



ASPECTOS DO CULTIVO *IN VITRO* DA MANGABEIRA
(Hancornia speciosa Gomes)

FERNANDA PEREIRA SOARES

2005

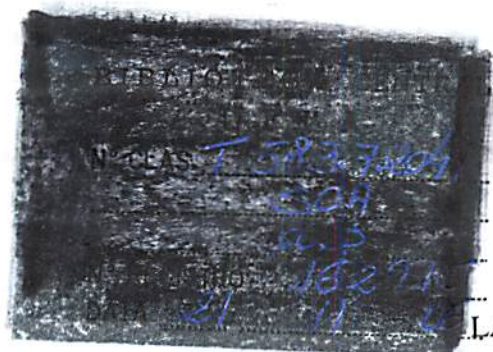
FERNANDA PEREIRA SOARES

ASPECTOS DO CULTIVO *IN VITRO* DA
MANGABEIRA
(*Hancornia speciosa* Gomes)

Dissertação 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
"Mestre".

Orientador

Prof. Dr. Renato Paiva



LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

2005

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

Soares, Fernanda Pereira

**Aspectos do cultivo *in vitro* da mangabeira (*Hancornia speciosa*
Gomes) / Fernanda Pereira Soares. – Lavras: UFLA, 2005.**

121 p.

Orientador: Renato Paiva

Dissertação (Mestrado) – UFLA

Bibliografia.

**1. *Hancornia speciosa*. 2. Cultivo. 3. Propagação. 4.
Germinação. 5. Organogênese. 6. Aclimatização. I. Universidade
Federal de Lavras. II. Título.**

CDD-634.9745

FERNANDA PEREIRA SOARES

**ASPECTOS DO CULTIVO *IN VITRO* DA
MANGABEIRA (*Hancornia speciosa* Gomes)**

Dissertação 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 "Mestre".

APROVADA em 09 de setembro de 2005.

Dr. Magdi Ahmed Ibrahim Aloufa **UFRN**

Dr. Breno Régis Santos **S & D Florestal**



Prof. Renato Paiva

UFLA

(Orientador)

A Deus e aos meus pais, William Soares de Lima e Nádia
Maria Pereira Soares,

OFEREÇO.

À minha irmã, Roberta.

Aos meus avós, Nércia, Alfeu, Zalfa e Wilson (*in memoriam*).

Aos meus tios, principalmente à Ivana, titia Conceição e tio Wilson.

Ao meu namorado Douglas.

Ao meu Orientador, Prof. Renato Paiva.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, à minha irmã, meus familiares e ao Douglas, por todo amor e encorajamento.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), em especial ao Setor de Fisiologia Vegetal, pela oportunidade de realização da pós-graduação.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador, professor Renato Paiva e sua esposa Patrícia Duarte de Oliveira Paiva, por toda atenção, apoio, amizade e conselhos durante estes anos.

Aos membros da banca examinadora: Prof. Magdi Ahmed Ibrahim Aloufa, Dr. Breno Régis Santos e Dr. Marcelo Murad Magalhães.

Aos professores Luiz Edson Mota de Oliveira, Ângela Maria Soares, José Donizete Alves, Luciano Paiva e Douglas Antônio de Carvalho, por todos os conhecimentos transmitidos.

Ao professor Evaristo Mauro de Castro pelos ensinamentos e grande amizade demonstrada, desde os tempos da graduação.

Ao professor Amauri Alves Alvarenga pela amizade e atenção sempre dispensada.

À grande amiga Raírys Cravo Nogueira, pela convivência, conselhos e valiosa ajuda na minha formação profissional.

Aos funcionários técnico-administrativos: Joel, Lena, Evaristo, Ana Cristina, D'Artagnan, Izonel, Barrinha e Odorêncio, por todo auxílio e pela simpatia sempre constante.

Aos amigos da Fisiologia Vegetal: Marilza, Andréa Shan, Dani (gaúcha), Inês, Cristina, Grécia, Morbeck, Rupert, Rúbia, Silvia, Ednabel, Kelceane, Anderson, Peterson, Sidnei, Janaína, Alessandro, Girlene, Karine, Larissa, Soami, João Paulo, Thatiane, Graciele, Lizandro, Paula, Evaristo e Ivana, por tornarem os meus dias de trabalho mais felizes.

Aos amigos Lenaldo e Cristiano, por serem exemplos de profissionais e pela valiosa ajuda.

Aos grandes companheiros: Franciane, Fernanda Nery, Samantha, Antonio Augusto, Carlos Vinício, Maiana, Cristina e Fernanda Grisi pelas inúmeras horas de alegria e pelo apoio em todos os momentos.

Aos amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas: Mauro, Ester Solange, Cíntia, Eduardo, Álvaro, Ana Cristina, Diogo, Letícia, Luciano, Rodrigo, Ednabel, Vanessa, Aline, Milene, Gabriela e Lucas pela ajuda e companheirismo durante todos esses anos.

Às colegas de graduação Daniella, Lívia, Marcela Nery, Tathiana, Neiva, Thaisa, Cristiane e Juliana, pela duradoura amizade.

Aos funcionários da Biblioteca da UFLA, por todo o auxílio prestado na busca de referências bibliográficas.

A todos que, de uma forma ou de outra, colaboraram para o encerramento desta etapa importante da minha vida e que, embora não citados aqui, não deixam de merecer meu profundo agradecimento.

BIOGRAFIA

FERNANDA PEREIRA SOARES, filha de William Soares de Lima e Nádya Maria Pereira Soares, nasceu em 8 de dezembro de 1980 em Lavras, MG. Mudou-se para Baependi, MG em seguida, onde estudou nos colégios Fundação Nhá Chica e Santo Inácio. Em 1995 transferiu-se para Lavras, finalizando o segundo grau em 1998, no Centro Educacional da Criança (CEC-Objetivo). Em março de 1999, iniciou o curso de graduação em Engenharia Agrônoma, na Universidade Federal de Lavras, concluindo-o em dezembro de 2003. Durante este período, foi monitora da disciplina Morfologia e Sistemática Vegetal, sob orientação do Prof. Douglas Antônio de Carvalho e desenvolveu projetos de pesquisa no Setor de Fisiologia Vegetal, sob a orientação dos professores Renato Paiva e Patrícia Duarte de Oliveira Paiva, como bolsista de iniciação científica da FAPEMIG. Em março de 2004, iniciou o curso de Mestrado em Agronomia – Fisiologia Vegetal na UFLA, concluindo-o em agosto de 2005.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
CAPÍTULO I: Introdução Geral	1
1 Introdução	2
2 Referencial Teórico	3
2.1 Descrição da espécie	3
2.2 Usos da espécie	6
2.3 Propagação da mangabeira	7
2.3.1 Propagação sexuada	7
2.3.2 Propagação assexuada	8
2.4 Aspectos anatômicos do cultivo <i>in vitro</i>	11
3 Referências Bibliográficas	13
CAPÍTULO II: Germinação <i>in vitro</i> e <i>ex vitro</i> de sementes de mangabeira	18
1 Resumo	19
2 Abstract	20
3 Introdução	21
4 Referencial Teórico	21
4.1 Germinação <i>in vitro</i>	21
5 Material e Métodos	24
5.1 Material Vegetal	24
5.2 Germinação <i>ex vitro</i>	24
5.2.1 Efeito de diferentes substratos	24
5.3 Germinação <i>in vitro</i>	25
5.3.1 Efeito de diferentes meios de cultura	25
5.3.2 Efeito do GA ₃ e da concentração de sacarose	26

5.3.3 Influência do pH.....	27
6 Resultados e Discussão	28
6.1 Germinação <i>ex vitro</i>	28
6.1.1 Efeito de diferentes substratos.....	28
6.2 Germinação <i>in vitro</i>	30
6.2.1 Efeito de diferentes meios de cultura.....	30
6.2.2 Efeito do GA ₃ e da concentração de sacarose.....	32
6.2.3 Influência do pH.....	34
7 Conclusões.....	35
8 Referências Bibliográficas	35
CAPÍTULO III: Organogênese direta em explantes caulinares de mangabeira	39
1 Resumo.....	40
2 Abstract	41
3 Introdução	42
4 Referencial Teórico	43
5 Material e Métodos	46
5.1 Efeito do BAP na indução de brotações.....	46
5.2 Efeito do ANA no enraizamento <i>in vitro</i> de brotações.....	47
5.3 Efeito do AIB no enraizamento <i>in vitro</i> de brotações.....	47
6 Resultados e Discussão	48
6.1 Efeito do BAP na indução de brotações.....	48
6.1.1 Número de brotos e de gemas por explante.....	48
6.1.2 Tamanho da maior brotação.....	51
6.1.3 Ocorrência de calos na base dos explantes.....	52
6.2 Efeito do ANA no enraizamento <i>in vitro</i> de brotações.....	55
6.3 Efeito do AIB no enraizamento <i>in vitro</i> de brotações.....	55
7 Conclusões	57

8 Referências Bibliográficas	57
CAPÍTULO IV: Controle da contaminação no estabelecimento <i>in vitro</i> de explantes foliares e caulinares de mangabeira	62
1 Resumo.....	63
2 Abstract	64
3 Introdução	65
4 Referencial Teórico.....	65
5 Material e Métodos	67
5.1 Efeito de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio e da presença de benomyl na desinfestação de explantes foliares.....	67
5.2. Efeito de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio e da presença de benomyl na desinfestação de explantes caulinares.....	68
6 Resultados e Discussão	69
6.1 Efeito de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio e da presença de benomyl na desinfestação de explantes foliares.....	69
6.2 Efeito de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio e da presença de benomyl na desinfestação de explantes caulinares.....	72
7 Conclusões	75
8 Referências Bibliográficas	75
CAPÍTULO V: Indução de calos em explantes foliares e caulinares de mangabeira	77
1 Resumo.....	78
2 Abstract	79
3 Introdução	80
4 Referencial Teórico.....	81
5 Material e Métodos	82
5.1 Efeito do 2,4-D e do BAP na indução de calos em explantes foliares de mangabeira cultivados em meio MS e WPM.....	82

5.2. Efeito do 2,4-D e do AIB na indução de calos em explantes foliares de mangabeira cultivados em meio WPM.....	84
5.3 Efeito do 2,4-D e do BAP na indução de calos em explantes caulinares de mangabeira cultivados em meio WPM.....	85
6 Resultados e Discussão	87
6.1 Efeito do 2,4-D e do BAP na indução de calos em explantes foliares de mangabeira cultivados em meio MS e WPM.....	87
6.2 Efeito do 2,4-D e do AIB na indução de calos em explantes foliares de mangabeira cultivados em meio WPM.....	92
6.3 Efeito do 2,4-D e do BAP na indução de calos em explantes caulinares de mangabeira cultivados em meio WPM.....	94
7 Conclusões	96
8 Referências Bibliográficas.....	97
CAPÍTULO VI: Aclimatização e caracterização anatômica do tecido foliar de plântulas de mangabeira obtidas via cultivo <i>in vitro</i> e após transferência para ambiente <i>ex vitro</i>	100
1 Resumo.....	101
2 Abstract	102
3 Introdução	103
4 Referencial Teórico.....	103
5 Material e Métodos	105
5.1 Aclimatização de plântulas de mangabeira germinadas <i>in vitro</i>	105
5.2 Anatomia foliar <i>in vitro</i> e <i>ex vitro</i>	106
6 Resultados e Discussão.....	107
6.1 Aclimatização de plântulas de mangabeira germinadas <i>in vitro</i>	107
6.2 Anatomia foliar <i>in vitro</i> e <i>ex vitro</i>	109
7 Conclusões	116
8 Referências Bibliográficas.....	117

RESUMO

SOARES, Fernanda Pereira. Aspectos do cultivo *in vitro* da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). 2005. 120p. Dissertação (Mestrado em 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 dessa espécie por meio de sementes, devido, principalmente, à baixa taxa de germinação e à recalcitrância, e a sua baixa resposta à regeneração por estaquia, valorizam a busca por soluções alternativas para a produção de mudas. O presente estudo teve por objetivo propor metodologias para o cultivo *in vitro* da mangabeira. Os resultados indicaram que não houve efeito significativo do tipo de substrato na germinação *ex vitro* de mangabeira. Maior percentagem de germinação *in vitro* foi obtida com a utilização dos meios de cultura WPM e MS/2, suplementados com 15,0 g L⁻¹ de sacarose, 0,2 mg L⁻¹ de GA₃ e com pH corrigido para 5,8. As concentrações de 5,0 mg L⁻¹ e 3,0 mg L⁻¹ de BAP foram as mais eficientes na indução, respectivamente, de brotações e gemas. O maior comprimento das brotações foi verificado em meio de cultura suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de BAP e a maior formação de calos ocorreu em meio suplementado com 4,0 mg L⁻¹ dessa citocinina. A auxina ANA não se mostrou eficiente, nas concentrações testadas, para o enraizamento *in vitro* de brotações de mangabeira. A auxina AIB, utilizada na concentração de 3,0 mg L⁻¹ propiciou o enraizamento de 20% das brotações. A desinfestação de explantes foliares e caulinares, em níveis satisfatórios, foi obtida em meio de cultura acrescido de benomyl, com a utilização de solução de hipoclorito de sódio 1,0% e 1,5%, respectivamente. As combinações de 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D + 2,0 mg L⁻¹ de BAP e de 3,0 mg L⁻¹ de 2,4-D + 3,0 mg L⁻¹ de BAP foram as mais eficientes na indução de calos em explantes foliares inoculados, respectivamente, em meio WPM e MS. Eficiência na calogênese de explantes foliares também foi promovida pela interação entre as auxinas 2,4-D e AIB. A inoculação de explantes caulinares em meio WPM acrescido somente de 2,4-D foi mais eficiente para a obtenção de calos. As plântulas de mangabeira germinadas *in vitro* que passaram pelo processo de pré-aclimatização apresentaram 86% de sobrevivência e aquelas aclimatizadas diretamente, 73%. Observaram-se diferenças anatômicas nas lâminas foliares de plântulas de mangabeira provenientes do ambiente *in vitro* e

* Comitê Orientador: Renato Paiva – UFLA (Orientador), Amauri Alves de Alvarenga – UFLA (Co-orientador), Patrícia Duarte de Oliveira Paiva – UFLA (Co-orientadora).

já aclimatizadas. As epidermes abaxial e adaxial não apresentaram diferenças significativas nos dois ambientes, ao contrário das espessuras dos parênquimas, que se apresentaram maiores nas lâminas foliares de plântulas já aclimatizadas. Maior densidade estomática foi verificada nas plântulas sob condição *in vitro*. Os estômatos das folhas em ambiente *in vitro* apresentaram diâmetros polar e equatorial maiores.

ABSTRACT

SOARES, Fernanda Pereira. Aspects of the *in vitro* culture of mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). 2005. 137 p. Dissertation (Master Program in Plant Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.*

The mangabeira has been spread out in a national scene, due to its delicious fruits. The difficulties encountered in the propagation process of this species due, primarily, to reduced seed germination, occurrence of recalcitrant seeds and a low response to regeneration from cuttings stimulate the search of alternatives for plant production. The objective of the present work was to propose different methodologies for the *in vitro* culture of mangabeira. The results showed no significant effect of the type of substrate for *ex vitro* seed germination. Higher *in vitro* seed germination was obtained using WPM and MS/2, supplemented with 15.0 g L⁻¹ sucrose, 0.2 mg L⁻¹ GA₃ and pH adjusted to 5.8. The concentrations of 5.0 and 3.0 mg L⁻¹ BAP were the most efficient for the induction of shoots and buds, respectively. Higher shoot length was observed using culture medium supplemented with 1.0 mg L⁻¹ BAP and major callus formation occurred in medium supplemented with 4.0 mg L⁻¹ BAP. The auxin NAA had no effect on root induction of shoots. The use of 3.0 mg L⁻¹ IBA promoted root formation in 20% of shoot explants. Disinfection of leaf and shoot explants, in satisfactory levels, was obtained using medium supplemented with benomyl and sodium hypochlorite solution 1.0% and 1.5%, respectively. The combinations of 2.0 mg L⁻¹ 2,4-D + 2.0 mg L⁻¹ BAP and 3.0 mg L⁻¹ 2,4-D + 3.0 mg L⁻¹ BAP were the most efficient in callus induction on leaf explants inoculated in WPM and MS, respectively. Efficiency on callus induction on leaf explants was also promoted with the interaction between the auxin 2,4-D and IBA. The inoculation of the nodal explants in WPM medium supplemented only with 2,4-D was the most efficient to induce callus. Plants cultivated *in vitro* that passed by the process of semi-acclimatization showed 86% survival and those direct acclimatized, 73%. Anatomical differences were observed in plants cultivated *in vitro* compared to those already acclimatized. The abaxial and adaxial epidermis presented no significant differences in both environments and was composed by one layer of cells covered with cuticle, which was thicker on the acclimatized plants. Higher stomata density was observed on plantlets cultivated *in vitro*. Stomata from plants cultivated *in vitro* presented higher polar and equatorial diameter.

* Guidance Committee: Renato Paiva – UFLA (Adviser), Amauri Alves de Alvarenga – UFLA (Co-adviser), Patrícia Duarte de Oliveira Paiva – UFLA (Co-adviser).

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

O Cerrado, bioma típico da zona tropical, é uma formação savânica que ocupa aproximadamente 2,0 milhões de km² e corresponde a 23,1% do território brasileiro, compreendendo o sul do Mato Grosso, os estados de Goiás, Tocantins, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais, o oeste da Bahia e o Distrito Federal. Estende-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. Segundo Barbosa (1996), algumas destas espécies podem constituir potenciais fontes de exploração econômica, desde que a pesquisa e o desenvolvimento de tecnologias viabilizem seu aproveitamento.

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

Existe, atualmente, um mercado potencial e emergente para as frutas nativas do Cerrado, a ser melhor explorado pelos agricultores, já que todo o aproveitamento desses frutos tem sido feito de forma extrativista e predatória. Neste cenário, o Cerrado tem sido agredido e depredado pela ação do fogo e dos tratores, colocando em risco de extinção várias espécies de plantas, entre elas algumas frutíferas nativas. Torna-se necessário, portanto, tomar medidas relacionadas ao desenvolvimento de metodologias de cultivo e propagação destas espécies, tanto para exploração econômica como para conservação.

Neste contexto, insere-se a mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), frutífera nativa do Cerrado, pertencente à família *Apocynaceae*. Sua propagação sexuada se caracteriza, assim como para outras espécies, por produzir indivíduos heterogêneos. Estudos indicam ainda, que as sementes desta espécie são extremamente recalcitrantes, o que tem limitado a obtenção de mudas destinadas à implantação de pomares comerciais e reflorestamento de áreas degradadas.

A propagação vegetativa por meio de estaquia, para a mangabeira, ainda não se consolidou como uma técnica viável, enquanto técnicas de cultivo *in vitro* têm se mostrado eficientes na propagação desta espécie. Estas técnicas apresentam inúmeras vantagens em relação a outros métodos de propagação, como a produção de mudas sadias em grande escala e com maior rapidez.

O presente trabalho teve por objetivo desenvolver um protocolo para a multiplicação *in vitro* e aclimatização de plântulas de 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. Fora do Brasil, essa frutífera é praticamente desconhecida, embora se saiba que ocorre também na Venezuela, Bolívia, Peru, Paraguai e, provavelmente, no Chaco argentino (Monachino, 1945).

Segundo Vieira Neto (1993), a mangabeira ocorre em maior densidade em solos pobres e de textura arenosa, predominantes na região do Cerrado e Tabuleiros Costeiros, indo desde as areias quartzosas até os podzólicos e latossolos. É observada em áreas com temperaturas médias anuais entre 24°C e

26°C e altitudes de até 1500 m. A pluviosidade ideal para o seu desenvolvimento pode estar entre 750 e 1600 mm anuais, sendo tolerante, contudo, a períodos de déficit hídrico.

A mangabeira possui altura mediana, atingindo de 2 a 10 m, copa ampla e ramos numerosos, separados e bem formados, de córtice levemente suberoso. Os ramos jovens são de coloração violácea, lisos até um ano de idade, meio angulosos, curtos, com poucas folhas e floríferos no ápice.

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 (Braga, 1960).

As folhas são opostas, simples, uniformemente espaçadas, coriáceas, elípticas, elíptico-lanceoladas nas duas extremidades, às vezes obtuso-subacuminadas no ápice. Têm de 3,5 a 10 cm de comprimento e de 1,5 a 5,0 cm de largura, sempre glabras nas duas faces, oliváceo-enegrescentes na face ventral e mais descoradas na dorsal, com pecíolo de 9 a 12 mm, axilar, fino, glabro e biglanduloso (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. A corola é hipocatenforme, de pré-floração contorcida, branca e, posteriormente, rósea ou amarela, tubulosa, perfumada; o tubo polínico possui de 3 a 4 cm de comprimento, com lobos de 1,0 a 1,5 cm; os pedicelos, de 6 a 8 mm, desaparecem junto a um cálice de 1 a 2 mm de comprimento, que pode ser glabro ou pubescente, com cinco lacínios ovais, obtusos, de margem ciliada. O androceu possui cinco estames epipétalos, com anteras lanceoladas de filetes curtos e deiscência rimosa. O gineceu possui ovário pequeno, unicarpelar, plúrioovular e glabro, com estilete longo e estigma típico da família (em carretel) (Villachica et al., 1996).

O fruto do tipo baga é elipsoidal ou arredondado, de 2,5 a 6,0 cm, com exocarpo amarelo dotado de manchas ou estrias avermelhadas, polpa bastante suave, doce, carnososo-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 o hilo no centro. O peso de 100 sementes com aproximadamente 50% de umidade é de $18,4 \pm 0,8$ g (Ferreira, 1973) (Figura 1).

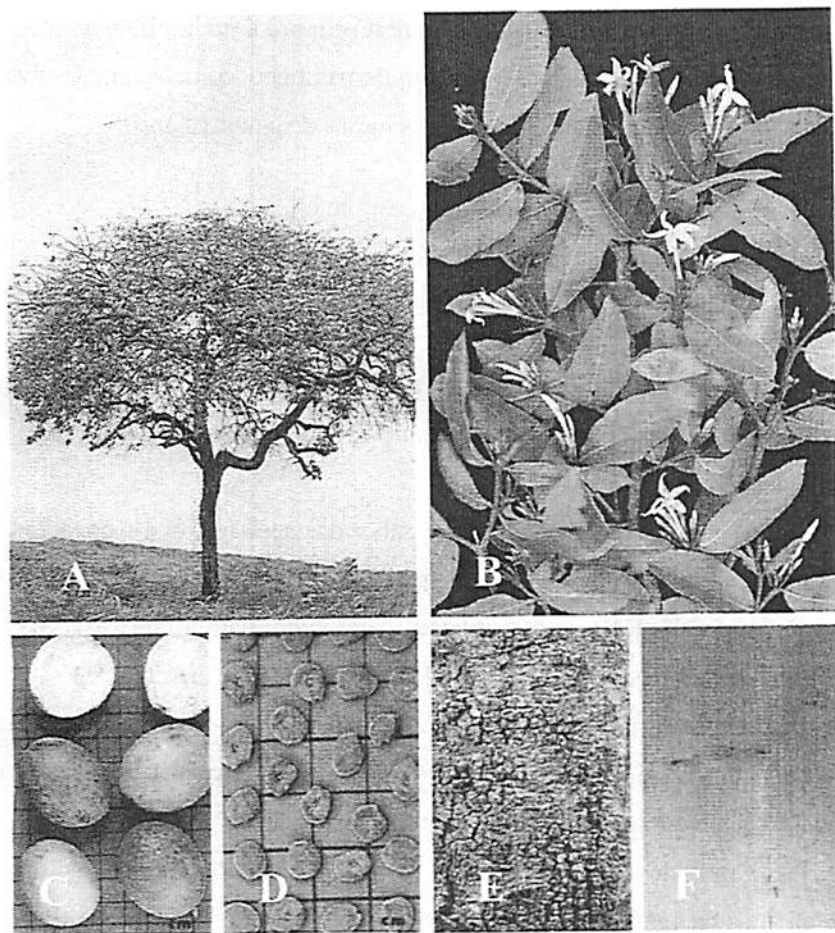


FIGURA 1. Aspecto visual de uma planta adulta (A), da inflorescência (B), de frutos (C), de sementes (D), da casca (E) e da madeira (F) de mangabeira. Fonte: Lorenzi, 2002. UFLA, Lavras, 2005.

Em geral, a mangabeira apresenta duas florações e frutificações durante o ano. A primeira floração, que ocorre de agosto a outubro, produz frutos no verão (entre janeiro e março) e é chamada de safra-botão. A segunda produção, que se dá de abril a junho (safra das flores), é a de inverno e é menor porque os frutinhas caem em grande quantidade devido às chuvas (Barros, 1967).

Vieira Neto (1994) relata que a frutificação ocorre praticamente durante todo o ano, com maior intensidade entre novembro e junho. Bezerra et al. (1997) determinaram a época de produção, em Pernambuco, como sendo de dezembro a maio, com maior concentração entre os meses de janeiro e abril.

2.2 Usos da espécie

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

Devido ao excelente aroma e sabor dos seus frutos, a mangabeira é uma das mais populares produtoras de matéria-prima para a agroindústria entre as frutíferas do Nordeste, sendo utilizada, sobretudo, para a fabricação de sucos e polpas congeladas (Lederman et al., 2000). No Brasil, além dessas formas, utiliza-se o fruto no consumo *in natura* e para a produção de doces, xaropes, compotas, licores, vinhos e vinagres (Braga, 1960; Barros, 1967). Como o fruto é ácido, pode também ser usado no preparo de geléias.

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

Estudos da composição nutricional de diversas frutas nativas do Cerrado revelaram que a mangaba possui um elevado teor de proteína, superior ao da maioria das espécies frutíferas. O elevado teor de ferro faz com que ela seja também uma das frutas mais ricas nesse nutriente, além de ser uma excelente fonte de ácido ascórbico (Narain, 1990).

Em algumas regiões, partes da planta são utilizadas na medicina popular, tendo a casca propriedades adstringentes e o látex sendo empregado contra a tuberculose, úlceras e herpes. O fruto verde é venenoso e impróprio para o consumo, causando intoxicações que podem levar à morte (Braga, 1960).

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).

Devido a todas estas características, a mangabeira se apresenta como uma espécie com grande potencial para ser utilizada em cultivos comerciais e reflorestamento de áreas degradadas ou de baixa capacidade de uso, podendo torná-las rentáveis.

2.3 Propagação da mangabeira

2.3.1 Propagação sexuada

A propagação sexuada da mangabeira é dificultada pelo fato de suas sementes serem recalcitrantes e a polpa do fruto ter uma ação inibitória sobre a germinação destas (Gricoletto, 1997). De acordo com Lorenzi (2002), normalmente, a percentagem de germinação de sementes desta espécie é baixa, devido à presença de inibidores na polpa. Além disso, a emergência e o desenvolvimento das mudas são lentos.

Devido ao elevado grau de recalcitrância, as sementes da mangabeira devem ser plantadas imediatamente ou até 48 horas depois de retiradas dos frutos, uma vez que, a partir do quarto dia, o poder germinativo cai 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 brusca na 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, exigindo rápida sementeira, a fim de evitar grandes perdas na capacidade de germinação. Isso acarreta um prolongado tempo de viveiro, tendo a muda que esperar até a próxima estação chuvosa para ser levada ao campo, aumentando, assim, 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 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 que, aos oito meses após a sementeira, 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 este método, inviabilizando-o pelo custo e espaço necessário.

Em virtude desses obstáculos, a cultura de tecidos poderá ser usada com grandes vantagens para a propagação da mangabeira.

Técnicas de cultura de tecidos são indicadas para determinadas espécies quando suas características botânicas impedem ou dificultam a propagação pelas

vias clássicas. Podem-se citar como exemplo espécies que apresentam dormência, recalcitrância ou grande variabilidade genética por meio de sua propagação sexuada, como verificado para a mangabeira.

Várias são as modalidades de cultura de tecidos, podendo ser por via direta, pelo desenvolvimento de novos órgãos diretamente do explante ou indireta, via cultura de calos. Estes calos podem ser submetidos a determinadas condições hormonais, as quais podem direcioná-los para o crescimento desorganizado ou para o desenvolvimento de órgãos, como gemas, raízes ou embriões, por organogênese ou embriogênese (Caldas, 1996). Podem ainda ser tratados com enzimas, obtendo-se protoplastos para a realização de trabalhos de engenharia genética ou obtenção de híbridos somáticos.

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

Um exemplo que justifica o uso da micropropagação é a multiplicação de plantas selecionadas por alta produtividade ou qualidade de frutos superiores. No caso de espécies cujas estacas não enraízam ou possuem baixo percentual de enraizamento, a cultura de tecidos pode representar solução para sua propagação. Outro caso, no qual a multiplicação *in vitro* é vantajosa, surge quando a espécie é rara ou produz poucas sementes e a produção de mudas é insuficiente para atender à demanda. Assim, a multiplicação por cultura de tecidos oferece a possibilidade de produzir dezenas ou centenas de mudas a partir de uma única semente ou matriz selecionada (Melo et al., 1998).

Para espécies lenhosas, a micropropagação apresenta algumas limitações que dificultam seu uso, como a grande variabilidade genética existente em plantas de espécies nativas e a maior dificuldade de crescimento e diferenciação

dos seus tecidos *in vitro* (Coelho, 1999). Para superar esses obstáculos, faz-se necessário o desenvolvimento de metodologias que atendam às exigências da planta e, em alguns casos, do explante em questão, tornando o processo bastante específico (Deccetti, 2000).

Segundo Pierik (1990), a propagação vegetativa *in vitro* apresenta cinco estágios diferentes. A fase 0 corresponde aos tratamentos dados à planta matriz, de onde são retirados os explantes. A fase 1 representa o momento em que um explante é isolado sob condições estéreis. A fase 2 é a fase de propagação, quando se objetiva conseguir a propagação do material vegetal sem a perda da estabilidade genética. A fase 3 envolve a preparação das brotações ou das plântulas obtidas na fase 2, para a transferência ao solo. Esse processo pode envolver a interrupção da formação de brotos axilares e o início do seu alongamento. Posteriormente, deve-se induzir a formação de raízes, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. A quarta e última fase é a da transferência das plântulas do tubo de ensaio para o solo e conseqüente estabelecimento.

Segundo Grattapaglia & Machado (1998) e George (1996), a maioria das plantas micropropagadas é obtida pela multiplicação de brotos axilares e a composição do meio de cultura é uma das variáveis que determinam o sucesso na proliferação das partes aéreas. Diversos meios básicos são utilizados na fase de multiplicação e suas variações mais freqüentes dizem respeito à composição de macronutrientes. A fonte de nitrogênio utilizada e o balanço entre os íons nitrato e amônio são aspectos que têm merecido maior atenção. O meio de cultura Murashige e Skoog (MS) (Murashige & Skoog, 1962) é o mais concentrado em termos de micro e macronutrientes e é também o mais empregado em cultura de tecidos (Pasqual, 2001). Já o meio de cultura WPM (do inglês wood plant medium) (Lloyd & McCown, 1980) é bastante utilizado para plantas lenhosas, por possuir baixas concentrações de íons totais.

Outra possibilidade de micropropagação é a multiplicação mediante indução de gemas adventícias por organogênese direta ou indireta. A organogênese direta refere-se ao surgimento de órgãos a partir de tecidos que apresentam potencial morfogênético na planta *in vivo*, mas que, em geral, não se expressa. A organogênese indireta ocorre quando o processo de regeneração de órgãos é precedido pela formação de calos.

Entende-se por calos um tecido tumoral parcialmente organizado que, geralmente, surge sobre feridas de órgãos ou tecidos diferenciados (Pierik, 1990), como resposta a lesões químicas ou físicas. Para a sua indução, muitas vezes, é necessário o suprimento exógeno de reguladores de crescimento, sendo a necessidade do regulador, no que diz respeito ao tipo e concentração, dependente do genótipo e do conteúdo endógeno de hormônio do vegetal (Vietez & San-José, 1996). As principais classes de reguladores de crescimento são auxinas, citocininas, giberelinas, etileno e ácido abscísico (George, 1996).

O sinergismo entre auxinas e citocininas é determinante no controle da morfogênese *in vitro*. Elevadas concentrações de citocininas e baixas de auxinas induzem, em geral, à formação de gemas em detrimento da formação de raízes e, invertendo-se esta relação, as gemas são inibidas, havendo indução de raízes (Santana, 2003).

2.4 Aspectos anatômicos do cultivo *in vitro*

As condições ambientais sob as quais ocorre o cultivo *in vitro*, no que se refere à composição do meio de cultura e do ar no interior dos recipientes, bem como quanto à luminosidade e à temperatura, fazem com que a planta proveniente da micropropagação apresente algumas características peculiares. Por conseguinte, estudos anatômicos de órgãos vegetativos das plântulas cultivadas *in vitro* podem fornecer informações para o controle da morfogênese e auxiliar na eficiência de protocolos de micropropagação.

Plantas provenientes do cultivo *in vitro* apresentam cutícula pouco desenvolvida e uma fraca conexão vascular entre o sistema radicular e as brotações, tornando-as muito suscetíveis ao estresse hídrico durante a aclimatização (Pierik, 1990).

A formação de apenas uma camada de células paliçádicas em plantas micropropagadas, em comparação com plantas desenvolvidas em casa de vegetação, as quais normalmente apresentam de duas a três camadas de células paliçádicas, além de maiores espaços intercelulares no mesofilo, vem sendo relatada para algumas espécies.

Brainerd & Fuchigami (1981) verificaram apenas uma camada de células paliçádicas nas folhas de brotações de ameixeira micropropagadas, em vez de duas ou três comumente encontradas e maiores espaços intercelulares no mesofilo, quando comparadas com folhas de plantas desenvolvidas em casa de vegetação ou campo. Houve redução desses espaços quando as plântulas foram transferidas para casa de vegetação. Entre outras espécies em que somente uma camada de células paliçádicas foi formada *in vitro* estão a framboeseira (Donnelly & Vidaver, 1984), o morangueiro (Fabri et al., 1986) e o cafeeiro (Santos, 2001), apresentando-se mais curtas e não alongadas.

De acordo com Preece & Sutter (1991), a elevada umidade relativa e a baixa irradiância no ambiente *in vitro* são os principais fatores que atuam na indução de alterações e funcionalidade de órgãos e tecidos, levando-os à incapacidade de controlar as perdas de água quando são submetidos a condições adversas, como o ambiente natural. Por esse motivo, torna-se necessária uma gradual aclimatização, a fim de que as plântulas sobrevivam quando transferidas para diferente condição ambiental.

Segundo observações de Fabbri et al. (1986), as folhas de plantas micropropagadas de morangueiro tornaram-se mais espessas durante a aclimatização, devido ao aumento do tamanho das células paliçádicas, mas não

houve mudança no número de camadas ou quantidade dos espaços do mesofilo. As folhas formadas durante a aclimatização tinham várias camadas paliçádicas e, com o aumento do tempo, as folhas jovens tornaram-se similares àquelas crescidas no campo.

Além das alterações anatômicas nos tecidos das plantas micropropagadas; o número e o formato dos estômatos também são afetados. Estudos indicam que a estrutura dos estômatos de plantas micropropagadas apresenta grande diferença em relação às plantas que cresceram em casa de vegetação ou no campo (Preece & Sutter, 1991). Em algumas espécies, como framboeseira, macieira e roseira, os estômatos adquirem formato arredondado e são maiores se comparados ao formato elíptico normalmente observado nas plantas cultivadas *in vivo* (Blanke & Belcher, 1989; Capellades et al., 1990 e Donelly & Vidaver, 1984). O número de estômatos por mm² foi maior em roseira (Capellades et al., 1990), porém, menor em ameixeira (Brainerd et al., 1981), se comparado às plantas de casa-de-vegetação.

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).

BARBOSA, A. S. **Sistema biogeográfico do cerrado: alguns elementos para sua caracterização**. Goiânia: Ed. 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, 1967.

BEZERRA, J. E. F.; LEDERMAN, I. E.; PEDROSA, A. C.; MOURA, R. J. M. de; DANTAS, A. P. **Recomendações para o cultivo de fruteiras tropicais**. Recife: IPA, 1997. 64 p. (IPA. Documentos, 24).

BLANKE, M. B.; BELCHER, A. R. Stomata of apple leaves cultured *in vitro*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 19, n. 1, p. 85-89, 1989.

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: Universitária UFRN, 1960. 540 p.

BRAINERD, K. E.; FUCHIGAMI, L. H. Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 106, n. 4, p. 515-518, July 1981.

BRAINERD, K. E.; FUCHIGAMI, L. H.; KWIATKOWSKI, S.; CLARK, C. S. Leaf anatomy and water stress of aseptically cultured 'Pixy' plum grown under different environments. **HortScience**, Alexandria, v. 16, n. 2, p. 173-175, Apr. 1981.

CALDAS, L. S. Micropropagação de plantas do cerrado. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 47., 1996, Nova Friburgo, RJ. **Anais...** Nova Friburgo, 1996. p. 22.

CAPELLADES, R.; FONTARNAU, R.; CARULLA, C.; DEBERGH, P. Environment influences anatomy of stomata and epidermal cells in tissue-cultured *Rosa multiflora*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 115, n. 1, p. 141-145, Jan. 1990.

COELHO, M. C. F. **Germinação de sementes e propagação *in vitro* de sucupira branca [*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth.]**. 1999. 119 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

DEC CETI, S. F. C. **Propagação *in vitro* de *Annona glabra* L.** 2000. 101 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

DONNELLY, D. J.; VIDAVER, W. E. Leaf anatomy of red raspberry transferred from culture to soil. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 109, n. 2, p. 172-176, Mar. 1984.

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, 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.

FABBRI, A.; SUTTER, E.; DUNSTON, S. K. Anatomical changes in persistent leaves of tissue-cultured strawberry plants after removal from culture. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v. 28, n. 4, p. 331-337, May 1986.

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 1 - The technology. Edington: Exegetics, 1996. 574 p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: EMBRAPA/CBAB, 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.

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

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.

LORENZI, H. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. São Paulo: Nova Odessa, 2002. v. 1, 386 p.

MELO, J. T. de; SILVA, J. A. da; ALMEIDA TORRES, R. A. de; SILVEIRA, C. E. dos S. da; CALDAS, L. S. Coleta, propagação e desenvolvimento inicial de espécies do cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. (Ed.). **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina: Embrapa-CPAC, 1998. p. 195-243.

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

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, Mar. 1962.

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.

OLIVEIRA, L. M. Q.; VALIO, I. F. M. Effects of moisture content on germination of seeds of *H. 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.

PIERIK, R. L. M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, 1990. 326 p.

PREECE, J. E.; SUTTER, E. G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (Ed.). **Micropropagation**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. p. 71-93.

SANTANA, J. R. F. **Controle da morfogênese *in vitro* em algumas espécies de *Annonaceae***. 2003. 237 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SANTOS, C. G. **Micropropagação e caracterização bioquímico-anatômica em *Coffea arabica* e *Coffea canephora***. 2001. 110 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

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

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.

VIETEZ, A. M.; SAN-JOSÉ, M. C. Adventitious shoot regeneration from *Fagus sylvatica* leaf explants *in vitro*. *In vitro Cellular & Developmental Biology*, Columbia, v. 32, p. 140-147, July/Sept. 1996.

VILLACHICA, H.; CARVALHO, J. E. U.; MULLER, C. H.; DIAZ, S. C.; ALMANZA, M. **Frutales y hortalizas promisorios de la Amazônia**. Lima: Tratado de Cooperación Amazônica, 1996. p. 227-31. (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 II

GERMINAÇÃO *IN VITRO* E *EX VITRO* DE SEMENTES DE MANGABEIRA

1 RESUMO

SOARES, Fernanda Pereira. Germinação *in vitro* e *ex vitro* de sementes de mangabeira. In: **Aspectos do cultivo *in vitro* da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes)**. 2005. p. 18-38. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

As dificuldades encontradas no processo de propagação da mangabeira por meio de sementes, devido, principalmente, à baixa taxa de germinação e à recalcitrância, valorizam a busca por soluções alternativas para a produção de mudas dessa espécie, de maneira rápida e eficiente. O objetivo deste trabalho foi realizar o estudo da germinação de sementes de mangabeira em condições *in vitro* e *ex vitro*, tendo como precedente a obtenção de explantes para posterior utilização no cultivo *in vitro*. Neste estudo, foram avaliados os efeitos de diferentes substratos, meios de cultura, concentrações de sacarose e GA₃ e de três níveis de pH na germinação da mangabeira. Frutos maduros foram coletados, passaram por processo de beneficiamento e tiveram suas sementes retiradas e utilizadas como explantes. Observou-se que não houve efeito significativo do tipo de substrato na germinação *ex vitro*, constatando-se, no entanto, uma pequena superioridade do substrato areia em relação aos demais. Maior percentagem de germinação de sementes de mangabeira *in vitro* foi obtida com a utilização dos meios de cultura WPM e MS/2, suplementados com 15,0 g L⁻¹ de sacarose, 0,2 mg L⁻¹ de GA₃ e com pH corrigido para 5,8.

2 ABSTRACT

SOARES, Fernanda Pereira. *In vitro* and *ex vitro* germination of seeds of mangabeira. In: Aspects of the *in vitro* culture of mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). 2005. p.18-38 Dissertation (Master Program in Plant Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.

The difficulties encountered in the propagation process of mangabeira due, primarily, to a reduced seed germination, occurrence of recalcitrant seeds and a low response to regeneration from cuttings stimulate the search of alternatives for plant production in a fast and efficient manner. The objective of this work was to study the *in vitro* and *ex vitro* seed germination in order to produce explants to be used on *in vitro* culture. The effect of different substrates, culture media, sucrose and GA₃ concentrations and three pH levels were evaluated. Seeds extracted from mature fruits collected were processed and used as explants. No significant effect was observed regarding the type of substrate used for *ex vitro* germination however, a small superiority was observed using sand. Higher *in vitro* germination was obtained using WPM and MS/2 media supplemented with 15.0 g L⁻¹, 0.2 mg L⁻¹ GA₃ and pH adjusted to 5.8.

3 INTRODUÇÃO

A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), frutífera nativa do Cerrado, apresenta sua propagação sexuada dificultada pelo fato de suas sementes serem recalcitrantes e porque a polpa do fruto tem uma ação inibitória sobre a germinação destas (Gricoletto, 1997). Estudos de meios de cultura que favoreçam a germinação *in vitro* desta espécie são importantes, tanto para maximizar a taxa de germinação como para obter plântulas com qualidade genética e fitossanitária adequada, que sirvam como fonte de explantes (Pinheiro et al., 2001).

Segundo Nogueira (2003), dados referentes ao tipo de substrato são fundamentais no processo germinativo e no estabelecimento da muda. Popinigis (1977) relata que o substrato apresenta grande influência na germinação e que fatores, como estrutura, aeração, capacidade de retenção de água e grau de contaminação por patógenos, podem variar segundo o material utilizado.

O objetivo do presente trabalho foi estudar aspectos da germinação *ex vitro* e *in vitro* da mangabeira, visando o estabelecimento de plantas que possam servir como fonte potencial de explantes para o cultivo *in vitro*.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 Germinação *in vitro*

A germinação é considerada um dos mais críticos estádios do desenvolvimento vegetal, sendo caracterizada por processos fisio-metabólicos de natureza complexa que levam à retomada do crescimento do eixo embrionário da semente e à protrusão da radícula no tegumento. Inicia-se com a absorção de

água pela semente (embebição) e finaliza-se com o início da alongação do eixo embrionário, usualmente a radícula (Bewley & Black, 1994).

Conforme Borges & Rena (1993), para que ocorra a retomada do crescimento das estruturas essenciais do embrião, a semente deve estar madura, ser bem constituída, ter conservado o poder germinativo e, ao mesmo tempo, deve receber, do meio exterior, água e oxigênio em quantidade suficiente para assegurar um intenso metabolismo. Mayer & Poljakoff-Mayber (1989) afirmam que fatores, como composição química e balanço hormonal, influenciam sobremaneira o processo germinativo.

Uma possibilidade para a obtenção de plantas matrizes, para serem usadas como fonte de explantes em experimentos de cultura de tecidos, é a germinação *in vitro*. Quando o estabelecimento da cultura via material oriundo do campo ou de casa de vegetação traz o problema da contaminação endógena severa, esta pode ser a única fonte de material asséptico. Segundo Gricoletto (1997), a obtenção dos explantes a partir de plântulas de sementes germinadas *in vitro* evita a contaminação do material vegetal e a baixa resposta morfogênética dos tecidos arbóreos adultos.

Durante o cultivo *in vitro*, as soluções de sais e açúcares que compõem os meios de cultura não exercem efeito puramente nutritivo, mas também influenciam o crescimento celular e a morfogênese por meio de propriedades osmóticas (George, 1996).

Amador & Stewart (1987), trabalhando com germinação *in vitro* de várias espécies lenhosas, obtiveram sucesso no controle do potencial osmótico do meio de cultura, utilizando diferentes concentrações de sacarose.

Gmitter (1986) e Rangaswamy (1963) obtiveram um significativo aumento na percentagem de germinação variando concentrações de sacarose no meio de cultura em *Orabanche* e *Citrus*, respectivamente. Resultados

semelhantes também foram observados por Komatsuda (1992), em seus trabalhos com várias espécies lenhosas.

Segundo Souza (2003), dependendo da espécie, não há necessidade de suplementação do meio com sacarose. Porém, pode ser que ao se adicionar sacarose ao meio de cultura, consiga-se manter a plântula *in vitro* por um período de tempo maior.

Diversas formulações de meios básicos têm sido utilizadas no cultivo *in vitro*. Não há uma formulação padrão, mas o meio MS (Murashige & Skoog, 1962), com suas modificações e diluições, tem sido utilizado com sucesso para diversas espécies. Para lenhosas, entretanto, o meio MS não se mostra satisfatório em alguns casos e, composições mais diluídas em macronutrientes apresentam melhor desempenho (Grattapaglia & Machado, 1998). O meio nutritivo WPM (Lloyd & Mc Cown, 1980), por exemplo, apresenta 25% das concentrações de íons nitrato e amônia do meio MS, além de mais potássio e um alto nível de íons sulfato, sendo amplamente utilizado para a micropropagação de espécies lenhosas (Pasqual, 2001).

O pH é considerado um fator crítico do meio de cultura (Murashige, 1974), influenciando na disponibilidade de nutrientes, de fitorreguladores e no grau de solidificação do ágar (Grattapaglia & Machado, 1990). Usualmente é ajustado numa faixa que varia de 5,0 a 6,5 (Pierik, 1987), para o crescimento adequado da maioria das espécies; em níveis inferiores a 4,5 e superiores a 7,0, geralmente ocorre paralisação do crescimento e do desenvolvimento *in vitro* (Murashige, 1974).

A presença de reguladores de crescimento no meio de cultura é também importante na regulação da germinação *in vitro*. Sabe-se, hoje, que as giberelinas têm um papel chave neste processo, estando envolvidas tanto na quebra da dormência como no controle da hidrólise de reservas, da qual depende o embrião em crescimento.

Enquanto, para diversas espécies, as giberelinas aceleram a germinação e a emergência, para outras, elas apresentam pequena resposta ou nenhum efeito. Carvalho (1997) observou que o ácido giberélico não contribuiu para acelerar a germinação *in vitro* de sementes de cafeeiro e o desenvolvimento final das mudas.

Deccetti (2000) obteve redução na taxa de germinação de sementes de *Annona glabra* quando utilizou 2,0 mg L⁻¹ de GA₃ no meio de cultura e, principalmente, quando este foi associado a elevadas concentrações de sacarose.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Material vegetal

Frutos maduros de mangabeira foram coletados de populações naturais localizadas no município de Pitangui, região Centro-Oeste do estado de Minas Gerais e, trazidos para o Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras.

Para a retirada das sementes, os frutos passaram por processo de beneficiamento, com retirada da polpa, imersão em hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M por 5 minutos e lavagem em água corrente com auxílio de peneira por 10 minutos. Em seguida, as sementes foram colocadas para secar à sombra.

5.2 Germinação *ex vitro*

5.2.1 Efeito de diferentes substratos

Dos frutos coletados no município de Pitangui, após a retirada manual do tegumento e devidamente secas, as sementes foram colocadas a 1,0 cm de profundidade, em placas do tipo gerbox contendo 3 diferentes tipos de substratos, todos previamente autoclavados: areia, areia + vermiculita na

proporção de 1:1 (v/v) e vermiculita. Cada tratamento foi constituído de 10 repetições, contendo 10 sementes cada.

Após o período de 30 dias em casa de vegetação, sob temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, irradiância de $67 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas, a percentagem de sementes germinadas foi avaliada em cada placa. Foi considerada germinada a plântula que emergisse o epicótilo.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, sendo as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey, com significância fixada em 5%.

5.3 Germinação *in vitro*

5.3.1 Efeito de diferentes meios de cultura

Retiradas dos frutos, as sementes, após passarem por um período de secagem à sombra, foram levadas para a câmara de fluxo laminar, imersas em álcool 70% (v/v) por 60 segundos e em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) com 1% de cloro ativo por 10 minutos. Ao final deste tempo, foram lavadas em água destilada e autoclavada e tiveram seus tegumentos retirados. Posteriormente, foram novamente imersas em solução de NaOCl com 1% de cloro ativo, onde permaneceram por mais 10 minutos, lavadas 5 vezes em água destilada e inoculadas em tubos de ensaio contendo os diferentes tratamentos.

Foram testados os meios de cultura WPM, WPM2x, WPM/2, MS e MS/2, suplementados com $30,0 \text{ g L}^{-1}$ de sacarose e solidificados com ágar 0,7%. O pH foi corrigido para 5,8 antes da autoclavagem a 120°C , durante 20 minutos.

Após a inoculação, as sementes foram mantidas em sala de crescimento sob irradiância de $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. A avaliação foi realizada aos 30 dias de incubação, sendo observada a percentagem de sementes germinadas em cada tratamento. Foi considerada germinada, a semente que apresentava a radícula protruída.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, com 20 repetições por tratamento, sendo cada uma composta por um tubo de ensaio e cada tubo contendo uma semente. Para a análise dos dados, utilizou-se a estatística descritiva.

5.3.2 Efeito do GA₃ e da concentração de sacarose

O processo de assepsia das sementes foi semelhante ao descrito no item 5.3.1.

Foram testados três níveis de GA₃ (0,0, 0,2 e 0,4 mg L⁻¹) e três concentrações de sacarose (0,0, 15,0 e 30,0 g L⁻¹) no meio de cultura WPM (Tabela 1), solidificado com ágar 0,7%. O pH foi corrigido para 5,8 antes da autoclavagem.

TABELA 1. Tratamentos utilizados para a germinação de sementes de mangabeira em função da combinação de GA₃ + sacarose, no meio de cultura WPM. Lavras, UFLA, 2004.

Tratamentos	GA ₃ (mg L ⁻¹)	Sacarose (g L ⁻¹)
T0	0,0	0,0
T1	0,0	15,0
T2	0,0	30,0
T3	0,2	0,0
T4	0,2	15,0
T5	0,2	30,0
T6	0,4	0,0
T7	0,4	15,0
T8	0,4	30,0

Após a inoculação, as sementes foram mantidas em sala de crescimento sob irradiância de 36 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25±2°C. A avaliação foi realizada aos 30 dias de incubação, sendo observada a

percentagem de sementes germinadas em cada tratamento. Foi considerada germinada, a semente que apresentava a radícula protrundida.

Foram utilizadas 20 repetições por tratamento, sendo cada uma composta por um tubo de ensaio e cada tubo contendo uma semente.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, sendo as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey, com significância fixada em 5%.

C) Influência do pH

O processo de assepsia das sementes foi semelhante ao descrito no item 5.3.1.

Foram testados três níveis de pH (4,8, 5,8 e 6,8) no meio de cultura WPM, suplementado com 15,0 g L⁻¹ de sacarose, 0,2 mg L⁻¹ de GA₃ e solidificado com ágar 0,7%:

Após a inoculação, as sementes foram mantidas em sala de crescimento sob irradiância de 36 μmol m⁻² s⁻¹, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25±2°C. A avaliação foi realizada aos 30 dias de incubação, sendo observada a percentagem de sementes germinadas em cada tratamento. Foi considerada germinada, a semente que apresentava a radícula protrundida.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, com 20 repetições por tratamento, sendo cada uma composta por um tubo de ensaio e cada tubo contendo uma semente. Para a análise dos dados, utilizou-se a estatística descritiva.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Germinação *ex vitro*

6.1.1 Efeito de diferentes substratos

Não houve diferenças significativas entre as percentagens de sementes de mangabeira germinadas nos substratos areia (T1), areia + vermiculita (T2) e vermiculita (T3) (Tabela 2).

TABELA 2. Análise de variância para a percentagem de sementes de mangabeira germinadas em diferentes substratos. UFLA, Lavras, 2004.

FV.	GL	QM	Pr > F
Substratos	2	0,30	0,918
ERRO	27	3,51	
Total	29		

Apesar das diferenças entre os tratamentos não terem sido significativas, os maiores percentuais de germinação foram obtidos no substrato areia (67%) (Figura 2), provavelmente por este reunir características necessárias a um bom substrato, como, por exemplo, porosidade adequada.

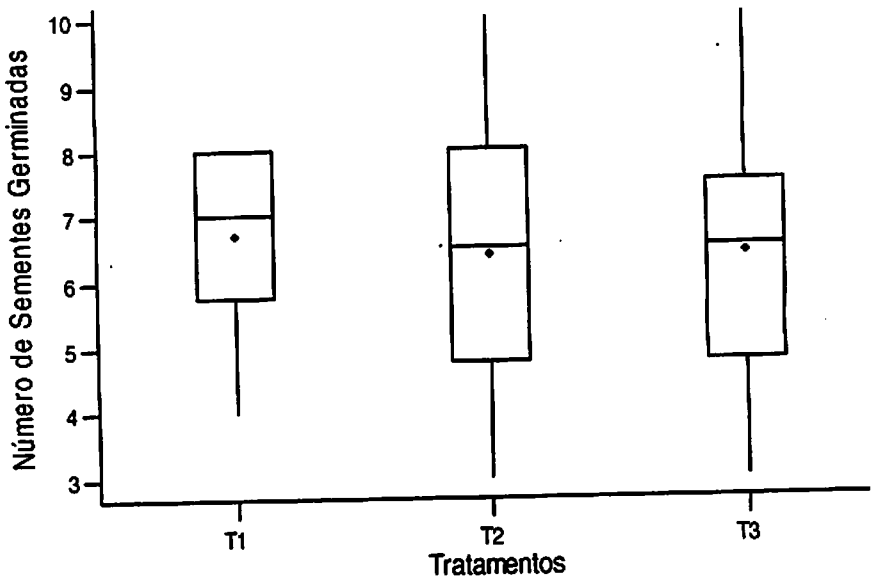


FIGURA 2. Box Plot para a média de sementes de mangabeira germinadas nos substratos areia (T1); areia + vermiculita (T2) e vermiculita (T3). UFLA, Lavras, 2004.

A porosidade ideal do substrato é aquela que permite o movimento de água e ar, favorecendo a germinação. Para que isso ocorra, as sementes não necessitam de nutrientes, mas apenas de hidratação e aeração, para que se procedam as reações que induzem à formação do caulículo e da radícula. Sendo assim, o substrato utilizado deve sempre manter proporção adequada entre a disponibilidade de água e a aeração, não podendo ser umedecido em excesso para evitar que a película de água envolva completamente a semente, restringindo a entrada e absorção de oxigênio (Villagomez et al., 1979).

Nogueira et al. (2003) observaram também, maior percentual de germinação de sementes de mangabeira no substrato areia (68%), quando comparado ao obtido com a utilização de mistura de húmus + areia lavada + terriço vegetal na proporção de 2:4:4 (v/v) e solo natural coletado no local de

origem das sementes. Resultados semelhantes foram encontrados por Parente & Machado (1986), também em experimentos com mangabeira.

O aspecto visual das plântulas de mangabeira oriundas da germinação nos três diferentes substratos pode ser observado na Figura 3, onde pode-se perceber também que houve um desenvolvimento normal destas plântulas quanto aos caracteres morfológicos.

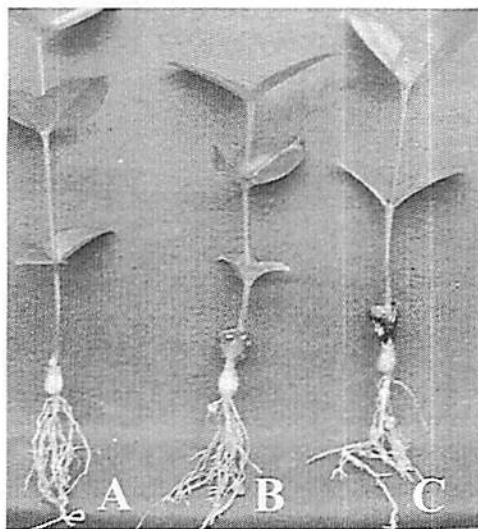


FIGURA 3. Aspecto visual das plântulas de mangabeira oriundas da germinação em areia (A); areia + vermiculita (B) e vermiculita (C). UFLA, Lavras, 2004.

6.2 Germinação *in vitro*

6.2.1 Efeito de diferentes meios de cultura

A percentagem de germinação de sementes de mangabeira nos diferentes meios de cultura testados foi semelhante (Tabela 3), demonstrando a não significância dos tratamentos.

TABELA 3. Percentagem de germinação de sementes de mangabeira em diferentes meios de cultura. UFLA, Lavras, 2004.

Meio de cultura	WPM	WPM2x	WPM/2	MS	MS/2
% de germinação	100%	95%	90%	95%	100%

Efeitos não-significativos do meio nutritivo foram observados também por Conceição (2000), testando diferentes concentrações do meio de cultura MS na germinação de sementes de timbó (*Derris urucu*).

Uma ligeira superioridade dos meios de cultura WPM e MS/2, ambos proporcionando 100% de germinação, foi, no entanto, constatada.

A maior percentagem de germinação de sementes de mangabeira em meio nutritivo MS/2 deveu-se, provavelmente, à diminuição do potencial osmótico promovido pela redução das concentrações de macro e micronutrientes do referido meio. Segundo Premecz et al. (1978), elevadas pressões osmóticas reduzem o crescimento e afetam o metabolismo celular.

Grattapaglia & Machado (1990) afirmam que o meio MS completo não tem se mostrado satisfatório em alguns casos, para espécies lenhosas e que composições mais diluídas, como as do meio WPM, podem apresentar melhores resultados.

Bertoni et al. (2002) confirmam a eficiência do meio WPM na germinação de sementes de *Zeyheria montana* Mart., uma espécie medicinal do Cerrado. Os autores reportam que a utilização desse meio menos concentrado promoveu um bom desenvolvimento das plântulas e favoreceu o estabelecimento do protocolo de propagação *in vitro* da espécie.

Pode-se visualizar na Figura 4, etapas do processo de germinação *in vitro* e desenvolvimento pós-seminal de mangabeira.

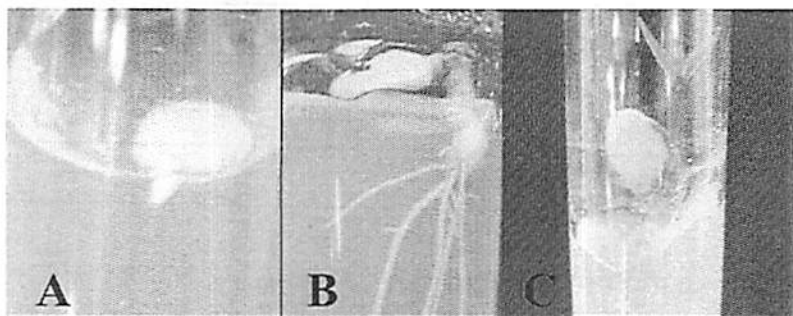


FIGURA 4. Aspecto visual do processo de germinação *in vitro* e desenvolvimento pós-seminal de mangabeira: (A) protrusão radicular; (B) alongação radicular e surgimento de raízes laterais e (C) alongação do epicótilo. UFLA, Lavras, 2004.

6.2.2 Efeito do GA_3 e da concentração de sacarose

No cultivo *in vitro* de mangabeira, a maior percentagem de sementes germinadas (90%) foi obtida no meio de cultura WPM, suplementado com 15,0 g L⁻¹ de sacarose e 0,2 mg L⁻¹ de GA_3 (T4), diferenciando-se significativamente somente do tratamento controle (T0), no qual estavam ausentes a sacarose e o ácido giberélico (Tabela 4).

TABELA 4. Percentagem de sementes de mangabeira germinadas *in vitro* sob diferentes concentrações de sacarose e de ácido giberélico (GA₃). UFLA, Lavras, 2004.

GA ₃ (mg L ⁻¹) e Sacarose (g L ⁻¹)	Percentagem de germinação
0,0 - 0	90% a
0,0- 15,0	85% a
0,0 - 30,0	85% a
0,2 - 0	80% a
0,2 - 15,0	80% a
0,2 - 30,0	80% a
0,4 - 0	70% a
0,4 - 15,0	70% a
0,4 - 30,0	55% b

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A menor percentagem de sementes germinadas (55%) foi observada na ausência de sacarose e GA₃ no meio de cultura. Azevedo (2003), ao contrário, obteve maiores percentagens de germinação *in vitro* de sementes de copaíba (*Copaiba langsdorffii*) em meio de cultura MS desprovido de sacarose. Resultados semelhantes também foram obtidos em sementes de *Annona glabra* (Deccetti, 2000).

A adição de 0,2 mg L⁻¹ de ácido giberélico (GA₃) ao meio de cultura favoreceu a germinação. No entanto, observou-se que concentrações superiores a esta provocaram uma diminuição na percentagem de sementes germinadas.

Pinheiro et al. (2001), testando diferentes concentrações de ácido giberélico na germinação *in vitro* de sementes de mangabeira, verificaram que a adição de 0,1 mg L⁻¹ desse regulador favoreceu o processo germinativo.

Contudo, concentrações iguais ou superiores a $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ provocaram uma diminuição na percentagem de sementes dessa espécie germinadas.

Em meio de cultura suplementado com $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ de GA_3 , quando a concentração de sacarose foi superior a $15,0 \text{ g L}^{-1}$, foi verificada uma redução significativa da percentagem de sementes de mangabeira germinadas. Provavelmente, a maior quantidade de sacarose no meio de cultura pode ter afetado a força osmótica do meio, prejudicando o processo germinativo da mangabeira. Segundo George (1996), concentrações elevadas de sacarose tornam a água do meio de cultura indisponível para a embebição das sementes, impossibilitando o início da germinação.

Resultados semelhantes foram encontrados por Gomes (1999) que obteve maior percentagem de germinação de sementes de moreira (*Maclura tinctoria*) em meios suplementados com sacarose, porém, em menores concentrações.

6.2.3 Influência do pH

A percentagem de germinação de sementes de mangabeira foi semelhante nos diferentes níveis de pH testados (Tabela 5), demonstrando a não significância dos tratamentos.

TABELA 5. Percentagem de germinação de sementes de mangabeira em diferentes níveis de pH. UFLA, Lavras, 2004.

pH	4,8	5,8	6,8
% de germinação	95%	100%	90%

Elevada percentagem de germinação foi verificada em toda a faixa de pH utilizada. Resultados semelhantes foram obtidos por Therios (1982) que constatou que sementes de *Prunus amygdalus* germinam em ampla faixa de pH sem apresentarem diferenças percentuais significantes.

De acordo com Huxley (1964), a germinação de sementes de muitas espécies não é dependente do pH, dentro dos limites fisiológicos. Sabe-se, no entanto, que ele é um fator controlador das vias metabólicas e da permeabilidade das membranas celulares, uma vez que afeta inúmeras reações enzimáticas (Davis, 1980).

7 CONCLUSÕES

Sementes de mangabeira apresentam elevada taxa de germinação, independente do tipo de substrato utilizado.

A concentração de sais nos meios de cultura WPM, WPM2x, WPM/2, MS e MS/2 não limita a elevada taxa de germinação das sementes de mangabeira.

A germinação de sementes de mangabeira é maximizada em meio de cultura suplementado com $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ de GA_3 e $15,0 \text{ g L}^{-1}$ de sacarose.

Esta espécie apresenta elevadas taxas de germinação na faixa de pH que varia de 4,8 a 5,8.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMADOR, A. M.; STEWART, K. A. Osmotic potencial and pH of fluid drilling gels as influenced by moisture loss and incorporation of growth regulators. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, v. 112, p. 26-28, 1987.

AZEVEDO, K. de S. **Indução e análises bioquímicas de calos e aspectos da anatomia foliar de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.)**. 2003. 86 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

BERTONI, B. W.; PINA, E. S.; FRANÇA, S. C. de. **Micropropagação de *Zeyheria Montana* Mart. – uma planta medicinal do cerrado**. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 27., 2002, Cuiabá. **Anais...** Cuiabá: UFMT, 2002. 1 CD-ROM.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: Physiology of development and germination**. 2. ed. New York: Plenum Press, 1994. 445 p.

CARVALHO, G. R. **Germinação de sementes e aclimatização de plântulas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) propagadas *in vitro***. 1997. 64 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CONCEIÇÃO, H. E. O. da. **Cultivo *in vitro*, nutrição mineral e quantificação de rotenóides em timbós (*Derris* sp.)**. 2000. 191 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

DAVIS, D. D. **Biochemistry of plants**. New York: Academic Press, 1980. v. 2, p. 581-611.

DECCETTI, S. F. C. **Propagação *in vitro* de *Annona glabra* L.** 2000. 101 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture. Part 1 - The technology**. Edington: Exegetics, 1996. 574 p.

GMITTER, F. G. Jr.; MOORE, G. A. **Plant regeneration from undeveloped ovules and embryogenic calli of *Citrus*: embryo production, germination and plant survival**. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 6, n. 2, p. 139-147, 1986.

GOMES, G. A. C. **Propagação *in vitro* de Moreira (*Maclura tinctoria*)**. 1999. 92 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. L.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPq, 1990. p. 99-170.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-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.

HUXLEY, P. A. The effects of hydrogen-ion concentration temperature and seed drying method on the germination of coffee seeds. **Proceedings of the International Seed Test Association**, Wallingford, v. 29, p. 61-70, 1964.

KOMATSUDA, T.; LEE, W. Maturation and germination of somatic embryos as affected by sucrose and plant growth regulators. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 28, n. 1, p. 103-113, Jan. 1992.

LLOYD, G.; MC COWN, B. Commercially-feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, Washington, v. 30, p. 421-427, 1980.

MAYER, A. M.; POLJAKOFF-MAYBER, A. **The germination of seeds**. New York: Pergamon Press, 1989. 210 p.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 25, p. 135-166, 1974.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, Mar. 1962.

NOGUEIRA, R. J. M. C.; ALBUQUERQUE, M. B. de; JUNIOR, J. F. S. Efeito do substrato na emergência, crescimento e comportamento estomático em plântulas de mangabeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 1, p. 15-18, abr. 2003.

PARENTE, T. V.; MACHADO, J. W. B. Germinação de sementes de mangaba (*Hancornia pubescens* Nees e Mart.) provenientes de frutos colhidos com

diferentes graus de maturação. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Cruz das Almas, v. 8, n. 1, p. 39-43, 1986.

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

PIERIK, R. L. M. *In vitro culture of higher plants*. Dordrecht: Martinus Nyhoff Publishers, 1987. 344 p.

PINHEIRO, C. S. R.; MEDEIROS, D. N. de; MACEDO, C. E. C. de; ALLOUFA, M. A. I. Germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomez) em diferentes meios de cultura. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 413-416, ago. 2001.

POPINIGIS, F. *Fisiologia da semente*. Brasília: AGIPLAN, 1977. 289 p.
PREMECZ, G.; RUZICKSKA, P.; OLAH, T.; FARKAS, G. L. Effect of 'osmotic stress' on protein and nucleic acid synthesis in isolated tobacco protoplasts. *Planta*, Berlin, v. 141, n. 1, p. 33-36, 1978.

RANGASWAMY, N. S. *Studies on culturing seeds of *Orabanche aegyptiaca**. In: Maheshwari and Ranga Swamy (eds.), 1963.

SOUZA, A. V. de. *Propagação in vitro e aspectos anatômicos de arnica [Lychnophora pinaster (Mart.)]*. 2003. 126 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

THERIOS, I. N. Effects of temperature, moisture stress and pH on the germination of seeds of almond (*Prunus amygdalus*). *Seed Science & Technology*, Zurich, v. 10, n. 3, p. 585-594, 1982.

VILLAGOMEZ, A. Y.; VILLASENOR, R. R.; SALINAS, M. J. R. *Lineamento para el funcionamiento de um laboratório de semillas*. México: INIA, 1979. 128 p.

CAPÍTULO III

ORGANOGÊNESE DIRETA EM EXPLANTES CAULINARES DE MANGABEIRA

1 RESUMO

SOARES, Fernanda Pereira. **Organogênese direta em explantes caulinares de mangabeira**. In: Aspectos do cultivo *in vitro* da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). 2005. p.39-61. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) destaca-se por possuir um grande potencial como planta frutífera e como produtora de borracha. Suas sementes apresentam recalcitrância, dificultando sua propagação, o que torna evidente a necessidade da obtenção de mudas por via assexuada. Neste contexto, o cultivo *in vitro* apresenta-se como uma alternativa a ser utilizada. O presente trabalho teve como objetivo estabelecer uma metodologia de micropropagação da mangabeira via organogênese direta, a partir de segmentos caulinares. Para a obtenção de brotações, segmentos caulinares provenientes de plântulas de mangabeira germinadas *in vitro* foram inoculados em meio de cultura WPM, suplementado com diferentes concentrações de BAP (0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg L⁻¹), 30,0 g L⁻¹ de sacarose e 7,0 g L⁻¹ de ágar. O pH foi corrigido para 5,8. Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento com temperatura média de 25±2°C, sob fotoperíodo de 16 horas e irradiância de 36 µmol m⁻² s⁻¹. Aos 30 dias da inoculação, avaliaram-se o número de brotações e gemas, o comprimento da maior brotação e a presença de calos na base dos explantes. Para o enraizamento das brotações, o meio de cultura WPM foi suplementado com 30,0 g L⁻¹ de sacarose, 7,0 g L⁻¹ de ágar, 0,1% de carvão ativado e diferentes concentrações de ANA (0,0; 1,0; 2,0 e 3,0 mg L⁻¹) e AIB (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L⁻¹). As brotações permaneceram em sala de crescimento com temperatura média de 25±2°C e no escuro por 15 dias, quando foram transferidas para meio WPM sem reguladores de crescimento. As concentrações de 5,0 mg L⁻¹ e 3,0 mg L⁻¹ de BAP foram as mais eficientes na indução, respectivamente, de brotações e gemas, em segmentos caulinares de mangabeira. O maior comprimento das brotações foi verificado em meio de cultura suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de BAP. A maior formação de calos ocorreu na base dos explantes inoculados em meio suplementado com 4,0 mg L⁻¹ dessa citocinina. A auxina ANA não se mostrou eficiente, nas concentrações testadas, no enraizamento *in vitro* de brotações de mangabeira. Na presença de 3,0 mg L⁻¹ de AIB, 20% das brotações enraizaram.

2 ABSTRACT

SOARES, Fernanda Pereira. **Direct organogenesis in nodal explants of mangabeira.** In: Aspects of the *in vitro* culture of mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). 2005. p.39-61. Dissertation (Master Program in Plant Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.

The mangabeira presents potential for fruit and rubber production. Since the seeds are recalcitrant which makes its propagation difficult, new approaches are needed in order to obtain plants through asexual methods. In this context, the process of *in vitro* culture presents as an alternative for the propagation of mangabeira. The objective of the present work was to establish a methodology for the micropropagation of mangabeira through direct organogenesis from nodal segments. To obtain shoots, nodal segments collected from *in vitro* germinated seedlings were inoculated in WPM medium supplemented with different concentrations of BAP (0.0; 1.0; 2.0; 3.0; 4.0 e 5.0 mg L⁻¹), 30 g L⁻¹ sucrose and 7 g L⁻¹ agar. The pH was adjusted to 5.8. After inoculation, explants were maintained in a growth room with average temperature of 25 ± 2° C, photoperiod of 16 hours and irradiance of 36 μmol m⁻²s⁻¹. Thirty days after inoculation, number of shoots and buds, length of the higher shoot and presence of callus at the explants basis were evaluated. For root induction, shoots were inoculated in WPM medium supplemented with 30 g L⁻¹ sucrose, 7 g L⁻¹ agar, 0.1% activated charcoal and different concentrations of NAA (0.0; 1.0; 2.0 e 3.0 mg L⁻¹) and IBA (0.0; 1.0; 2.0; 3.0 e 4.0 mg L⁻¹). The inoculated shoots were maintained in a growth room with average temperature of 25 ± 2° C in the dark for 15 days after which were transferred to a WPM medium without any growth regulators. The concentrations of 5.0 mg L⁻¹ and 3.0 mg L⁻¹ BAP were the most efficient for induction of shoots and buds, respectively. Higher shoot length was observed in medium supplemented with 1.0 mg L⁻¹ BAP. The higher formation of callus occurred at the basis of explants inoculated in medium supplemented with 4.0 mg L⁻¹ BAP. The use of NAA was not efficient, in all tested concentrations, to induce *in vitro* root formation in shoots. In presence of 3.0 mg L⁻¹ IBA, 20% of the shoots developed roots.

3 INTRODUÇÃO

A mangabeira apresenta um grande potencial como planta frutífera e até mesmo como produtora de borracha. No entanto, o extrativismo apresenta-se, atualmente, como única forma de exploração da espécie.

O estabelecimento de plantios comerciais da mangabeira tem sido dificultado pelo curto período de armazenamento das sementes e pelo insucesso da sua propagação por estaquia.

Avanços na instalação de pomares implicam na necessidade de produção de mudas de alta qualidade e baixo custo, o que requer o uso de métodos intensivos de propagação (Corrêa, 1990; Yui, 1990), sendo a propagação vegetativa essencial para a manutenção dos caracteres agronômicos desejáveis do genótipo.

O desenvolvimento de técnicas de cultura de tecidos vegetais tem sido uma das contribuições mais significativas para o avanço do processo de propagação. A micropropagação é a técnica alternativa mais utilizada, com a finalidade de obtenção de um grande número de plantas uniformes, independente da época do ano (Borthakur et al., 1998). Por essa razão, a definição de uma metodologia para a micropropagação da mangabeira pode apresentar uma contribuição efetiva no desenvolvimento da cultura.

O objetivo deste trabalho foi estabelecer uma metodologia de micropropagação da mangabeira via organogênese direta a partir de segmentos caulinares.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

Técnicas de cultura de tecidos, especialmente a micropropagação, têm sido amplamente utilizadas para inúmeras espécies, principalmente quando a propagação generativa é insatisfatória, quando a progênie obtida é heterogênea, devido à heterozigose ou em casos em que a propagação por sementes não ocorre naturalmente. Por outro lado, é importante ressaltar sua grande utilidade em programas de conservação e de melhoramento, dada a economia de tempo na multiplicação de variedades, assim como na produção de clones promissores e livres de patógenos (Santana, 2003).

A micropropagação 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). De acordo com 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 espécies que, na mesma subcultura, produzem até cem brotos por explante. Para as plantas do Cerrado, os poucos trabalhos já realizados indicam que a produção de brotos na mesma subcultura é da ordem de dez por explante. Entretanto, observa-se que quanto maior o número de brotos, menor será o seu comprimento. Além disso, muitas vezes, os brotos apresentam características morfológicas anormais. A vantagem de se obter brotos normais e alongados (maiores do que 1,5 cm) é que esses enraizam 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 celular 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 organogênese nas culturas de tecidos e órgãos (Pasqual, 2001).

Segundo Grattapaglia & Machado (1998), das citocininas comercialmente disponíveis, a 6-benzilaminopurina (BAP), é a que, em geral, apresenta melhores resultados *in vitro* para promover a multiplicação de diversas espécies, sendo utilizada em aproximadamente 60% dos meios de cultivo, seguida da cinetina (KIN), com cerca de 23%.

Quanto ao enraizamento, as auxinas mais utilizadas são o ácido indolbutírico (AIB) e o ácido naftalenoacético (ANA) (Assis & Teixeira, 1998). As respostas às auxinas não são universais. Certas espécies enraízam com dificuldade ou não enraízam, mesmo na presença de auxinas e algumas espécies até dispensam o uso de auxinas no seu enraizamento (Rohr & Hanus, 1987).

Grattapaglia & Machado (1998) comentam que a auxina é importante nas duas fases iniciais da rizogênese (indução e iniciação), mas pode ser inibidora na última fase (alongação). Para evitar a inibição da rizogênese pela presença constante de auxina no meio, tem sido adotada a estratégia de manter os explantes por um período curto na presença desta substância. Em seguida,

faz-se a inoculação em um novo meio sem regulador de crescimento (George & Sherrington, 1984).

Na formação de raízes adventícias em espécies lenhosas, o uso de carvão ativado no meio tem favorecido o enraizamento. Por apresentar uma alta capacidade de adsorção, esta substância tem a propriedade de modificar a composição dos meios de cultura, adsorvendo uma série de substâncias adicionadas ao meio, liberadas pelos explantes ou presentes no ágar, que possam afetar negativamente o crescimento. Outra propriedade atribuída ao carvão ativado é o favorecimento do processo de enraizamento, devido à redução da intensidade de luz na região de formação da raiz (Assis & Teixeira, 1998). Amin & Jaiswal (1987), Anderson (1980) e Damiano (1978), relataram o efeito do carvão, quando utilizado em baixas concentrações, no enraizamento de brotações de morangueiro, framboeseira e goiabeira, respectivamente.

A composição do meio de cultura é outra importante variável que determina o sucesso nas diversas fases da micropropagação. Os nutrientes presentes no meio são necessários ao metabolismo das células e aos fatores de crescimento, responsáveis pela diferenciação em brotos e raízes (Schuch & Peters, 1993). A fonte de nitrogênio utilizada e o balanço entre os íons nitrato e amônio são aspectos que têm merecido grande atenção (Grattapaglia & Machado, 1998). O meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) é o mais concentrado em termos de micro e macronutrientes e é também o mais empregado em cultura de tecidos (Pasqual, 2001; Tisserat, 1985). Já o meio de cultura WPM (Lloyd & McCown, 1980) é bastante utilizado em plantas lenhosas, por possuir baixas concentrações de íons totais, representando apenas 45% da força iônica do meio MS.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Efeito do BAP na indução de brotações

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

Segmentos caulinares contendo até duas gemas laterais foram inoculados em meio de cultura WPM (Lloyd & McCown, 1980), suplementado com diferentes concentrações de BAP (0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg L⁻¹) e 3% de sacarose. O meio foi solidificado com 0,7% de ágar e seu pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 120°C, durante 20 minutos.

Após a inoculação, os segmentos foram mantidos em sala de crescimento a 25±2°C de temperatura, irradiância de 36 µmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas. Foram avaliados o número de brotações e gemas por explante, o comprimento da maior brotação e a presença de calos na base dos explantes, aos 30 dias de cultivo.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com vinte repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por um tubo de ensaio contendo um explante.

Com relação ao número de brotações e gemas produzidas, ajustaram-se modelos log-lineares, cujas equações descrevem a resposta média de cada variável analisada. Já em relação à presença de calos na base dos explantes, devido a variável de interesse ser dicotômica, apresentando dois possíveis resultados (SIM/NÃO), justificou-se o ajuste de um modelo de regressão logística. A qualidade destes modelos foi estimada via teste qui-quadrado de Person e análise de Deviance (Balakrishnan, 1992), respectivamente.

5.2 Efeito do ANA no enraizamento *in vitro* de brotações

Brotações obtidas *in vitro* foram inoculadas em meio de cultura WPM contendo diferentes concentrações de ANA (0,0; 1,0; 2,0 e 3,0 mg L⁻¹), 3% de sacarose e 0,1% de carvão ativado. O meio foi solidificado com 0,7% de ágar e seu pH foi ajustado para 5,8.

Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento a 25±2°C de temperatura e na ausência de luz, por 15 dias. Decorrido esse período, foram transferidos para meio de cultura WPM sem reguladores de crescimento e na ausência de carvão ativado. Trinta dias depois, a formação de raízes nos diferentes tratamentos foi avaliada.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com vinte repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por um tubo de ensaio, contendo uma brotação.

5.3 Efeito do AIB no enraizamento *in vitro* de brotações

Brotações obtidas *in vitro* foram inoculadas em meio de cultura WPM contendo diferentes concentrações de AIB (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L⁻¹), 3% de sacarose e 0,1% de carvão ativado. O meio foi solidificado com 0,7% de ágar e seu pH foi ajustado para 5,8.

Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento a 25±2°C de temperatura e na ausência de luz, por 15 dias. Decorrido esse período, foram transferidos para meio de cultura WPM sem reguladores de crescimento e na ausência de carvão ativado. Trinta dias depois, a formação de raízes nos diferentes tratamentos foi avaliada.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com vinte repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por um tubo de ensaio, contendo uma brotação.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Efeito do BAP na indução de brotações

6.1.1 Número de brotos e de gemas por explante

Os modelos utilizados para a análise estatística, (1) e (2), mostraram-se adequados aos dados experimentais, já que as probabilidades do teste qui-quadrado de Person, respectivamente 0,996 e 0,704, foram superiores ao nível de significância, preestabelecido em 5%.

$$\bar{y}_{\text{brotos}} = e^{0,2636+0,4127\text{BAP}-0,0355\text{BAP}^2} \quad (1)$$

$$\bar{y}_{\text{gemas}} = e^{0,8924+0,6772\text{BAP}-0,0982\text{BAP}^2} \quad (2)$$

Houve formação de brotações em todos os tratamentos testados (Figura 5), mesmo na ausência do regulador de crescimento. Entretanto, a adição de BAP ao meio de cultura proporcionou aumento do número de novos brotos formados por explante.

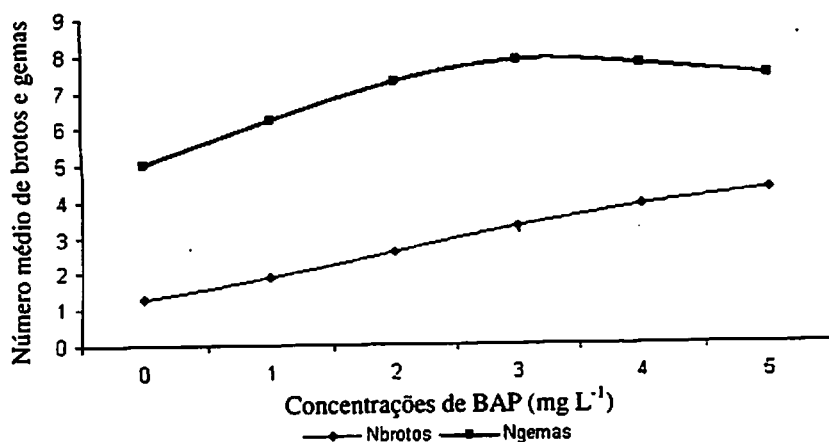


FIGURA 5. Número médio de brotos e gemas nos explantes caulinares de mangabeira para cada concentração de BAP acrescentada ao meio de cultura WPM. UFLA, Lavras, 2005.

De acordo com Preece (1995), as citocininas têm função primordial na divisão celular e atuam também na quebra da dominância apical e na indução e crescimento de brotações. Grattapaglia & Machado (1998) afirmam ainda que o tipo de citocinina e a sua concentração são os fatores que mais influenciam o sucesso da multiplicação *in vitro*.

Um efeito sinérgico do BAP sobre o número total de brotos formados foi verificado. Para esta variável, a maior média observada foi de quatro brotações, para explantes cultivados na concentração de 5,0 mg L⁻¹ de BAP. Para Nogueira (2003), ao contrário, concentrações acima de 4,0 mg L⁻¹ dessa citocinina não foram eficientes na indução de brotos axilares em segmentos nodais de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.).

Quanto ao número de gemas, um aumento foi verificado até a concentração de 3,0 mg L⁻¹ de BAP (7,5 gemas por explante). A partir deste ponto, ocorreu um decréscimo.

Pasqual & Barros (1992) relataram que o melhor resultado para a proliferação de gemas em segmentos nodais de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* Mart.) foi dado pela concentração de 4,0 mg L⁻¹ de BAP. Santos (2004), por outro lado, ao induzir brotações em segmentos nodais de pequi, verificou um decréscimo do número de gemas a partir da concentração de 1,0 mg L⁻¹ de BAP.

O aspecto das brotações de mangabeira obtidas *in vitro* pode ser observado na Figura 6. Com a visualização, pode-se perceber, nas concentrações maiores de BAP, um aumento do número de brotações, em detrimento, porém, do comprimento destas.

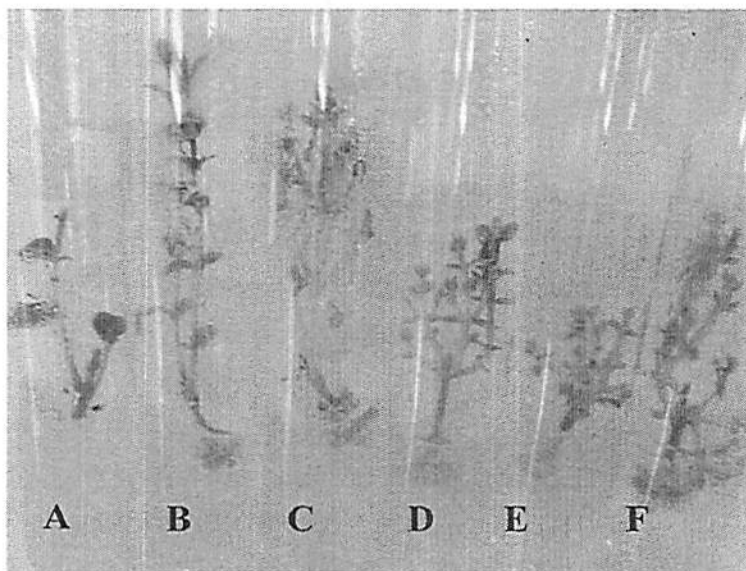


FIGURA 6. Aspecto visual de brotações de mangabeira obtidas de segmentos caulinares inoculados em meio WPM suplementado com: A) 0,0 mg L⁻¹ BAP; B) 1,0 mg L⁻¹ BAP; C) 2,0 mg L⁻¹ BAP; D) 3,0 mg L⁻¹ BAP; E) 4,0 mg L⁻¹ BAP; F) 5,0 mg L⁻¹ BAP. UFLA, Lavras, 2005.

6.1.2 Tamanho da maior brotação

O efeito das diferentes concentrações de BAP sobre o tamanho da maior brotação formada foi significativo, considerando-se um nível de significância fixado em 5%, como pode ser observado na Tabela 6.

TABELA 6. Análise de variância para o comprimento da maior brotação em segmentos nodais de mangabeira inoculados em meio de cultura WPM, suplementado com diferentes concentrações de BAP. UFLA, Lavras, 2005.

FV.	GL.	QM	Pr > F
CONCENTRAÇÃO	5	4,36*	0,013
ERRO	114	1,43	
Total	119		

*Significativo, a nível de 5% de probabilidade, pelo teste F.

O maior comprimento médio das brotações, 3,175, 3,0 e 2,875 cm foi verificado nos tratamentos com 1,0, 2,0 e 3,0 mg L⁻¹ de BAP, respectivamente (Tabela 7). Acima dessas concentrações houve uma tendência de redução do tamanho dos brotos formados.

TABELA 7. Teste de Tukey para comparação das médias referentes ao comprimento das brotações nas diferentes concentrações de BAP adicionadas ao meio WPM. UFLA, Lavras, 2005.

Concentrações de BAP (mg L ⁻¹)	Médias	
1,0	3,175	a
2,0	3,000	a
3,0	2,825	ab
5,0	2,575	b
4,0	2,525	b
0,0	1,850	c

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Resultados semelhantes foram encontrados por Chitra & Padmaja (1999) ao induzirem brotações em ápices caulinares de amora (*Morus indica* L. cultivar M-5). Tabachnik & Kester (1977) observaram que concentrações de BAP acima de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ inibiram a elongação de brotações de pessegueiro e amendoeira.

De acordo com Yui et al. (1990), a utilização de concentrações elevadas de BAP promove a formação de grande número de brotos em detrimento, porém, de seu desenvolvimento. Trabalhando com sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides* Kunth), Silveira et al. (1996) observaram que segmentos caulinares dessa espécie, quando inoculados em meio de cultura suplementado com $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP, produziam, em média, 10 brotos de 10 mm de comprimento, enquanto que em $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP, o mesmo tipo de explante produzia quatro brotos de 23 mm de comprimento cada.

Pasqual (2001) afirma que elevadas concentrações de citocininas podem reduzir o tamanho das brotações e estimular a ocorrência de hiperidricidade e formação de folhas anormais.

Grattapaglia & Machado (1998) relatam que a tendência de diminuição do comprimento de brotações a partir de determinada concentração pode decorrer de um possível efeito fitotóxico da citocinina. Para Narayanaswamy (1977), a toxidez causada pelo excesso de reguladores de crescimento no meio de cultura, ou pelo prolongado período de tempo em que a cultura permanece exposta a eles, pode provocar alterações genéticas, fisiológicas e morfológicas, resultando na redução da taxa de multiplicação e no encurtamento dos caules, o que dificulta a individualização das plantas e o processo de enraizamento.

6.1.3 Ocorrência de calos na base dos explantes

O modelo utilizado para a análise estatística da ocorrência de calos na base dos explantes é dado pela equação abaixo (3).

$$P(\text{Resp}=\text{SIM} \mid \text{Conc}, \text{Con}^2) = \frac{1}{1 + e^{(2.775 - 2.370\text{Conc} + 0.310\text{Conc}^2)}} \quad (3)$$

Por meio da probabilidade da Deviance ($p=0,255$), verifica-se a adequacidade do modelo, tendo em vista o nível de significância, fixado em 5%.

No gráfico da Figura 7, observa-se a não expressividade da calogênese na ausência do regulador de crescimento.

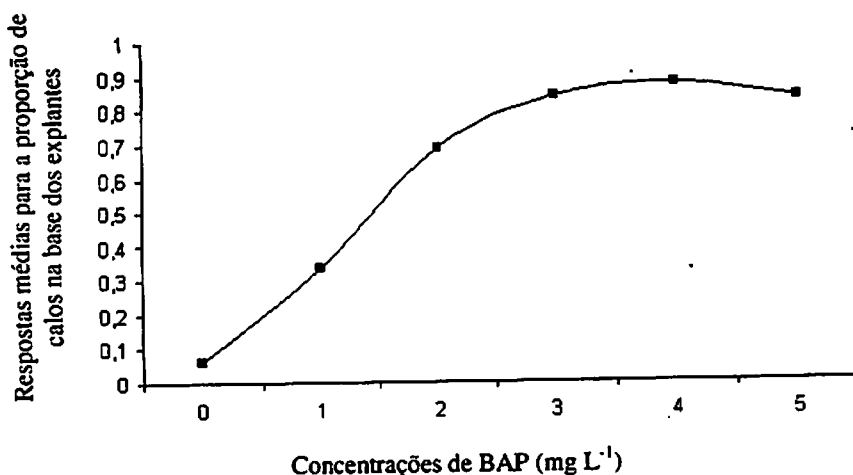


FIGURA 7. Respostas médias para a proporção de calos na base dos explantes para cada concentração de BAP acrescentada ao meio de cultura WPM. UFLA, Lavras, 2005.

A ocorrência de calos na base dos explantes aumentou com o acréscimo de BAP ao meio de cultura, até a concentração de 4,0 mg L⁻¹ (90%). A partir deste ponto, uma tendência de queda dessa variável resposta foi verificada. Resultados semelhantes foram obtidos por Fráguas (2003) que, trabalhando com a figueira 'Roxo de Valinhos', encontrou maior peso da matéria fresca (1,672 g)

e seca (0,85 g) de calos basais de explantes caulinares, utilizando o meio de cultura WPM, suplementado com 4,0 mg L⁻¹ de BAP.

Em pesquisa com *Inga vera* subsp. *affinis*, Soares (2003) observou que, à medida que se aumentou a concentração de BAP, estimulou-se a formação de calos em segmentos caulinares. As concentrações de 6,0, 9,0 e 12,0 mg L⁻¹ deste regulador foram as que apresentaram os resultados mais significativos, entre 70% e 80% de formação de calos. Efeitos equivalentes foram verificados por Bonilla (2002) em *Rudgea viburnoides*. Para Nogueira (2003), a concentração de 8,0mg L⁻¹ de BAP proporcionou a maior ocorrência de calos em brotações de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.), aproximadamente 90%.

Segundo Fráguas (2003), a formação de calos, neste caso, não é desejada, já que pode favorecer o surgimento de variações genotípicas no explante.

O aspecto visual dos calos basais, formados nas brotações de mangabeira cultivadas *in vitro*, na presença de 4,0 mg L⁻¹ de BAP, pode ser observado na Figura 8.



FIGURA 8. Aspecto de calos basais formados em brotações de mangabeira cultivadas em meio WPM suplementado com 4,0 mg L⁻¹ BAP. UFLA, Lavras, 2005.

6.2 Efeito do ANA no enraizamento *in vitro*

As doses de ANA utilizadas nesse experimento não proporcionaram a formação de raízes nas brotações de mangabeira cultivadas *in vitro*. Este regulador não exerceu efeito positivo na rizogênese e os níveis internos de auxinas dos explantes não foram suficientes para desencadear este processo morfogenético. Segundo Kulescha (1988), o nível das auxinas endógenas é o que determina a formação de raízes adventícias, ou seja, é o acúmulo de auxinas endógenas que induz à formação de raízes.

A testemunha (ausência de ANA no meio de cultura) também não promoveu o enraizamento. É possível que o explante apresente concentrações endógenas de citocininas ou residuais dos experimentos de multiplicação, que podem ter desfavorecido o balanço hormonal para a emergência de raízes. A rizogênese é geralmente inibida por altas concentrações de citocinina que, utilizada na indução de brotações, pode afetar negativamente o alongamento dos primórdios radiculares (Pasqual, 1998).

Pio et al. (2002) comentam que a formação de raízes bem desenvolvidas é de grande importância para a sobrevivência e adaptação das plântulas cultivadas *in vitro*. Assim, sendo o enraizamento uma etapa essencial para a continuidade do cultivo de várias espécies, o fato das brotações de mangabeira não terem sido enraizadas *in vitro* limita a formação de mudas por meio da micropropagação, sendo necessários mais estudos para esta fase.

6.3 Efeito do AIB no enraizamento *in vitro*

Foi observado o enraizamento de 20% das brotações de mangabeira inoculadas em meio de cultura suplementado com 3,0 mg L⁻¹ de AIB (Figura 9).

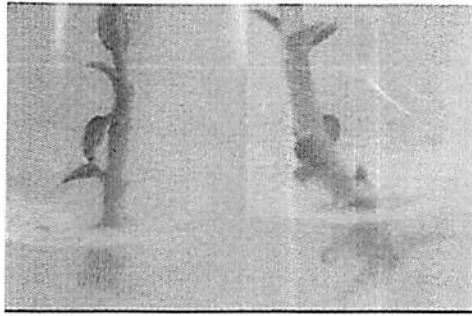


FIGURA 9. Aspecto visual de brotações de mangabeira enraizadas em meio WPM, suplementado com $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ AIB. UFLA, Lavras, 2005.

Segundo Wang & Anderson (1988), o AIB é a auxina sintética mais comumente utilizada na indução de enraizamento. Por apresentar a propriedade de promover a formação de primórdios radiculares, este regulador tem sido utilizado para induzir o enraizamento de numerosas espécies vegetais (Awad & Castro, 1989).

Efeito favorável do AIB no processo de rizogênese foi obtido por Bonilla (2002) em estudos com tangará-açu (*Rudgea viburnoides*).

Em *Coffea arabica* e *C. canephora*, maior número de raízes foi observado em explantes cultivados na presença de $6,0 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB (Santos, 2001). Em moreira (*Machura tinctoria*), também se obteve enraizamento em meio WPM 50% acrescido de $4,8 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB e $4,7 \text{ g L}^{-1}$ de carvão ativado (Gomes, 1999).

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

Segundo Pasqual (1998), diferenças genótípicas na resposta à auxina podem ser causadas pela habilidade diferenciada do tecido em absorver e ou metabolizar a auxina sintética, convertendo-a para auxina endógena (AIA).

7 CONCLUSÕES

A utilização de BAP promove resposta eficiente na indução de multibrotações em segmentos nodais de mangabeira.

A concentração de 2,0 mg L⁻¹ de BAP possibilita a obtenção de brotações mais desenvolvidas, embora induza também a formação de calos na base dos explantes.

O ANA não induz, nas concentrações testadas, a formação de raízes em brotações de mangabeira.

O AIB induz, na concentração de 3,0 mg L⁻¹, a formação de raízes em brotações de mangabeira.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHUJA, M. R. *Micropropagation of woody plants*. London: Kluwer Academic Publishers, 1992. v. 41, 507 p.

AMIN, M. N.; JAISWAL, V. S. Rapid Clonal propagation of guava through *in vitro* shoot proliferation on nodal explants of mature trees. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Amsterdam, v. 9, n. 3, p. 235-243, 1987.

ANDERSON, W. C. Tissue culture cultivation of red and black raspberries, *Rubus idaeus* and *R. occidentalis*. *Acta Horticulturae*, Amsterdam, v. 20, p. 112-113, 1980.

ASSIS, T. F.; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. 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. 261-296.

BALAKRISHANAN, N. Handbook of the logidtic distribution. **Statistics: Textbooks and monographs**, New York, 1992. 602 p.

BONILLA, M. G. O. **Propagação *in vivo*, indução, curva de crescimento de calos e abordagem fitoquímica em *Rudgea viburnoides* (CHAM) Benth.** 2002. 162 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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.

CHITRA, D. S. V.; PADMAJA, G. Clonal propagation of mulberry (*Morus indica* L. cultivar M-5) thorooung *in vitro* culturae of nodal explants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 80, n. 3/4, p. 289-298, Apr. 1999.

CORRÊA, D. de M. **Enraizamento *in vitro* de porta-enxertos de macieira (*Malus domestica* Borkh.).** 1990. 50 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, MG.

DAMIANO, C. II carbone attivo nella coltura *in vitro* della fragola. **Frutticoltura**, Bologna, v. 40, n. 1, p. 49-50, 1978.

DECCEITI, S. F. C. **Propagação *in vitro* de *Annona glabra* L.** 2000. 101 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

FRÁGUAS, C. B. **Micropropagação e aspectos da anatomia foliar da figueira ‘Roxo de Valinhos’ em diferentes ambientes.** 2003. 110 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture. Part 1 - The technology.** Edington: Exegetics, 1996. 1574 p.

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture.** Eversley: Exegetics, 1984. 709 p.

- GOMES, G. A. C. **Propagação *in vitro* de Moreira (*Maclura tinctoria*)**. 1999. 92 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- 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.
- KULESCHA, Z. Recherches sur l'élaboration de substances de croissance of micropropagation. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 230, p. 63-71, 1988.
- LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, Washington, v. 30, p. 421-427, 1980.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, Mar. 1962.
- NARAYANASWAMY, S. Regeneration of plants from tissue cultures. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y. P. S. **Applied and fundamental aspects of plant cell tissue and organ culture**. Berlin: Springer Verlag, 1977. p. 179-248.
- NOGUEIRA, R. C. **Propagação *in vitro*, análises anatômicas e bioquímicas de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.)**. 2003. 88 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- PASQUAL, M. **Textos acadêmicos: meios de cultura**. Lavras: FAEPE/UFLA, 2001. 127 p.
- PASQUAL, M.; BARROS, I. de. Efeito do ácido naftaleno acético e da 6-benzilaminopurina sobre a proliferação de brotos *in vitro* em barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 7, p. 1017-1019, jul. 1992.
- PASQUAL, M.; RAMOS, J. D.; HOFFMANN, A.; CARVALHO, G. R. **Cultura de Tecidos Vegetais: Tecnologias e aplicações: meios de cultura**. Lavras: FAEPE/UFLA, 1998. 116 p.

PIO, R. **Ácido indolbutírico e sacarose no enraizamento de estacas apicais e desenvolvimento inicial da figueira (*Ficus carica* L.).** 2002. 109 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PREECE, J. E. Can nutrient salts partially substitute for plant growth regulator? **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, Oxford, n. 1, v. 1, p. 26-37, 1995.

ROHR, R.; HANUS, D. Vegetative propagation of wavy grain sycamore maple. **Canadian Journal of Foresty Research**, Ottawa, v. 17, n. 5, p. 418-420, May 1987.

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

SANTANA, J. R. F. **Controle da morfogênese *in vitro* em algumas espécies de *Annonaceae*.** 2003. 237 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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

SANTOS, C. G. **Micropropagação e caracterização bioquímico-anatômica em *Coffea arabica* e *Coffea canephora*.** 2001. 110 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SCHUCH, M. W.; PETERS, J. A. Multiplicação *in vitro* de brotações de macieira cultivares Marubakaido (*Malus prunifolia*, Xilld, Borkh) e Meggumi (*Malus domestica*, Borkh). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 4, p. 433-437, abr. 1993.

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

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

TABACHNICK, L.; KESTER, D. E. Shoot culture of almond peach hybrid clones *in vitro*. **HortScience**, Alexandria, v. 12, n. 6, p. 545-547, 1977.

TISSERAT, B. Embryogenesis, organogenesis in plant regeneration. In: DIXON, R. A. (Ed.). **Plant cell culture, a practical approach**. Oxford: IRL, 1985. p. 79-105.

WANG, Q.; ANDERSON, A. S. Propagation of *Hibiscus rosa-sinensis*: relations between stock plant, age, environment and growth regulator treatments. **Acta horticulture**, Wageningen, n. 227, p. 167-169, 1988.

YUI, E. **Multiplicação *in vitro* de porta-enxertos de macieira (*Malus domestica* Borkh.)**. 1990. 69 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, MG.

CAPÍTULO IV

CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO NO ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE EXPLANTES FOLIARES E CAULINARES DE MANGABEIRA

1 RESUMO

SOARES, Fernanda Pereira. Controle da contaminação no estabelecimento *in vitro* de explantes foliares e caulinares de mangabeira. In: Aspectos do cultivo *in vitro* da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). 2005. p.62-76. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

O curto período de armazenamento das sementes da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) é um fator limitante para sua propagação sexuada. Além disso, não se tem obtido sucesso com a propagação por estaquia da espécie. Neste contexto, a cultura de tecidos apresenta-se como uma alternativa a ser utilizada. No entanto, o estabelecimento *in vitro* de espécies nativas, em função de suas características peculiares, apresenta problemas associados à contaminação bacteriana ou fúngica. Dessa maneira, o objetivo deste trabalho foi determinar metodologias para o estabelecimento *in vitro* da mangabeira, estudando o efeito da adição de diferentes substâncias no controle da contaminação. Foram testadas diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (0,0%, 0,5%, 1,0%, 1,5% e 2,0% de cloro ativo) na desinfestação de explantes foliares e caulinares de mangabeira. Após os tratamentos de desinfestação, os explantes foram inoculados em meio WPM, acrescido ou não de 500 mg L⁻¹ de benomyl e suplementado com 30,0 g L⁻¹ de sacarose e 7,0 g L⁻¹ de ágar. O pH foi corrigido para 5,8. Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento com temperatura média de 25±2°C, sob fotoperíodo de 16 horas e irradiância de 36 μmol m⁻² s⁻¹ durante 15 dias, quando efetuou-se a avaliação do número de explantes contaminados por tratamento. A desinfestação de explantes foliares e caulinares de mangabeira, em níveis satisfatórios, foi obtida em meio de cultura acrescido de benomyl, com a utilização de etanol 70%, seguida de solução de hipoclorito de sódio 1,0% e 1,5%, respectivamente.

2 ABSTRACT

SOARES, Fernanda Pereira. Control of contamination during the *in vitro* establishment of shoot and leaf explants. In: Aspects of the *in vitro* culture of mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). 2005. p.62-76. Dissertation (Master Program in Plant Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.

The short period of seed storage of mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) is a limiting factor for its sexual propagation. In addition, no success has been obtained through cuttings of this species. In this context, the process of *in vitro* culture presents as an alternative for the propagation of mangabeira. However, due to specific characteristics of native species, the *in vitro* establishment presents difficulties related to bacterial or fungi contamination. The objective of this work was to determinate methodologies to the *in vitro* establishment of mangabeira, by evaluating the effect of the addition of different products for contamination control. Different concentrations of sodium hypochlorite (0.0, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0% active chlorine) were tested for the disinfection of leaf and nodal explants of mangabeira. After the disinfection treatments, the explants were inoculated in WPM medium in the presence or absence of 500 mgL⁻¹ benomyl and supplemented with 30 g L⁻¹ sucrose and 7 g L⁻¹ agar. The pH was adjusted to 5.8. After inoculation, the explants were maintained in a growing room with average temperature of 25 ± 2°C, photoperiod of 16 hours and irradiance of 36 μmol m⁻² s⁻¹ for 15 days after which the number of contaminated explants for treatment was evaluated. Disinfection of leaf and nodal explants of mangabeira, in a satisfactory level, was obtained in culture medium containing benomyl, using 70% ethanol followed by solutions of 1.0% and 1.5% sodium hypochlorite, respectively.

3 INTRODUÇÃO

O fruto da mangabeira, árvore nativa do Cerrado, é muito apreciado pela população local, apresentando boa digestibilidade e valor nutritivo, com teor de proteína superior ao da maioria das frutíferas.

Com o recente desenvolvimento do mercado de frutas tropicais no Brasil, despertando o comércio de polpas congeladas para a produção de sucos, a instalação de pomares comerciais dessa espécie surge como uma alternativa de renda para os agricultores do Cerrado.

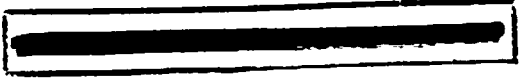
Contudo, o curto período de armazenamento das sementes da mangabeira, torna-se um fator limitante para sua propagação sexuada. Além disso, não se tem obtido sucesso com a propagação por estaquia.

O desenvolvimento de técnicas de cultura de tecidos vegetais tem sido uma das contribuições mais significativas para o avanço do processo de propagação. Entretanto, o estabelecimento *in vitro* de espécies nativas, como a mangabeira, em função de suas características peculiares, apresenta problemas, como a contaminação.

Dessa maneira, o objetivo deste trabalho foi determinar metodologias para o estabelecimento *in vitro* da mangabeira, estudando o efeito da adição de diferentes substâncias no controle da contaminação.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

A aplicação das técnicas de cultura de tecidos em espécies arbóreas freqüentemente encontra problemas de contaminação no início das culturas. Esses problemas se agravam nos trópicos úmidos, onde o clima favorece a proliferação de microorganismos (Enjaric et al., 1988).



A contaminação depende do material vegetal utilizado como fonte de explantes, que pode ser de casa de vegetação ou do campo. No caso de espécies nativas, o material vegetal é muitas vezes, retirado diretamente do campo contendo elevada concentração de microorganismos.

Grattapaglia & Machado (1998) comentam que a contaminação de explantes na micropropagação geralmente ocorre devido à presença de microorganismos na superfície ou no interior do explante, além, é claro, de possíveis erros cometidos pelos operadores no momento da assepsia, reinfestando o material previamente desinfestado. A contaminação por microorganismos endofíticos é o problema mais sério na cultura de tecidos vegetais, especialmente em espécies tropicais (Kneifel & Leonhardt, 1992).

Os microorganismos contaminantes competem com os explantes pelos nutrientes do meio de cultura e provocam danos diretos e indiretos pela colonização de seus tecidos, podendo, ainda, eliminar, no meio, metabólitos tóxicos às plantas.

Várias substâncias podem ser utilizadas na desinfestação dos explantes (Sato et al., 2001). No entanto, as combinações dos princípios ativos dessas substâncias podem variar muito, sendo necessária a adequação de acordo com a espécie e a sensibilidade do tecido a ser desinfestado.

O descontaminante mais utilizado na cultura de tecidos é o hipoclorito de sódio ou de cálcio, diluído em água, com cerca de 1% de cloro ativo. Para melhorar o contato com a superfície do explante, o tratamento com hipoclorito é freqüentemente precedido por uma lavagem em álcool. O etanol remove parcialmente ceras hidrofílicas e resinas, que protegem os microorganismos do contato com o descontaminante (Bonga & Von Aderkas, 1992). Para Thomas & Davey (1975) e Grattapaglia & Machado (1998), o álcool etílico 70% apresenta maior eficiência como desinfestante do que o álcool puro, já que não desidrata rapidamente os tecidos vegetais.

Quando não se tem uma desinfestação eficiente pelo método usual, com etanol e hipoclorito de sódio, podem ser utilizadas substâncias, como fungicidas e bactericidas, no meio de cultivo, para melhorar a eficiência da desinfestação.

O benomyl, primeiro fungicida sistêmico desenvolvido, possui atividades preventivas, curativas e sistêmicas contra numerosos grupos de fungos. Apresenta, ainda, baixa toxicidade e, de modo geral, não provoca fitotoxicidade. Tem sido utilizado em diversos trabalhos no controle de contaminações fúngicas do meio e do material vegetal em várias concentrações, de 50 mg L⁻¹ (Hauptmann et al., 1985) a 0,6 g L⁻¹, apesar de já existir uma portaria que proíba sua comercialização.

Seja qual for o produto utilizado, os explantes a serem desinfestados devem ser mantidos em água corrente por alguns minutos, para uma lavagem superficial de partículas de poeira e outras fontes de contaminações superficiais. O processo de desinfestação deve ser realizado em câmara de fluxo laminar, em condições assépticas, utilizando vidrarias previamente esterilizadas (Grattapaglia & Machado, 1998).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Efeito de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio e da presença de benomyl na desinfestação de explantes foliares

Folhas obtidas de plantas mantidas em casa de vegetação, 120 dias após germinadas, depois de permanecerem por 20 minutos sob água corrente, foram, em câmara de fluxo laminar, imersas em álcool 70% durante 60 segundos e em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (0,0%, 0,5%, 1,0%, 1,5% e 2,0% de cloro ativo) por 15 minutos. Em seguida, foram lavadas cinco vezes em água destilada e autoclavada.

Após a desinfestação, explantes foliares com aproximadamente 1,0 cm² foram inoculados em tubos de ensaio contendo meio de cultura WPM (Lloyd & Mc Cown, 1980), suplementado com 30,0 g L⁻¹ de sacarose e acrescido ou não de 500 mg L⁻¹ de benomyl. O meio foi solidificado com ágar 0,7% e o pH foi corrigido para 5,8 antes da autoclavagem a 120°C, durante 20 minutos.

Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento sob irradiância de fótons de 36 μmol m⁻²s⁻¹, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25±2°C. A avaliação foi realizada após 15 dias de incubação, sendo quantificado o número de explantes contaminados em cada tratamento.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com dez repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por um tubo de ensaio contendo um explante.

Utilizou-se a regressão logística para modelar os dados binários em função dos parâmetros, representando as covariáveis. A avaliação da qualidade do ajuste dos modelos foi realizada via “Deviance” (Balakrishnan, 1992).

5.2 Efeito de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio e da presença de benomyl na desinfestação de explantes caulinares

Segmentos caulinares obtidos de plantas mantidas em casa de vegetação, com aproximadamente 120 dias de idade, após permanecerem por 20 minutos sob água corrente, foram, em câmara de fluxo laminar, imersos em álcool 70% durante 60 segundos e em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (0,0%, 0,5%, 1,0%, 1,5% e 2,0% de cloro ativo) por 15 minutos. Em seguida, foram lavados 5 vezes em água destilada e autoclavada.

Após a desinfestação, explantes caulinares com aproximadamente 1,0 cm de comprimento foram inoculados em tubos de ensaio contendo meio de cultura WPM, suplementado com 30,0 g L⁻¹ de sacarose e acrescido ou não de 500 mg L⁻¹ de benomyl. Os meios foram solidificados com ágar 0,7% e o pH foi

corrigido para 5,8 antes da autoclavagem a 120°C, durante 20 minutos. Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento sob irradiância de fótons de 36 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25±2°C. A avaliação foi realizada após 15 dias de incubação, sendo quantificado o número de explantes contaminados em cada tratamento.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com dez repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por um tubo de ensaio contendo um explante.

Utilizou-se a regressão logística para modelar os dados binários em função dos parâmetros representando as covariáveis. A avaliação da qualidade do ajuste dos modelos foi realizada via “Deviance” (Balakrishnan, 1992).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Efeito de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio e da presença de benomyl na desinfestação de explantes foliares

Dois modelos de regressão logística foram obtidos, sendo a equação (1) para os dados referentes à ausência do fungicida benomyl e a equação (2) para a presença deste no meio de cultura.

$$p(\text{conta m.} = 1 | C) = \frac{1}{(1 + \exp(0,849 + 0,962.C))} \quad (1)$$

$$p(\text{contam.} = 1 | C) = \frac{1}{(1 + \exp(-2,264 + 7,774.C))} \quad (2)$$

A qualidade do ajuste dos modelos é representada por meio da “Deviance”, com probabilidades de 0,153 e 0,988, respectivamente. Com base

nesses valores, tendo a significância fixada em 5%, pode-se afirmar que os modelos ajustados são apropriados aos dados observados.

Os modelos ajustados com as estimativas das proporções de contaminação dos explantes foliares para cada concentração de cloro ativo utilizada, na presença e na ausência do fungicida benomyl no meio de cultura, são representados no gráfico da Figura 10.

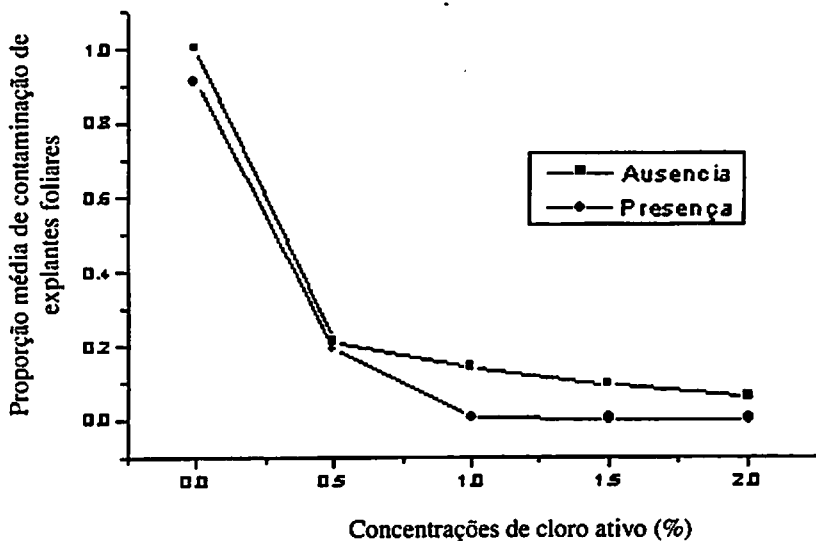


FIGURA 10. Proporção de contaminação para cada concentração de cloro ativo utilizada durante a desinfestação de explantes foliares de mangabeira, na presença e na ausência do fungicida benomyl no meio de cultura. UFLA, Lavras, 2004.

Na ausência do hipoclorito de sódio, elevadas proporções de explantes foliares de mangabeira contaminados foram obtidas, tanto na presença quanto na ausência de benomyl. No entanto, para todas as concentrações de cloro ativo utilizadas, a contaminação dos explantes foliares foi maior na ausência do fungicida. Provavelmente, os fungos endógenos pré-existentes, não foram

eliminados pela desinfestação superficial do material vegetal com o hipoclorito de sódio.

Alves Júnior et al. (2003), trabalhando com anonáceas, também observaram que o uso do benomyl contribuiu para a redução significativa da contaminação. De forma semelhante, Sato et al. (2001) recomendam o uso deste fungicida na concentração de 200 mg L⁻¹ para controlar a contaminação no estabelecimento *in vitro* de juazeiro-de-bode (*Celtis* sp.).

Na presença e ausência do fungicida no meio de cultura, nas concentrações iniciais de cloro ativo, ocorreu a maior percentagem de contaminação. A partir da concentração de 1,0%, para os tratamentos providos de benomyl, a percentagem de contaminação manteve-se praticamente constante, indicando ser essa concentração, do ponto de vista econômico e fisiológico, a mais satisfatória. Susuki et al. (2002) também obtiveram explantes foliares desinfestados para a indução de calos em liliáceas ornamentais utilizando como desinfestante superficial o hipoclorito de sódio na concentração de 1% de cloro ativo.

Cerqueira et al. (2002) encontraram, como melhor concentração de hipoclorito de sódio para a desinfestação de explantes foliares de *Tridax procumbens* L., 0,6% de cloro ativo.

O aspecto visual dos explantes foliares de mangabeira *in vitro* pode ser observado na Figura 11.

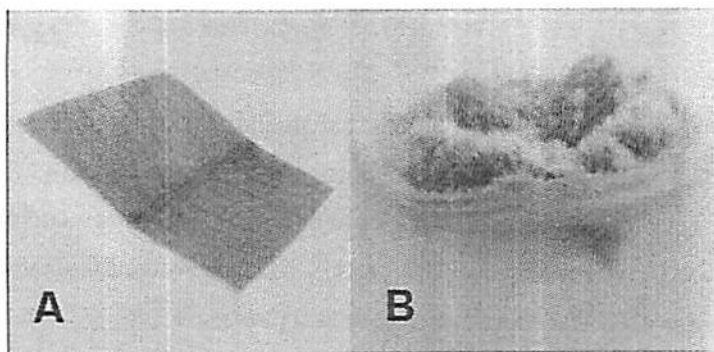


FIGURA 11. Explante foliar de mangabeira *in vitro* sem contaminação (A), e contaminado por fungo (B). UFLA, Lavras, 2004.

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que o uso do hipoclorito de sódio pode reduzir em até 80% a probabilidade de contaminação do explante. Entretanto, este agente desinfestante não tem ação efetiva sobre contaminantes endógenos, o que justifica a utilização do benomyl no meio de cultivo.

6.2 Efeito de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio e da presença de benomyl na desinfestação de explantes caulinares

Dois modelos de regressão logística foram obtidos, sendo a equação (3) para os dados referentes à ausência do fungicida benomyl e a equação (4) para a presença deste no meio de cultura.

$$p(\text{contam.} = 1 | C) = \frac{1}{(1 + \exp(-0,3557 + 1,964.C))}$$

$$p(\text{contam.} = 1 | C) = \frac{1}{(1 + \exp(0,6553 + 2,013.C))}$$

A qualidade do ajuste dos modelos é representada por meio da “Deviance”, com probabilidades de 0,834 e 0,788, respectivamente. Com base

nesses valores, tendo a significância fixada em 5%, pode-se afirmar que os modelos ajustados são apropriados aos dados observados.

As estimativas das proporções de contaminação dos segmentos caulinares, para as diferentes concentrações de cloro ativo, na presença e na ausência do fungicida benomyl, podem ser visualizadas no gráfico da Figura 12.

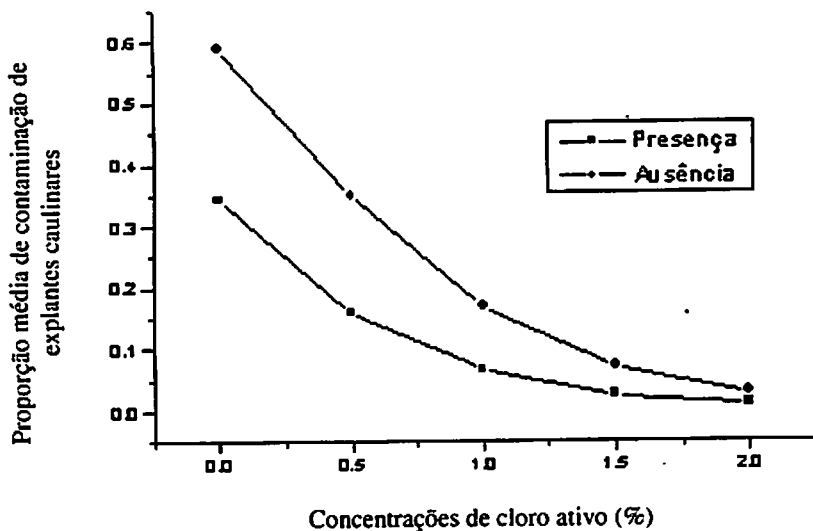


FIGURA 12. Proporção de contaminação para cada concentração de cloro ativo utilizada durante a desinfestação de explantes caulinares de mangabeira, na presença e na ausência do fungicida benomyl no meio de cultura. UFLA, Lavras, 2004.

As maiores proporções de contaminação, em todas as concentrações avaliadas, ocorreram nos tratamentos cujos meios não foram suplementados com benomyl. A percentagem de contaminação nos meios suplementados com este fungicida foi mantida praticamente constante a partir da concentração de 1,5% de cloro ativo, indicando ser esta a mais satisfatória.

Haldemann, et al. (1987) eliminaram a contaminação proveniente de fungos em ápices de *Camellia* oriundos do campo adicionando ao meio, dosagens que oscilaram de 0,5 a 1,0 g L⁻¹ de benomyl. Carvalho et al. (1990) obtiveram também uma redução de até 30% na contaminação quando utilizaram diferentes concentrações desse fungicida na assepsia de segmentos nodais de *Eucalyptus grandis*.

O aspecto visual dos explantes caulinares de mangabeira *in vitro* pode ser observado na Figura 13.

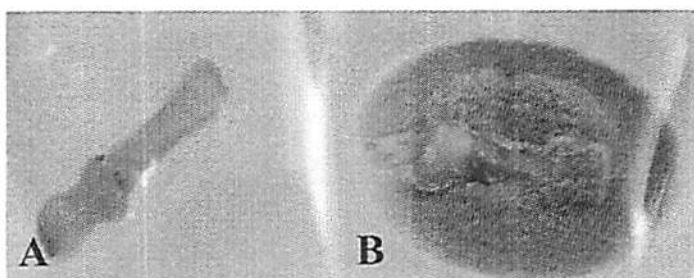


FIGURA 13. Explante caulinar de mangabeira *in vitro* sem contaminação (A) e contaminado por fungo (B). UFLA, Lavras, 2004.

Semelhante ao observado para explantes foliares, verificou-se redução de até 20% na proporção de contaminação, com a adição de benomyl ao meio de cultura, em todas as concentrações de cloro testadas. Esses resultados podem ser explicados pela baixa atividade do etanol e do hipoclorito de sódio sobre os esporos fúngicos, como sugerido por Pasqual et al. (2002), além da presença de contaminantes endógenos, inacessíveis a estes agentes desinfestantes.

7 CONCLUSÕES

A desinfestação de explantes foliares e caulinares de mangabeira, em níveis satisfatórios, pode ser obtida com a utilização de etanol 70%, seguida de solução de hipoclorito de sódio 1,0% e 1,5%, respectivamente.

O benomyl adicionado ao meio de cultura na concentração de 500 mg L⁻¹, diminui a probabilidade de contaminação de explantes foliares e caulinares dessa espécie.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES JUNIOR, J.; SANTANA, J. R. F. de; PAIVA, R.; LEMOS, E. E. P. de; NICIOLI, P. M.; SANTOS, B. R. Uso de antibiótico e fungicida para controlar contaminações *in vitro* de segmentos foliares de *Annonaceae*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 27., 2002, Belém, PA. Anais... Belém, PA, 2003.

BALAKRISHANAN, N. **Handbook of the logit distribution**. Statistics: Textbooks and monographs, New York, 1992. 602 p.

BONGA, J. M.; VON ADEKAS, P. *In vitro* culture of tree. The Netherlands: Kluwer Academic Publish, 1992. 236 p. (Forestry Science, v. 38).

CARVALHO, D. de; PINTO, J. E. B. P.; PASQUAL, M. Uso de fungicida e antioxidantes em cultura *in vitro* de segmentos nodais de *Eucaliptus grandis* Hill ex maiden. *Ciência e Prática*, Lavras, v. 14, n. 1, p. 97-106, jan./mar. 1990.

CERQUEIRA, E. S.; PINTO, J. E. B. P.; MORAIS, A. R.; CASTRO, N. E. A.; CARDOSO, M. D. G.; LAMEIRA, O. A. Indução de calos em erva-de-touro (*Tridax procumbens* L.) utilizando diferentes reguladores de crescimento e tipos de explantes. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 26, n. 2, p. 301-308, abr./jun. 2002.

ENJARIC, F.; CARRON, M. P.; LARDET, L. Contamination of primary cultures in tropical areas: the case of *Hevea brasiliensis*. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 225, p. 57-65, 1988.

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. 331-353.

HALDEMAN, J. H.; THOMAS, R. L.; McKAMY, D. L. Use of benomyl and rifampicin for *in vitro* shoot tip culture of *Camellia sinensis* and *C. japonica*. **HortScience**, Alexandria, v. 22, n. 2, p. 306-307, Apr. 1987.

HAUPTMANN, R. M.; WIKHOLM, J. M.; PAXTON, J. D. Benomyl: a broad spectrum fungicide for use in plant cell and protoplast culture. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 4, n. 3, p. 129-132, 1985.

KNEIFEL, W.; LEONHARDT, W. Testing of different antibiotics against gram-positive and gram-negative bacteria from plant tissue culture. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 29, n. 2, p. 139-144, May 1992.

PASQUAL, G.; MANES, F.; MONACELLI, B.; NATALE, L.; ANSELMINI, S. Effects of the culture medium pH and ion uptake *in vitro* vegetative organogenesis in thin cell layers of tobacco. **Plant Science**, Clare, v. 162, n. 6, p. 947-955, June 2002.

SATO, A. Y.; DIAS, H. C. T.; ANDRADE, L. A.; SOUZA, V. C. Micropropagação de *Celtis* sp: controle da contaminação e oxidação. **Cerne**, Lavras, v. 7, n. 2, p. 117-123, 2001.

SUSUKI, S.; OOTA, M.; NAKANO, M. Embryogenic callus induction from leaf explants of the Liliaceous ornamental plant, *Agapanthus praecox* spp. *Orientalis* (Leighton) Leighton Histological study and response to selective agents. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 95, n. 1/2, p. 123-132, Aug. 2002.

THOMAS, E.; DAVEY, M. R. **From single cells to plants**. London: Wykeham Publications, 1975. 171 p.

CAPÍTULO V

INDUÇÃO DE CALOS EM EXPLANTES FOLIARES E CAULINARES DE MANGABEIRA

1 RESUMO

SOARES, Fernanda Pereira. **Indução de calos em explantes foliares e caulinares de mangabeira.** In: Aspectos do cultivo *in vitro* da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). 2005. p.77-99. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

O gênero *Hancornia* apresenta taxa de germinação baixa e emergência lenta da plântula, dificultando a sua propagação sexuada. Além disso, sua multiplicação por estaquia não tem obtido sucesso. Estas limitações podem inviabilizar tanto a produção racional de mudas de mangabeira como sua utilização silvicultural. Neste contexto, a cultura de tecidos surge como uma ferramenta importante, que pode auxiliar a propagação dessa espécie de forma eficaz. No cultivo *in vitro*, um dos métodos que possibilitam a propagação em massa de uma determinada espécie é o cultivo de calos. Visando a posterior regeneração de plantas como uma alternativa para a produção de mudas de mangabeira, o objetivo deste trabalho foi a obtenção de calos a partir de segmentos foliares e caulinares dessa espécie. Foram utilizados como explantes segmentos foliares e caulinares de mangabeira. Os explantes foliares foram inoculados em tubos de ensaio contendo meios de cultura, suplementados com 30,0 g L⁻¹ de sacarose, 7,0 g L⁻¹ de ágar e diferentes combinações de reguladores de crescimento. O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. Estudou-se o efeito de diferentes combinações de 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0 e 3,0 mg L⁻¹) + BAP (0,0; 1,0; 2,0 e 3,0 mg L⁻¹) em meio MS e WPM e de 2,4-D (0,0; 0,5 e 1,0 mg L⁻¹) + AIB (0,0; 0,5 e 1,0 mg L⁻¹) em meio WPM. Os explantes caulinares foram inoculados em tubos de ensaio contendo meio de cultura WPM, suplementado com 30,0 g L⁻¹ de sacarose, 7,0 g L⁻¹ de ágar e diferentes combinações de 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0 e 3,0 mg L⁻¹) + BAP (0,0; 1,0; 2,0 e 3,0 mg L⁻¹). O pH foi ajustado para 5,8. Após a inoculação, os explantes permaneceram em sala de crescimento com temperatura média de 25±2°C e no escuro por 30 dias, quando a percentagem da área dos explantes coberta por calos foi avaliada. As combinações de 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D + 2,0 mg L⁻¹ de BAP e de 3,0 mg L⁻¹ de 2,4-D + 3,0 mg L⁻¹ de BAP foram as mais eficientes na indução de calos em explantes foliares de mangabeira inoculados, respectivamente, em meio WPM e MS. Eficiência na calogênese de explantes foliares também foi promovida pela interação entre as auxinas 2,4-D (1,0 mg L⁻¹) e AIB (1,0 mg L⁻¹). A inoculação de explantes caulinares de mangabeira em meio WPM acrescido somente de 2,4-D foi mais eficiente para a obtenção de calos, com média próxima a 100%.

2 ABSTRACT

SOARES, Fernanda Pereira. **Callus induction in leaf and nodal explants of mangabeira.** In: Aspects of the *in vitro* culture of mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). 2005. p.77-99 Dissertation (Master Program in Plant Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.

The *Hancornia* genus present low germination rate and slow plant growth, which makes its sexual propagation difficult. In addition, its propagation through cuttings has not been successful. These limitations affect the production of plants and its silvicultural use. In this context, the tissue culture techniques present as important tools which may facilitate the propagation of this species. Callus cultivation is considered one of the techniques for massive propagation of many species. In order to obtain posterior plant regeneration, as an alternative for the mangabeira propagation, the object of this work was to induce the formation of callus from nodal and leaf explants. Leaf explants were inoculated in test tubes containing culture media supplemented with 30.0g L⁻¹ sucrose, 7.0g L⁻¹ agar and different combinations of growth regulators. The pH was adjusted to 5.8 prior autoclaving. The effect of different combinations of 2,4-D (0.0, 1.0, 2.0 and 3.0 mg L⁻¹) + BAP (0.0, 1.0, 2.0 and 3.0 mg L⁻¹) in MS and WPM media and 2,4-D (0.0, 0.5 and 1.0 mg L⁻¹) + AIB (0.0, 0.5 and 1.0 mg L⁻¹) in WPM media was evaluated. Nodal explants were inoculated in WPM medium supplemented with 30.0 g L⁻¹ sucrose, 7.0g L⁻¹ agar and different combinations of 2,4-D (0.0, 1.0, 2.0 and 3.0 mg L⁻¹) + BAP (0.0, 1.0, 2.0 and 3.0 mg L⁻¹). The pH was adjusted to 5.8. After inoculation, the explants were maintained in a growing room with average temperature of 25 ± 2° C in the dark for 30 days after which the percentage of explants area covered with callus was evaluated. The combinations of 2.0 mg L⁻¹ 2,4-D + 2.0 mg L⁻¹ BAP and 3.0 mg L⁻¹ 2,4-D + 3.0 mg L⁻¹ BAP were the most efficient on callus induction in leaf explants in WPM and MS, respectively. Efficiency in callus induction was also promoted with the interaction between the auxin 2,4-D (1.0 mg L⁻¹) and IBA (1.0 mg L⁻¹). Inoculation of nodal explants in WPM medium supplemented only with 2,4-D was more efficient to induce callus with an average close to 100%.

3 INTRODUÇÃO

A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) é uma frutífera nativa do Cerrado de grande potencial econômico. Sua exploração está relacionada, em sua maior parte, ao extrativismo predatório, um risco à sobrevivência da espécie e uma barreira ao aproveitamento de todas as suas potencialidades.

Lorenzi (2002) menciona que o gênero *Hancornia* apresenta taxa de germinação baixa e emergência lenta da plântula, dificultando a sua propagação sexuada. Além disso, sua multiplicação por estaquia não tem obtido sucesso (Lederman et al., 1989).

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

A multiplicação do material vegetal, por meio da micropropagação, pode ser realizada por meio da proliferação de gemas axilares, mediante indução de gemas adventícias por organogênese direta ou indireta (passando pela fase de calo) e via embriogênese somática (Grattapaglia & Machado, 1998).

Espécies, como a mangabeira, que possuem características de germinação que dificultam a produção de grande número de mudas durante o ano todo têm, nestas diversas técnicas de cultura de tecidos, uma aliada para sua propagação. A obtenção de calos, neste caso, pode ser o ponto de partida para futuros trabalhos de regeneração de plantas saudáveis.

Visando à posterior regeneração de plantas, como uma alternativa para a produção de mudas de mangabeira, o objetivo deste trabalho foi a obtenção de calos a partir de segmentos foliares e caulinares dessa espécie.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

Uma das metodologias para a propagação *in vitro* mais aplicadas é a calogênese. Calos são definidos como aglomerados de células parenquimáticas não organizados, irregularmente diferenciados, que se multiplicam desordenadamente e se desenvolvem em resposta a injúrias químicas ou físicas, podendo diferenciar-se em tecidos e órgãos (Torres et al., 1998).

Segundo Pierik (1990), o crescimento e o desenvolvimento dessas células podem ser influenciados pelo próprio material vegetal, pelo meio nutritivo, acrescido ou não de reguladores de crescimento e por fatores externos, como luz e temperatura. Esses fatores agem acelerando, retardando ou mesmo inibindo a proliferação celular e, conseqüentemente, a formação e o crescimento do calo.

Para ocorrer a indução de calo, qualquer tecido pode ser utilizado como explante. Entretanto, procura-se utilizar explantes que contenham maior proporção de tecido meristemático ou que apresentem maior capacidade de expressar a totipotência. Pierik (1990) comenta que explantes oriundos de tecidos jovens, não lignificados, são mais apropriados para a cultura de tecidos por possuírem alta capacidade de regeneração.

De acordo com Vietez & San-José (1996), muitas vezes é necessário o suprimento exógeno de reguladores de crescimento para a indução de calos. Essa indução é regulada pela interação e balanço entre os reguladores sintéticos fornecidos e os hormônios produzidos internamente pelo explante.

O efeito produzido *in vitro* por um determinado regulador de crescimento depende do ambiente no qual o órgão ou tecido está sendo cultivado. Concentrações idênticas de um mesmo regulador, em dois meios de cultura diferentes entre si podem ter efeitos distintos (Pasqual, 2001).

As auxinas têm sido amplamente utilizadas nos meios de cultivo para a indução de calos. Entretanto, seu efeito difere conforme a situação. Por isso, concentrações efetivas deste regulador precisam ser ajustadas de acordo com o genótipo da planta a ser cultivada e o tipo de tecido ou órgão.

O balanço auxina/citocinina é, na maioria das vezes, determinante na calogênese. Ozias-Akins & Vasil (1985) mencionam, no entanto, que citocininas exógenas nem sempre são necessárias e que muitos tecidos desenvolvem-se *in vitro* apenas com suprimento de auxinas. Dentre os reguladores de crescimento mais utilizados na indução de calos destacam-se o 2,4-D, ANA, BAP e, mais recentemente, o TDZ.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Efeito do 2,4-D e do BAP na indução de calos em explantes foliares de mangabeira cultivados em meio MS e WPM

Plântulas oriundas de casa de vegetação, obtidas por meio da germinação *in vivo* (Capítulo II), serviram como fonte de explantes para este experimento. O protocolo de desinfestação adotado foi aquele que maior sucesso obteve no experimento relatado no Capítulo IV: 60 segundos em álcool 70%, 15 minutos em hipoclorito de sódio com 1,0% de cloro ativo e cinco lavagens em água destilada e autoclavada.

Segmentos foliares com 1,0 cm² foram inoculados em tubos de ensaio contendo o meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) e o meio de cultura WPM (Lloyd & McCown, 1980), suplementados com diferentes concentrações de 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0 e 3,0 mg L⁻¹) e BAP (0,0; 1,0; 2,0 e 3,0 mg L⁻¹), além de 3% de sacarose e 500 mg L⁻¹ de benomyl. Os meios foram solidificados com 0,7% de ágar e o pH foi corrigido para 5,8, antes da autoclavagem.

Foram efetuados cortes nas superfícies adaxial e abaxial dos explantes, tendo a incubação, sido realizada no escuro e em temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$.

A avaliação (visual) foi feita 30 dias após a inoculação, observando-se a percentagem da área dos explantes ocupada por calos nos diferentes tratamentos (Tabela 8).

TABELA 8. Tratamentos utilizados para a indução de calos em explantes foliares de mangabeira em função da combinação de 2,4-D + BAP, nos meios de cultura MS e WPM. Lavras, UFLA, 2004.

Tratamentos	2,4-D (mg L^{-1})	BAP (mg L^{-1})
T0	0,0	0,0
T1	0,0	1,0
T2	0,0	2,0
T3	0,0	3,0
T4	1,0	0,0
T5	1,0	1,0
T6	1,0	2,0
T7	1,0	3,0
T8	2,0	0,0
T9	2,0	1,0
T10	2,0	2,0
T11	2,0	3,0
T12	3,0	0,0
T13	3,0	1,0
T14	3,0	2,0
T15	3,0	3,0

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com vinte repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por um tubo de ensaio, contendo um explante. Os tratamentos que apresentaram respostas nulas e pontos discrepantes foram excluídos da análise estatística, realizada com a utilização do teste de Kruskal-Wallis (Triola, 1999), considerando um nível de significância de 5%.

Para uma melhor visualização dos dados e para comparar quais tratamentos diferiram entre si, foi utilizada a construção de um Box Plot (Bussab & Morettin, 1987).

5.2 Efeito do 2,4-D e do AIB na indução de calos em explantes foliares de mangabeira cultivados em meio WPM

As plântulas obtidas por meio da germinação *in vitro* (Capítulo II) foram utilizadas como fonte de explantes para este experimento.

Segmentos foliares com 1,0 cm² foram inoculados em tubos de ensaio contendo o meio de cultura WPM, suplementado com as auxinas 2,4-D (0,0; 0,5 e 1,0 mg L⁻¹) e AIB (0,0; 0,5 e 1,0 mg L⁻¹) e 3% de sacarose. O meio foi solidificado com 0,7% de ágar e seu pH foi corrigido para 5,8 antes da autoclavagem.

Foram efetuados cortes nas superfícies adaxial e abaxial dos explantes, tendo a incubação, sido realizada no escuro e em temperatura de 25±2^oC.

A avaliação foi feita 30 dias após a inoculação, observando-se a percentagem da área dos explantes ocupada por calos nos diferentes tratamentos (Tabela 9).

TABELA 9. Tratamentos utilizados para a indução de calos em explantes foliares de mangabeira em função da combinação de 2,4-D + AIB, no meio de cultura WPM. Lavras, UFLA, 2004.

Tratamentos	2,4-D (mg L ⁻¹)	AIB (mg L ⁻¹)
T0	0,0	0,0
T1	0,0	0,5
T2	0,0	1,0
T3	0,5	0,0
T4	0,5	0,5
T5	0,5	1,0
T6	1,0	0,0
T7	1,0	0,5
T8	1,0	1,0

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com vinte repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por um tubo de ensaio contendo um explante.

A análise estatística foi realizada com a utilização do teste de Kruskal-Wallis (Triola, 1999), considerando um nível de significância de 5%.

Para uma melhor visualização dos dados e para comparar quais tratamentos diferiram entre si, foi utilizado o Box Plot (Bussab & Morettin, 1987).

5.3 Efeito do 2,4-D e do BAP na indução de calos em explantes caulinares de mangabeira cultivados em meio WPM

As plântulas obtidas por meio da germinação *in vitro* (Capítulo II) foram utilizadas como fonte de explantes para este experimento.

Segmentos caulinares com 1,0 cm de comprimento foram inoculados em tubos de ensaio contendo o meio de cultura WPM, suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0 e 3,0 mg L⁻¹) e BAP (0,0; 1,0; 2,0 e 3,0 mg

L⁻¹), além de 3% de sacarose. O meio foi solidificado com 0,7% de ágar e o pH foi corrigido para 5,8.

A incubação foi realizada no escuro e em temperatura de 25±2^oC.

A avaliação foi feita 30 dias após a inoculação, observando-se a percentagem da área do explante ocupada por calos nos diferentes tratamentos (Tabela 10).

TABELA 10. Tratamentos utilizados para a indução de calos em explantes caulinares de mangabeira em função da combinação de 2,4-D + BAP, no meio de cultura WPM. Lavras, UFLA, 2004.

Tratamentos	2,4-D (mg L ⁻¹)	BAP (mg L ⁻¹)
T0	0,0	0,0
T1	0,0	1,0
T2	0,0	2,0
T3	0,0	3,0
T4	1,0	0,0
T5	1,0	1,0
T6	1,0	2,0
T7	1,0	3,0
T8	2,0	0,0
T9	2,0	1,0
T10	2,0	2,0
T11	2,0	3,0
T12	3,0	0,0
T13	3,0	1,0
T14	3,0	2,0
T15	3,0	3,0

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com vinte repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por um tubo de ensaio contendo um explante.

A análise estatística foi realizada com a utilização do teste de Kruskall-Wallis (Triola, 1999), considerando um nível de significância de 5%.

Para uma melhor visualização dos dados e para comparar quais tratamentos diferiram entre si, foi utilizado o Box Plot (Bussab & Morettin, 1987).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Efeito do 2,4-D e do BAP na indução de calos em explantes foliares de mangabeira cultivados em meio MS e WPM

A calogênese iniciou-se ao longo da segunda semana de cultivo, a partir de pontos que se expandiam e recobriam a superfície dos explantes.

Na Tabela 11, observa-se, pela probabilidade encontrada no teste de Kruskal-Wallis, que, em ambos os meios de cultura, pelo menos um dos tratamentos diferiu significativamente de outro.

TABELA 11. Estatística e probabilidade do teste Kruskal-Wallis para a formação de calos em explantes foliares de mangabeira nos dois meios de cultivo, MS e WPM. UFLA, Lavras, 2004.

Meio de cultivo	Estatística do teste	Probabilidade
WPM	42,67	0,001
MS	40,49	0,001

Alguns tratamentos, em ambos os meios de cultura, apresentaram respostas nulas e pontos discrepantes, como pode ser verificado nos Box Plots apresentados nas Figuras 14 e 15.

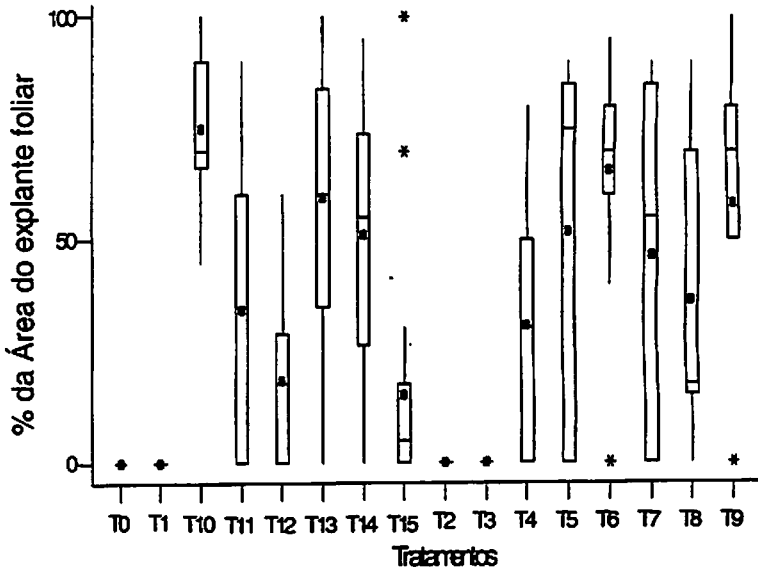


FIGURA 14. Box Plot para a percentagem da área coberta por calos dos explantes foliares de mangabeira, em função das diferentes concentrações de 2,4-D e BAP, em mg L^{-1} , utilizadas no meio de cultura WPM: (T0) 0,0 de 2,4-D e 0,0 de BAP; (T1) 0,0 de 2,4-D e 1,0 de BAP; (T2) 0,0 de 2,4-D e 2,0 de BAP; (T3) 0,0 de 2,4-D e 3,0 de BAP; (T4) 1,0 de 2,4-D e 0,0 de BAP; (T5) 1,0 de 2,4-D e 1,0 de BAP; (T6) 1,0 de 2,4-D e 2,0 de BAP; (T7) 1,0 de 2,4-D e 3,0 de BAP; (T8) 2,0 de 2,4-D e 0,0 de BAP; (T9) 2,0 de 2,4-D e 1,0 de BAP; (T10) 2,0 de 2,4-D e 2,0 de BAP; (T11) 2,0 de 2,4-D e 3,0 de BAP; (T12) 3,0 de 2,4-D e 0,0 de BAP; (T13) 3,0 de 2,4-D e 1,0 de BAP; (T14) 3,0 de 2,4-D e 2,0 de BAP; (T15) 3,0 de 2,4-D e 3,0 de BAP. UFLA, Lavras, 2004.

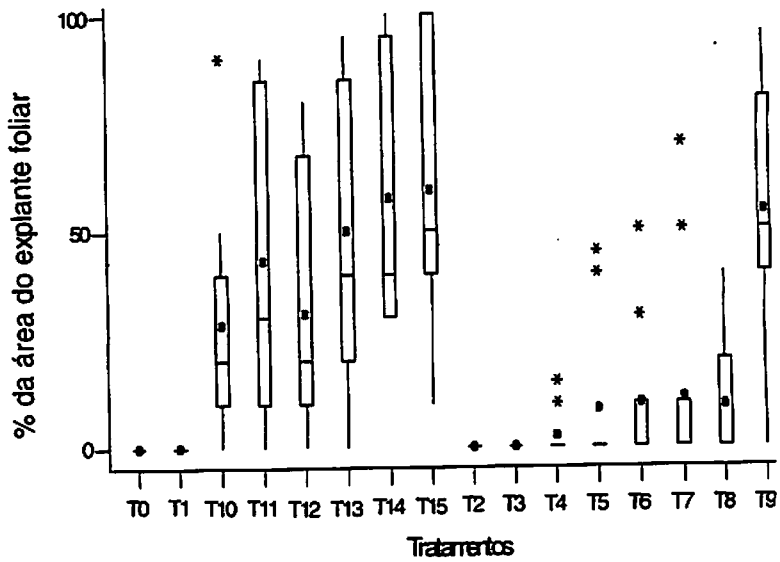


FIGURA 15. Box Plot para a percentagem da área coberta por calos dos explantes foliares de mangabeira, em função das diferentes concentrações de 2,4-D e BAP, em mg L⁻¹, utilizadas no meio de cultura MS: (T0) 0,0 de 2,4-D e 0,0 de BAP; (T1) 0,0 de 2,4-D e 1,0 de BAP; (T2) 0,0 de 2,4-D e 2,0 de BAP; (T3) 0,0 de 2,4-D e 3,0 de BAP; (T4) 1,0 de 2,4-D e 0,0 de BAP; (T5) 1,0 de 2,4-D e 1,0 de BAP; (T6) 1,0 de 2,4-D e 2,0 de BAP; (T7) 1,0 de 2,4-D e 3,0 de BAP; (T8) 2,0 de 2,4-D e 0,0 de BAP; (T9) 2,0 de 2,4-D e 1,0 de BAP; (T10) 2,0 de 2,4-D e 2,0 de BAP; (T11) 2,0 de 2,4-D e 3,0 de BAP; (T12) 3,0 de 2,4-D e 0,0 de BAP; (T13) 3,0 de 2,4-D e 1,0 de BAP; (T14) 3,0 de 2,4-D e 2,0 de BAP; (T15) 3,0 de 2,4-D e 3,0 de BAP. UFLA, Lavras, 2004.

Na ausência do regulador de crescimento 2,4-D (T₀, T₁, T₂ e T₃) não houve formação de calos nos explantes foliares de mangabeira, tanto no meio de cultura WPM quanto no MS. Este resultado corrobora com estudos realizados por Deccetti (2000), que reportam a ausência de calos em *Annona glabra*, quando o 2,4-D não estava presente. Da mesma maneira, Vietez & San-José (1996) também não observaram a formação de calos em explantes de *Fagus silvatica*, quando BAP foi utilizado isoladamente no meio de cultura. Resultado

contrário foi encontrado por Cordeiro (1999), que obteve maior calogênese utilizando explantes foliares de *Coffea arabica*, induzidos apenas com BAP.

Segundo Grattapaglia & Machado (1998), o 2,4-D tende a estimular a formação de calos, mesmo em baixas concentrações. Este fitorregulador apresenta efeito no metabolismo do RNA, induzindo a transcrição de RNAs mensageiros capazes de codificar proteínas requisitadas para o crescimento e que podem induzir a proliferação celular desordenada, ou seja, a formação de calos (George, 1996). A indução de calos na ausência desse regulador, como os obtidos em *Coffea arabica*, pode ser decorrente da elevada concentração de auxinas naturais no tecido utilizado como explante.

No meio WPM, a maior percentagem de calos formados (aproximadamente 75%) foi verificada com a utilização de 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 2,0 mg L⁻¹ de BAP (T₁₀). Concentrações superiores de BAP provocaram a diminuição da calogênese neste meio de cultivo. Lima (2004), ao contrário, não observou a formação de calos, quando explantes foliares de sangra d'água (*Croton urucurana* Baill.) foram cultivados na presença de 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 2,0 mg L⁻¹ de BAP.

No meio MS, as concentrações de 3,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 3,0 mg L⁻¹ de BAP (T₁₅) foram as que proporcionaram maior formação de calos (aproximadamente 60%).

A diferença na concentração de sais pode ter sido responsável pela discrepância de resultados encontrados para os dois meios de cultivo. Raghava et al. (1992) compararam diferentes diluições do meio MS com o meio WPM, acrescidos de diferentes reguladores de crescimento e observaram que a composição e a concentração dos nutrientes no meio de cultura influenciaram no requerimento de diferentes concentrações de reguladores de crescimento para uma mesma espécie. Murashige & Skoog (1962), quando publicaram a

formulação do meio MS, chamaram a atenção para a inter-relação entre os sais inorgânicos e os reguladores de crescimento no meio de cultura.

Em ambos os meios, a interação entre a auxina 2,4-D e a citocinina BAP mostrou-se importante no aumento da calogênese.

Cunha & Ferreira (1996) e Gomes (1999) observaram também a necessidade de interação entre auxina e citocinina para uma eficiente indução de calos em explantes de *Maclura tinctoria* e *Linum usitatissimum* L., respectivamente. Em copaíba (*Copaifera langsdorffii*), Azevedo (2003) somente obteve calogênese utilizando $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D + $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP.

Nos tratamentos em que a concentração de 2,4-D superou a de BAP, observou-se também a formação de raízes (Figura 16). O enraizamento ocorreu naturalmente a partir do 25^o dia após a inoculação.

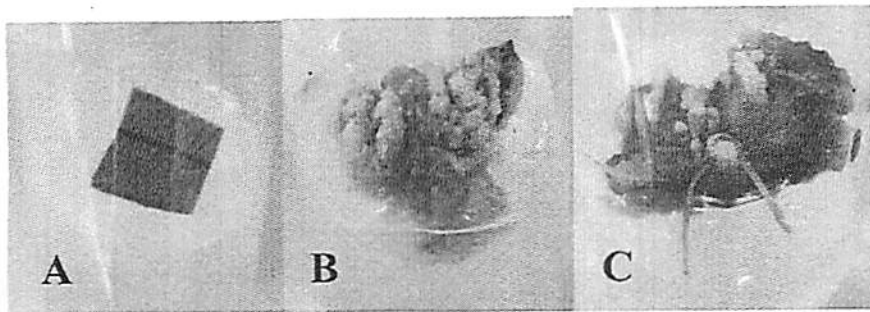


FIGURA 16. Indução de calos em explantes foliares de mangabeira em meio WPM suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D e BAP: A) explante cultivado na ausência de 2,4-D; B) calos obtidos na presença de baixa relação 2,4-D/BAP; C) calos e raízes obtidos na presença de elevada relação 2,4-D/BAP. UFLA, Lavras, 2004.

6.2 Efeito do 2,4-D e do AIB na indução de calos em explantes foliares de mangabeira cultivados em meio WPM

De acordo com a probabilidade encontrada pelo teste de Kruskal-Wallis ($p = 0,000$), inferior ao nível de significância utilizado (5%), pode-se afirmar que houve diferença significativa na formação de calos para, pelo menos, um dos tratamentos.

Para melhor visualização dos resultados, construiu-se um gráfico Box Plot baseado nos postos de observação, para comparar quais tratamentos diferem entre si (Figura 17.).

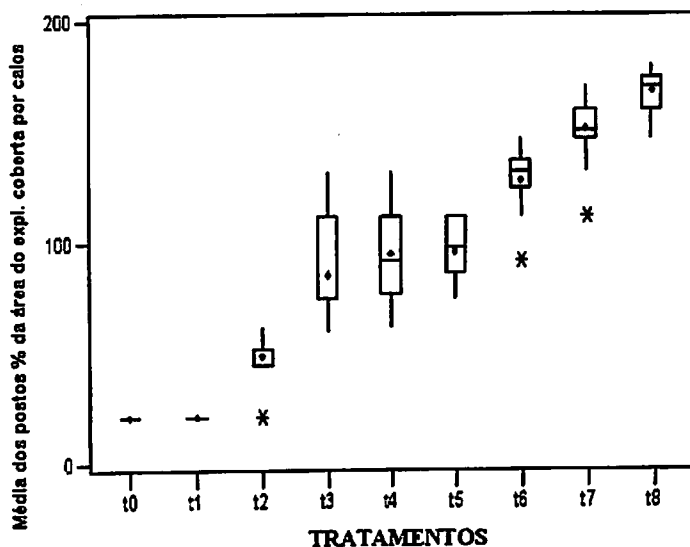


FIGURA 17. Box Plot para a percentagem da área coberta por calos dos explantes foliares de mangabeira, em função das diferentes concentrações de 2,4-D e AIB, em mg L^{-1} , utilizadas no meio de cultura WPM: (T0) 0,0 de 2,4-D e 0,0 de AIB; (T1) 0,0 de 2,4-D e 0,5 de AIB; (T2) 0,0 de 2,4-D e 1,0 de AIB; (T3) 0,5 de 2,4-D e 0,0 de AIB; (T4) 0,5 de 2,4-D e 0,5 de AIB; (T5) 0,5 de 2,4-D e 1,0 de AIB; (T6) 1,0 de 2,4-D e 0,0 de AIB; (T7) 1,0 de 2,4-D e 0,5 de AIB; (T8) 1,0 de 2,4-D e 1,0 de AIB. UFLA, Lavras, 2004.

Na ausência do 2,4-D (T_0 , T_1 e T_2), a calogênese nos explantes foliares de mangabeira foi inexpressiva, próxima a zero. Quando este regulador foi adicionado, observou-se um aumento da produção de calos, principalmente na concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ (T_6 , T_7 e T_8).

Fixando-se a concentração de 2,4-D em $0,5 \text{ mg L}^{-1}$, a adição de AIB (independente da concentração) não apresentou efeito significativo na formação de calos. Um efeito sinérgico do AIB sobre a formação de calos foi observado, no entanto, nos tratamentos suplementados com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D, verificando-se uma interação significativa entre as duas auxinas. Palú (2002) também encontrou, em experimentos realizados com café (*Coffea arabica*), uma interação significativa para 2,4-D e AIB na calogênese de anteras.

A melhor resposta para indução de calos em explantes foliares de mangabeira foi promovida pela interação entre 2,4-D ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$) e AIB ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$) (T_8). Resultados contrários foram observados por Santos (2001) que, utilizando também as auxinas 2,4-D e AIB em um experimento de indução de calos em explantes foliares de cafeeiro (*Coffea arabica* e *Coffea canephora*), observou que a interação entre esses reguladores de crescimento não influenciou nos resultados. Neste caso, a produção máxima de calos obtida foi com apenas $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D para as cultivares Rubi e Topázio e com $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D para a cultivar Apatã. Duskova & Dusek (1995) observaram maior formação de calos em explantes foliares de *Leuzea carthamoides* DC. inoculados somente na presença de AIB ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$).

Em todos os tratamentos em que ocorreu a formação de calos, observou-se também a formação de raízes (Figura 18), a partir do 20º dia após a inoculação.

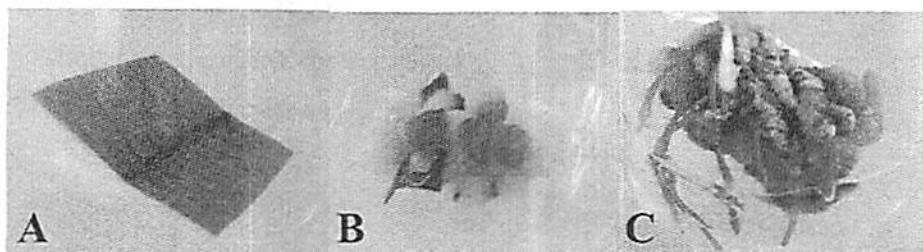


FIGURA 18. Indução de calos em explantes foliares de mangabeira em meio WPM suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D e AIB: A) explante cultivado na ausência de 2,4-D; B) calos obtidos na presença de 2,4-D e AIB C) calos e raízes obtidos na presença de 2,4-D e AIB. UFLA, Lavras, 2004.

6.2 Efeito do 2,4-D e do BAP na indução de calos em explantes caulinares de mangabeira cultivados em meio WPM

A formação de calos em segmentos caulinares de mangabeira iniciou-se ao longo da terceira semana de cultivo, a partir de pontos que se expandiam e recobriam a superfície dos explantes.

Na ausência do regulador de crescimento 2,4-D (T_0 , T_1 , T_2 e T_3), a percentagem de calos observada foi inexpressiva, próxima a zero (Figura 19).

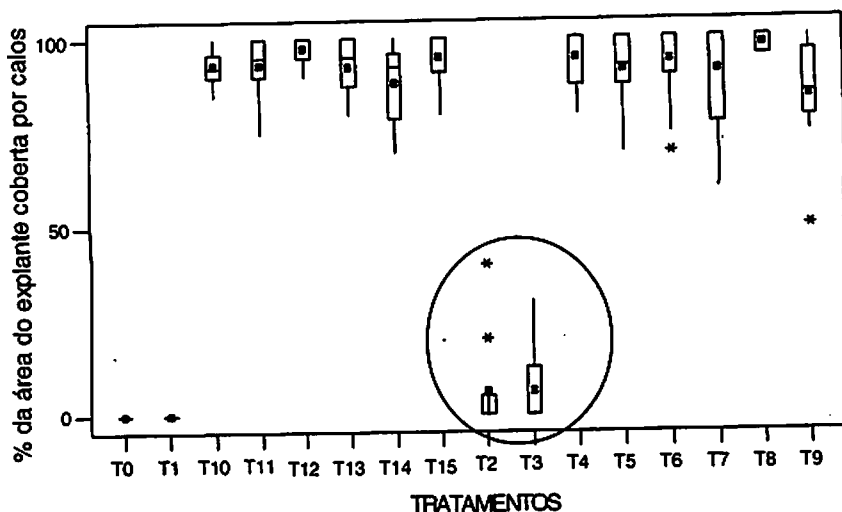


FIGURA 19. Box Plot para a percentagem da área coberta por calos dos explantes caulinares de mangabeira, em função das diferentes concentrações de 2,4-D e BAP, em mg L^{-1} , utilizadas no meio de cultura WPM: (T0) 0,0 de 2,4-D e 0,0 de BAP; (T1) 0,0 de 2,4-D e 1,0 de BAP; (T2) 0,0 de 2,4-D e 2,0 de BAP; (T3) 0,0 de 2,4-D e 3,0 de BAP; (T4) 1,0 de 2,4-D e 0,0 de BAP; (T5) 1,0 de 2,4-D e 1,0 de BAP; (T6) 1,0 de 2,4-D e 2,0 de BAP; (T7) 1,0 de 2,4-D e 3,0 de BAP; (T8) 2,0 de 2,4-D e 0,0 de BAP; (T9) 2,0 de 2,4-D e 1,0 de BAP; (T10) 2,0 de 2,4-D e 2,0 de BAP; (T11) 2,0 de 2,4-D e 3,0 de BAP; (T12) 3,0 de 2,4-D e 0,0 de BAP; (T13) 3,0 de 2,4-D e 1,0 de BAP; (T14) 3,0 de 2,4-D e 2,0 de BAP; (T15) 3,0 de 2,4-D e 3,0 de BAP. UFLA, Lavras, 2004.

Os demais tratamentos apresentaram, pelo teste de Kruskal-Wallis, probabilidade igual a 0,083, para um nível de significância de 5%, indicando não diferirem significativamente entre si. A média da percentagem de calos verificada, neste caso, foi próxima a 100.

Um ligeiro aumento na formação de calos, apesar de não significativo, foi observado nos explantes caulinares inoculados na presença de 2,4-D e na ausência de BAP. Segundo Nogueira (2003), este comportamento possivelmente se deve ao fato da citocinina encontrada no meio de cultura (BAP), aliada ao conteúdo endógeno do explante caulinar, ter proporcionado um aumento na

concentração deste regulador em relação ao conteúdo de auxinas, ocasionando uma diminuição na ocorrência de calos.

Resultado semelhante foi obtido por Paiva-Neto (1996). Esse autor constatou que o uso isolado de 2,4-D, na concentração de 6,36 mg L⁻¹ em moreira (*Chlorophora tinctoria*), promoveu a calogênese. Já a combinação 2,4-D e BAP reduziu a porcentagem de explantes com calos. Gomes (1999), ao contrário, observou a necessidade de interação entre auxina e citocinina para a eficiente indução de calos em explantes de *Maclura tinctoria*.

Para todos os tratamentos testados, não foi observada a formação de raízes (Figura 20).

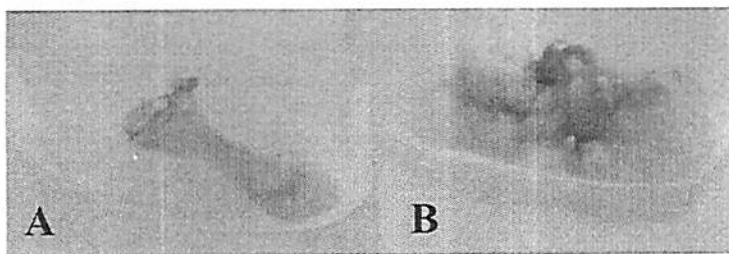


FIGURA 20. Indução de calos em explantes caulinares de mangabeira em meio WPM suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D e BAP: A) explante cultivado na ausência de 2,4-D; B) calos obtidos na presença de 2,4-D. UFLA, Lavras, 2004.

7 CONCLUSÃO

É possível a indução de calos em explantes foliares e caulinares de mangabeira.

A aplicação exógena do 2,4-D é uma condição necessária para a indução de calos em explantes foliares e caulinares dessa espécie.

A adição de BAP, em conjunto com o 2,4-D, aumenta, em explantes foliares e diminui, em explantes caulinares, a formação de calos.

No meio de cultura WPM, a combinação de 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 2,0 mg L⁻¹ de BAP é a mais eficiente para a indução de calos em explantes foliares de mangabeira.

No meio de cultura MS, a combinação de 3,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 3,0 mg L⁻¹ de BAP é a mais eficiente para a indução de calos em explantes foliares dessa espécie.

Eficiência na calogênese de explantes foliares de mangabeira também pode ser promovida pela interação entre as auxinas 2,4-D (1,0 mg L⁻¹) e AIB (1,0 mg L⁻¹).

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEVEDO, K. de S. **Indução e análises bioquímicas de calos e aspectos da anatomia foliar de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.)**. 2003. 86 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

BUSSAB, W. O.; MORETTIN, P. A. **Estatística Básica**. São Paulo: Editora Atual, 1987.

CORDEIRO, A. T. **Embriogênese somática indireta e fusão interespecífica de protoplasto em *Coffea***. 1999. 111 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

CUNHA, A. C. G.; FERREIRA, M. F. Somatic embryogenesis, organogenesis and callus growth Kinectis of flax. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 47, n. 1, p. 1-8, 1996.

DEC CETTI, S. F. C. **Propagação *in vitro* de *Annona glabra* L.** 2000. 101 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

DUSKOVA, J.; DUSEK, J. *Leuzea carthamoides* DC. *in vitro*. **Herba Polonica**, Poznan, v. 41, p. 165-169, May 1995.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture. Part I - The technology**. Edington: Exegetics, 1996. 574 p.

GOMES, G. A. **Propagação *in vitro* de Moreira (*Maclura tinctoria*)**. 1999. 91 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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.

LEDERMAN, I. E.; BEZERRA, J. E. F.; GONZAGA NETO, L. Propagação vegetativa da mangabeira (*Hancornia speciosa* Muell) através de estaquia, em câmara de nebulização. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 10., 1989, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: SBF, 1989. p. 356-359.

LIMA, E. C. **Micropropagação, calogênese e anatomia foliar de sangra d'água (*Croton urucurana* Baill.)**. 2004. 97 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, Washington, v. 30, p. 421-427, 1980.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. São Paulo: Nova Odessa, 2002. v. 1, 386 p.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, Mar. 1962.

NOGUEIRA, R. C. **Propagação *in vivo* e *in vitro* de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss)**. 2003 89 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

OZIAS-AKINS, P.; VASIL, I. K. Nutrition of plant tissue cultures. In: VASIL, I. K. **Cell culture and somatic cell genetics of plants: cell growth, nutrition,**

[REDACTED]

cytodifferentiation and cryopreservation. Florida: Academic, 1985. v. 2, p. 128-147.

PAIVA-NETO, V. B. Comportamento *in vitro* de tecido foliar e segmento nodal de moreira (*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud). 1996. 39 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PALÚ, E. G. Indução *in vitro* de calogênese em anteras e brotações em segmentos nodais de *Coffea arabica* L. 2002. 47 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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

PIERIK, R. L. M. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Martins Nijoff, 1990. 326 p.

RAGHAVA SEAMY, B. V.; HIMABINDU, K.; LAKSHMI SITA, G. *In vitro* micropropagation of elite rosewood (*Dalbergia latifolia* Roxb.). *Plant Cell Reports*, New York, v. 11, n. 3, p. 126-131, Apr. 1992.

SANTOS, C. G. Micropropagação e caracterização bioquímico-anatômica em *Coffea arabica* e *Coffea canephora*. 2001. 110 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; FERREIRA, A. T. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, 1998. v. 1, p. 11-20.

TRIOLA, M. F. *Introdução a Estatística*. Rio de Janeiro: LTC Editora, 1999. 410 p.

VIETEZ, A. M.; SAN-JOSÉ, M. C. Adventitious shoot regeneration from *Fagus sylvatica* leaf explants *in vitro*. *In vitro Cellular & Developmental Biology*, Columbia, v. 32, n. 3, p. 140-147, July/Sept. 1996.

CAPÍTULO VI

ACLIMATIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA DO TECIDO FOLIAR DE PLÂNTULAS DE MANGABEIRA OBTIDAS VIA CULTIVO *IN VITRO* E APÓS TRANSFERÊNCIA PARA AMBIENTE *EX VITRO*

1 RESUMO

SOARES, Fernanda Pereira. **Aclimatização e caracterização anatômica do tecido foliar de plântulas de mangabeira obtidas via cultivo *in vitro* e após transferência para ambiente *ex vitro*.** In: Aspectos do cultivo *in vitro* da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). 2005. p.100-120. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Para que se compreenda o processo de plasticidade adaptativa de uma espécie sob diferentes condições ambientais é de grande importância que seja feito um estudo sobre a sua anatomia foliar. O presente trabalho teve como objetivos estabelecer uma metodologia de aclimatização para as plântulas de mangabeira cultivadas *in vitro* e ainda comparar a estrutura anatômica de folhas de plântulas germinadas *in vitro* e aclimatizadas. Para a aclimatização, plântulas de mangabeira diretamente retiradas do cultivo *in vitro* e plântulas pré-aclimatizadas durante 7 dias em sala de crescimento foram transferidas para tubetes contendo plantmax. Fez-se o controle da umidade e utilizaram-se sombrites para controlar a irradiância. Para o estudo anatômico, cortes transversais e paradérmicos foram realizados nas lâminas foliares de plântulas provenientes do cultivo *in vitro* e de plântulas já aclimatizadas. As plântulas germinadas *in vitro* que passaram pelo processo de pré-aclimatização apresentaram 86% de sobrevivência e as aclimatizadas diretamente, 73%. Nas seções transversais e paradérmicas das lâminas foliares de mangabeira, observaram-se diferenças anatômicas entre as plântulas retiradas do ambiente *in vitro* e as já aclimatizadas. As epidermes abaxial e adaxial não apresentaram diferenças significativas nos dois ambientes, mostrando-se compostas por apenas uma camada de células revestidas pela cutícula, a qual verificou-se ser mais espessa nas plântulas já aclimatizadas. A medida das espessuras do parênquima paliçádico e esponjoso diferiu de forma significativa nos dois ambientes. Ambos apresentaram-se mais espessos nas lâminas foliares coletadas de plântulas já aclimatizadas. Maior densidade estomática foi observada nas plântulas sob condição *in vitro* (342 estômatos por mm^2) se comparadas às já aclimatizadas (226 estômatos por mm^2). Os estômatos das folhas de mangabeira em ambiente *in vitro* apresentaram-se com diâmetros polar e equatorial maiores que os estômatos das folhas de plântulas já aclimatizadas.

2 ABSTRACT

SOARES, Fernanda Pereira. **Acclimatization and anatomical characterization of leaf tissue from mangabeira plants obtained by *in vitro* culture and after transference to an *ex vitro* environment.** In: Aspects of the *in vitro* culture of mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). 2005. p.100-120 Dissertation (Master Program in Plant Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.

In order to understand the process of adaptative plasticity of a species under different environmental conditions, it is important to study its leaf anatomy. The objectives of the present study were to establish an acclimatization methodology of mangabeira plantlets cultivated *in vitro* and compare the leaf structure of plants germinated *in vitro* with those acclimatized. For the acclimatization, mangabeira plants cultivated *in vitro* and plants semi-acclimatized for 7 days in a growth room were transferred to plastic tubes containing plantmax. The humidity was controlled and light screens were used to control the irradiance. For the anatomic study, transversal and paradermic cuts were performed on leaves of plants cultivated *in vitro* and plants acclimatized. *In vitro* germinated that passed through a semi-acclimatization process showed 86% survival and those directly acclimatized, 73%. Anatomical differences in the transversal and paradermic leaf sections were observed in plants cultivated *in vitro* compared to those already acclimatized. The abaxial and adaxial epidermis presented no significant differences in both environments and was composed by only one layer of cells covered with cuticle, which was thicker on the acclimatized plants. The thickness of the palisade and spongy parenchyma differed significantly in both environments which were thicker in semi-acclimatized plants. Higher stomata density was observed on plantlets cultivated *in vitro* (342 stomata/mm²) when compared with those semi-acclimatized (266 stomata/mm²). Stomata from plants cultivated *in vitro* presented higher polar and equatorial diameter compared to plants semi-acclimatized.

3 INTRODUÇÃO

As mudas micropropagadas, em função da baixa taxa de crescimento *in vitro* e da reduzida capacidade fotossintética e de regulação da perda de água, são extremamente vulneráveis e requerem um período de aclimatização durante a transferência para o ambiente natural ou para um ambiente de transição, como a casa de vegetação ou telado (Lakso et al., 1986; Lee et al., 1985).

De acordo com Preece & Sutter (1991), a elevada umidade relativa e a baixa irradiância no ambiente *in vitro* são os principais fatores que atuam na indução de alterações e funcionalidade de órgãos e tecidos, levando-os à incapacidade de controlar as perdas de água quando submetidos a condições adversas, como o ambiente natural.

Em muitas espécies, o estágio de aclimatização é considerado crítico e o sucesso da transferência de plantas para a casa de vegetação ou para o campo depende da interação e do manejo adequado dos diversos fatores envolvidos na adaptação da planta à nova condição ambiental (Decchetti, 2000).

Considerando a importância econômica da mangabeira e a ausência de relatos na literatura sobre a sua anatomia foliar e aclimatização, o presente estudo teve como objetivos estabelecer uma metodologia de aclimatização para as plântulas dessa espécie cultivadas *in vitro* e ainda, comparar a estrutura interna de folhas de plântulas germinadas *in vitro* e aclimatizadas.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

O desenvolvimento das características fisiológicas e anatômicas de plântulas micropropagadas é necessário para a gradual aclimatização destas ao ambiente da casa de vegetação ou à condição de campo. Um reduzido

desenvolvimento da cutícula (Fuchigami et al., 1981) e um sistema vascular de pouco desenvolvimento (Fabri & Bartolini, 1985; Leshem, 1983; Ziv et al., 1981) são as causas sugeridas para a suscetibilidade das plântulas ao estresse hídrico durante essa fase.

A sobrevivência e o crescimento das mudas micropropagadas dependem do manejo adequado dos diversos fatores envolvidos na adaptação da planta à mudança ambiental e da formação de novas estruturas, principalmente folhas, mais adaptadas às novas condições (Carvalho & Amâncio, 2002).

Nesse contexto, o controle e a otimização da luz após a transferência tem sido essencial para a sobrevivência da planta, sendo o período de decréscimo gradual da umidade relativa acompanhado pelo incremento progressivo na irradiância (George, 1996).

A sobrevivência e o crescimento das plantas cultivadas *in vitro* são ainda problemáticos para algumas culturas. Embora muitas não tenham problemas durante a aclimatização e o período seja suficiente para corrigir alterações induzidas *in vitro* e garantir a sobrevivência após a transferência, em muitas espécies ocorre significativa perda de mudas durante esse período (Bag et al., 2000).

Preece & Sutter (1991) citam que as técnicas de aclimatização podem ser iniciadas ainda durante o cultivo *in vitro*. A pré-aclimatização ou endurecimento consiste de técnicas que permitam tornar o ambiente *in vitro* semelhante ao ambiente natural, bem como manusear a muda para favorecer a sua sobrevivência e crescimento (George, 1993). Dami & Hughes (1996) e Deng & Donnelly (1993) citam, como método de pré-aclimatização, o aumento do intercâmbio de gases entre o recipiente e o meio externo, pelo afrouxamento ou retirada das tampas dos recipientes de cultivo. Segundo George (2003), o tempo ideal para a pré-aclimatização é de 4 a 5 dias, podendo ir até 6 a 9 dias, e

apresenta como vantagens a economia de trabalho, tempo e espaço, quando comparado aos métodos convencionais.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Aclimatização de plântulas de mangabeira germinadas *in vitro*

Plântulas obtidas por meio da germinação *in vitro* (Capítulo II), com 60 dias de idade, foram transferidas diretamente ou após passarem por um período de 7 dias de pré-aclimatização (abertura do recipiente de cultivo), para tubetes com volume de 250 mL, contendo plantmax e envoltas com saco plástico transparente para manutenção da umidade relativa no ambiente. A bandeja com os tubetes foi mantida em sala de crescimento à temperatura controlada de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e irradiância de fótons de $67 \mu\text{m m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Concomitantemente ao controle da umidade relativa e da temperatura, foi realizado o controle da intensidade luminosa, submetendo as plântulas a diferentes níveis de irradiância. Com esse objetivo, nos primeiros 7 dias de aclimatização, as plântulas foram mantidas sob sombrite 70%, o qual foi substituído por sombrite 50% e, posteriormente, 30%, a cada sete dias. Neste mesmo período, o saco envoltório do tubete foi sendo perfurado até a remoção completa, visando a redução gradual da umidade relativa.

Aos 21 dias, os tubetes com as plântulas foram levados para viveiro, onde permaneceram por mais 10 dias sob sombrite 30%, antes do transplântio para sacos de polietileno preto contendo uma mistura de terra e areia, na proporção de 1:1.

Aos 31 dias, a avaliação de sobrevivência das plântulas foi realizada. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com 15 repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por um tubete contendo uma plântula.

5.2 Anatomia foliar *in vitro* e *ex vitro*

Folhas completamente expandidas foram coletadas ao acaso do terço superior de plântulas de mangabeira provenientes da germinação *in vitro* e aclimatizadas. As folhas foram fixadas em álcool etílico 70% (v/v).

Cortes transversais do limbo foliar foram efetuados à mão livre, no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras.

Em seguida, procedeu-se a clarificação dos cortes em solução de hipoclorito de sódio 20% (v/v do produto comercial), por um período de três a cinco minutos e três lavagens em água destilada. A coloração dos cortes anatômicos foi efetuada utilizando-se uma mistura de azul de astra e safranina, segundo os métodos descritos por Kraus & Arduin (1997). Posteriormente, foram preparadas lâminas semipermanentes em água glicerinada (1:1), lutadas com esmalte sintético.

As seções transversais foram utilizadas para a realização de medições de espessura das epidermes adaxial e abaxial e dos parênquimas paliádico e esponjoso, com auxílio de ocular micrométrica OSM.

Para as avaliações de caracterização dos estômatos (densidade estomática e diâmetros polar e equatorial), foram efetuados cortes paradérmicos nas superfícies abaxial e adaxial das lâminas foliares. As seções paradérmicas foram montadas entre lâmina e lamínula, diretamente com a solução corante (safranina 1% em água glicerinada) e observadas em microscópio Olympus CBB, com auxílio de câmara clara, segundo a técnica de Laboriau et al. (1961).

No Laboratório de Citogenética do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, foram feitas as fotomicrografias, em microscópio Olympus BX60, com filme ASA 100 colorido.

As medições de espessura, densidade estomática e diâmetro polar e equatorial dos estômatos foram analisadas utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado, com 5 repetições por tratamento. Cada repetição foi composta por três medidas para espessura e quatro para densidade estomática e diâmetro polar e equatorial dos estômatos.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Aclimatização de plântulas de mangabeira germinadas *in vitro*

A proporção de plântulas sobreviventes nos dois tratamentos (pré-aclimatização e aclimatização direta) foi similar. A probabilidade resultante da diferença das duas proporções (0,355), fixando-se um intervalo de 95% de confiança, revelou a não significância entre elas.

A redução gradual do sombrite e a abertura parcial do saco plástico envoltório dos tubetes caracterizaram um processo viável de aclimatização de plântulas de mangabeira. As plântulas germinadas *in vitro* que passaram pelo processo de pré-aclimatização apresentaram 86% de sobrevivência e as aclimatizadas diretamente, 73%, após um período de 21 dias em sala de crescimento e 10 dias em viveiro (Tabela 12).

TABELA 12. Proporção de sobrevivência de plântulas de mangabeira submetidas ao processo de pré-aclimatização (T1) e aclimatização direta (T2). Lavras, UFLA, 2005.

Tratamentos	Nº de plantas sobreviventes	Total de repetições	Proporção de sobrevivência
1	13	15	0,866667
2	11	15	0,733333

A maior percentagem de sobrevivência das plântulas pré-aclimatizadas em relação às diretamente submetidas à fase de aclimatização pode ser justificada pela antecipação das modificações do ambiente de cultivo que, provavelmente conferiu a essas plântulas, melhores condições de tolerar o estresse causado pela transferência. Segundo Broome & Zimmerman (1984), a remoção das tampas dos tubos auxilia as trocas gasosas e pode favorecer a sobrevivência *ex vitro* quando as plantas são transferidas para ambiente com baixa umidade e substrato poroso.

Ziv (1986) relata que, quando os recipientes que continham plântulas de craveiro foram abertos e a umidade relativa mantida a 50%-70%, houve aumento no desenvolvimento de cera epicuticular e, após nove dias de abertura dos recipientes, a taxa de sobrevivência aumentou de 75% para 90%. Entretanto, Hoffmann (1999) constatou que a abertura antecipada dos frascos ou o selamento destes com algodão desfavoreciam a sobrevivência e o crescimento das mudas de macieira durante a aclimatização.

Verificou-se que o controle ambiental, no local de aclimatização, favoreceu o crescimento e o desenvolvimento das plântulas de mangabeira. Esses resultados corroboram com Deccetti (2000), que constatou ser possível a aclimatização de mudas de *Annona glabra* micropropagadas, fazendo-se o controle da umidade relativa aliada ao controle da irradiância. Resultados semelhantes foram encontrados também por Santos (2001), em experimentos com *Coffea arabica* e *Coffea canephora*.

Segundo Díaz-Pérez et al. (1995), durante o processo de aclimatização ocorre a conversão da condição heterotrófica para autotrófica e um gradual retorno às características naturais da planta. As novas folhas formadas durante este processo já apresentam características intermediárias entre aquelas apresentadas *in vitro* e *ex vitro*, com mudanças na morfologia, redução na

condutância estomatal, incremento no conteúdo de clorofila e maior eficiência na carboxilação.

O aspecto visual de plântulas de mangabeira aclimatizadas e de parte do processo de aclimatização pode ser observado na Figura 21.

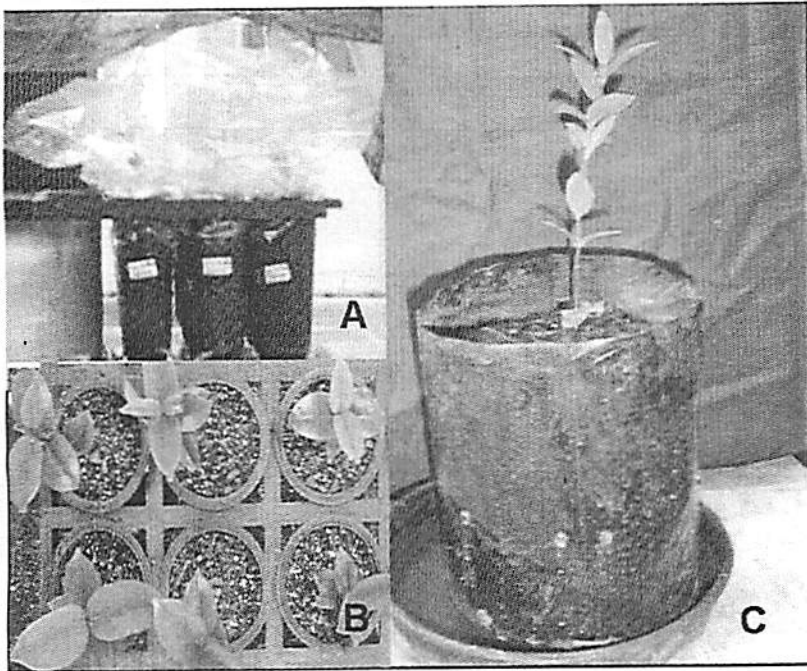


FIGURA 21. Aspecto visual de plântulas de mangabeira em processo de aclimatização (A); aclimatizadas em tubetes com substrato plantimax (B) e transferidas para sacos de polietileno, contendo mistura de terra e areia, na proporção de 1:1 (C). UFLA, Lavras, 2005.

6.2 Anatomia foliar *in vitro* e *ex vitro*

Nas seções transversais das lâminas foliares de mangabeira, observaram-se diferenças anatômicas entre os dois tipos de cultivo.

As espessuras das epidermes abaxial e adaxial das lâminas foliares provenientes dos dois ambientes não apresentaram diferenças significativas, com

espessuras médias respectivas de 18,5 e 17,01 μm para o cultivo *in vitro* e de 16,87 e 17,55 μm nas folhas de plântulas já aclimatizadas (Tabelas 13 e 14).

TABELA 13. Análise de variância para as medidas de espessura da epiderme adaxial de folhas de mangabeira cultivadas *in vitro* e aclimatizadas. UFLA, Lavras, 2005.

FV.	GL.	QM	Pr > F
TRATAMENTOS	1	0,108	0,3366
ERRO	28	3,164	
Total	29		

TABELA 14. Análise de variância para as medidas de espessura da epiderme abaxial de folhas de mangabeira cultivadas *in vitro* e aclimatizadas. UFLA, Lavras, 2005.

FV.	GL.	QM	Pr > F
TRATAMENTOS	1	0,972	0,0969
ERRO	28	0,329524	
Total	29		

Em todas as condições de cultivo, ambas as epidermes se mostraram compostas por apenas uma camada de células (epiderme uniestratificada) revestidas pela cutícula, a qual verificou-se ser mais espessa nas plântulas já aclimatizadas. O espessamento da cutícula é uma característica que confere às plantas cultivadas em ambiente natural uma proteção extra contra a ação da radiação solar, pelo reflexo dos raios solares, evitando um superaquecimento do citoplasma das células mesofílicas (Alquini et al., 2003).

O mesofilo, nas duas condições de cultivo, mostrou-se dorsiventral, apresentando parênquima paliçádico na face superior da lâmina (adaxial) e parênquima esponjoso na face inferior (abaxial) (Figura 22).



FIGURA 22. Seções transversais do limbo foliar de mangabeira em condições de cultivo *in vitro* (A) e aclimatização (B): EAd - Epiderme adaxial; PP - Parênquima paliçádico; PE - Parênquima esponjoso; EAb - Epiderme abaxial. UFLA, Lavras, 2005.

De acordo com Menezes et al. (2003), em espécies com mesofilo dorsiventral, a grande maioria dos cloroplastos é encontrada nas células do parênquima paliçádico. Devido à forma e ao arranjo dessas células, os cloroplastos podem se dispor paralelamente às paredes celulares, aumentando a eficiência fotossintética.

A medida das espessuras dos parênquimas paliçádico e esponjoso diferiu de forma significativa nos dois ambientes, com espessuras respectivas de 42,3 e 93,64 μm no cultivo *in vitro* e de 59,1 e 110,39 μm nas folhas de plântulas já aclimatizadas (Tabelas 15 e 16).

TABELA 15. Análise de variância para as medidas de espessura do parênquima paliçádico de folhas de mangabeira cultivadas *in vitro* e aclimatizadas. UFLA, Lavras, 2005.

FV.	GL.	QM	Pr > F
TRATAMENTOS	1	154,533**	0,000
ERRO	28	1,274048	
Total	29		

**Significativo, a nível de 1% de probabilidade, pelo teste F.

TABELA 16. Análise de variância para as medidas de espessura do parênquima esponjoso de folhas de mangabeira cultivadas *in vitro* e aclimatizadas. UFLA, Lavras, 2005.

FV.	GL.	QM	Pr > F
TRATAMENTOS	1	104,1603**	0,001
ERRO	28	7,907952	
Total	29		

**Significativo, a nível de 1% de probabilidade, pelo teste F.

Como é possível verificar, ambos os parênquimas apresentaram-se mais espessos nas lâminas foliares coletadas de plântulas já aclimatizadas.

Tanto nas plântulas oriundas do cultivo *in vitro* quanto nas já submetidas ao processo de aclimatização, o mesofilo apresentou parênquima paliçádico constituído de duas camadas de células, porém, essas apresentaram-se mais alongadas no ambiente *ex vitro*. Segundo Lee et al. (2000), células paliçádicas mais alongadas constituem um padrão clássico de resposta e de adaptação das plantas à alta intensidade luminosa, o que evidencia a plasticidade adaptativa da mangabeira.

A medida das espessuras das lâminas foliares de plântulas de mangabeira diferiu de forma significativa nos dois ambientes (Tabela 17).

TABELA 17. Análise de variância para as medidas de espessura de folhas de mangabeira cultivadas *in vitro* e aclimatizadas. UFLA, Lavras, 2005.

FV.	GL.	QM	Pr > F
TRATAMENTOS	1	393,1320**	0,000
ERRO	28	8,1130	
Total	29		

**Significativo, a nível de 1% de probabilidade, pelo teste F.

Folhas de plântulas já aclimatizadas apresentaram espessura total de 203,9 μm , superior à espessura de folhas oriundas do ambiente *in vitro* que foi de 171,32 μm .

Resultados semelhantes foram encontrados por Fidelis (2000), trabalhando com *Brosimum gaudichaudii*, que relata maiores espessuras para folhas desenvolvidas *in vivo* do que para folhas *in vitro*.

A presença de estômatos, nas duas condições ambientais, somente foi verificada na epiderme abaxial das lâminas foliares, o que caracteriza a mangabeira como uma espécie hipostomática.

Houve diferença estatística para a densidade estomática nos dois ambientes de cultivo estudados (Tabela 18).

TABELA 18. Análise de variância para a densidade estomática de folhas de mangabeira cultivadas *in vitro* e aclimatizadas. UFLA, Lavras, 2005.

FV.	GL.	QM	Pr > F
TRATAMENTOS	1	608,4000**	0,0002
ERRO	38	37,1052	
Total	39		

**Significativo, a nível de 1% de probabilidade, pelo teste F.

Maior densidade estomática foi observada nas plântulas sob condição *in vitro* (342 estômatos por mm^2) se comparadas às já aclimatizadas (226 estômatos por mm^2). O aumento no número de estômatos/ mm^2 nas folhas das plantas cultivadas *in vitro*, quando comparado às plantas da mesma espécie que crescem em outros ambientes, tem sido reportado em diversos estudos e associado, principalmente, à elevada umidade relativa do ar no interior do recipiente (Brainerd & Fuchigami, 1981).

Também Wetztenin & Sommer (1983) verificaram densidades estomáticas significativamente maiores em cultivo *in vitro* do que em plantas de campo ou nas folhas de plantas em fase final de aclimatização. Contrariamente, Brainerd et al. (1981), em trabalho com ameixeira cv. Pixy sob três diferentes ambientes de cultivo (explantos *in vitro*, plantas em aclimatização em casa de vegetação e plantas no campo), verificaram que as densidades estomáticas foram menores nos explantes *in vitro* do que nas plantas em aclimatização na casa de vegetação.

A análise de variância (Tabelas 19 e 20) demonstrou que houve diferença estatística para diâmetro polar e equatorial dos estômatos nos dois ambientes. Ambos apresentaram-se maiores nas folhas das plântulas de ambiente *in vitro*.

TABELA 19. Análise de variância para diâmetro polar de estômatos em folhas de mangabeira cultivadas *in vitro* e aclimatizadas. UFLA, Lavras, 2005.

FV.	GL.	QM	Pr > F
TRATAMENTOS	1	4,096*	0,0256
ERRO	38	0,758816	
Total	39		

*Significativo, a nível de 5% de probabilidade, pelo teste F.

TABELA 20. Análise de variância para diâmetro equatorial de estômatos em folhas de mangabeira cultivadas *in vitro* e aclimatizadas. UFLA, Lavras, 2005.

FV.	GL.	QM	Pr > F
TRATAMENTOS	1	7,921*	0,0256
ERRO	38	0,467	
Total	39		

*Significativo, a nível de 5% de probabilidade, pelo teste F.

Os estômatos das folhas de plântulas de mangabeira *in vitro* apresentaram-se com diâmetro polar de 27,5 μm e equatorial de 23,81 μm . Nas folhas de plântulas já aclimatizadas o diâmetro polar médio dos estômatos foi de 24,62 μm e o equatorial de 19,76 μm .

Foi verificado também que os estômatos das folhas de plântulas mantidas *in vitro* apresentaram formato circular e os encontrados nas plântulas já aclimatizadas, formato elíptico. Diversos estudos mencionam que a estrutura dos estômatos de plantas micropropagadas apresenta grandes diferenças em relação à observada nas plantas que se desenvolveram em ambiente natural (Fráguas, 2003). Wardle et al. (1983), por exemplo, verificaram que as plântulas de *Liquidambar styraciflua* em fase de aclimatização apresentaram estômatos em formato elipsóide e em menor densidade do que as plântulas *in vitro*.

Além dos estômatos, diferenças no formato das células epidérmicas também foram verificadas. As células da epiderme das plântulas mantidas *in vitro* apresentaram-se mais sinuosas e dotadas de paredes menos espessas, o que pode estar relacionado com o fato dessas plântulas não apresentarem, ainda, características adaptativas contra a perda excessiva de água.

Na Figura 23 podem ser observadas as variações na morfologia dos estômatos e as características das células epidérmicas das folhas sob os diferentes ambientes de cultivo.

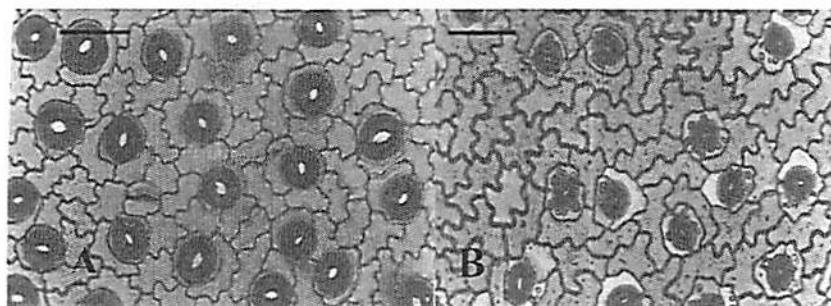


FIGURA 23. Epiderme abaxial de folhas de mangabeira *in vitro* (A) e aclimatizadas (B). UFLA, Lavras, 2005.

De acordo com Capellades (1990), o período de aclimatização *ex vitro* permite a redução na frequência de estômatos, altera o formato e a topografia destes e, de maneira geral, favorece os diversos parâmetros foliares.

7 CONCLUSÕES

A redução gradual do sombrite e a abertura parcial do saco plástico envoltório dos tubetes caracterizam um processo viável de aclimatização de plântulas de mangabeira.

O período de pré-aclimatização em sala de crescimento aumenta a proporção de sobrevivência de plântulas de mangabeira à aclimatização.

As estruturas foliares de plântulas de mangabeira oriundas do ambiente *in vitro* apresentam os parênquimas paliádico e esponjoso menos espessos, em comparação aos das plântulas já aclimatizadas.

A densidade estomática e os diâmetros polar e equatorial dos estômatos são maiores nas folhas das plântulas de mangabeira mantidas *in vitro*.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALQUINI, Y.; BONA, C.; BOEGER, M. R. T.; COSTA, C. G. da; BARROS, C. F. Epiderme. In: APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREI, S. M. (Ed.). *Anatomia vegetal*. Viçosa: UFV, 2003. p. 87-108.
- BAG, N.; CHANDRA, S.; PALM, L. M. S.; NANDI, S. K. Micropropagation of Dev-ringal [*Thamnocalamus spathiflorus* (Trin.) Munro] – a temperate bamboo, and comparison between *in vitro* propagated plants and seedlings. *Plant Science*, Clare, v. 156, n. 2, p. 125-135, July 2000.
- BRAINERD, K. E.; FUCHIGAMI, L. H. Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, v. 106, n. 4, p. 515-518, July 1981.
- BRAINERD, K. E.; FUCHIGAMI, L. J.; KWIATKOWSKI, S.; CLARK, C. S., Leaf anatomy and water stress of aseptically cultured 'Pixy' plum grown under different environments. *HortScience*, Alexandria, v. 16, n. 2, p. 173-175, 1981.
- BROOME, O. C.; ZIMMERMAN, R. H. Culture of shoots meristems: fruit plants *in vitro*: VASIL, I. K. (Ed.). *Cell culture and somatic cell genetics of plants* – Laboratory procedures and their applications, v. 1. Orlando: Academic Press, 1984. p. 111-122.
- CAPELLADES, R.; FONTARNAU, R.; CARULLA, C.; DEBERGH, P. Environment influences anatomy of stomata and epidermal cells in tissue cultured *Rosa multiflora*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, v. 115, n. 1, p. 141-145, Jan. 1990.
- CARVALHO, L. C.; AMÂNCIO, S. Antioxidant defence system in plantlets transferred from *in vitro* to *ex vitro*: effects of increasing light intensity and CO₂ concentration. *Plant Science*, Clare, v. 162, n. 1, p. 33-40, Jan. 2002.
- DAMI, I.; HUGHES, H. G. Effects of PEG-induced water stress on *in vitro* of 'Valiant' grape. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v. 47, n. 2, p. 97-101, 1996.
- DECCETTI, S. F. C. *Propagação in vitro de Annona glabra L.* 2000. 101 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

DENG, R.; DONNELLY, D. J. *In vitro* hardening of red raspberry by CO₂ enrichment and reduced medium sucrose concentration. **HortScience**, Alexandria, v. 28, n. 10, p. 1048-1051, Oct. 1993.

DÍAZ-PÉREZ, J.; SHACKEL, K. A.; SUTTER, E. G. Acclimatization and subsequent gas exchange, water relations, survival and growth of microculture apple plantlets after transplanting them in soil. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 95, n. 2, p. 225-232, Oct. 1995.

FABRI, A.; BARTOLINI, G. Osservazioni anatomiche su radichi di barbetelle di Paradox moltiplicate agamicamente. **Frutticoltura**, Firenze, v. 47, n. 1, p. 43-46, gen. 1985.

FIDELIS, I.; CASTRO, E. M.; PINTO, J. E. B. P.; GAVILANES, M. L.; SANTIAGO, E. J. A. Características anatômicas de estruturas vegetativas de *Brosimum gaudichaudii* desenvolvidas *in vitro* e *in vivo*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 2, p. 327-336, abr./jun. 2000.

FRÁGUAS, C. B. **Micropropagação e aspectos da anatomia foliar da figueira Roxo de Valinhos em diferentes ambientes**. 2003. 110 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

FUCHIGAMI, L. H.; CHENG, T. Y.; SOELDNER, A. Abaxial transpiration and water loss in aseptically cultured plum. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 106, n. 4, p. 519-522, July 1981.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture – Part 1: The technology**. 2. ed. Edington: Exegetics, 1993. 786 p.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture - Part 1: The technology**. Edington: Exegetics, 1996. 1574 p.

HOFFMANN, A. **Enraizamento e aclimatização de mudas micropropagadas dos portos-enxertos de macieira ‘Murubakaido’ e ‘M-26’**. 1999. 240 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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

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, 1961.

LAKSO, A. N. et al. Carbon dioxide enrichment for stimulation of growth of *in vitro*-propagated grapevines after transfer from culture. **The Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 111, n. 4, p. 634-638, July 1986.

LEE, D. W.; OBERBAUER, S. F.; JOHNSON, P.; KRISHNAPILAY, B.; MANSOR, M. MOHAMAD, H.; YAP, S. K. Effects of irradiance and spectral quality on leaf structure and functions in seedlings of two Southeast Asian *Hopea* (Dipterocarpaceae) species. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 87, n. 4, p. 447-455, Apr. 2000.

LEE, N.; WETZTEIN, H. Y.; SOMMER, H. E. Effects of quantum flux density on photosynthesis and chloroplast ultrastructure in tissue-cultured plantlets and seedlings of *Liquidambar styraciflua* L. towards improved acclimatization and field survival. **Plant Physiology**, Maryland, v. 78, n. 3, p. 637-941, July 1985.

LESHEM, B. Growth of carnation meristems *in vitro*: anatomical structure of abnormal plantlets and the effect of agar concentration in the medium on their formation, **Annals of Botany**, London, v. 52, p. 413-415, 1983.

MENEZES, N. L.; SILVA, D. C.; PINNA, G. F. M. Folha. In: APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. (Ed.). **Anatomia Vegetal**. Viçosa, MG: UFV, 2003. 438 p.

PREECE, J. E.; SUTTER, E. G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (Ed.). **Micropropagation**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. p. 71-93.

SANTOS, C. G. **Micropropagação e caracterização bioquímica anatômica em *Coffea arabica* e *Coffea canephora***. 2001. 110 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

WARDLE, K.; DOBBS, E. B.; SHORT, K. L. *In vitro* acclimatization of aseptically cultured plantlets to humidity. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v. 108, n. 3, p. 386-389, May 1983.

WETZSTEIN, H. Y.; SOMMER, H. E. Scanning electron microscopy of *in vitro* cultured *Liquidambar styraciflua* plantlets during acclimatization. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v. 108, n. 3, p. 475-480, May 1983.

ZIV, M. *In vitro* hardening and acclimatization of tissue culture plants. In: WITHERS, L. A.; ALDERSON, P. G. (Ed.). **Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications**, Butterworths: London, 1986. p. 187-196.

ZIV, M.; MEIR, G.; HALEVY, A. Hardening carnation plants regenerated from shoot tips cultured *in vitro*. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 21, n. 3/4, p. 423, 1981.