1996. 44 p. (Contribuições, 3).

BARROS, R. da C. Mangabeira, rainha dos tabuleiros. **Mundo Agrícola**, São Paulo, v. 16, n. 191, p. 9-12, mar. 1967.

BORGES, J. D.; ZICA, L. F. Efeito de fito-hormônios de enraizamento em estacas de mangabeira. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 13., 1994, Salvador. **Resumos...** Salvador: SBF, 1994. v. 3, p. 777-778.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste:** especialmente do Ceará. 4. ed. Natal: ESAM, 1960. 540 p. (Coleção Mossoroense).

BRANDÃO, M.; LACA-BUENDÍA, J. P.; MACEDO, J. F. **Árvores nativas e exóticas do Estado de Minas Gerais.** Belo Horizonte: Epamig, 2002. 528 p.

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

CHERNYAD'EV, I. I. Ontogenetic changes in the photosynthetic apparatus and effects of cytokinins (Review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, Moscou, v. 36, n. 6, p. 527-539, Nov./Dec. 2000.

COSTA, M. A. P. de C.; ALMEIDA, W. A. B. de; DANTAS, A. C. V. L.; SILVA, S. A.; SOUZA, F. V. Principais resultados com micropropagação de mangabeira na Bahia. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DA

- MANGABA, I., 2003, Aracaju. **Anais...** Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2003. 1 CD-ROM.
- DIAS, M. G. L.; MARANHÃO, T. O. Análise citogenética e palinológica quanto à viabilidade e morfologia em mangabeira (*Hancornia speciosa*). **Revista Biociências**, Taubaté, v. 1, p. 61-69, 1994.
- ESPÍNDOLA, A. C. de M.; FRANÇA, E. A.; NASCIMENTO JÚNIOR, N. A. Efeito da profundidade de plantio e misturas de substratos na germinação e vigor das mudas de mangabeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 14, n. 3, p. 165-168, dez. 1993.
- ESPÍNDOLA, A. C. de M.; MARTINS, A. G.; FREITAS, A. M. M. Algumas considerações sobre a taxonomia e a morfologia da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) em áreas de ocorrência no município de Maceió-AL. In: REUNIÃO NORDESTINA DE BOTÂNICA, 22., 1999, Maceió. **Resumos...** Maceió, 1999. p. 51.
- FERREIRA, M. B. Frutos comestíveis do Distrito Federal. III. Pequi, mangaba, marolo e mamãozinho. **Cerrado**, Brasília, v. 5, n. 20, p. 22-25, abr./jun. 1973.
- GEORGE, E. F. **Plant Propagation by Tissue Culture**, Part I: the technology. Edington: Exegetics, 1996. 1574 p.
- FONSECA, F. K. P. de; LEMOS, E. E. P. de; OLIVEIRA, J. G. L.; ALENCAR, L. M. C. de. Efeito do balanço hormonal na organogênese e multiplicação de brotos de mangabeira *Hancornia speciosa* Gomes *in vitro*. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DA MANGABA, I., 2003, Aracaju. **Anais...** Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2003. 1 CD-ROM. Seção Resumos Expandidos.
- 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 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Brasília, Brasília.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção extrativista vegetal**. 2002. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 09 maio 2007.

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

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

MARTINELLI, L.; SCIENZA, A.; GIANAZZA, E.; VILA, P. L. Somatic embryogenesis from leaves and petioles of grapevine. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 289, 1985, p. 243-244.

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

NARAIN, N. Mangaba. In: NAGY, S.; SHAW, P. E.; WARDOWSKI, W. F. (Ed.). **Fruits of tropical and subtropical origin: composition, properties and uses**. Lake Alfred: Florida Science Source, 1990. p. 159-165.

NAVES, R. V. **Espécies frutíferas nativas dos cerrados de Goiás: caracterização e influências do clima e dos solos**. 1999. 206 p. Tese (Doutorado) – Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

OLIVEIRA, L. M. de. **Citocininas nos processos anatômicos, citológicos e fisiológicos durante o cultivo *in vitro* e aclimatização de *Annona glabra* L.** 2006. 104 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

OLIVEIRA, L. M. Q.; VALIO, I. F. M. Effects of moisture contention germination of seeds of *Hancornia speciosa* Gomes (*Apocynaceae*). **Annals of Botany**, London, v. 69, n. 1, p. 1-5, Jan. 1992.

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

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

RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. Fitofisionomias do bioma Cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. (Ed.). **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 1998. p. 87-166.

SALOMÃO, A. N.; ALLEM, A. C. Polyembryony in angiospermous trees of the Brazilian Cerrado and Caatinga vegetation. **Acta Botanica Brasilica**, São Carlos, v. 15, n. 3, p. 369-378, set./dez. 2001.

SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. (Ed.). **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. 556 p.

SILVEIRA, F. A. da. **Abelhas silvestres (*Hymenoptera: Apoidea*) e suas fontes de alimento no cerrado na Estação de Experimentação de Paraopeba, Minas Gerais**. 1989. 50 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

SOARES, F. P. **Aspectos do cultivo *in vitro* da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes)**. 2005. 121 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

TAKEY, K.; SAKAKIBARA, H.; SYGIYAMA, T. Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Biology and Chemistry**, Rockville, v. 276, n. 28, p. 26405-26410, July 2001.

TIAN, M. S.; DOWNS, C. G.; LILL, R. E.; KING, G. A. A role for ethylene in the yellowing of broccoli. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 119, n. 2, p. 276-281, Mar. 1994.

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

VIEIRA NETO, R. D. Mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). In: SIMPÓSIO NACIONAL DE RECURSOS GENÉTICOS DE FRUTEIRAS NATIVAS, 1992, Cruz das Almas. **Anais...** Cruz das Almas: EMBRAPA-CNPMPF, 1993. p. 109-116.

VIEIRA NETO, R. D. **Cultura da mangabeira**. Aracaju: Embrapa – CPATC, 1994. 16 p. (Circular Técnica, 02).

VILLACHICA, H.; CARVALHO, J. E. U.; MULLER, C. H.; DIAZ, S. C.;  
ALMANZA. **Frutales y hortalizas promisorios de la Amazonia**. Lima:  
Tratado de Cooperacion Amazonica, 1996. p. 227-231. (SPT-TCA, 44).

WISNIEWSKI, A.; MELO, C. F. M. de. **Borrachas naturais brasileiras: III.**  
borracha de mangabeira. Belém: Embrapa-CPATU, 1982. 59 p. (Documentos).

## CAPÍTULO 2

### EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE CITOCININA NA MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DA MANGABEIRA

#### RESUMO

SOARES, Fernanda Pereira. Efeito de diferentes fontes de citocinina na multiplicação *in vitro* da mangabeira. In: \_\_\_\_\_. **Influência das citocininas nos aspectos anatômicos, bioquímicos e fisiológicos do cultivo *in vitro* da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes).** 2008. p. 17-38. Tese (Doutorado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

A mangabeira destaca-se por possuir grande potencial como planta frutífera. Suas sementes apresentam recalcitrância, dificultando sua propagação, o que torna evidente a necessidade da obtenção de mudas por via assexuada. Neste contexto, a cultura de tecidos apresenta-se como uma alternativa a ser utilizada. Entre os fatores que afetam a morfogênese *in vitro*, as citocininas merecem destaque, afetando a diferenciação de gemas e o crescimento das brotações. Avaliou-se, neste trabalho, o efeito da ausência e presença de três fontes de citocinina (BAP, CIN e TDZ) na multiplicação *in vitro* de explantes caulinares de mangabeira. Entre as citocininas testadas, o BAP induziu maior número de brotações (1,98), gemas (19,22) e folhas (18,86) por explante e foi responsável pela formação de brotos de maior comprimento (4,55 cm). As brotações oriundas de meio não suplementado com citocinina apresentaram maior facilidade de enraizamento. Das citocininas testadas, o BAP foi responsável pela maior taxa de multiplicação (9,61) de brotações de mangabeira. Os subcultivos sucessivos afetaram negativamente a capacidade de multiplicação de explantes caulinares da espécie.

## ABSTRACT

SOARES, Fernanda Pereira. Effect of different sources of cytokinins in the *in vitro* multiplication of mangabeira. In: **Influence of cytokinins in anatomical, biochemical and physiological aspects of *in vitro* growth of mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes)**. 2008. p. 16-37. Tese (Doctorate in Plant Physiology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Mangabeira stands out for having a high potential as fruit plant. The seeds have recalcitrance, making the propagation difficult, which highlights the necessity of obtaining seedlings through asexual methods. In this context, the tissue culture is presented as an alternative to be used. Among the factors that affect *in vitro* morphogenesis, cytokinins deserve some highlight, affecting the differentiation of buds and the growth of shoots. It was evaluated in this work the effect of absence and presence of three sources of cytokinins (6- benzylaminopurine - BAP, kinetin - CIN and thidiazuron - TDZ) in the *in vitro* multiplication of shoot explants of mangabeira. Among the tested cytokinins, BAP induced a higher number of shoots (1,98), buds (19,22) and leaves (18,86) by explant and was in charge of the formation of shoot with a longer length (4,55 cm). The shoots from culture media not supplemented with cytokinin had more facility of rooting. Of the tested cytokinins, BAP was responsible for the higher rate of shoot multiplication (9,61) of mangabeira. The subsequent subcultures negatively affected the capacity of shoot explant multiplication of the species.

## 1 INTRODUÇÃO

A mangabeira, pertencente à família *Apocynaceae*, é uma espécie frutífera de clima tropical que vegeta no Nordeste do Brasil, atingindo também o Cerrado da região central. Produz frutos comestíveis, consumidos *in natura* e utilizados na industrialização de sucos, doces e sorvetes (Espíndola & Ferreira, 2003).

De acordo com Campbell (1996), a propagação dessa espécie por métodos tradicionais tem sido dificultada pelo fato de suas sementes serem recalcitrantes. Além disso, por ser alógama, sua propagação pela via sexuada resulta em elevado grau de variabilidade de inúmeras características de importância econômica.

A propagação vegetativa por meio de estaquia, enxertia e mergulhia, para a mangabeira, também não tem logrado êxito suficiente para ser utilizada em viveiros comerciais (Vasques-Araújo et al., 1996).

Neste contexto, a micropropagação surge como uma ferramenta importante. Sua utilização permite a multiplicação em larga escala e em curto espaço de tempo, a partir de pequenos fragmentos de tecidos.

Dentre os fatores que controlam a morfogênese *in vitro*, destacam-se os reguladores de crescimento. As citocininas, juntamente com as auxinas, são as classes mais utilizadas.

Além de serem essenciais à citocinese, as citocininas promovem alterações na taxa metabólica, na atividade enzimática, a indução e a formação de órgãos, a quebra de dominância apical, a mobilização de nutrientes orgânicos e inorgânicos e o aumento da longevidade de tecidos e órgãos (Oliveira, 2006; Howell et al., 2003).

Das citocininas comercialmente disponíveis, a 6-benzilaminopurina (BAP) é a que, em geral, tem apresentado melhores resultados *in vitro* na

promoção da multiplicação de diversas espécies, sendo utilizada em, aproximadamente, 60% dos meios de cultivo, seguida da cinetina (CIN), com cerca de 23% (Grattapaglia & Machado, 1998).

De acordo com Peres (2002), o efeito diferencial dos vários tipos de citocininas, quando aplicados ao meio de cultura, pode estar relacionado ao fato de cada um deles interferir de modo particular no metabolismo hormonal endógeno.

Objetivou-se, com a realização deste trabalho, avaliar a influência de diferentes fontes de citocininas na indução de brotações *in vitro* de mangabeira, bem como o efeito residual dessa classe de reguladores no enraizamento e em sucessivos subcultivos.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas do Setor de Fisiologia Vegetal, do Departamento de Biologia, da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

### 2.1 Indução de brotações *in vitro* em explantes caulinares de mangabeira

Plântulas de mangabeira originadas de sementes germinadas *in vitro*, em meio *Wood Plant Medium* (WPM), definido por Lloyd & McCown (1980), foram utilizadas como fonte de explantes.

Segmentos caulinares contendo até duas gemas laterais foram inoculados em meio de cultura WPM basal e em meio WPM suplementado com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de três diferentes citocininas: BAP, CIN e TDZ. Foram utilizados 30,0 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 7,0 g L<sup>-1</sup> de ágar. O pH foi ajustado para 5,8, antes da autoclavagem a 120°C, durante 20 minutos.

Após a inoculação, os tubos foram vedados com tampas e filmes plásticos e mantidos em sala de crescimento, a 27±2°C de temperatura, irradiância de fótons de 50 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 16 horas. Foram avaliados o número de brotações, de gemas e de folhas por explante e o comprimento da maior brotação, aos 35 dias de cultivo.

Adotou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC), analisando-se 50 plantas por tratamento. Para a análise estatística, foi utilizado o programa Sisvar 4.6 (Ferreira, 1999). As médias foram comparadas, pelo teste de Scott & Knott, a 5% de probabilidade.

### 2.2 Enraizamento *in vitro* de brotações de mangabeira

Brotações de mangabeira, provenientes de meio de cultura WPM basal e WPM suplementado com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, CIN e TDZ, após serem

individualizadas, foram inoculadas em meio WPM adicionado de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de ácido indolbutírico (AIB). Foram utilizados 30,0 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 7,0 g L<sup>-1</sup> de ágar. O pH foi ajustado para 5,8, antes da autoclavagem a 120°C, durante 20 minutos.

Após a inoculação, os tubos foram vedados com tampas e filmes plásticos e mantidos em sala de crescimento, no escuro, a 27±2°C de temperatura. Quinze dias depois, as brotações foram transferidas para meio WPM basal, permanecendo durante 30 dias sob irradiância de fótons de 50 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, temperatura de 27±2°C e fotoperíodo de 16 horas. Foram avaliados o número de raízes por brotação e o comprimento da maior raiz formada.

Adotou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC), analisando-se 20 plantas por tratamento. Para análise estatística, foi utilizado o programa Sisvar 4.6 (Ferreira, 1999). As médias foram comparadas, pelo teste de Scott & Knott, a 5% de probabilidade.

### **2.3 Multiplicação *in vitro* de explantes caulinares de mangabeira em diferentes subcultivos**

A partir das brotações de mangabeira originadas do cultivo *in vitro* em meio WPM basal e em meio WPM suplementado com diferentes fontes de citocinina (BAP, CIN e TDZ), foram realizados três subcultivos, em intervalos de 35 dias, inoculando-se os explantes no mesmo meio de cultura anterior. Os explantes caulinares foram subcultivados com duas gemas axilares.

Após a inoculação, os tubos foram vedados com tampas e filmes plásticos e mantidos em sala de crescimento, a 27±2°C de temperatura, irradiância de fótons de 50 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 16 horas. Foram avaliados, ao final do cultivo inicial (35 dias) e em cada um dos subcultivos, a taxa de multiplicação, o número de brotações e gemas por explante e o comprimento da maior brotação formada. A taxa de multiplicação foi determinada dividindo-se o número de

gemas, obtido ao final de cada período de 35 dias, pelo número inicial de gemas do explante, segundo metodologia descrita por Erig & Schuch (2002).

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), tendo sido analisadas 20 brotações por tratamento. Para a análise estatística, utilizou-se o programa Sisvar 4.6 (Ferreira, 1999) e as médias foram comparadas pelo teste de Scott & Knott, a 5% de probabilidade.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Indução de brotações *in vitro* em explantes caulinares de mangabeira

A formação de brotações ocorreu em todos os tratamentos testados (Tabela 1), mesmo na ausência de citocinina. Entretanto, a adição de citocininas ao meio de cultura basal propiciou um incremento da proliferação de brotos.

**TABELA 1.** Efeito da adição de BAP, CIN e TDZ ( $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) no número médio de brotações, folhas e gemas, e no comprimento da maior brotação formada em explantes caulinares de mangabeira, 35 dias após a inoculação.

Fonte de citocinina	Nº de brotações	Comprimento médio da maior brotação (cm)	Nº de gemas	Nº de folhas
Controle	1,58 b	1,78 c	5,96 c	5,02 c
BAP	1,98 a	4,55 a	19,22 a	18,86 a
CIN	1,92 a	3,46 b	10,20 b	9,80 b
TDZ	1,70 b	3,13 b	11,32 b	10,90 b

\* Médias seguidas pela mesma letra, em cada coluna, não diferem entre si, de acordo com o teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

As maiores médias observadas, 1,98 e 1,92 brotações por explante, resultaram da adição ao meio nutritivo de BAP e CIN, respectivamente.

Resultados semelhantes foram obtidos por Santos et al. (2005) que, trabalhando com explantes caulinares de *Anana erectifolius* L. B. Smith, verificaram a formação de maior número de brotos (5,83 por explante) em meio de cultura suplementado com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP.

Oliveira (2006), em experimentos visando à indução de brotações em *Annona glabra* L., observou a formação de 1,33 e 1,26 brotos por explante, quando adicionou ao meio de cultura WPM, 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e CIN, respectivamente.

A superioridade do BAP em relação a outras fontes de citocinina, na multiplicação *in vitro*, foi também registrada por Mantovani (1997), em experimentos visando à regeneração de caixeta.

O aspecto visual das brotações formadas em explantes caulinares de mangabeira inoculados em meio de cultura suplementado com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP pode ser observado na ilustração da Figura 1.



**FIGURA 1.** Aspecto visual de brotações formadas em explantes caulinares de mangabeira inoculados em meio de cultura suplementado com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP.

Das citocininas testadas, o TDZ foi a que propiciou a menor proliferação de brotos (1,7 por explante), os quais, ao longo da cultura, apresentaram-se mal formados, com caules retorcidos e folhas atípicas.

Na Figura 2 pode-se observar o aspecto visual das brotações formadas em explantes caulinares de mangabeira inoculados em meio de cultura suplementado com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de TDZ.



**FIGURA 2.** Aspecto visual de brotações formadas em explantes caulinares de mangabeira, inoculados em meio de cultura suplementado com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de TDZ.

Observações semelhantes foram feitas por Nannetti & Pinto (1995) e por Mantovani et al. (2001), na multiplicação de *Heliconia* e de *Cordia trichotoma*, respectivamente.

A formação de menor número de brotos com a utilização de TDZ pode estar relacionada ao fato de essa citocinina ser mais ativa biologicamente que as demais. De acordo com Alves et al. (1995), a maior atividade biológica do TDZ na multiplicação, em relação a outras fontes, se deve ao incremento da atividade da enzima fosfatase ácida, responsável pela interconversão nucleotídeo-nucleosídeo da estrutura de citocininas endógenas, tornando-as biologicamente

ativas e atuando como um inibidor de crescimento, se utilizado em elevadas concentrações.

Para certas espécies, algumas desvantagens têm sido relatadas e associadas ao uso do TDZ, como hiper-hidria (Briggs et al., 1988; Gribaudo & Fronda, 1991), morfologia anormal de folhas (Van Nieuwkerk et al., 1986; Briggs et al., 1988; Gribaudo & Fronda, 1991; Kim et al., 1997), gemas curtas e não alongadas (Preece & Imel, 1991; Kim et al., 1997), gemas fasciadas (Huetteman & Preece, 1993), diminuição ou eliminação do enraizamento (Badzian et al., 1989; Gribaudo & Fronda, 1991).

Com relação ao comprimento do maior broto formado, a maior média (4,55 cm) foi verificada na presença de BAP no meio nutritivo.

Maior número de gemas e folhas (19,22 e 18,86, respectivamente) foi observado em explantes caulinares inoculados em meio de cultura suplementado com a citocinina BAP. Os menores valores foram encontrados em meio WPM basal.

O incremento do número de gemas, verificado com a suplementação do meio nutritivo com BAP, está diretamente relacionado ao maior número de brotações formadas na presença dessa citocinina. Esse achado concorda com os resultados obtidos por Faria & Fortes (1996) que, trabalhando com *Malus prunifolia*, também observaram intensa formação de gemas (14,7 por explante) nessas condições de cultivo.

Houve formação de calos basais somente nos explantes caulinares em contato com as três citocininas testadas, principalmente naqueles cultivados em presença de TDZ.

Segundo Murthy et al. (1995), a ação diferenciada do TDZ em relação a outras citocininas e à intensa formação de calos, muitas vezes observada em explantes cultivados em sua presença, pode estar relacionada ao fato de esse

regulador de crescimento induzir a acumulação de auxinas e citocininas endógenas nos tecidos.

A formação de calosidade na base do segmento caulinar não é desejável nessa fase de multiplicação, já que o calo pode comprometer a proliferação de gemas axilares e afetar o enraizamento (Grattapaglia & Machado, 1998).

Foi verificado o enraizamento de 60% dos explantes caulinares de mangabeira inoculados em meio de cultura WPM basal (Figura 3).



**FIGURA 3.** Presença de raízes em brotações formadas em explantes caulinares de mangabeira inoculados em meio WPM basal.

### **3.2 Enraizamento *in vitro* de brotações de mangabeira**

Houve formação de raízes em todos os tratamentos testados. Observou-se, no entanto, maior capacidade de enraizamento das brotações oriundas de meio de cultura basal, em relação às que foram multiplicadas na presença de citocininas (Figura 4).



**FIGURA 4.** Aspecto visual de raízes formadas em brotação de mangabeira inoculada em meio WPM basal.

A adição das citocininas CIN e BAP ao meio de cultura durante a fase de multiplicação provocou redução significativa no número de raízes formadas por explante (Tabela 2).

**TABELA 2.** Efeito residual de BAP, CIN e TDZ ( $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) no número médio de raízes e comprimento da maior raiz formada em brotações de mangabeira, 45 dias após a inoculação.

Fonte de citocinina	Nº de raízes por brotação	Comprimento médio da maior raiz (cm)
Controle	1,70 a	0,94 a
BAP	0,75 b	0,09 b
CIN	0,35 b	0,09 b
TDZ	1,95 a	0,35 b

\* Médias seguidas pela mesma letra, em cada coluna, não diferem entre si, de acordo com o teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Resultados semelhantes foram obtidos por Machado et al. (2006) que, trabalhando com a multiplicação *in vitro* de porta-enxerto de videira ‘VR043-43’, observaram que as diferentes concentrações de BAP testadas reduziram a formação de raízes.

Efeito inibitório das citocininas sobre a iniciação de raízes laterais também foi verificado, em *Passiflora* spp., por Faria & Segura (1997). Grattapaglia et al. (1987) constataram efeito residual do BAP inibindo o enraizamento em *Eucalyptus urophylla*, *E. cloeziana* e *E. citriodora*.

Franclet (1985), citado por Caldas et al. (1998), relata que o contato prolongado das culturas com elevadas concentrações de BAP, na fase de multiplicação, pode exigir até seis subcultivos em meio contendo carvão ativado, para eliminar o efeito residual da citocinina e permitir um bom enraizamento.

Neste trabalho, maior número de raízes, 1,95 e 1,70, foi verificado em brotações originadas de meio de cultura suplementado com TDZ e de meio WPM basal, respectivamente.

Resultados diferentes foram encontrados por Hoepfner et al. (1996) que, estudando o efeito de diferentes fontes de citocinina na multiplicação *in vitro* de *Rubus* sp., verificaram a formação de menor número de raízes em microestacas derivadas de meio de cultura suplementado com TDZ.

Em relação ao comprimento da maior raiz formada, a maior média (0,94 cm) foi observada em brotações multiplicadas em meio não suplementado com citocinina.

Oliveira (2006) verificou maior comprimento de raízes (6,58, 4,98 e 4,94 cm) em brotações de *Annona glabra* L. multiplicadas na presença das citocininas BAP, zeatina e cinetina, respectivamente.

### 3.3 Multiplicação *in vitro* de explantes caulinares de mangabeira em diferentes subcultivos

Ao final do cultivo inicial, maior número de brotos (1,98 por explante) foi verificado com a adição da citocinina BAP ao meio nutritivo. Esse valor permaneceu praticamente constante nos três subcultivos posteriores (Tabela 3), indicando a manutenção da capacidade de proliferação de brotações nos explantes caulinares de mangabeira inoculados em meio de cultura suplementado com essa citocinina.

**TABELA 3.** Número de brotações em explantes caulinares de mangabeira inoculados em meio WPM basal e WPM suplementado com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, CIN e TDZ, em função do número de subcultivos.

Fonte de citocinina	Cultivo			
	Inicial	1	2	3
Controle	1,7 aA	0,8 bB	0,6 cB	0,3 cB
BAP	1,98 aA	2,1 aA	2,3 aA	2,3 aA
CIN	1,8 aA	1,7 aA	1,3 bB	1,1 bB
TDZ	1,7 aA	1,0 bB	1,1 bB	0,9 bB

\* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, de acordo com o teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Para explantes cultivados em meio de cultura sem a adição de citocininas, maior número de brotos (1,7) foi observado nos primeiros 35 dias. Nos subcultivos posteriores, houve queda no valor dessa variável resposta.

Esse mesmo padrão repetiu-se com o uso de CIN e TDZ. Para essas duas citocininas, o número de subcultivos afetou negativamente a proliferação de brotos.

Maior número de gemas foi observado em explantes caulinares inoculados em meio de cultura suplementado com BAP. Na presença dessa citocinina, o maior valor para a variável resposta foi verificado ao final do período de cultivo inicial (Tabela 4).

**TABELA 4.** Número de gemas em explantes caulinares de mangabeira inoculados em meio WPM basal e WPM suplementado com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, CIN e TDZ, em função do número de subcultivos.

Fonte de citocinina	Cultivo			
	Inicial	1	2	3
Controle	5,58cA	1,5bB	2,4bB	1,2cB
BAP	19,22aA	7,6aB	9,3aB	9,6aB
CIN	10,18bA	5,2aB	4,1bB	7,8aA
TDZ	11,32bA	2,0bC	2,1bC	4,6bB

\* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, de acordo com o teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

A ausência de citocinina mostrou-se um fator desfavorável à proliferação de gemas. Menor valor (1,2 gemas por explante), neste caso, foi verificado ao final dos três subcultivos.

Com os sucessivos subcultivos, o BAP provocou a interrupção do crescimento das brotações de mangabeira. Para esse tratamento, menor

comprimento de brotos (0,92 cm) foi verificado ao final do segundo subcultivo (Tabela 5).

**TABELA 5.** Comprimento do maior broto em explantes caulinares de mangabeira inoculados em meio WPM basal e WPM suplementado com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, CIN e TDZ, em função do número de subcultivos.

Fonte de citocinina	Cultivo			
	Inicial	1	2	3
Controle	1,78 cA	0,39 aB	0,64 aB	0,37 cB
BAP	4,54 aA	0,95 aB	0,92 aB	1,91 bB
CIN	3,41 bB	1,02 aC	1,09 aC	4,52 aA
TDZ	3,12 bA	0,65 aB	0,75 aB	3,61 aA

\* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, de acordo com o teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Para CIN e TDZ, brotações de maior comprimento, 4,52 e 3,61 cm, respectivamente, foram encontradas ao final do terceiro subcultivo.

Quanto à taxa de multiplicação, o valor máximo (9,61), para todos os tratamentos, ocorreu ao final do cultivo inicial, na presença de BAP (Tabela 6).

**TABELA 6.** Taxa de multiplicação em explantes caulinares de mangabeira inoculados em meio WPM basal e WPM suplementado com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, CIN e TDZ, em função do número de subcultivos.

Fonte de citocinina	Cultivo			
	Inicial	1	2	3
Controle	2,79 cA	0,75 bB	1,2 bB	0,6 cB
BAP	9,61 aA	3,8 aB	4,65 aB	4,8 aB
CIN	5,09 bA	2,6 aB	2,05 bB	3,9 aA
TDZ	5,66 bA	1,0 bC	1,05 bC	2,3 bB

\* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, de acordo com o teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Lima & Moraes (2006), trabalhando com o cultivo de diferentes genótipos de bananeira em meio nutritivo suplementado com a citocinina BAP, observaram menores taxas de multiplicação entre o terceiro e o sexto subcultivo. Os autores sugerem que o decréscimo se deveu, provavelmente, ao acúmulo da citocinina no explante. Segundo eles, uma das maneiras para tentar maximizar a produção de brotos seria alternar concentrações altas e baixas dessa classe de reguladores.

De acordo com Santos et al. (2006), uma maior taxa de multiplicação *in vitro* implica na maior velocidade do processo de micropropagação e na redução da necessidade de constante estabelecimento de novas culturas.

Em meio WPM basal, ocorreram as menores taxas de multiplicação, com o valor mínimo (0,6) encontrado ao final do terceiro subcultivo.

#### 4 CONCLUSÕES

O meio de cultura WPM, suplementado com  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP, na fase de multiplicação, induz as melhores respostas organogênicas na cultura de segmentos caulinares de mangabeira.

Brotações de mangabeira oriundas de meio de cultura WPM basal apresentam maior facilidade de enraizamento *in vitro*.

Das citocininas testadas, o BAP é responsável pela maior taxa de multiplicação de brotações de mangabeira.

Os subcultivos afetam negativamente a capacidade de multiplicação de explantes caulinares da espécie.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, R. M. M.; LEMOS, G. B.; COSTA, M. P. Efeitos do thidiazuron na atividade da fosfatase ácida durante a micropropagação da arnica (*Solidago microglosa*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 5., 1995, Lavras. **Anais...** Lavras, 1995. p. 196.
- BADZIAN, T.; FOTYMA-KERN, J.; HENNEN, G. R.; OGLESBY, P. The influence of 6-benzyladenine and thidiazuron on organogenesis of *Brassica actinophylla* Endl. Cv. Amate shoot explants. **Acta horticulturae**, Wageningen, n. 251, p. 191-197, 1989.
- BRIGGS, B. A.; MCCULLOCH, S. M.; EDICK, L. A. Micropropagation of azeleas using thidiazuron. **Acta horticulturae**, Wageningen, n. 227, p. 330-333, 1988.
- 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-CNPQ. v. 1. p. 87-132, 1998.
- CAMPBELL, R. J. South American fruits deserving further attention. In: JANICK, J. (Ed.). **Progress in new crops**. Arlington: ASHS Press, 1996. p. 431-439.
- DEBI, B. R.; TAKETA, S.; ICHII, M. Cytokinin inhibits lateral root initiation but stimulates lateral root elongation in rice (*Oryza sativa*). **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 162, n. 5, p. 507-515, May 2005.
- ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido: efeito da orientação do explante no meio de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 293-295, ago. 2002.
- ESPÍNDOLA, A. C. de M.; FERREIRA, E. G. Aspectos nutricionais e adubação da mangabeira. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DA MANGABA, 1., 2003, Aracaju. **Resumos...** Aracaju: Embrapa – CPATC, 2003. 1 CD-ROM.
- FARIA, J. T. C. **Calogênese e organogênese *in vitro* de porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido (*Malus prunifolia*)**. 1996. 50 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

FARIA, J. L. C.; SEGURA, J. *In vitro* control of adventitious bud differentiation by inorganic médium components and silver thiosulfate in explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. **In Vitro Cellular Developmental Biology -Plant**, Calgary, v. 33, n. 3, p. 209-212, July/Sept. 1997.

FERREIRA, D. F. **SISVAR – Sistema de análise de variância para dados balanceados**. Lavras: UFLA, 1999.

GRATTAPAGLIA, D.; ASSIS, T. F.; CALDAS, L. S. Efeito residual de BAP e NAA na multiplicação e enraizamento *in vitro* de *Eucalyptus*. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 2., 1987, Brasília, DF. **Resumos...** Brasília, DF: [s.n.], 1987. p. 10.

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.

GRIBAUDO, I.; FRONDA, A. Effects of thidiazuron on Grapevine axillary buds cultivated *in vitro*. **HortScience**, Alexandria, v. 26, n. 8, p. 1083, Aug. 1991.

HOEPFNER, A. S.; NESTBY, R.; NYBOM, H. Genetic deviation initiated by adventitious shoot regeneration from tissue cultured red raspberry. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v. 71, n. 1, p. 71-79, Jan. 1996.

HOWELL, S. H.; LALL, S.; CHE, P. Cytokinins and shoot development. **Trends in Plant Science**, London, v. 8, n. 9, p. 453-459, Sept. 2003.

HUETTEMAN, C. A.; PREECE, J. E. Thidiazuron: a potent cytokinin for wood plant tissue culture. **Plant cell, tissue and organ culture**, Dordrecht, v. 33, n. 2, p. 105-119, May 1993.

KIM, M. K.; SOMMER, H. E.; BONGARTIEN, B. C.; MERKLE, S. A. High-frequency induction of adventitious shoots from hypocotyl segments of *Liquidambar styraciflua* L. by thidiazuron”. **Plant cell reports**, New York, v. 16, n. 8, p. 536-540, May 1997.

LIMA, J. D.; MORAES, W. da S. Concentração de benzilaminopurina e avaliação de protocolo para multiplicação *in vitro* de genótipos de bananeira. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 36, n.1, p. 13-19, jan./abr. 2006.

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.

MACHADO, M. P.; BIASI, L. A.; RITTER, M. RIBAS, L. L. F.; KOEHLER, H. S. Multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de videira VR043-43 (*Vitis vinifera* X *Vitis rotundifolia*). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 4, p. 648-655, jul./ago. 2006.

MANTOVANI, N. C. **Estudo da regeneração *in vitro* de caixeta (*Dydimopanax morototoni* (Aubl.) Dene et Planch)**. Santa Maria: UFSM, 1997. 106 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

MANTOVANI, N. C.; FRANCO, E. T. H. VESTENA, S. Regeneração *in vitro* de louro-pardo (*Cordia trichotoma* (Vollzo) Arrábida ex Steudel). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 11, n. 2, p.93-101, dez. 2001.

MURTHY, B. N. S.; MURCH, S. J.; SAXENA, P. K. Thidiazuron – induced somatic embryogenesis in intact seedlings of peanut (*Arachis hypogaea*): endogenous growth regulator levels and significance of cotyledons. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 94, n. 2, p. 268-276, June 1995.

NANNETTI, D. C.; PINTO, J. E. B. P. Efeito de diferentes níveis de nitrogênio e calico combinados com BAP e TDZ no desenvolvimento de *Heliconia* sp. *in vitro*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 5., 1995, Lavras. **Anais...** Lavras, 1995. p. 144.

OLIVEIRA, L. M. de. **Citocininas nos processos anatômicos, citológicos e fisiológicos durante o cultivo *in vitro* e aclimatização de *Annona glabra* L.** 2006. 104 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

PERES, L. E. P. As bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*: um conhecimento útil para o desenvolvimento de protocolos biotecnológicos. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 4, n. 25, p. 44-48, mar./abr. 2002.

PREECE, J. E.; IMEL, M. R. Plant regeneration from leaf explants of *Rhododendron* ‘P.J.M. hybrids’. **Scientia horticultrae**, Amsterdam, v. 48, n. 1-2, p. 159-170, Oct. 1991.

SANTOS, B. R.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R. C.; OLIVEIRA, L. M. de; SILVA, D. P. C. da; MARTINOTTO, C.; SOARES, F. P.; PAIVA, P. D. de O. Micropropagation of “pequizeiro” (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 2, p. 293-295, ago. 2006.

SANTOS, A. S. de A.; MACHADO, I. S.; LEÃO, A. L.; RAMOS, A. de. A. Concentrações de BAP e TDZ na propagação *in vitro* de Carauá (*Anana erectifolius* L. B. Smith). **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 3, n. 35, p. 62-65, jul./dez. 2005.

VAN NIEUWKERK, J. P.; ZIMMERMAN, R. H.; FORDHAM, I. Thidiazuron stimulation of apple shoot proliferation *in vitro*. **HortScience**, Alexandria, v. 21, n. 3, p. 516-518, June 1986.

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

### CAPÍTULO 3

#### EFEITO DE DIFERENTES FONTES E CONCENTRAÇÕES DE AUXINA NA MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE MANGABEIRA

##### RESUMO

SOARES, Fernanda Pereira. Efeito de diferentes fontes e concentrações de auxina na multiplicação *in vitro* de mangabeira. In: Efeito de diferentes fontes e concentrações de auxina na multiplicação *in vitro* da mangabeira. In: \_\_\_\_\_. **Influência das citocininas nos aspectos anatômicos, bioquímicos e fisiológicos do cultivo *in vitro* da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes).** 2008. p. 39-53. Tese (Doutorado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

O gênero *Hancornia* apresenta sementes com percentagem de germinação baixa e emergência lenta da plântula, dificultando a sua propagação sexuada. Além disso, sua multiplicação por estaquia, enxertia e alporquia não tem obtido sucesso. Estas limitações podem inviabilizar a produção comercial de mudas de mangaba. Neste contexto, a cultura de tecidos surge como uma ferramenta importante, que pode auxiliar na propagação da espécie de forma eficaz. Avaliou-se, neste trabalho, o efeito de diferentes concentrações de AIB (ácido indolbutírico) e ANA (ácido naftalenoacético) (0,0; 0,05; 0,1; 0,5 e 1,0 mg L<sup>-1</sup>) combinadas com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, no processo de multiplicação *in vitro* de mangabeira. A auxina AIB não alterou significativamente o padrão de multiplicação *in vitro* da espécie, mas contribuiu para o alongamento das brotações formadas. A maior média de comprimento de brotos (4,27 cm) foi obtida quando os explantes caulinares foram cultivados em meio suplementado com BAP e 0,1 mg L<sup>-1</sup> dessa auxina. ANA, até a concentração de 0,1 mg L<sup>-1</sup>, favoreceu o incremento do número de brotos formados (4,3 por explante), mas não contribuiu para o alongamento das brotações.

## ABSTRACT

SOARES, Fernanda Pereira. Effect of different sources and concentrations of auxins in the *in vitro* multiplication of mangabeira. In: \_\_\_\_\_. **Influence of cytokinins in anatomical, biochemical and physiological aspects of *in vitro* growth of mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes)**. 2008. p. 39-53. Tese (Doctorate in Plant Physiology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

The gender *Hancornia* presents seeds with a low percentage of germination and slow seedling emergence, making its sexual propagation difficult. Besides, its multiplication by cutting, grafting and layering hasn't been successful. These limitations may make the seedling commercial production of mangaba impossible. In this context, the tissue culture appears as an important tool, which can help the propagation of the specie efficiently. It was evaluated in this work the effect of different concentrations of AIB (indolbitiric acid) and ANA (naphthaleneacetic acid) (0,0; 0,05; 0,1; 0,5 e 1,0 mg L<sup>-1</sup>) combined with 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP (6-benzylaminopurine), in the process of *in vitro* multiplication of mangabeira. AIB auxin did not significantly change the standard of *in vitro* multiplication of the species, but it contributed for the formed shoot enlogation. The highest average of shoot length (4,27 cm) was gotten when the stem explants were cultivated in supplemented media with BAP and 0,1 mg L<sup>-1</sup> from this auxin. ANA, even the concentration of 0,1 mg L<sup>-1</sup>, helped to increase the number of formed shoots (4,3 per explant), but it did not contribute to the shoot enlogation.

## 1 INTRODUÇÃO

A mangabeira, espécie arbórea nativa do Cerrado, tem grande potencial como planta frutífera e na recuperação de áreas degradadas (Vieira Neto, 1994). Apesar de não constar das listas de espécies em extinção, tem seu germoplasma bastante ameaçado em diversas regiões, em decorrência da redução das áreas remanescentes dos ecossistemas nos quais ocorre.

O estabelecimento de plantios comerciais da mangabeira tem sido dificultado pelo curto período de armazenamento das sementes e pelo insucesso da sua propagação assexuada pelos métodos tradicionais.

Neste contexto, a micropropagação surge como uma alternativa a ser utilizada para a obtenção de um grande número de plantas uniformes, independente da época do ano (Borthakur et al., 1998).

Segundo Bonga (1985), por ser de manipulação relativamente fácil, principalmente devido ao tamanho do explante utilizado, e por originar plantas, em geral, geneticamente mais estáveis, a proliferação de gemas axilares é a técnica mais utilizada para a multiplicação *in vitro* de plantas lenhosas, como a mangabeira.

De acordo com Sano & Almeida (1998), observam-se diversos padrões de multiplicação, dependendo da espécie cultivada. Entretanto, quanto maior o número de brotos, menor será o seu comprimento. A vantagem de se obter brotos normais e alongados (maiores do que 1,5 cm) é que esses enraízam mais facilmente do que brotos curtos.

O crescimento e a organogênese *in vitro* são altamente dependentes da interação entre as substâncias de crescimento que ocorrem naturalmente na planta (hormônios) e os análogos sintéticos (reguladores de crescimento), os quais são adicionados ao meio de cultura (George, 1996).

Quoirin & Lepoivre (1977) constataram que, embora nem sempre as auxinas sejam necessárias no meio de multiplicação, essa classe de reguladores é usada com o intuito de estimular o crescimento das partes aéreas. De acordo com Lundergan & Janick (1979), a presença de uma auxina no meio de multiplicação anula o efeito inibitório das citocininas sobre o alongamento dos explantes. Dentre as auxinas mais usadas nos meios de multiplicação, destacam-se ANA (ácido naftalenoacético), AIB (ácido indolbutírico) e AIA (ácido indolacético).

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de estudar o efeito de diferentes concentrações de AIB e ANA, combinadas com BAP, no processo de multiplicação *in vitro* de mangabeira.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Efeito de diferentes concentrações de AIB combinadas com BAP na indução de brotações *in vitro*, em explantes caulinares de mangabeira

Plântulas de mangabeira germinadas *in vitro* em meio WPM (Lloyd & McCown, 1980) foram utilizadas como fonte de explantes.

Segmentos caulinares contendo até duas gemas laterais foram inoculados em meio de cultura WPM suplementado com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e diferentes concentrações de AIB (0,0; 0,05; 0,1; 0,5 e 1,0 mg L<sup>-1</sup>). Foram utilizados 30,0 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 7,0 g L<sup>-1</sup> de ágar. O pH foi ajustado para 5,8, antes da autoclavagem a 120°C, durante 20 minutos.

Os tubos foram vedados com tampas e filmes plásticos e mantidos em sala de crescimento, a 27±2°C de temperatura, irradiância de 50 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de fótons e fotoperíodo de 16 horas. Foram avaliados o número de brotações, gemas e folhas por explante e o comprimento da maior brotação formada, aos 35 dias de cultivo.

Adotou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC), analisando-se 15 plantas por tratamento. Para análise estatística, foi utilizado o programa Sisvar 4.6 (Ferreira, 1999). As médias foram comparadas pelo teste de Scott & Knott, a 5% de probabilidade.

### 2.2 Efeito de diferentes concentrações de ANA combinadas com BAP na indução de brotações *in vitro* em explantes caulinares de mangabeira

Plântulas de mangabeira germinadas *in vitro* em meio WPM foram utilizadas como fonte de explantes.

Segmentos caulinares contendo até duas gemas laterais foram inoculados em meio de cultura WPM suplementado com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e diferentes concentrações de ANA (0,0; 0,05; 0,1; 0,5 e 1,0 mg L<sup>-1</sup>). Foram utilizados 30,0

g L<sup>-1</sup> de sacarose e 7,0 g L<sup>-1</sup> de ágar. O pH foi ajustado para 5,8, antes da autoclavagem a 120°C, durante 20 minutos.

Os tubos foram vedados com tampas e filmes plásticos e mantidos em sala de crescimento, a 27±2°C de temperatura, irradiância de fótons de 50 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 16 horas. Foram avaliados o número de brotações, gemas e folhas por explante e o comprimento da maior brotação formada, aos 35 dias de cultivo.

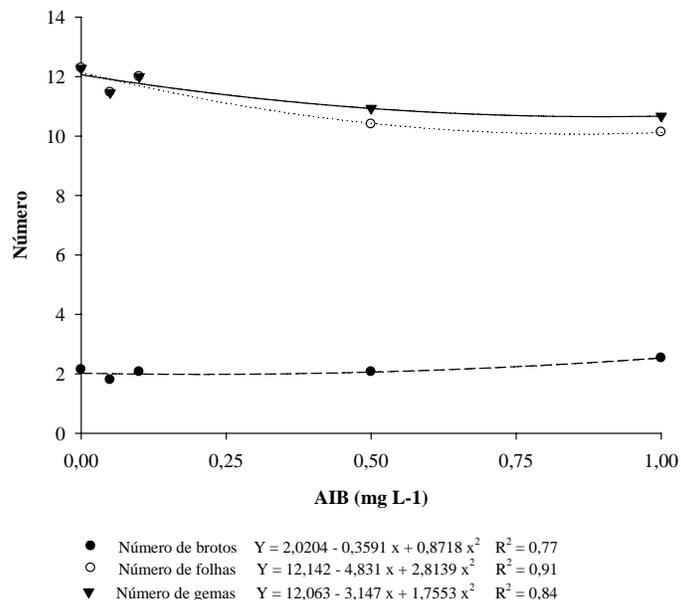
Adotou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC), analisando-se 15 plantas por tratamento. Para análise estatística, foi utilizado o programa Sisvar 4.6 (Ferreira, 1999). As médias foram comparadas pelo teste de Scott & Knott, a 5% de probabilidade.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Efeito de diferentes concentrações de AIB combinadas com BAP na indução de brotações *in vitro*, em explantes caulinares de mangabeira

Não foi verificado efeito significativo da adição da auxina AIB no meio de multiplicação, para as variáveis referentes a número de brotos, de gemas e de folhas.

A formação de brotos ocorreu em todos os tratamentos testados, com média próxima a 2,0 por explante (Figura 1).



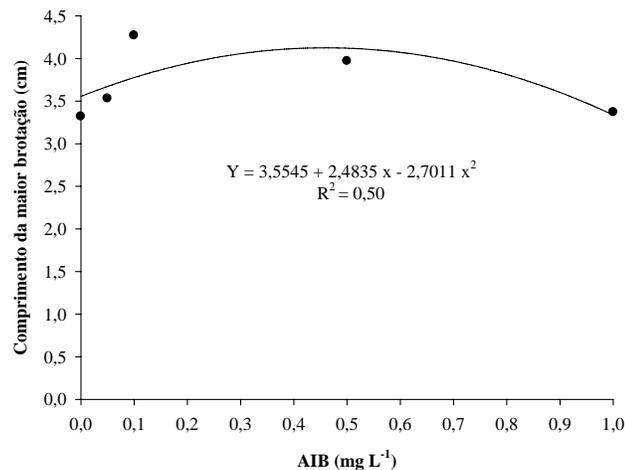
**FIGURA 1.** Número médio de brotos, folhas e gemas nos explantes caulinares de mangabeira, para cada concentração de AIB (0,0; 0,05; 0,1; 0,5 e 1,0 mg L<sup>-1</sup>) acrescentada ao meio de cultura WPM suplementado com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP.

Resultados contrastantes foram obtidos por Pasqual et al. (1991) que, trabalhando com amoreira-preta, verificaram maior produção de brotos com a adição de uma auxina sintética ao meio de cultura.

Maior número de gemas e folhas (12,29 e 12,28, respectivamente) foi observado em explantes caulinares cultivados em meio de cultura suplementado apenas com a citocinina. Os menores valores foram verificados quando a auxina foi adicionada ao meio de cultura na concentração de 1,0 mg L<sup>-1</sup>.

Esses resultados indicam que, provavelmente, os explantes caulinares de mangabeira utilizados para este experimento possuíam concentração endógena de auxina satisfatória para a fase de multiplicação.

Com relação à variável comprimento de brotações, o maior valor (4,27 cm) foi obtido quando os explantes caulinares foram cultivados em meio suplementado com BAP e 0,1 mg L<sup>-1</sup> de AIB. Em concentrações acima desta, a adição da auxina provocou a formação de brotos de menor comprimento (Figura 2).



**FIGURA 2.** Comprimento médio da maior brotação formada nos explantes caulinares de mangabeira, para cada concentração de AIB (0,0; 0,05; 0,1; 0,5 e 1,0 mg L<sup>-1</sup>), acrescentada ao meio de cultura WPM suplementado com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP.

Esse resultado corrobora com a afirmação de Quoirin & Lepoivre (1977) de que, apesar de as auxinas, em alguns casos, serem importantes para a obtenção de melhores resultados na fase de multiplicação, elas devem ser adicionadas ao meio de cultura em pequenas concentrações.

Lundergan & Janick (1979) confirmam a tendência de as auxinas, quando adicionadas ao meio de multiplicação, contribuírem para o alongamento das brotações, diminuindo os efeitos de “rosetamento” causados pela citocinina. De acordo com Taiz & Zeiger (2004), apesar de as citocininas endógenas serem evidentemente necessárias à proliferação normal das células e,

conseqüentemente, ao crescimento normal da parte aérea, a aplicação adicional dessa classe de reguladores de crescimento pode inibir o processo de alongamento de caules.

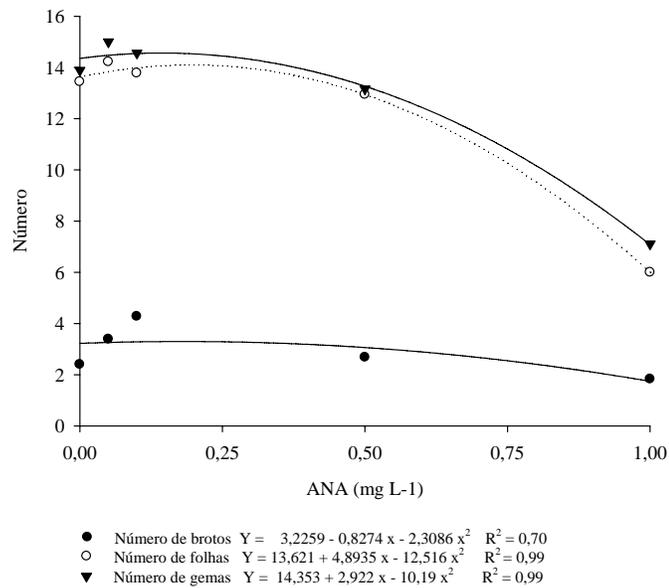
Verificou-se formação de calos basais nos explantes caulinares em todos os tratamentos testados. Maior formação calosa, entretanto, ocorreu nos explantes cultivados na concentração de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB (Figura 3), o que se traduz em efeito indesejável, em se tratando de propagação clonal.



**FIGURA 3.** Aspecto visual de formação calosa basal em explantes caulinares de mangabeira, inoculados em meio de cultura WPM suplementado com  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP e  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB.

### **3.1 Efeito de diferentes concentrações de ANA combinadas com BAP na indução de brotações *in vitro*, em explantes caulinares de mangabeira**

A formação de brotações nos explantes caulinares de mangabeira foi observada em todos os tratamentos testados (Figura 4).



**FIGURA 4.** Número médio de brotos, folhas e gemas nos explantes caulinares de mangabeira, para cada concentração de ANA (0,0; 0,05; 0,1; 0,5 e 1,0 mg L<sup>-1</sup>) acrescentada ao meio de cultura WPM suplementado com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP.

A adição da auxina ANA até a concentração de 0,1 mg L<sup>-1</sup> favoreceu o incremento do número de brotos formados (4,3 por explante) (Figura 5). A partir desse ponto, uma queda nos valores dessa variável foi verificada. É provável que a suplementação do meio de cultura com ANA em concentrações mais elevadas tenha provocado o desbalanceamento da relação endógena entre auxinas e citocininas nos explantes, reduzindo o número de brotações produzidas.



**FIGURA 5.** Aspecto visual de brotações formadas em explante caulinar de mangabeira, inoculado em meio de cultura WPM suplementado com  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP e  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA.

Corroborando com esses resultados, trabalhos realizados por Cheema & Sharma (1983) e Ochatt & Caso (1983), na multiplicação *in vitro* de macieira e por Ramirez-Malagon et al. (2001), na micropropagação de *Spathiphyllum floribundum*, mostraram que baixas concentrações de ANA, combinadas com BAP, induzem a proliferação de maior número de brotações.

Maior número de gemas e folhas (15 e 14,2, respectivamente) foi observado em explantes caulinares cultivados na presença da citocinina BAP, com a suplementação de  $0,05 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA. Os menores valores foram verificados com a adição da auxina ao meio de cultura, na concentração de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ .

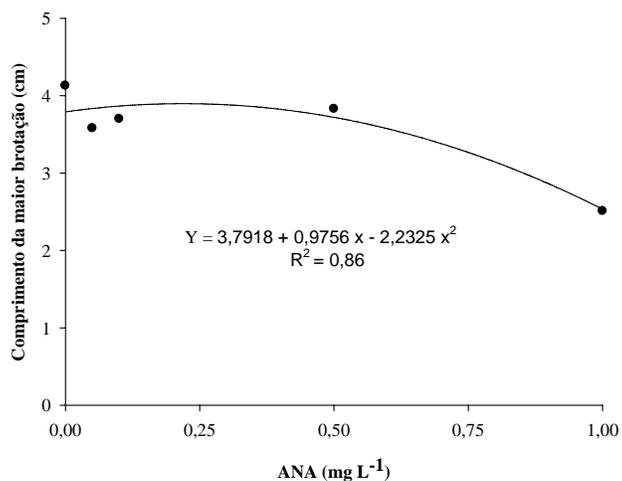
Del Castillo & Zerda (1990), trabalhando com *Rubus glaucus*, encontraram, como melhor tratamento para a proliferação de gemas *in vitro*, a associação de  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP com  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA.

Santos et al. (2006), em trabalho com micropropagação de *Caryocar brasiliense* Camb., verificaram formação de maior número de gemas (17,4) em

explantes caulinares inoculados em meio suplementado com 0,05 mg L<sup>-1</sup> de ANA e 0,75 mg L<sup>-1</sup> de BAP.

Resultados favoráveis para a utilização de BAP e ANA, em baixas concentrações, também foram observados por Bem-Jaacov & Dax (1981), quando induziram brotações *in vitro* de *Grevillea rosmarinifolia*.

Para o comprimento da maior brotação, o maior valor médio (4,13 cm) foi obtido em explantes caulinares cultivados em meio nutritivo suplementado apenas com BAP (Figura 6).



**FIGURA 6.** Comprimento médio da maior brotação formada nos explantes caulinares de mangabeira, para cada concentração de ANA (0,0; 0,05; 0,1; 0,5 e 1,0 mg L<sup>-1</sup>), acrescentada ao meio de cultura WPM suplementado com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP.

Verificou-se formação de calos basais nos explantes caulinares em todos os tratamentos testados. Maior formação calosa, entretanto, ocorreu nos explantes cultivados na concentração de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA.

#### 4 CONCLUSÕES

A auxina AIB, adicionada ao meio de cultura WPM acrescido de 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, não altera significativamente o padrão de multiplicação *in vitro* de mangabeira, mas contribui para o alongamento das brotações formadas.

A auxina ANA, quando adicionada, em pequenas concentrações, ao meio de cultura WPM acrescido de 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, altera positivamente o padrão de multiplicação *in vitro* de mangabeira, mas não contribui para o alongamento das brotações formadas.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEM-JAACOV, J.; DAX, E. *In vitro* propagation of *Grevillea rosmarinifolia*. **HortScience**, Alexandria, v. 16, n. 3, p. 309-310, 1981.
- BONGA, J. M. Tissue culture techniques. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. **Tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1985. p. 4-35.
- BORTHAKUR, M.; HAZARIKA, J.; SINGH, R. S. A protocol for micropropagation of *Alpinia galanga*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 55, n. 3, p. 231-233, 1998.
- CHEEMA, G. S.; SHARMA, D. P. *In vitro* propagation of apple rootstocks EMLA 25. 1983. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 131, p. 75-89.
- DEL CASTILLO, R. A.; ZERDA, A. Estudios preliminares para la propagacion clonal in vitro de mora (*Rubus glaucus* L.). **Agronomia Colombiana**, Bogotá, v. 7, n. 1-2, p. 17-25, 1990.
- FERREIRA, D. F. **SISVAR – Sistema de análise de variância para dados balanceados**. Lavras: UFLA, 1999.
- GEORGE, E. F. **Plant Propagation by Tissue Culture, Part 1: the technology**. Edington: Exegetics, 1996. 1574 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.
- LUNDERGAN, C.; JANICK, J. Low temperature storage of in vitro apple shoots. **HortScience**, Alexandria, v. 14, n. 4, p. 514, Aug. 1979.
- OCHATT, S. J.; CASO, H. C. *In vitro* meristem culture of M.4 apple (*Malus pumila* Mill) optimal nutrient medium. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 2, n. 1, p. 39-48, 1983.
- PASQUAL, M.; PEIXOTO, P. H. P.; SANTO, J. C. dos. Propagação *in vitro* da amora-preta (*Rubus* sp) cv.Ébano: uso de reguladores de crescimento. **Ciência e Prática**, Lavras, v. 15, n. 3, p. 282-286, jul./set. 1991.

QUOIRIN, M.; LEPOIVRE, P. Étude de milieux adaptés aux cultures *in vitro* de Prunus. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 78, p. 437-442, 1977.

RAMIREZ-MALAGON, R.; BORODANENKO, A.; BARRERA-GUERRA, J. L.; OCHOA-ALEJO, N. Shoot number and shoot size as affected by growth regulators *in vitro* cultures of *Spathiphyllum floribundum* L. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 89, n. 3, p. 227-236, July 2001.

SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. (Ed.). **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. 556 p.

SANTOS, B. R.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R. C.; OLIVEIRA, L. M. de; SILVA, D. P. C. da; MARTINOTTO, C.; SOARES, F. P.; PAIVA, P. D. de O. Micropropagação de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 2, p. 293-295, ago. 2006.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3 ed. Porto Alegre – RS: Editora Artmed, 2004. 719 p.

VIEIRA NETO, R. D. **Cultura da mangabeira**. Aracaju: Embrapa- CPATC, 1994. 16 p. (Circular Técnica, 02).

## CAPÍTULO 4

### ATUAÇÃO DE DIFERENTES FONTES DE CITOCININA NOS ASPECTOS BIOQUÍMICOS, ANATÔMICOS E ULTRA-ESTRUTURAIS DO CULTIVO *IN VITRO* DA MANGABEIRA

#### RESUMO

SOARES, Fernanda Pereira. Atuação de diferentes fontes de citocinina nos aspectos bioquímicos, anatômicos e ultra-estruturais do cultivo *in vitro* da mangabeira. In: \_\_\_\_\_. **Atuação das citocininas nos aspectos anatômicos, bioquímicos e fisiológicos do cultivo *in vitro* da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes)**. 2008. p.54-75. Tese (Doutorado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Entre os fatores que afetam a morfogênese *in vitro*, as citocininas merecem destaque. Para a identificação das fontes mais efetivas dessa classe de reguladores no retardo da senescência foliar e de possíveis alterações histológicas ocasionadas por ela, a análise bioquímica, anatômica e ultra-estrutural do material multiplicado poderá contribuir. Avaliou-se, neste trabalho, o efeito da ausência e da presença de diferentes fontes de citocinina sobre o retardo da senescência, a espessura dos parênquimas paliçádico e esponjoso, as dimensões dos estômatos, a densidade estomática e o comprimento e a largura de cloroplastos de folhas de brotações de mangabeira. Das citocininas testadas, BAP foi a mais eficiente no retardo da degradação de clorofilas. O TDZ, seguido da cinetina, induziu a maior acumulação de carotenóides nas folhas de brotações submetidas à senescência. Maior teor de proteína foi verificado no 6º dia de permanência das brotações no escuro. Ao final do período de senescência, as brotações cultivadas na presença de citocininas apresentaram os maiores teores de açúcares solúveis totais. BAP induziu aumento na espessura dos parênquimas paliçádico e esponjoso, promovendo também incremento na densidade estomatal. Em sua presença, os estômatos adquiriram formato elipsóide. A formação de cloroplastos de maiores dimensões foi verificada em folhas de brotações cultivadas na presença de cinetina.

## ABSTRACT

SOARES, Fernanda Pereira. Performance of different sources of cytokinins in biochemical, anatomical and ultrastructural aspects of *in vitro* cultivation of mangabeira In:\_\_\_\_\_. **Influence of cytokinins in anatomical, biochemical and physiological aspects of *in vitro* growth of mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes)**. 2008. p. 54-75. Tese (Doctorate in Plant Physiology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Among the factors that affect *in vitro* morphogenesis, the cytokinins deserve highlight. For the identification of the most effective sources of this type of regulators in leaf senescence delaying, and possible histological alterations occurred by it, the biochemical, anatomical and ultrastructural analyses of the multiplied material may contribute. It was evaluated in this work the effect of absence and presence of different sources of cytokinin in the senescence delaying thickness of palisade and spongy parenchymas, stomatal sizes, stomatal density length and width of leaf chloroplasts of shoots of mangabeira. Of the tested cytokinins, BAP was the most efficient in the delaying of chlorophyll degradation. TDZ, followed by kinetin, induced a higher accumulation of carotenoids in the shoot leaves submitted to senescence. A higher tenor of protein was found on the 6th day of staying of the shoots in the dark. At the end of senescence phase, the cultivated shoots in the presence of cytokinins showed the highest tenors of total soluble sugar. BAP induced an increase in the thickness of palisade and spongy parenchymas, also promoting some enhancing in the stomatal density. In its presence, the stomatals got an ellipsoid shape. The formation of chloroplasts of bigger dimensions was found in shoot leaves cultivated in the presence of kinetin.

## 1 INTRODUÇÃO

A mangabeira, espécie nativa do Cerrado e dos tabuleiros costeiros e baixadas litorâneas, é uma das mais importantes matérias-primas para a indústria de sucos e sorvetes do Nordeste do Brasil. Encontra-se, ainda, entre as dez espécies selecionadas como sendo de altíssima prioridade pelo programa Plantas do Futuro do CNPq/World Bank/GEF/MMA/Probio (Ferreira et al., 2005).

Técnicas de cultivo *in vitro* se mostram eficientes na sua propagação. No entanto, existem algumas limitações. A senescência foliar precoce, ocasionada pelo acúmulo de etileno nos tecidos confinados no ambiente *in vitro*, é um exemplo.

A redução nos níveis de clorofila e o concomitante amarelecimento de folhas são indicativos da ocorrência de senescência. O envelhecimento é o estágio final do desenvolvimento desses órgãos, ocorrendo modificações na estrutura, no metabolismo e na expressão gênica. Estruturalmente, células de folhas senescentes apresentam modificações subcelulares, como a perda da integridade dos cloroplastos, que contêm mais de 70% da proteína foliar. Em termos metabólicos, os processos de síntese são suplantados pelos de catálise, como o da clorofila e o de macromoléculas, como proteínas, lipídeos e RNA.

Tem-se inferido que a senescência é um processo regulado pelo balanço entre etileno e citocinina nos tecidos. Correlação inversa entre os níveis de citocinina nas folhas e o início da senescência tem sido constatada (Taiz & Zeiger, 2004).

A atuação das citocininas tem sido associada também a processos morfoanatômicos, como o desenvolvimento do sistema vascular (Aloni, 2001; Estelle, 2001), a expansão celular (Huff & Ross, 1975), a funcionalidade dos estômatos (Vaselova et al., 2005), a diferenciação dos cloroplastos e a manutenção do aparato fotossintético (Chernyad'ev, 2000; Kulaeva et al., 2002).

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito de diferentes fontes de citocinina no retardo da senescência e nos aspectos anatômicos e ultra-estruturais de folhas de brotações de mangabeira mantidas *in vitro*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas do Setor de Fisiologia Vegetal, do Departamento de Biologia, da Universidade Federal de Lavras (UFLA). As análises bioquímicas foram efetuadas no Laboratório de Bioquímica de Alimentos, do Departamento de Ciência dos Alimentos; as análises anatômicas, no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia e as análises ultra-estruturais, no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-Estrutural do Departamento de Fitopatologia da UFLA.

### 2.1 Material vegetal

Plântulas de mangabeira germinadas *in vitro* em meio WPM (Lloyd & McCown, 1980) foram utilizadas como fonte de explantes.

Segmentos caulinares contendo até duas gemas laterais foram inoculados em meio de cultura WPM basal e em meio WPM suplementado com  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  de três diferentes citocininas: BAP, CIN e TDZ. Foram utilizados  $30,0 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose e  $7,0 \text{ g L}^{-1}$  de ágar. O pH foi ajustado para 5,8, antes da autoclavagem a  $120^\circ\text{C}$ , durante 20 minutos.

Após a inoculação, os tubos foram vedados com tampas e filmes plásticos e mantidos em sala de crescimento, a  $27\pm 2^\circ\text{C}$  de temperatura, irradiância de fótons de  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 horas, permanecendo nessas condições por 35 dias.

## **2.2 Efeito de diferentes fontes de citocinina no retardo da senescência foliar em brotações de mangabeira cultivadas *in vitro***

Após 35 dias de cultivo, período correspondente ao final da fase de multiplicação, selecionaram-se 150 brotações de cada tratamento, com, aproximadamente, mesmo tamanho e aspecto. Essas foram submetidas à senescência em ambiente escuro, por um período de 12 dias. Foram coletadas folhas das brotações ao final do cultivo inicial (35 dias) e no 6º e 12º dia de indução de senescência para a realização das análises bioquímicas. Em cada período, efetuou-se a quantificação de clorofila total, carotenóides, proteínas e açúcares solúveis totais (AST).

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 3 (período de coleta) x 4 (citocinina). Em cada período, 50 brotações por tratamento foram utilizadas. Para a análise estatística, utilizou-se o programa Sisvar 4.3 (Ferreira, 1999). As médias foram comparadas pelo teste de Scott & Knott, a 5% de probabilidade.

### **2.2.1 Análises bioquímicas**

A quantificação de clorofila total foi realizada conforme o método proposto por Arnon (1949), efetuando-se leituras espectrofotométricas a 645 nm e a 663 nm.

Para o doseamento dos carotenóides totais, procedeu-se à extração em hexano e posterior leitura espectrofotométrica a 450 nm, segundo método Association of Official Analytical Chemists (1990).

Para análise do teor de açúcares solúveis totais, adotou-se o método de antrona (Dische, 1962), utilizando-se como padrão, glicose.

A determinação da fração protéica foi realizada por meio do doseamento do nitrogênio total pelo método Micro-Kjeldahl (AOAC, 1995), utilizando-se o fator 6,25 para conversão dos valores de nitrogênio total para a fração protéica.

Os teores de todas as variáveis analisadas foram expressos em micrograma por grama de matéria seca ( $\mu\text{g g}^{-1}$  de MS).

### **2.3 Análises anatômicas**

Para a realização das análises anatômicas, ao final dos 35 dias de cultivo inicial, foram coletadas, das brotações de mangabeira, folhas completamente expandidas, fixadas em álcool 70°GL. O estudo anatômico baseou-se no exame microscópico de secções transversais, obtidas com micrótomo manual, e de secções paradérmicas das superfícies abaxial e adaxial das folhas, obtidas à mão livre, ambas da região mediana.

As secções transversais foram clarificadas com hipoclorito de sódio 50%, lavadas em água destilada, coradas com azul de astra e safranina e montadas em glicerina 50%, segundo metodologia descrita por Kraus & Arduin (1997). As determinações da espessura dos tecidos foram realizadas com ocular micrométrica acoplada em microscópio de luz, avaliando-se cinco folhas oriundas de cinco brotações diferentes, com três medições realizadas no terço mediano da lâmina foliar, totalizando 15 repetições por tratamento.

As lâminas com secções paradérmicas das faces abaxial e adaxial das folhas foram montadas com solução corante de safranina 1% em água glicerinada. A contagem do número de estômatos foi realizada em microscópio Olympus CBB, utilizando-se câmara clara. As fotomicrografias foram obtidas com fotomicroscópio Olympus BX 60 e filme ASA 400 colorido. O cálculo da densidade estomática foi expresso em número de estômatos por  $\text{mm}^2$ , segundo a técnica de Labouriau et al. (1961). A amostragem consistiu de cinco folhas de

cinco brotações diferentes, avaliando-se quatro campos do terço mediano de cada lâmina foliar, totalizando 20 repetições por tratamento.

Foram quantificados a espessura dos parênquimas paliçádico e esponjoso e das epidermes adaxial e abaxial, o diâmetro polar e equatorial dos estômatos e a densidade estomática das folhas de mangabeira.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC). Para a análise estatística, utilizou-se o programa Sisvar 4.3 (Ferreira, 1999). As médias foram comparadas pelo teste de Scott & Knott, a 5% de probabilidade.

#### **2.4 Análises ultra-estruturais**

Para a realização das análises ultra-estruturais, ao final de 35 dias de cultivo, foram coletadas, das brotações de mangabeira, folhas completamente expandidas. As amostras foram imersas em solução fixadora Karnovisk (pH 7,2), por um período de 24 horas, lavadas em tampão cacodilato por três vezes, pós-fixadas em solução aquosa de tetróxido de ósmio 1% por 4 horas em temperatura ambiente, lavadas por três vezes em água destilada e, em seguida, desidratadas em acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%) por três vezes. Completada esta etapa, foi efetuada a inclusão do material em resina 30%, por 8 horas e, posteriormente, em resina 70%, por 12 horas. As amostras, após permanecerem por dois períodos de 24 horas cada em resina 100%, foram conduzidas à polimerização em estufa, a 70°C, por 48 horas.

Os blocos obtidos foram submetidos ao desbaste com lâminas de barbear para a retirada da resina excedente e realizados os cortes em seções semifinas (1µm) e ultrafinas (< 100nm), utilizando-se um ultramicrotomo Reichert-Jung (ultracut), com navalha de diamante. Os cortes semifinos foram coletados com anel de ouro e colocados em lâminas de vidro, corados com azul de toluidina (1 g de azul de toluidina, 1 g de borato de sódio e 100 mL de água, purificados em filtro Millipore 0,2 µm) e montados, permanentemente, em meio Permoult. Os

cortes ultrafinos foram coletados em uma gota de água com grades Slots e colocados em raques, cobertos com película de formvar (Rowley & Moran, 1975). As seções foram pós-contrastadas em acetato de uranila, seguido por acetato de chumbo por 3 minutos cada e, em seguida, examinadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss, modelo EM 902 a 80Kv.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC). Para a análise estatística, utilizou-se o programa Sisvar 4.3 (Ferreira, 1999). As médias foram comparadas pelo teste de Scott & Knott, a 5% de probabilidade.

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1 Efeito de diferentes fontes de citocinina no retardo da senescência foliar em brotações de mangabeira cultivadas *in vitro***

A presença de citocininas no meio de cultura e o tempo de senescência induzida influenciaram significativamente o teor de clorofilas totais em folhas de brotações de mangabeira mantidas *in vitro*.

Ao final dos 35 dias de cultivo inicial, no 6º e no 12º dia de permanência das brotações no escuro, observou-se maior acúmulo de clorofila total (297,4 208,7 e 194,4  $\mu\text{g g}^{-1}$  de MS) nas folhas dos brotos cultivados em meio WPM basal (Tabela 1).

**TABELA 1.** Teor de clorofila ( $\mu\text{g g}^{-1}$  de MS) em folhas de brotações de mangabeira cultivadas em meio de cultura WPM basal e WPM suplementado com diferentes fontes de citocinina (BAP, CIN e TDZ) ao final do período de cultivo inicial (35° dia) e no 6° e 12° dias de senescência induzida.

Fonte de citocinina	Período de cultivo		
	35° dia	6° dia	12° dia
Controle	297,4aA	208,7aB	194,4aC
BAP	181,6bA	178,8bA	173,7bA
CIN	153,4cA	150,6cA	139,1cB
TDZ	124,1dA	102,3dB	101,04dB

\* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, de acordo com o teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Para BAP, CIN e TDZ, o máximo acúmulo de clorofila total (181,6, 153,4 e 124,1  $\mu\text{g g}^{-1}$  de MS, respectivamente) se deu ao final do cultivo inicial. Das citocininas testadas, o BAP foi a que mais retardou a degradação desse pigmento. Oliveira et al. (2007), em trabalho com *Annona glabra*, encontraram como citocinina sintética mais efetiva no retardo da degradação da clorofila *in vitro*, a cinetina.

Quanto ao teor de carotenóides, aos 35 dias e durante toda a fase de manutenção das brotações no escuro, o TDZ, seguido da cinetina, induziu a maior acumulação desses pigmentos nas folhas das brotações de mangabeira (Tabela 2).

**TABELA 2.** Teor de carotenóides ( $\mu\text{g g}^{-1}$  de MS) em folhas de brotações de mangabeira cultivadas em meio de cultura WPM basal e WPM suplementado com diferentes fontes de citocinina (BAP, CIN e TDZ), ao final do período de cultivo inicial (35º dia) e no 6º e 12º dias de senescência induzida.

Fonte de citocinina	Período de cultivo		
	35º dia	6º dia	12º dia
Controle	4,03dB	5,15dB	8,1cA
BAP	8,61cB	10,8cA	8,23cB
CIN	12,12bA	12,39bA	12,4bA
TDZ	17,23aA	16,34aA	16,32aA

\* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, de acordo com o teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Oliveira et al. (2007) verificaram maior acúmulo de carotenóides em folhas de brotações de *Annona glabra* L. submetidas à senescência induzida na presença de cinetina.

De acordo com Chernyad'ev (2000), o acúmulo de carotenóides nas plantas é de grande importância na manutenção dos fotossistemas, permitindo maior organização do sistema lamelar. Esse mesmo autor sugere que a preservação de uma maior quantidade de carotenóides nas folhas, devido à adição de citocininas ao meio de cultura, pode possibilitar maior captação de energia pelos fotossistemas.

Quanto ao teor de proteínas, ao final dos 35 dias da fase de multiplicação, a diferença no valor dessa variável resposta não foi significativa para as citocininas testadas (Tabela 3).

**TABELA 3.** Teor de proteínas ( $\mu\text{g g}^{-1}$  de MS) em folhas de brotações de mangabeira cultivadas em meio de cultura WPM basal e WPM suplementado com diferentes fontes de citocinina (BAP, CIN e TDZ), ao final do período de cultivo inicial (35º dia) e no 6º e 12º dias de senescência induzida.

Fonte de citocinina	Período de cultivo		
	35º dia	6º dia	12º dia
Controle	4,51aB	7,5bA	7,46aA
BAP	4,4aB	5,8cA	5,8bA
CIN	4,4aC	9,36aA	5,66bB
TDZ	4,7aB	8,14bA	7,4aA

\* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, de acordo com o teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Em todos os tratamentos, verificou-se maior teor de proteínas no segundo período de coleta das folhas, aos 6 dias de senescência induzida.

De acordo com Taiz & Zeiger (2004), os tecidos senescentes realizam processos catabólicos que exigem a síntese de novo de várias enzimas hidrolíticas, tais como proteases, nucleases, lipases e enzimas degradadoras de clorofila, o que explicaria o maior teor protéico verificado logo após o início do período de senescência induzida.

Corroborando com essa afirmação, Kulaeva et al. (2002), em experimentos com *Hordeum vulgare* L., sugerem a participação ativa das citocininas na biossíntese de proteínas nos cloroplastos durante o período de senescência. Ainda de acordo com D'Agostinho et al. (2000), o aumento na

expressão de genes é um dos efeitos primários dessa classe de reguladores de crescimento.

Os açúcares solúveis totais (AST), com o início do período de escuro, apresentaram queda em seus valores, para todos os tratamentos. Esse decréscimo, verificado até o 6º dia, foi seguido por um aumento gradativo (Tabela 4).

**TABELA 4.** Teor de açúcares solúveis totais (AST) ( $\mu\text{g g}^{-1}$  de MS) em folhas de brotações de mangabeira cultivadas em meio de cultura WPM basal e WPM suplementado com diferentes fontes de citocinina (BAP, CIN e TDZ, ao final do período de cultivo inicial (35º dia) e no 6º e 12º dias de senescência induzida.

Fonte de citocinina	Período de cultivo		
	35º dia	6º dia	12º dia
Controle	1,81 cA	1,37bB	1,43cB
BAP	2,56aA	1,35bB	2,49aA
CIN	2,21bA	1,61aC	1,96cB
TDZ	1,7cB	1,16bC	2,01bA

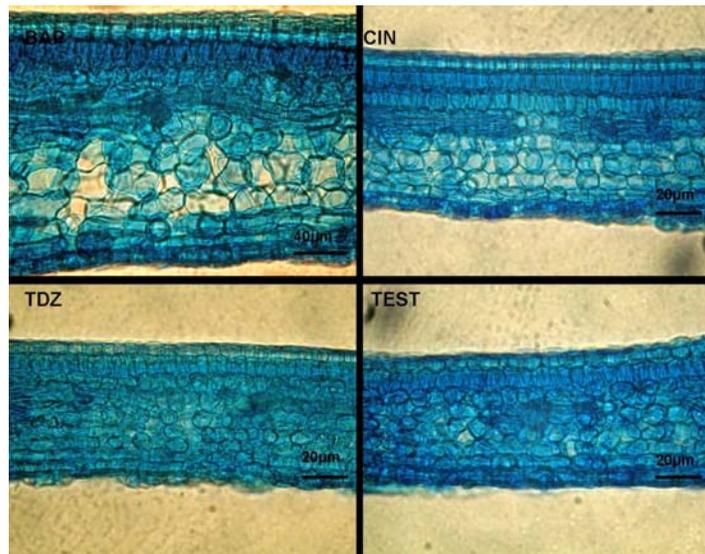
\* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, de acordo com o teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

As brotações cultivadas na presença de BAP apresentaram os maiores teores de AST aos 35 dias de cultivo e ao final do período de senescência induzida. Resultados contrastantes foram obtidos por Oliveira et al. (2007), que observaram que brotações de *Annona glabra* L. submetidas a tratamentos sem

adição de citocinina apresentaram maiores teores de AST durante o período de permanência na ausência de luz.

### 3.2 Análises anatômicas

As folhas de mangabeira, como verificado no estudo anatômico, apresentam organização dorsiventral (Figura 1).



**FIGURA 1.** Fotomicrografias de seções transversais de folhas de mangabeira cultivada *in vitro* em meio de cultura WPM basal (TEST) e WPM suplementado com diferentes fontes de citocinina: BAP, CIN e TDZ.

Pelos resultados obtidos na análise de variância, verificou-se que a presença de BAP no meio de cultura, durante a fase de multiplicação, afetou de modo significativo a espessura das epidermes adaxial e abaxial e do limbo foliar (Tabela 5).

**TABELA 5.** Espessura ( $\mu\text{m}$ ) das epidermes adaxial e abaxial, dos parênquimas paliçádico e esponjoso e do limbo de folhas de mangabeira cultivada em meio de cultura WPM basal e WPM suplementado com diferentes fontes de citocinina (BAP, CIN e TDZ).

Fonte de citocinina	Epiderme adaxial	Epiderme abaxial	Parênquima paliçádico	Parênquima esponjoso	Limbo foliar
Controle	11,38 b	10,77 b	12,17 b	74,08 b	108,42 b
BAP	16,53 a	13,89 a	18,71 a	92,44 a	141,57 a
CIN	10,7b	10,09 b	12,85 b	64,33 b	97,96 b
TDZ	6,45 c	10,31 b	11,27 b	68,02 b	96,06 b

\* Médias seguidas pela mesma letra, em cada coluna, não diferem entre si, de acordo com o teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Maior espessura das epidermes adaxial e abaxial (16,53 e 13,89  $\mu\text{m}$ , respectivamente) foi verificada em folhas de brotações cultivadas na presença dessa citocinina. Da mesma forma, para os parênquimas paliçádico e esponjoso, a máxima espessura (18,71 e 92,44  $\mu\text{m}$ , respectivamente) foi encontrada nas folhas de brotações de mangabeira cultivadas em meio acrescido de BAP.

Resultados semelhantes foram obtidos por Oliveira (2006) que, em experimentos com *Annona glabra* L., verificou a ação do BAP no aumento da espessura dos parênquimas paliçádico e esponjoso.

Segundo Chernyad'ev (2000), as citocininas desempenham relevante papel na ontogenia das folhas, sobretudo nos estágios iniciais, durante os quais ocorre a máxima taxa de divisão celular.

A atuação do BAP na formação de tecidos foliares durante o cultivo *in vitro* da mangabeira confirma a maior eficácia dessa fonte de citocinina na micropropagação da espécie.

A cinetina e o TDZ não se mostraram efetivos no estímulo ao desenvolvimento dos parênquimas paliçádico e esponjoso. Não foram verificadas alterações histológicas nos tecidos das brotações cultivadas na presença desses reguladores.

Em comparação ao que foi verificado nos demais tratamentos, as folhas das brotações de mangabeira cultivadas na presença de BAP apresentaram estômatos com maior diâmetro polar (27,51  $\mu\text{m}$ ), em relação ao equatorial (26,54  $\mu\text{m}$ ), o que lhes garantiu um formato mais elipsóide (Tabela 6).

**TABELA 6.** Diâmetro ( $\mu\text{m}$ ) equatorial, diâmetro polar e densidade estomática de folhas de mangabeira cultivadas em meio de cultura WPM basal e WPM suplementado com diferentes fontes de citocinina (BAP, CIN e TDZ).

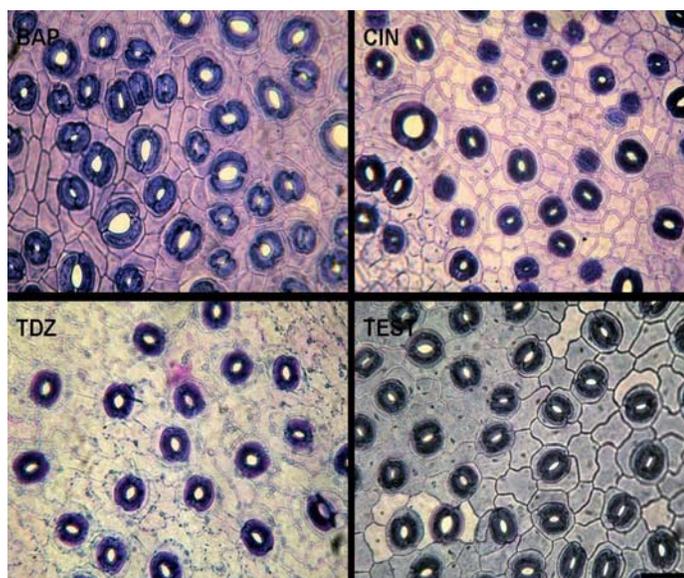
Fonte de citocinina	Diâmetro equatorial	Diâmetro polar	Densidade estomática
Controle	22,45 b	22,95 b	332,21 b
BAP	26,54 a	27,51 a	392,81 a
CIN	22,34 b	22,73 b	330,62 b
TDZ	20,39 c	21,14 b	301,83 c

\* Médias seguidas pela mesma letra, em cada coluna, não diferem entre si, de acordo com o teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

De acordo com Lee & Wetzstein (1988) e Sciutti & Morini (1995), há evidências de uma maior funcionalidade dos estômatos com formato elipsóide em relação aos de formato mais arredondado.

Maior densidade estomática (392,81 estômatos por  $\text{mm}^2$ ) foi observada nas folhas de brotações de mangabeira oriundas de meio de cultura acrescido de

BAP. A menor densidade estomática (301,83 estômatos por  $\text{mm}^2$ ) ocorreu na presença de TDZ (Figura 2).



**FIGURA 2.** Fotomicrografias de seções paradérmicas da superfície abaxial de folhas de mangabeira cultivada *in vitro* em meio de cultura WPM basal (TEST) e WPM suplementado com diferentes fontes de citocinina: BAP, CIN e TDZ. Barra = 50  $\mu\text{m}$ .

Nas plantas cultivadas na presença de BAP, além da maior densidade estomática, verificou-se a presença de paredes celulares menos sinuosas, em relação aos demais tratamentos.

### 3.3 Análises ultra-estruturais

A cinetina promoveu o maior desenvolvimento dos cloroplastos, tanto em comprimento (6,3  $\mu\text{m}$ ) quanto em largura (2,72  $\mu\text{m}$ ) (Tabela 7).

**TABELA 7.** Comprimento e largura ( $\mu\text{m}$ ) de cloroplastos em folhas de brotações de mangabeira cultivadas *in vitro*, em meio de cultura WPM basal e WPM suplementado com diferentes fontes de citocinina: BAP, CIN e TDZ.

Fonte de citocinina	Comprimento	Largura
Controle	3,85 c	2,21 a
BAP	4,99 b	1,63 b
CIN	6,3 a	2,72a
TDZ	3,92 c	1,57 b

\* Médias seguidas pela mesma letra, em cada coluna, não diferem entre si, de acordo com o teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Resultados semelhantes foram obtidos por Oliveira (2006) que, cultivando brotações de *Annona glabra* L. na presença dessa fonte de citocinina, verificou a formação de cloroplastos de maiores dimensões (6,21  $\mu\text{m}$  de comprimento e 2,45  $\mu\text{m}$  de largura).

As folhas das brotações de mangabeira cultivadas na ausência de citocininas e na presença de TDZ apresentaram cloroplastos menos desenvolvidos.

Corroborando com esses resultados, Oliveira (2006) verificou a formação de cloroplastos menores e de formato irregular em folhas de plantas de anonáceas cultivadas *in vitro*, na presença de TDZ.

#### 4 CONCLUSÕES

Durante o período de senescência induzida *in vitro*, BAP é a citocinina mais eficiente no retardo da degradação de clorofilas em folhas de brotações de mangabeira.

TDZ, seguido da cinetina, induz maior acumulação de carotenóides nas folhas de brotações da espécie submetidas à senescência induzida.

Maior teor de proteína é verificado durante o período de permanência das brotações de mangabeira no escuro.

Ao final do período de senescência, as brotações cultivadas na presença de citocininas apresentam os maiores teores de açúcares solúveis totais.

A adição de BAP ao meio de cultura afeta positivamente a diferenciação dos parênquimas paliçádico e esponjoso em folhas de brotações de mangabeira cultivadas *in vitro*.

Cinetina e TDZ não se mostraram efetivos no estímulo ao desenvolvimento dos tecidos parenquimáticos, em lâminas foliares da espécie.

Folhas de brotações de mangabeira cultivadas na presença de BAP apresentam maior densidade estomática e estômatos de formato mais elipsóide.

A cinetina afeta positivamente a formação de cloroplastos em folhas de brotações de mangabeira cultivadas *in vitro*.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALONI, R. Foliar and axial aspects of vascular differentiation: hypotheses and evidence. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 20, n. 1, p. 22-34, Mar. 2001.
- ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, Maryland, 24(1):1-15, 1949.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 15<sup>th</sup> ed. Washington, DC, 1990. 1298 p.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 17<sup>th</sup> ed. Arlington, 1995. 1141 p.
- ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, Maryland, v. 24, n.1, p. 1-15, Jan. 1949.
- CHERNYAD'EV, I. I. Ontogenetic changes in the photosynthetic apparatus and effects of cytokinins (Review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, Moscou, v. 36, n. 6, p. 527-539, Nov./Dec. 2000.
- D'AGOSTINO, B.; DERUERE, J.; KIEBER, J. J. Characterization of the response of the Arabidopsis ARR gene family to cytokinin. **Plant Physiology**, Rockville, v. 124, n. 4, p. 1706-1771, Dec. 2000.
- DISCHE, Z. General color reactions. In: WHISTLER, R. L.; WOLFRAM, M. L. (Ed.). **Carbohydrate chemistry**. New York: Academic Press, 1962. p. 477-512.
- ESTELLE, M. Cytokinin receptor: just another histidine kinase. **Current Biology**, Massachusetts, v. 11, n. 7, p. 271-273, Apr. 2001.
- FERREIRA, D. F. **SISVAR – Sistema de análise de variância para dados balanceados**. Lavras: UFLA, 1999.
- 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.; PAREYN, F. G. C.; FIGUEIRÔA, J. M. de; SANTOS JUNIOR, A. G. (Orgs.). **Espécies da flora nordestina de importância econômica potencial**. Recife: Associação Plantas do Nordeste, 2005. p. 49-100.

HUFF, A. K.; ROSS, C. W. Promotion of radish cotyledon enlargement and reducing sugar content by zeatin and red light. **Plant Physiology**, Rockville, v. 56, n. 3, p. 429-433, Mar. 1975.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**, Rio de Janeiro: EDUR, 1997. 198 p.

KULAEVA, O. N.; BURKHANOVA, E. A.; KARAVAIKO, N. N.; SELIVANKINA, S. Y.; PORFIVORA, S. A.; MASLOVA, G. G.; ZEMLYACHENCKO, Y. V.; BORNER, T. Chloroplasts affect the leaf response to cytokinin. **Journal of Plant Physiology**, Leipzig, v. 159, n. 12, p. 1309-1316, Dec. 2002.

LABOURIAL, L. G.; OLIVEIRA, J. G.; SALGADO-LABOURIAL, M. L. Transpiração de *Schizolobium parahyba* (Vell) Toledo I. Comportamento na estação chuvosa, nas condições de Caeté, Minas Gerais. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 3, p. 237-257, set. 1961.

LEE, N.; WETZSTEIN, H. Y. Quantum flux density effects on the anatomy and surface morphology of *in vitro* and *in vivo* developed sweetgum leaves. The **Journal of the American Society for Horticulture Science**, Alexandria, v. 113, n. 1, p. 167-171, Jan. 1988.

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

OLIVEIRA, L. M. de. **Citocininas nos processos anatômicos, citológicos e fisiológicos durante o cultivo *in vitro* e aclimatização de *Annona glabra* L.** 2006. 104 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

OLIVEIRA, L. M. de; PAIVA, R.; SANTANA, J. R. F. de; NOGUEIRA, R. C.; SOARES, F. P.; SILVA, L. C. Effect of cytokinins on senescence and foliar abscission during *in vitro* *Annona glabra* L. cultivation. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 29, n.1, p. 25-30, abr. 2007.

ROWLEY, C. R.; MORAN, D. T. A simple procedure for mounting wring wrinkle – free sections on formvar – coated slot grids. **Ultramicrotomy**, Amsterdam, v. 1, n.1, p. 151-155, 1975.

SCIUTTI, B. R.; MORINI, S. Water loss and photosynthesis of plum plantlets is influenced by relative humidity during rooting *in vitro*. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v. 70, n. 2, p. 221-228, Mar. 1995.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

VASELOVA, S. V.; FARHUTDINOV, R. G.; VASELOV, S. Y.; KUDOYAROVA, G. R.; VASELOV, D. S.; HARTUNG, W. The effect of root cooling on hormone content, leaf conductance and root hydraulic conductivity of durum wheat seedlings (*Triticum durum* L.) **Journal of Plant Physiology**, Leipzig, v. 162, n. 1, p. 21-26, Jan. 2005.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)